



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GABRIEL PACHECO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DE
PERFIL M1 E M2 POR *Leishmania infantum* IN VITRO**

FORTALEZA

2026

GABRIEL PACHECO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DE PERFIL
M1 E M2 POR *Leishmania infantum* IN VITRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas do Departamento
de Biologia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

FORTALEZA

2026

GABRIEL PACHECO DA SILVA

AVALIAÇÃO DA IMUNOMODULAÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS DE PERFIL
M1 E M2 POR *Leishmania infantum* IN VITRO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Biológicas do Departamento
de Biologia da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira

Aprovada em: 03/07/2026

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Ticiane Monteiro Abreu
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Marla Jayssa Correa Da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ao meu avô, José Aumir (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por me conceder saúde, força e perseverança para chegar até aqui, e por colocar em meu caminho pessoas tão especiais ao longo desta jornada.

Ao Clube de Regatas do Flamengo — porque seria ingratidão não mencionar. Obrigado, por ser, nos momentos de tensão e cansaço, uma fonte inesgotável de alegria e orgulho. Nas vitórias e nas derrotas, o Flamengo sempre esteve lá para lembrar que vale a pena lutar até o fim. Uma vez Flamengo, Flamengo até morrer!

À minha família, em especial à minha mãe, Maria Regiane Pacheco, e à minha avó, Lúcia Farias Pacheco, por todo o amor, apoio, dedicação e sacrifícios realizados ao longo da minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível. Esta conquista também é de vocês, que sempre acreditaram em mim e estiveram ao meu lado em todos os momentos. À minha tia Telma e ao meu primo Daniel, pelo incentivo, apoio e encorajamento durante o início da graduação, contribuindo para que eu seguisse firme nessa caminhada.

Agradeço a todos que fazem parte do Laboratório de Parasitologia — professores, técnicos, doutores, mestres e estagiários. Mais do que colegas de trabalho, vocês se tornaram amigos e contribuíram para que essa trajetória fosse repleta de momentos únicos, aprendizados e boas lembranças.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Maria Jania Teixeira, pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos essenciais para a realização deste trabalho. Obrigado por me acolher no Laboratório de Parasitologia, acreditar no meu potencial e me guiar ao longo dessa trajetória. Sua dedicação à ciência e aos seus alunos é uma inspiração para todos nós.

À Fabiola Fernandes, por ter me proporcionado os primeiros ensinamentos práticos no laboratório e por compartilhar seus conhecimentos com tanta dedicação.

À Naya Lúcia, por me permitir vivenciar minhas primeiras experiências na rotina experimental, contribuindo de forma fundamental para minha formação.

À Marla Jayssa, por me apresentar um lado mais leve, divertido e descontraído da pesquisa, pelas inúmeras conversas, pela cultura paraense compartilhada e, claro, por me apresentar à famosa lavagem de algas.

À Amanda, por todos os ensinamentos transmitidos ao longo do seu trabalho e por, em meu segundo ano, ter me concedido o honroso título de “Príncipe do Laboratório”, uma lembrança que guardarei com muito carinho.

À Sabrina, por toda a ajuda, disponibilidade, paciência e orientação durante a elaboração deste trabalho, sendo uma presença indispensável em diferentes etapas dessa jornada.

Ao Antônio, pelos momentos de descontração, pelas risadas constantes, por sua irreverência e pelas conversas mais aleatórias — e memoráveis — possíveis.

Ao Keven, pelas conversas, pelos conselhos valiosos e pela amizade construída ao longo desses anos. Você se tornou um grande amigo e tem toda a minha admiração, respeito e gratidão.

À Andressa e à Juliane, pelos momentos de conversa, pelas brincadeiras, pelas risadas e pela convivência tão agradável. Vocês são mulheres admiráveis e inspiradoras.

Por fim, a todos vocês, meus amigos, que acreditaram em mim, me acolheram e me permitiram ser verdadeiramente eu. Levo comigo os ensinamentos, as experiências e as memórias que construímos juntos. O meu mais sincero e profundo agradecimento.

Aos meus amigos Pedro Rodrigues, João Pedro, Victor Hugo, Juan Pablo, Mário Clévio, Ronald Araújo e Felipe, pela amizade, companheirismo e por estarem presentes nos momentos mais importantes dessa trajetória. Agradeço pelas conversas, pelo apoio, pelas risadas e por tornarem essa caminhada mais leve e especial. Sou grato por poder contar com a amizade de cada um de vocês.

À Maria Luiza, pela companhia, pelas brincadeiras, pelos conselhos e, principalmente, pela amizade. A meu ver, nossa relação se aproxima muito da de dois irmãos que a UFC uniu, sendo você a irmã mais velha. Obrigado por fazer parte dessa jornada, por tornar mais leves os momentos difíceis e por compartilhar tantas conversas, risadas e experiências ao longo desses anos. Sua presença foi muito importante nessa caminhada. Obrigado por ser exatamente quem você é, uma mulher incrível, admirável e uma amiga que qualquer pessoa teria a sorte de ter ao seu lado.

Ao Tiago Domingos, por uma amizade que talvez fosse improvável, mas que se tornou uma das mais importantes da minha trajetória. Obrigado pela parceria, confiança, apoio e por compartilhar comigo os desafios da graduação e da vida. Sua amizade foi indispensável nessa caminhada, e sou muito grato por todos os momentos que vivemos. Muito obrigado por tudo.

À Amanda Sousa, uma das primeiras amigas que construí durante a graduação. Muito obrigado por compartilhar tantos momentos comigo, pelas conversas, risadas e histórias que marcaram essa caminhada. Sua amizade tornou essa trajetória mais leve e especial. Sem dúvida, você foi um dos melhores presentes que a UFC me proporcionou.

À Rafaela, que surgiu, antes de tudo, como uma grande amiga na reta final da graduação. Sua dedicação, esforço e determinação são inspiradores para todos que têm o privilégio de conviver com você. Obrigado por toda a ajuda nessa fase tão importante, pelas dicas, pelos conselhos e por me tranquilizar nos momentos de maior tensão. Sua amizade, apoio e confiança fizeram toda a diferença. Você é uma pessoa admirável e uma grande inspiração para mim.

À Universidade Federal do Ceará e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), pelo apoio e incentivo à pesquisa durante minha graduação. As oportunidades proporcionadas por esse programa foram fundamentais para minha formação acadêmica, contribuindo significativamente para meu crescimento estudantil e profissional.

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio-termo. Ou você faz uma coisa bem-feita ou não faz.” (Ayrton Senna).

RESUMO

A leishmaniose visceral é uma doença infectoparasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida pela picada de flebotomíneos infectados e considerada um grave problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde. No Brasil, a forma visceral da doença é causada por *Leishmania infantum*, com o cão doméstico como principal hospedeiro vertebrado, enquanto o ser humano atua como hospedeiro acidental. Os macrófagos constituem as principais células hospedeiras do parasito e desempenham papel dual na infecção, atuando simultaneamente como células efectoras e como nicho de replicação intracelular, a depender do seu perfil de polarização. Diante disso, este trabalho teve como objetivo investigar o impacto da polarização dos macrófagos nos fenótipos M0, M1 (pró-inflamatórios) e M2 (anti-inflamatórios) sobre a infecção por *L. infantum* in vitro, com foco nos mecanismos de imunomodulação que influenciam o controle e a persistência do parasito. Utilizando macrófagos murinos J774, que foram polarizados e, em seguida, infectados com promastigotas de *L. infantum* (Li), o estudo avaliou os macrófagos após 24 e 48 horas, medindo taxa de infecção, carga parasitária, produção de óxido nítrico (NO) e níveis das citocinas TNF- α , IL-4 e IL-10. Os resultados demonstraram que M1+Li apresentou a menor taxa de infecção (24h = $20,17 \pm 0,47$ e 48h = $18,75 \pm 0,75$ macrófagos infectados/100 macrófagos) e a menor carga parasitária (24h = $106,7 \pm 1,38$ e 48h = $116,5 \pm 0,80$ amastigotas/100 macrófagos), associados à maior produção de NO ($21,95 \pm 0,40$ $\mu\text{mol/mL}$ com 48 h) e TNF- α ($73,41 \pm 4,15$ pg/mL com 48 h), indicando a eficácia do perfil pró-inflamatório no controle do parasito. Em contrapartida, M2+Li foram mais suscetíveis à infecção, mostrando taxas mais alta de infecção (24h = $33,71 \pm 0,56$ e 48h = $37,86 \pm 0,95$ macrófagos infectados/100 macrófagos) e carga parasitária (24h = $133,5 \pm 1,30$ e 48h = $141,2 \pm 1,04$ amastigotas/100 macrófagos), juntamente com níveis elevados de IL-10 (24h = $17,74 \pm 0,90$ e 48h = $22,25 \pm 1,31$ pg/mL) e IL-4 (24h = $13,15 \pm 0,97$ e 48h = $15,83 \pm 1,08$ pg/mL). Esses dados sugerem, portanto, que *L. infantum* pode modular a resposta imunológica dos macrófagos, favorecendo sua persistência em microambientes dominados por macrófagos M2. O estudo destaca a crucial importância do eixo M1/M2 na imunopatogênese da leishmaniose visceral, sugerindo que a modulação dos macrófagos pode ser uma estratégia promissora para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; macrófagos; inflamação.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is an infectious parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of infected phlebotomine sand flies, and considered a severe public health problem by the World Health Organization. In Brazil, the visceral form of the disease is caused by *Leishmania infantum*, with the domestic dog acting as the main vertebrate host, while humans act as accidental hosts. Macrophages are the main host cells for the parasite and play a dual role in the infection, acting simultaneously as effector cells and as an intracellular replication niche, depending on their polarization profile. Therefore, this study aimed to investigate the impact of macrophage polarization into M0, M1 (pro-inflammatory), and M2 (anti-inflammatory) phenotypes on *L. infantum* infection *in vitro*, focusing on the immunomodulation mechanisms that influence the control and persistence of the parasite. Using murine J774 macrophages, which were polarized and subsequently infected with *L. infantum* (Li) promastigotes, the study evaluated the macrophages after 24 and 48 hours by measuring the infection rate, parasite load, nitric oxide (NO) production, and levels of the cytokines TNF- α , IL-4, and IL-10. The results demonstrated that M1+Li showed the lowest infection rate (24h = 20.17 ± 0.47 and 48h = 18.75 ± 0.75 infected macrophages/100 macrophages) and the lowest parasite load (24h = 106.7 ± 1.38 and 48h = 116.5 ± 0.80 amastigotes/100 macrophages). This was associated with the highest production of NO (21.95 ± 0.40 $\mu\text{mol/mL}$ at 48h) and TNF- α (73.41 ± 4.15 pg/mL at 48h), indicating the efficacy of the pro-inflammatory profile in controlling the parasite. In contrast, M2+Li were more susceptible to infection, showing higher infection rates (24h = 33.71 ± 0.56 and 48h = 37.86 ± 0.95 infected macrophages/100 macrophages) and parasite loads (24h = 133.5 ± 1.30 and 48h = 141.2 ± 1.04 amastigotes/100 macrophages), alongside elevated levels of IL-10 (24h = 17.74 ± 0.90 and 48h = 22.25 ± 1.31 pg/mL) and IL-4 (24h = 13.15 ± 0.97 and 48h = 15.83 ± 1.08 pg/mL). These data therefore suggest that *L. infantum* can modulate the immune response of macrophages, favoring its persistence in microenvironments dominated by M2 macrophages. The study highlights the crucial importance of the M1/M2 axis in the immunopathogenesis of visceral leishmaniasis, suggesting that macrophage modulation may be a promising strategy for the development of new therapeutic approaches.

Keywords: visceral leishmaniasis; macrophages; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> de acordo com a região do mundo	19
Figura 2	– Endemicidade da leishmaniose visceral em 2024.....	22
Figura 3	– Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp.	25
Figura 4	– Resposta imune hospedeira na leishmaniose	28
Figura 5	– Ativação clássica e alternativa dos macrófagos.....	33
Figura 6	– Taxa de infecção dos macrófagos	47
Figura 7	– Carga parasitária dos macrófagos	48
Figura 8	– Níveis de óxido nítrico produzidos pelos macrófagos.....	49
Figura 9	– Níveis de TNF- α produzidos pelos macrófagos.....	50
Figura 10	– Níveis de IL-4 produzidos pelos macrófagos	51
Figura 11	– Níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Proteína Ativadora 1
Arg-1	arginase I
B7-1	Proteína de superfície CD80
B7-2	Proteína de superfície CD86
B reg	Célula B regulatória
CEBP- β	Proteína de ligação ao potenciador/CCAAT beta
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Dano
DCs	Células Dendríticas
DTN	Doença Tropical Negligenciada
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPM	Erro Padrão da Média
FTs	Fatores de Transcrição
GBD	Carga Global de Doenças
GIPLs	Glicoinositolfosfolipídios
GP63	Glicoproteína 63
GPI	Glicofosfatidilinositol
H ₃ PO ₄	Ácido Fosfórico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IS	Índice de Seletividade
KMP-11	Proteína de Membrana de Cinetoplastídeos de 11 kDa
LC	Leishmaniose Cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana

LV	Leishmaniose Visceral
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
MØ	Macrófago
M1	Macrófago com perfil pró-inflamatório
M2	Macrófago com perfil anti-inflamatório
MAC	Complexo de Ataque à Membrana
MF	Miltefosina
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1β	Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 beta
mL	Mililitro
NED	(N-(1-naftil)-etilenodiamina dihidrocloro)
NETs	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
NF-κB	Fator Nuclear Kappa B
NK	Natural killer
nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados ao Patógeno
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKC	Proteína quinase C
PM	Paromomicina
PRI	Pulverização Residual Intradomiciliar
PRRs	Receptores de Reconhecimento de Padrões
PTPs	Proteínas Tirosina Fosfatases
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
SBF	Soro Bovino Fetal
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador β
Th	T helper (T auxiliar)
TLRs	Receptores Toll-Like

TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
VP	Vacúolo Parasitóforo
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$\pm$	Mais ou menos
$\%$	Porcentagem
$<$	Menor que
n $^{\circ}$	Número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Leishmanioses	18
1.2	Leishmaniose visceral e <i>Leishmania infantum</i>.....	20
1.3	Aspectos epidemiológicos	21
1.4	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	23
1.5	Resposta imunológica contra <i>Leishmania infantum</i>.....	25
1.5.1	Resposta imune no baço e no fígado	29
1.5.2	Macrófagos como células-chave: hospedeiras e efetoras	32
1.5.3	Polarização de macrófagos	32
1.5.4	Mecanismos de evasão do parasito	34
1.6	Diagnóstico, tratamento e controle	37
1.6.1	Diagnóstico	38
1.6.2	Tratamento	39
1.6.3	Controle	40
2	JUSTIFICATIVA	42
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivos gerais	43
3.2	Objetivos específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Polarização de macrófagos J774	44
4.2	Infecção dos macrófagos	44
4.3	Determinação da taxa de infecção e da carga parasitária	45
4.4	Dosagem de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias	45
4.5	Determinação da produção de NO	46
4.6	Análise estatística	46
5	RESULTADOS	47
5.1	Taxa de infecção dos macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i>	47
5.2	Carga parasitária dos macrófagos infectados com <i>Leishmania infantum</i>	48
5.3	Produção de óxido nítrico nos macrófagos infectados com <i>L. infantum</i>.....	48
5.4	Produção de TNF- α nos macrófagos infectados com <i>L. infantum</i>	49
5.5	Produção de IL-4 nos macrófagos	50
5.6	Produção de IL-10	51

6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto complexo de doenças infectoparasitárias cujos agentes etiológicos são protozoários digenéticos do gênero *Leishmania* (família Trypanosomatidae), transmitidos pela picada de vetores infectados (Akhoundi *et al.*, 2016; Burza *et al.*, 2018). Diferentes espécies de *Leishmania* estão associadas às manifestações clínicas distintas, com gravidade variável, desde lesões cutâneas autolimitadas até doença visceral sistêmica grave. Diante disso, são classificadas em duas formas principais: leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, o que contribui para a heterogeneidade epidemiológica da doença. A apresentação clínica e os seus sintomas dependem da espécie que causa a infecção, cada qual com uma distribuição geográfica diferente, e o desfecho da doença é determinado por uma multiplicidade de fatores, incluindo as características do parasito, do vetor e do hospedeiro (Burza *et al.*, 2018; Ansari *et al.*; Kato, 2025).

As primeiras descrições do parasito *Leishmania* ocorreram no final do século XIX, após sua identificação em um caso de LC na Ásia Central. No início do século XX, o parasito foi descrito em casos de calazar na Índia, sendo denominado *L. donovani*, e quando associado à forma cutânea, de *L. tropica*. No Brasil, a presença do parasito em lesões humanas foi confirmada alguns anos depois, com a identificação da espécie *L. braziliensis*. Posteriormente, ficou comprovado que flebotomíneos atuavam como vetores na transmissão da doença (Rey, 2008; Conceição-Silva; Alves, 2014). A riqueza genética da *Leishmania* influencia diretamente a infecção, a dinâmica epidemiológica, a evolução e a resistência deste parasito. A exata identificação taxonômica das espécies é de grande relevância, não só para o correto diagnóstico e prognóstico da doença, como também para a tomada de decisões a respeito do tratamento e das medidas de controle (Conceição-Silva; Alves, 2014).

É possível classificar as leishmanias conforme a região do mundo em que elas ocorrem, de acordo com Lainson e Shaw (1987) e Revisado pela OMS (2010) (figura 1). Assim, em países do Velho Mundo (Ásia, África e Europa), apenas o subgênero *Leishmania* é encontrado, mais frequentemente associado às espécies *L. donovani* e *L. infantum* e às espécies associadas com a LC, entre elas, *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*. Enquanto isso, no Novo Mundo (a exemplo das Américas), têm ocorrência dos dois subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, estando relacionados às espécies *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) infantum*, *L. (V.)*

braziliensis e *L. (V.) guyanensis*, entre outras espécies (Lupi *et al.*, 2009; Conceição-Silva; Alves, 2014; Maurício, 2018).

Figura 1 - Classificação das espécies de *Leishmania* de acordo com a região do mundo.

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensi</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo Principal	Viscerotrópica	Dermotrópica	Dermotrópica	Mucotrópica

^a O status da espécie está em discussão

^b A posição taxonômica está em discussão

Fonte: Organização Mundial da Saúde, 2010.

No Brasil, a forma visceral da doença é causada pela espécie *L. (L.) infantum* (*syn. L. chagasi*), enquanto as formas tegumentares são causadas, principalmente, por três principais espécies, a saber: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. Outras espécies, como *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) lindenbergi* são mais presentes nos estados do norte do país, principalmente, na região amazônica (Brasil, 2006; 2017; OPAS, 2022).

As fêmeas de flebotomíneos infectadas, dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), são os principais vetores das leishmanioses (Cannet *et al.*, 2023). Os flebotomíneos são insetos pequenos, com o corpo coberto por pelos e exoesqueleto delgado, popularmente conhecidos, dependendo da localização geográfica, como “mosquito-palha”, nomenclatura dada ao fato de, ao pousarem, permanecerem com as asas eretas e elevadas acima do corpo. Além disso, apenas as fêmeas são hematófagas, ou seja, alimentam-se de sangue, o que explica seu papel central na transmissão da leishmaniose (Killick-Kendrick, 1999; Ribeiro *et al.*, 2019; Pareyn *et al.*, 2020). Os flebotomíneos são frequentemente encontrados em áreas com acúmulo de matéria orgânica, como folhas em decomposição, o que proporciona as condições ideais para o desenvolvimento das larvas. As rachaduras e frestas em casas de barro,

consideradas moradias em contexto de vulnerabilidade socioeconômica, também podem servir de abrigo para esses insetos, especialmente em áreas rurais ou periurbanas (Rahim *et al.*, 2024).

1.2 Leishmaniose visceral e *Leishmania infantum*

Com incidência mundial de 0,2 a 0,4 milhões de casos e cerca de 20.000 a 40.000 óbitos anualmente, a leishmaniose visceral (LV) é a manifestação clínica mais grave e letal da leishmaniose, se não tratada, inclusive, com potencial para surtos (Oliveira *et al.*, 2021; WHO, 2023). A LV está presente em 78 países, concentrada, especialmente, na bacia do Mediterrâneo, Ásia Ocidental, Central e América do Sul, com o Brasil sendo o país mais afetado na região, onde a doença é causada pela espécie *L. infantum* (Serafim *et al.*, 2020; Alvar *et al.*, 2021). Mais de 90% dos casos globais de LV ocorreram em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (Alvar *et al.*, 2012). Conhecida popularmente como "Calazar", é uma doença de notificação compulsória no Brasil, o qual está incluído no grupo de 33 dos 88 países endêmicos que possuem essa obrigatoriedade (Desjeux, 2004; Brasil, 2006).

A LV sofreu um forte processo de urbanização no território brasileiro a partir do final dos anos 80 e, atualmente, a doença encontra-se em rápida expansão, chegando a áreas urbanas de médio e grande porte nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, impulsionada por transformações ambientais, fluxos migratórios, pressões socioeconômicas e secas periódicas, que resultam na redução do espaço ecológico da doença e facilitam a ocorrência de epidemias (Conceição-Silva & Alves, 2014).

No Ceará, de acordo com dados do boletim epidemiológico nº. 01 de 2025, entre os anos de 2007 e 2024, foram registrados 7.386 casos confirmados de leishmaniose visceral em humanos e 438 óbitos, com média anual de 410 casos e taxa de letalidade geral de 5,9%. Até a semana epidemiológica 40 de 2024, 134 pacientes, distribuídos em 36 municípios, foram diagnosticados com LV. A capital Fortaleza encontra-se como detentora do maior volume absoluto de casos confirmados, apresentando uma média de 62 casos anuais entre os anos de 2015 a 2024, classificada, portanto, como área de transmissão muito intensa (Ceará, 2025).

O principal vetor da leishmaniose visceral no Brasil é a fêmea de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*, a qual tem alta capacidade de adaptação a ambientes urbanos (peridomicílio e intradomicílio), sendo comumente encontrada em abrigos de animais como galinheiros e canis (Brasil, 2006). No meio urbano, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção, podendo ser, inclusive, assintomático. A enzootia canina geralmente precede a ocorrência de casos humanos. Já no ambiente silvestre, os principais reservatórios

são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Brasil, 2006).

A gravidade da LV é resultado da infecção sistêmica de células fagocíticas. Após a invasão, os macrófagos infectados disseminam-se pelo sistema fagocítico mononuclear, onde se multiplicam, provocando uma resposta inflamatória sistêmica (Oliveira et al., 2021). O parasito apresenta tropismo por órgãos linfo-hematopoiéticos, afetando, principalmente, a medula óssea, o baço, o fígado e os gânglios linfáticos (Conceição-Silva & Alves, 2014; Abadías-Granado et al., 2021; Pareyn et al., 2025).

No contexto das manifestações clínicas, a infecção por *L. infantum* apresenta um amplo espectro sintomatológico, embora se estime que cerca de 90% dos casos sejam assintomáticos (Oliveira et al., 2021; Pareyn et al., 2025). Por outro lado, nos casos sintomáticos, as manifestações variam de quadros oligossintomáticos a formas graves (crônicas) que, quando não tratadas, levam o indivíduo infectado ao óbito (Brasil, 2006; Pareyn et al., 2025). As características clássicas incluem febre prolongada, perda de peso, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (Costa-Da-Silva et al., 2022; OPAS, 2024).

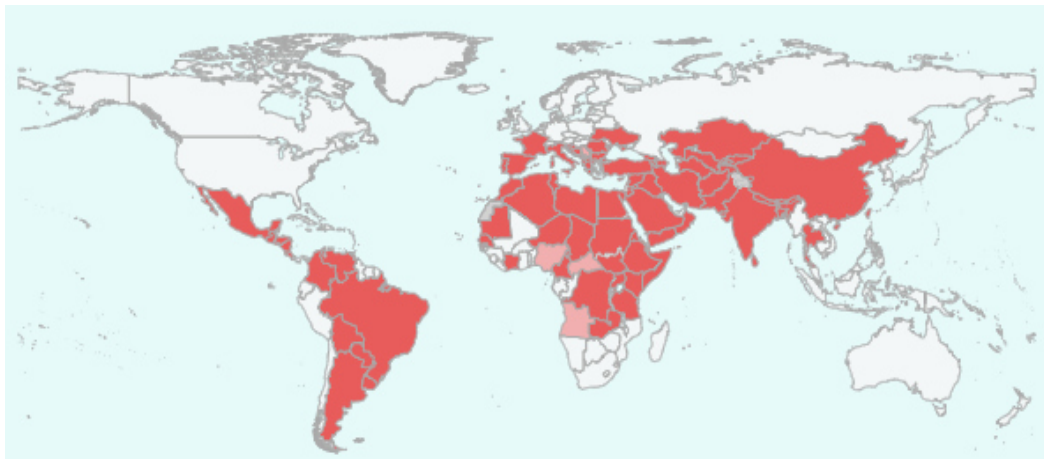
Nesse sentido, a evolução do quadro clínico na LV pode ser dividida em três fases progressivas. A fase aguda, que pode levar à morte após um início súbito, caracteriza-se por febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia incipiente. Já a fase de estado geralmente ocorre após dois meses de evolução, com febre irregular, emagrecimento progressivo, acentuação da palidez e aumento significativo da hepatoesplenomegalia, com nítido comprometimento do estado geral do paciente. Por fim, a fase final (calazar) surge quando não há intervenção terapêutica ou quando esta é ineficaz e a doença progride para febre contínua, desnutrição severa e edema de membros inferiores (que pode evoluir para inchaço generalizado). Nesta fase, surgem complicações sistêmicas graves, como hemorragias, icterícia, ascite e infecções bacterianas secundárias e recaídas, as quais são as principais causas de óbito (Brasil, 2006; Oliveira et al.; Gontijo et al., 2021).

O desfecho clínico da leishmaniose visceral é influenciado por diversos fatores que elevam os índices de mortalidade, como idade (crianças menores que 5 anos e adultos maiores que 50 anos possuem maior risco), presença de icterícia, anemia grave e quadros hemorrágicos. Além do mais, a presença de comorbidades e coinfeções, como a tuberculose e o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), é considerada um fator de risco para o agravamento da LV (Alvar, 2021; Pareyn et al., 2025).

1.3 Aspectos epidemiológicos

Do ponto de vista epidemiológico, a leishmaniose possui uma ampla distribuição global, presente em quase 100 países, principalmente no Sudeste Asiático, leste da África e Américas, sendo endêmica em áreas subtropicais e tropicais (Costa-da-Silva *et al.*, 2022; Vilas-Boas *et al.*; Solano-Gálvez *et al.*, 2024; Kato, 2025). A doença é considerada um grave problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS), classificada entre as principais doenças do mundo, devido à alta morbidade e mortalidade, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas mundialmente e 700.000 a 1.000.000 de novos casos anualmente, sendo a maioria desses casos nas Américas, na África e na Ásia, em países como Argélia, Etiópia, Iraque, Afeganistão, Brasil, Peru e Arábia Saudita (Lupi *et al.*, 2009; WHO, 2024). A severidade desse cenário é evidenciada pelo impacto letal da forma visceral, a qual foi responsável por 4.627 óbitos no mundo em 2023 de acordo com o relatório Global Burden of Disease (GBD, 2023).

Figura 2 – Endemicidade da leishmaniose visceral em 2024.



Fonte: Organização Mundial da Saúde.

Além disso, a doença afeta, especialmente, as populações economicamente desfavorecidas, sendo classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pela OMS, associada à desnutrição, ao deslocamento populacional, a moradias precárias, ao sistema imunológico debilitado e à falta de recursos financeiros, fatores determinantes para o diagnóstico, tratamento e controle da patologia. (Sheikh *et al.*; Vilas-Boas *et al.*; Solano-Gálvez *et al.*; OPAS; WHO, 2024).

Na América Latina, os casos de leishmaniose eram restritos ao ambiente rural e silvestre, tratados como uma zoonose, com os mamíferos selvagens (roedores, marsupiais e

primatas) como reservatórios naturais, sendo rara a infecção em seres humanos (Peterson *et al.*, 2003; Reithinger *et al.*, 2007). Todavia, esse cenário epidemiológico tem sofrido modificações, expandindo-se para as áreas urbanas de médio e grande porte, impulsionado por fatores como a urbanização intensa, o desmatamento e as mudanças climáticas, o que permite a adaptação dos ciclos de transmissão aos ambientes peridomésticos, ocupando áreas anteriormente não endêmicas, com animais domésticos como potenciais reservatórios, intensificando o aumento dos casos em seres humanos (Reithinger *et al.*, 2007; Salomón *et al.*, 2012; Teixeira-Neto *et al.*, 2014).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), a leishmaniose é endêmica em mais de 10 países da América Latina (como Argentina, Bolívia, Paraguai, México e Brasil), com a dinâmica epidemiológica influenciada pelas características geográficas, ecológicas e sociais do continente. Além disso, na região está concentrada uma grande diversidade de insetos vetores e de animais que atuam como reservatórios do parasito. Na América Latina, entre os anos de 2001 e 2023, foram registrados mais de 1.000.000 de casos de LT. Em 2024 foi notificado o maior número absoluto de casos com 9.810 infectados. Nesse mesmo período, foram reportados 74.440 casos de LV, sendo o Brasil o principal país endêmico nessa região, responsável por 92% dos casos em 2024, além de concentrar a maioria dos municípios com transmissão intensa ou muito intensa (WHO, 2024; OPAS, 2024, 2025).

No Brasil, a LV configura-se como um importante problema de saúde pública, em especial, no Nordeste. Segundo dados do Ministério da Saúde, no período de 2007 a 2024, o país registrou cerca de 50.372 casos de LV, com a região Nordeste respondendo por mais da metade das notificações nesse período. São destaques os estados do Maranhão (MA), Piauí (PI), Pernambuco (PE) e Bahia (BA), classificados como áreas de alto risco. O Ceará (CE) representa o estado com maior número de casos na região, e sua capital, Fortaleza, lidera entre os municípios dos estados citados, com 2.194 casos de LV, durante esse período, o que pode ser explicado pela urbanização, intenso fluxo migratório e potenciais reservatórios, fatores que facilitam a disseminação da doença (Cavalcante *et al.*, 2022; Melo *et al.*, 2023; Ministério da Saúde do Brasil, 2024).

1.4 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

O ciclo biológico de *Leishmania* spp. é digenético e heteroxênico, ou seja, o parasito alterna entre dois hospedeiros: o vetor flebotomíneo e os hospedeiros mamíferos (Ansari *et al.*, 2025). No flebotomíneo, o parasito existe como promastigota, que são formas alongadas, de

núcleo arredondado ou ovalado, com o cinetoplasto situado entre a extremidade anterior e o núcleo próximo à bolsa flagelar. Ademais, possuem flagelo longo e livre, que emerge da região anterior do parasito, e extremidade posterior afilada, podendo medir entre 16-40 μm de comprimento, incluindo o flagelo (Conceição-Silva; Alves, 2014). No vetor, as promastigotas passam por diferentes estágios de desenvolvimento, o que inclui a transformação de promastigotas procíclicas — as quais estão em intensa replicação, em promastigotas metacíclicas — a forma infectante do parasito, vivendo no meio extracelular, no trato digestivo (Gontijo; Carvalho, 2003; Dostálová; Volf, 2012; Solano-Gálvez *et al.*, 2024).

Por outro lado, a forma amastigota é arredondada e imóvel, de núcleo arredondado, com flagelo curto e internalizado na bolsa flagelar, e cinetoplasto localizado próximo à bolsa flagelar. O tamanho da amastigota pode variar, dependendo da espécie do parasito, em torno de 1,5-3 μm x 3-6,5 μm de diâmetro (Conceição-Silva; Alves, 2014). Essa forma de vida está presente no interior das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, onde se multiplica e se dissemina (Gontijo; Carvalho, 2003).

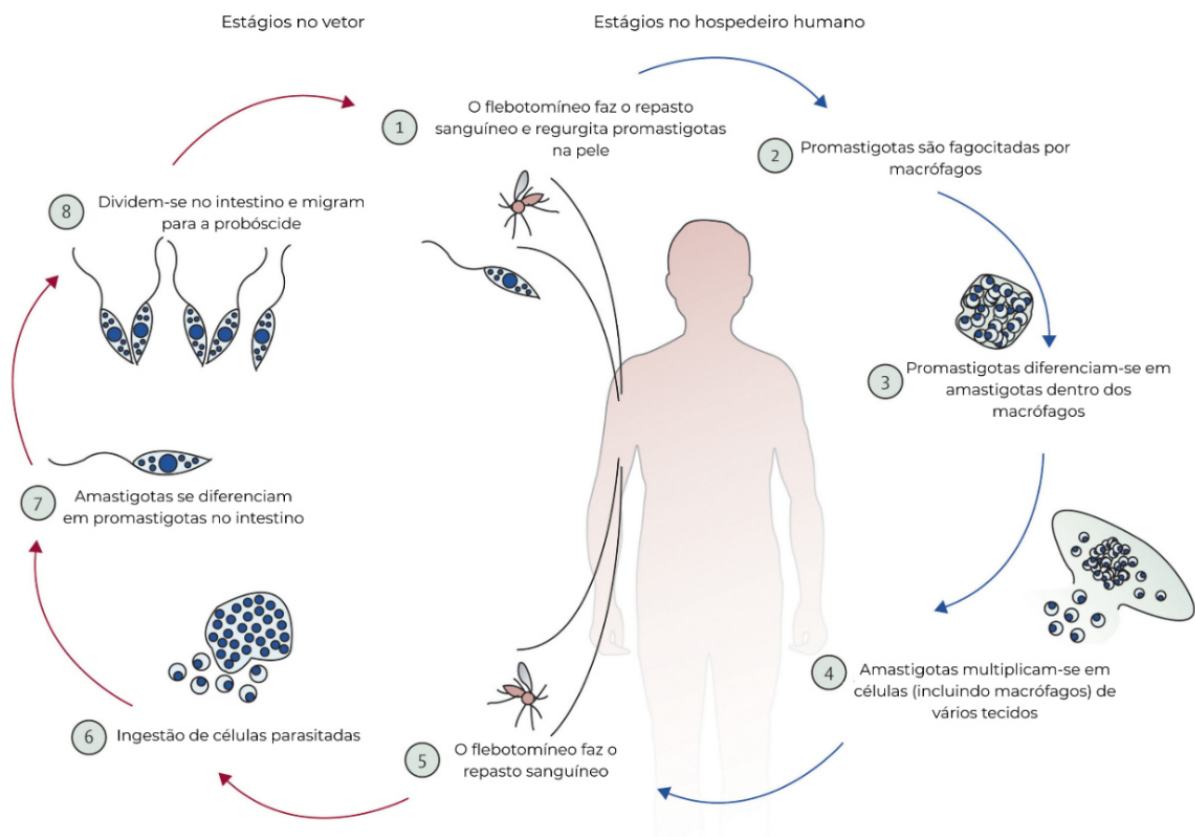
A transmissão ocorre quando a fêmea do flebotomíneo infectada, ao se alimentar de sangue no hospedeiro mamífero, injeta as formas promastigotas metacíclicas, seguida de fagocitose por células do sistema fagocítico mononuclear (como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos) (Figura 3). No interior dos macrófagos, é formado o vacúolo parasitóforo no fagossomo, que se funde ao lisossomo e resulta na formação do fagolisossomo, local onde as promastigotas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas, que, por sua vez, multiplicam-se dentro das células, rompem a membrana dos macrófagos e espalham-se para outros tecidos (Reithinger *et al.*, 2007).

Ao se alimentar de um hospedeiro infectado, o flebotomíneo fêmea ingere as células contendo as formas amastigotas do parasito. No intestino médio do vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, que se multiplicam. Destaca-se que as alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes funcionam como sinais para a metaciclogênese, que direciona as promastigotas procíclicas à probóscida, onde amadurecem, transformam-se novamente em promastigotas metacíclicas e instalam-se próximas às glândulas salivares do flebotomíneo fêmea, aptas para um novo ciclo de transmissão, durante um novo repasto sanguíneo (Elmahallawy *et al.*, 2021; Costa-Da-Silva *et al.*, 2022; Divenuto *et al.*, 2023; Pareyn *et al.*, 2025).

A dinâmica de transmissão e a alta prevalência mundial da leishmaniose foram diretamente influenciadas pelo processo de coevolução parasito-hospedeiro. Essa interação faz parte de um sistema biológico multifatorial, imprevisível e dinâmico. Estudos demonstraram,

por exemplo, que a saliva dos flebotomíneos possui moléculas farmacologicamente ativas de natureza anti-hemostáticas, quimiotáticas e imunomoduladoras, injetadas no local da picada durante o repasto sanguíneo que são associadas à capacidade de *Leishmania* manipular o sistema imunológico do hospedeiro. Esses fatores favorecem a alta infectividade do parasito, pois se associam à resistência, à disseminação e ao estabelecimento da infecção no hospedeiro. Algumas dessas propriedades dos componentes salivares dos flebotomíneos têm sido exploradas como potenciais alvos para o desenvolvimento de vacinas (Brasil; Lestina *et al.*; Scorza *et al.*, 2017; Serafim *et al.*, 2020).

Figura 3 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Fonte: adaptado de Reithinger *et al.*, 2007.

1.5 Resposta imunológica contra *Leishmania infantum*

A resposta imunológica frente à infecção por *Leishmania* spp. tem início no local da picada, onde o inseto vetor inocula as formas promastigotas metacíclicas do parasito na derme do hospedeiro (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Nesse local, a interação entre os parasitos, as células imunológicas residentes no tecido e as células epiteliais ativa a resposta imune inata

do hospedeiro, por meio do reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células residentes (Almeida *et al.*, 2023). Esse processo desencadeia a liberação de citocinas e quimiocinas, promovendo o recrutamento de fagócitos e de células apresentadoras de antígenos, especialmente os neutrófilos, as células naturais killer (NK), as células dendríticas (DCs) e os macrófagos (Serafim *et al.*; Mirzael *et al.*, 2021; Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Com o estabelecimento da infecção, o parasito passa a interagir com as células recrutadas, modulando suas funções, seus fenótipos e a posterior resposta adaptativa (Ayala *et al.*, 2024).

Inicialmente, por serem as células de defesa mais abundantes na circulação, os neutrófilos são as primeiras células da imunidade inata que chegam ao local da infecção, onde liberam substâncias antimicrobianas e realizam a fagocitose dos parasitos (de Figueiredo *et al.*, 2016; de Menezes *et al.*, 2016). Uma vez fagocitados pelos neutrófilos, o parasito enfrenta dois caminhos possíveis: a morte pela explosão oxidativa ou a evasão dos mecanismos citotóxicos dos neutrófilos (Lodi *et al.*, 2024). Os neutrófilos podem expelir armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) para aprisionar os parasitos e produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) para eliminá-los (Regli *et al.*, 2017).

No cenário de evasão, os parasitos podem induzir a sobrevivência prolongada dos neutrófilos, nos quais se instalam e resistem aos efeitos microbicidas. Uma vez instalados, os parasitos induzem a apoptose dos neutrófilos e os seus restos celulares são reconhecidos pelos macrófagos, que realizam a eferocitose no local. Esse processo permite a entrada silenciosa dos parasitos sobreviventes nos macrófagos, sem a presença de sinais inflamatórios que gerem resistência à infecção, em um mecanismo denominado “cavalo de Tróia” (van Zandbergen *et al.*, 2004; Liu e Uzonna, 2012). É válido destacar que, embora seja um mecanismo silencioso, os neutrófilos infectados podem liberar quimiocinas como a interleucina-8 (IL-8) e a Proteína Inflamatória de Macrófagos-1 beta (MIP-1 β) durante a apoptose como sinais de recrutamento de macrófagos, que passarão a ser local principal da infecção (Bacellar e Carvalho, 2005; Ayala *et al.*, 2024).

Desse modo, ainda que as primeiras horas de infecção por *Leishmania* sp. contem com a atuação principal dos neutrófilos, são os macrófagos as principais células efetoras na imunidade inata contra a leishmaniose (de Menezes *et al.*; de Figueiredo *et al.*, 2016). Os macrófagos são as principais células fagocíticas da imunidade inata e têm por característica a plasticidade de suas funções e de seus fenótipos em resposta a diversos estímulos, regulando a homeostasia e a evolução da defesa do hospedeiro (Almeida *et al.*; Chen *et al.*, 2023). Vale

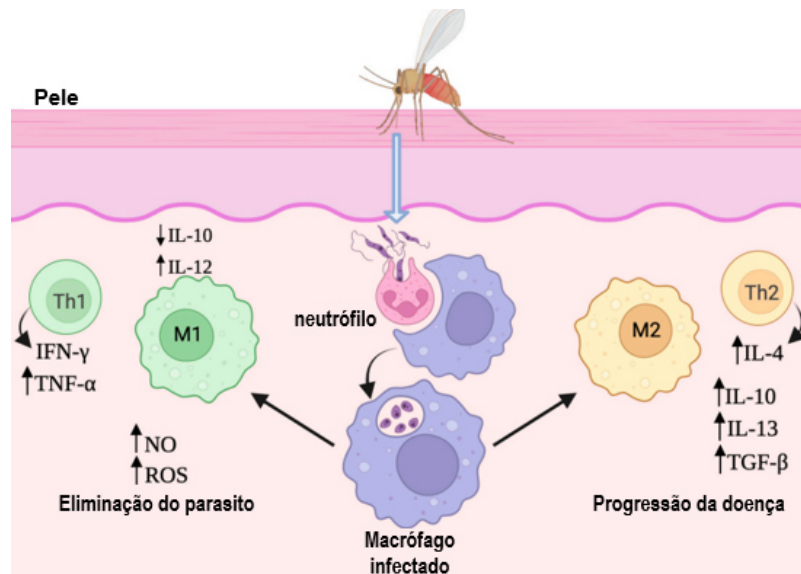
ressaltar que, as respostas imunes inatas pelos macrófagos são desencadeadas pela interação entre PAMPs ou DAMPs com os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll-like (TLRs) expressos na sua superfície ou pela sinalização de citocinas (Chen *et al.*, 2023; Lodi *et al.*, 2024).

Uma vez ativados, os macrófagos realizam a fagocitose do parasito e a sua destruição intracelular, no fagolisossomo, onde o parasito é exposto a enzimas proteolíticas, a espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, como óxido nítrico (NO). Os fragmentos dos parasitos são apresentados via Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) às células T, ativando-as e dando início à resposta imune adaptativa. Essas células são, ainda, capazes de promover o reparo tecidual do local lesionado, removendo células mortas, estimulando a angiogênese e síntese da matriz extracelular rica em colágeno (Chen *et al.*; Abbas *et al.*, 2023).

Nesse sentido, o estabelecimento eficiente da imunidade mediada por células T é de fundamental importância para o controle da infecção e desfecho clínico da doença, relacionado à recuperação na leishmaniose visceral (Bacellar e Carvalho, 2005; Mirzael *et al.*, 2021; Yasmin *et al.*, 2022). Os subconjuntos das células T CD4⁺ T auxiliares 1 (Th1) e T helper 2 (Th2), ativados pelos macrófagos, possuem funções distintas e importantes no controle eficaz da LV, em que cada perfil expressa diferentes tipos de citocinas em resposta a determinado estímulo, definindo a resistência ou suscetibilidade à infecção (Ayala *et al.*, 2024; Abbas *et al.*, 2023).

A resposta Th1 está associada ao combate à infecção por meio de mecanismos pró-inflamatórios, já a via Th2 induz um ambiente anti-inflamatório e regenerativo, porém relacionado à persistência do parasito (Figura 4) (Yasmin *et al.*, 2022; Ayala *et al.*, 2024). Então, o equilíbrio entre Th1 x Th2, em conjunto com outros mecanismos regulatórios que promovam, oportunamente, as suas respectivas ativações são determinantes para o curso clínico na infecção por *Leishmania infantum* (Costa-da-Silva *et al.*, 2022). Além disso, a conexão adequada entre imunidade inata e adaptativa permite que as células da via Th1 e os macrófagos infectados interajam, induzindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios, a exemplo do fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-12 (IL-12), que, sinergicamente com o interferon-gama (IFN- γ), ativam as funções microbidas dos macrófagos e promovem a eliminação mais eficiente dos parasitos (Elmahallawy *et al.*, 2021).

Figura 4 – Resposta imune hospedeira na leishmaniose.



Fonte: adaptado de Ayala *et al.*, 2024. Resposta imune Th1/Th2 à infecção por *Leishmania*. Perfis de ativação macrofágica M1 (verde) e M2 (amarelo) induzidos pela infecção por *Leishmania* e associados às respostas imunes Th1 e Th2, respectivamente. O perfil M1 promove a eliminação do parasito, enquanto o perfil M2 favorece a progressão da infecção.

Entretanto, na maioria dos casos em pacientes sintomáticos, a LV encontra-se caracterizada pelo comprometimento funcional da resposta Th1 e, consequentemente, da produção de citocinas pró-inflamatórias importantes, como IL-2, IL-12, TNF-α e IFN-γ, além de apresentar níveis elevados de IL-10, IL-4 e TGF-β, mediadores anti-inflamatórios, que inativam os macrófagos M1 e estão relacionados à progressão da leishmaniose e ao aumento da carga parasitária nos macrófagos (Rodrigues *et al.*, 2016; Mirzael *et al.*, 2021).

Assim, a resposta imunológica não está suprimida durante a leishmaniose visceral ativa. Ao contrário, o sistema imunológico encontra-se altamente ativado, porém a resposta pró-inflamatória via Th1 torna-se pouco eficaz em controlar a proliferação parasitária, uma vez que se encontra regulada negativamente por citocinas anti-inflamatórias via Th2, que inibem principalmente a produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, mecanismo efetor fundamental à eliminação dos parasitos internalizados. Esse fato provavelmente é mediado pelos mecanismos de sobrevivência desenvolvidos por *Leishmania* sp. durante sua evolução, em especial nos órgãos pelos quais o parasito apresenta tropismo (baço, fígado e medula óssea), o que provoca seus sintomas clássicos (Rodrigues *et al.*, 2016; Bohr *et al.*, 2021; Lodi *et al.*, 2024).

Com relação à imunidade humoral, a leishmaniose visceral é caracterizada pela ativação desregulada dos linfócitos B e pela hipergamaglobulinemia, que apresenta baixa capacidade protetora ao hospedeiro (Omachi *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2020). Modelos murinos infectados com *L. infantum* demonstraram uma produção precoce de Imunoglobulina IgM e IgG com capacidade de formar imunocomplexos e de induzir a produção de IL-10 pelos macrófagos, correlacionando-se à maior carga parasitária e à progressão da doença (Kane e Mosser, 2001; Deak *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que as células B humanas incubadas com as formas amastigotas de *L. infantum* apresentaram uma diferenciação em células B regulatórias (Bregs) que resultou em um maior nível de secreção da IL-10, com supressão das células T (CD4⁺), e redução do Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interferon γ (IFN- γ) (Andreani *et al.*, 2015).

Ademais, infecções experimentais em camundongos BALB/c com *L. donovani* e *L. infantum* demonstraram o desenvolvimento de uma resposta Th1/Th2 mista, sem a presença de um padrão polarizado bem definido. Tal resposta foi caracterizada pela produção simultânea de IFN- γ , IL-4 e IL-10 nas células do baço e do fígado, com correlação positiva, inclusive, na cinética da síntese dessas citocinas. Além disso, a resposta mista foi confirmada pela detecção concomitante de IgG1, associada a Th2, e de IgG2a, relacionada a Th1. Esses achados sugerem uma relação multifatorial na resposta imunológica do hospedeiro, a qual pode não depender unicamente do balanço explicado pelo modelo clássico Th1/Th2. Ao passo que a compreensão dos mecanismos de sinalização e resposta das células efectoras, como os macrófagos, mediante sinais polarizantes, pode auxiliar na melhor compreensão do curso da doença. Isto é, há hiperativação do sistema imunológico, mas o que de fato os macrófagos fazem para decidir combater ou não a infecção ainda permanece pouco esclarecido (Rolão *et al.*, 2007; Salgueiro *et al.*, 2018).

1.5.1 Resposta imune no baço e no fígado

No curso da doença ativa, o baço e o fígado apresentam respostas imunológicas contrastantes, devido aos microambientes inflamatórios distintos, mas complementares entre si, pois enquanto o fígado controla a infecção, o baço apresenta deficiência na contenção parasitária, determinando o curso clínico (Poulaki *et al.*, 2021). Desse modo, o baço atua como um filtro imunológico da corrente sanguínea, além de ser central na coordenação dos gradientes de quimiocinas que modulam os linfócitos T e B. No baço, a polpa vermelha é responsável pela retirada de patógenos e de células senescentes presentes no sangue, ao passo que a polpa branca

organiza as zonas T e B, permitindo o desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Tennenbaum *et al.*, 2023; Yannick e Mueller, 2023).

Durante a infecção por *L. infantum*, o parasito alcança o baço, onde desencadeia uma resposta imune caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias (Palacios *et al.*, 2023). Desse modo, as células B da zona marginal são hiperativadas e passam a produzir grandes quantidades de anticorpos IgM e, posteriormente, IgG, pouco eficazes contra o parasito (Deak *et al.*, 2010; De Carvalho *et al.*, 2020). Com a progressão da doença, tem-se aumento na síntese de citocinas como IL-6 e IL-10, atuantes na imunossupressão, que contribuem para a desregulação dos gradientes de quimiocinas, como CXCL13 e CCL19, comprometendo a ativação, a migração e o posicionamento adequado das células imunes, o que provoca a desorganização da polpa branca e a falha na formação dos granulomas em torno dos parasitos (de Melo *et al.*, 2021; Fontes *et al.*, 2024). Com a imunossupressão progressiva, inicialmente surge a hiperplasia da polpa branca, acompanhada de forte recrutamento leucocitário, associado à hipergamaglobulinemia (de Melo *et al.*, 2021; Dirkx *et al.*, 2024).

À medida que a doença avança para a fase crônica, há uma queda na expressão de quimiocinas, comprometendo a quimiotaxia leucocitária e agravando a desorganização do tecido esplênico, com reflexo na não eliminação do parasito (de Melo *et al.*, 2021). Como resultado, ocorre a desestruturação progressiva da polpa branca, com perda da sua arquitetura funcional, associada ao acúmulo de plasmócitos e de macrófagos parasitados, além do aumento dos megacariócitos, que culmina na esplenomegalia, um dos sinais marcantes na leishmaniose visceral, confirmando, inclusive, a falha das respostas granulomatosas do hospedeiro em controlar a carga parasitária no baço (Montes de Oca *et al.*, 2020; de Melo *et al.*, 2021; Poulaki *et al.*, 2021).

Por sua vez, no fígado a resposta clássica é aquela mediada por IFN- γ , TNF- α e IL-12, sendo, portanto, uma resposta inflamatória pela via Th1. Em comparação com o baço, no fígado ocorre a formação eficiente de granulomas hepáticos, o que permite um controle melhor sobre o parasito, especialmente devido à ativação das células de Kupffer, que pode persistir por meses ou anos (Sukhumavasi *et al.*, 2021; Rodrigues *et al.*, 2022). Em conjunto com as células T CD4⁺ e T citotóxicas, as células de Kupffer infectadas ou que formam o granuloma hepático diferenciam-se ao fenótipo M1 dos macrófagos, eliminando os parasitos em seu interior, por meio das espécies reativas (Kaye *et al.*, 2004). A formação organizada desses granulomas no fígado é um dos fatores que permite a ocorrência de uma eliminação eficaz dos parasitos, ao contrário do baço, que apresenta uma sobrecarga parasitária (Poulaki *et al.*; Sukhumavasi *et al.*, 2021).

As alterações estruturais hepáticas observadas durante a leishmaniose visceral são a hepatomegalia, devido à proliferação das células de Kupffer, à formação de granulomas múltiplos e à presença de infiltrados inflamatórios, além da possibilidade de necrose e de disfunções metabólicas, ocasionados por citocinas imunossupressoras, especialmente pela IL-10 produzida nos macrófagos infectados, a qual diminui a produção de albumina por meio da interferência nos mecanismos dependentes dos fatores de transcrição JAK/STAT3 e CEBP- β (Singh *et al.*; Andrade *et al.*, 2025).

1.5.2 Macrófagos como células-chave: hospedeiras e efetoras

Como visto inicialmente, a infecção acontece nos neutrófilos ao tentar controlarem os parasitos. Porém, eles são células de vida curta e os parasitos não encontram neles um abrigo ideal para sua sobrevivência prolongada, sendo, portanto, usados como um meio para chegar aos macrófagos (Liu e Uzonna, 2012). Desse modo, é no interior dos macrófagos que os parasitos são capazes de se instalar e se diferenciar nas formas amastigotas, as quais são formas intracelulares obrigatórias, e se multiplicar, de modo a viabilizar não só a infecção, mas também o seu ciclo de vida (de Menezes *et al.*, 2016).

Os macrófagos são células versáteis, responsáveis por diversas funções ao serem ativados por estímulos do patógeno ou por citocinas. Na pele, atuam como células sentinelas, respondendo aos estímulos iniciais da infecção, além de promoverem a fagocitose e a homeostase tecidual. Na circulação sistêmica, participam da amplificação da resposta imune, por meio do recrutamento de monócitos presentes no sangue para o sítio de infecção por *Leishmania* sp., onde se diferenciam em macrófagos efetores (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2020; Carneiro *et al.*, 2021; Abbas *et al.*, 2023).

Em contraste, os macrófagos como células hospedeiras relacionam-se ao aumento da carga parasitária e encontram-se regulados, na maioria das vezes, pelas citocinas IL-10 e IL-4, indispensáveis ao estabelecimento da leishmaniose. Paradoxalmente, como nicho replicativo, os macrófagos oferecem um ambiente seguro à sobrevivência e à replicação de *Leishmania* sp., ao interromper os mecanismos pró-inflamatórios dos macrófagos, provocados pelos mecanismos de evasão imunológica empregados pelos parasitos (Toepp e Petersen, 2020; Yasmin *et al.*, 2022). É no interior dos macrófagos que os parasitos se diferenciam em amastigotas, adaptados ao ambiente do fagolisossomo, transformando-o em um vacúolo parasitóforo (Oliveira *et al.*, 2022). É também no fagolisossomo que os parasitos encontram

suas principais fontes de nutrientes, como ferro, aminoácidos e lipídios (Rabhi *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2017).

1.5.3 Polarização de macrófagos

A plasticidade fenotípica é uma característica marcante dos macrófagos e permite que adquiram capacidades funcionais distintas quando expostos a estímulos específicos. A resposta dos macrófagos a diferentes citocinas produzidas pelas células T auxiliares é um exemplo clássico de estímulo que leva à polarização e depende, dentre outros fatores, da interação célula-célula e do estado patológico do hospedeiro (Lampiasi *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2025). Nesse sentido, a polarização dos macrófagos é um processo em que se estimula essas células a se diferenciarem em perfis funcionais contrastantes, determinados pelos tipos de citocinas presentes no ambiente infeccioso (Tomimoto-Pellissier *et al.*, 2018).

Essas modificações trazem consigo impactos significativos na resolução da doença e no reparo dos tecidos lesados, garantindo, em última análise, a homeostase tecidual e diferentes desfechos clínicos, tanto resolutivos quanto regenerativos (Liu e Uzonon, 2012; Carneiro *et al.*, 2021; Ghafouri-Fard *et al.*, 2021). De início, uma visão dualística bem simplista classificou os macrófagos diferenciados em dois subconjuntos: os macrófagos M1 e M2. Todavia, atualmente já se sabe que existem outras subdivisões oriundas dessas células diferenciadas, como M2a, M2b, M2c e M2d, com vias metabólicas de indução complexas e altamente controladas, demonstrando a complexidade desse mecanismo (Atri *et al.*, 2018; Ghafouri-Fard *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a ativação dos macrófagos M0 é dividida em dois espectros: a ativação clássica e alternativa (Liu e Uzonon, 2012). Os macrófagos que são ativados pela via clássica exibem o fenótipo M1 e adquirem as características pró-inflamatórias, ao passo que aqueles ativados pela via alternativa passam a exibir o fenótipo M2, de características anti-inflamatórias (Abbas *et al.*, 2023; Kumar *et al.*, 2025) (Figura 5).

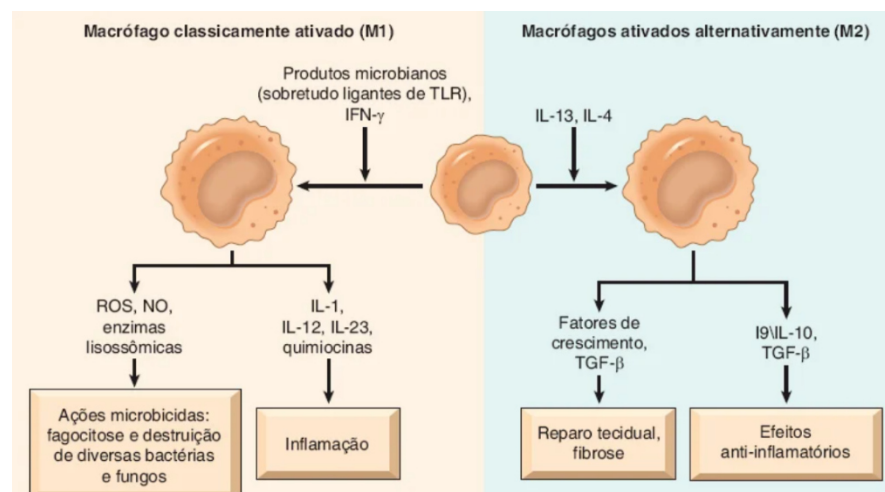
A ativação dos macrófagos pela via clássica pode se dar por meio de produtos microbianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), que entram em contato com os receptores de reconhecimento de padrão dos macrófagos, bem como por citocinas pró-inflamatórias derivadas das células T auxiliares (Th1), em especial o IFN- γ e o TNF- α , no curso da resposta imune adaptativa (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2025). Os macrófagos M1 exibem fortes propriedades microbicidas e fagocíticas, uma vez que expressam em sua superfície os receptores Toll-like 2 e 4, as proteínas coestimuladoras de superfície B7-1 e B7-2 e o MHC de

classe II, além de liberarem citocinas e quimiocinas que retroalimentam positivamente a polarização adicional dos macrófagos, amplificando, assim, a resposta imunológica (Ghafouri-Fard *et al.*, 2021).

Além disso, o subconjunto M1 torna-se mais eficiente para eliminar os microrganismos, por possuir alta expressão de enzimas lisossômicas e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), o que, conseqüentemente, leva à produção de grandes quantidades de mediadores tóxicos, como o óxido nítrico (NO) e as espécies reativas de oxigênio (ROS), marcadores do fenótipo M1 (Abbas *et al.*, 2023). Ainda são fontes de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-2, IL-6 e IL-12, predominando em muitas das reações inflamatórias agudas, sendo importantes para controlar a infecção, como as causadas por *Leishmania* sp., no hospedeiro (Patel *et al.*, 2017; Goto e Mizobuchi, 2023).

Em contrapartida, a ativação alternativa dos macrófagos é mediada pela exposição a citocinas da via Th2, como IL-4, IL-5, IL-13, IL-10 e TGF- β , estando singularmente envolvida em infecções parasitárias, a exemplo de infecções por *L. infantum*, e nas respostas humorais (Porta *et al.*, 2015; Atri *et al.*, 2018; Alizadeh *et al.*, 2023). Os macrófagos do fenótipo M2 não possuem atividades microbicidas nem de apresentação de antígenos, tornando-se mais aptos à imunossupressão, ao controle da inflamação, ao reparo tecidual, à eferocitose, à angiogênese, à síntese de colágeno e, em alguns casos, à inflamação crônica, garantindo a homeostase do local (Lampiasi *et al.*, 2016; Goto e Mizobuchi, 2023; Kumar *et al.*, 2025). Desse modo, a ativação do subconjunto M2 leva à síntese e à liberação de grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias e regulatórias, a exemplo da IL-4, IL-13, IL-10 e do TGF- β , além do aumento na expressão da arginase-1, um marcador funcional clássico dos macrófagos de perfil M2, e dos receptores de IL-4 (IL-4R) (Sica *et al.*, 2014; Lória-Cervera e Andrade-Narváez, 2020).

Figura 5 - Ativação clássica e alternativa dos macrófagos.



Fonte: Kumar *et al.*, 2023. Ativação clássica e alternativa dos macrófagos. Produtos microbianos e citocinas induzem macrófagos classicamente ativados (M1), responsáveis pela fagocitose, destruição de microrganismos e amplificação da inflamação. Já citocinas específicas induzem macrófagos alternativamente ativados (M2), que atuam no reparo tecidual e na resolução da inflamação.

1.5.4 Mecanismos de evasão do parasito

A sobrevivência dos parasitos do gênero *Leishmania* no interior das células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros depende da capacidade deles de interromper ou alternar os eventos de sinalização celular do hospedeiro que resultem na falha da produção de moléculas microbicidas e citocinas pró-inflamatórias, bem como na interferência na apresentação adequada de antígenos através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) (Liu; Uzonna, 2012; Carneiro *et al.*, 2021).

Durante o processo evolutivo, os parasitos de *Leishmania* spp. desenvolveram mecanismos complexos para evadir o sistema imunológico do hospedeiro, desregulando cascatas metabólicas de sinalização e de ativação, conferindo êxito à infecção e à manutenção de seu ciclo de vida (Rios-Barros *et al.*, 2025). Assim, a imunorregulação benéfica à infecção é consequência não só das moléculas derivadas da superfície do parasito, como também dos componentes da saliva do inseto vetor introduzidos no local da picada durante o repasto sanguíneo (Lestnova *et al.*, 2017). Esta última, por sua vez, é caracterizada pelas propriedades imunossupressoras dos seus componentes que modulam a resposta imunológica do hospedeiro e inibem o microambiente inflamatório dos macrófagos M1, pois aumentam a expressão de citocinas relacionadas à resposta Th2 e atenuam a expressão de citocinas associadas à resposta Th1, além de reduzirem a produção de NO pelos macrófagos, o que resulta na persistência do parasito e no aumento da carga parasitária (Rohoušová e Volf, 2006; Prates *et al.*, 2011; Chaves *et al.*, 2016). Dessa maneira, a imunomodulação tem seu início no momento da picada pelo *Lutzomyia longipalpis* e facilita a infecção das células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro pelas promastigotas metacíclicas (Kumari *et al.*, 2022).

De modo geral, após estabelecida a infecção, *L. infantum* é capaz de direcionar o sistema imune do hospedeiro a desenvolver uma resposta de perfil Th2/M2. Ao regular negativamente a ação inflamatória dos macrófagos, esse evento favorece o aumento da atividade da arginase-1, levando à depleção da síntese do NO, o que resulta no desequilíbrio entre proteção e patogênese, comprometendo o controle da infecção pelo hospedeiro (Tomiotto-

Pellissier *et al.*, 2018; Antonia *et al.*, 2021; Conde *et al.*, 2022). Essa modulação das vias de sinalização visa desregular as funções críticas dos macrófagos em benefício do parasito, permitindo o estabelecimento de *L. infantum* no interior dos macrófagos recrutados para eliminá-lo (Shio *et al.*, 2011).

Além disso, protozoários do gênero *Leishmania* desenvolveram estratégias de evasão dependentes das moléculas presentes em sua membrana plasmática, bem como no seu material genético (Rios-Barros *et al.*, 2025). Nesse contexto, a presença de um glicocálice espesso, composto por uma matriz de glicoconjugados como lipofosfoglicano (LPG) e glicoinositolfosfolipídios (GIPLs), além da Glicoproteína 63 (GP63), da proteína de membrana de cinetoplastídeos de 11 kDa (KMP-11), reconhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), e do gene A2, constituem elementos cruciais aplicados no processo de evasão imunológica em parasitos do gênero *Leishmania* (Atayde *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2022).

A GP63, ou protease de superfície principal (MSP), é uma metaloprotease zinco-dependente, expressa na superfície através de uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) ou secretada diretamente (Atayde *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2022). Esta molécula desempenha funções essenciais na virulência e patogênese da leishmaniose, pois promove a adesão às células fagocíticas e atua na sobrevivência do parasito (Kumari *et al.*, 2022; Al-Kaeabi *et al.*, 2025). A função biológica da GP63 está relacionada a múltiplos mecanismos de proteção e evasão em promastigotas metacíclicas, em especial, na capacidade de clivar a proteína do complemento C3b em iC3b inativo, o que permite a evasão da lise provocada pelo sistema complemento, favorecendo a entrada do parasito sem sinais inflamatórios (Atayde *et al.*, 2016; Matlashewski, 2001; Contreras *et al.*, 2010). Além disso, a GP63 inativa o C4b, bloqueando a via das lectinas do sistema complemento (Pereira-Filho *et al.*, 2023). A GP63 entra no citoplasma e acessa o núcleo do macrófago, onde cliva substratos como proteínas tirosina fosfatases (PTPs), fatores de transcrição (FTs) e a proteína DoK (Atayde *et al.*, 2016; Kumari *et al.*, 2022). Essas clivagens, por sua vez, suprimem a expressão da iNOS, a síntese de NO, TNF- α , IL-12 e a atividade biológica da proteína ativadora 1 (AP-1), reguladora positiva da produção das citocinas pró-inflamatórias e da expressão da iNOS (Silva-Almeida *et al.*, 2012; Rath *et al.*, 2014; Kumari *et al.*, 2022). No vetor, a GP63 é crucial para a proteção das formas promastigotas contra enzimas hidrolíticas do intestino médio do inseto (Matlashewski, 2001; Silva-Almeida *et al.*, 2012).

O lipofosfoglicano (LPG) é a macromolécula de superfície mais abundante no estágio promastigota, atuando na persistência do parasito e exibindo um caráter

imunossupressor em infecções por *L. infantum* (Ibraim *et al.*, 2013; Forestier *et al.*, 2015). O parasito evade o ataque pelo sistema complemento, devido à atuação dessa macromolécula ao formar uma barreira superficial resistente que restringe o acesso e o depósito das proteínas do complemento à superfície do parasito e retarda a formação do complexo de ataque à membrana (MAC), impedindo a sua eliminação (Pereira-Filho *et al.*, 2023). Além disso, o LPG age na subversão do estresse oxidativo provocado pelos macrófagos e inibe a ativação da proteína quinase C (PKC) (Zamora-Chimal *et al.*, 2017; Descoteaux *et al.*, 1992) que desempenha um papel fundamental na regulação das funções dos macrófagos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, de NO e de ROS criticamente associadas à ativação dos linfócitos Th1 e à eliminação do parasito (Liu & Uzonna, 2012).

Ademais, o LPG inibe transitoriamente a fusão fagossomo-endossomo, prejudicando a formação do fagolisossomo e permitindo a sobrevivência das promastigotas antes da diferenciação em amastigotas no interior dos macrófagos (Matlashewski, 2001; Quintela-Carvalho *et al.*, 2022; Nunes *et al.*, 2025). Por fim, o parasito, com auxílio do LPG, é capaz de prejudicar a montagem do complexo NADPH oxidase na membrana do fagossomo, reduzindo a sua exposição às espécies reativas de oxigênio (ROS), além de alterar o pH ácido dentro do vacúolo parasitóforo (VP) para que as amastigotas sobrevivam e passem, inclusive, a competir pela arginina a fim de reduzir a síntese de óxido nítrico (NO) (Nunes *et al.*, 2025).

Nessa perspectiva, a atividade da arginase I (Arg-1) nos macrófagos é aumentada na infecção por *Leishmania* spp. e o efeito biológico desse aumento repercute na resposta imunológica do hospedeiro. Isso porque Arg-1 compete com a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) pelo metabolismo da L-arginina, ou seja, esse aminoácido é um substrato comum a iNOS e a Arg-1. Por sua vez, o catabolismo da L-arginina pela arginase em macrófagos infectados promove o desvio metabólico desse aminoácido, gerando ureia e ornitina, as quais podem ser utilizadas para a síntese de poliaminas, utilizadas como nutriente pelos parasitos. Esse processo leva à depleção da disponibilidade da L-arginina e, por consequência, à queda na síntese de NO, fato que favorece a sobrevivência de *Leishmania* nos macrófagos alternativamente ativados (Gotoh & Mori, 1999; Iniesta *et al.*, 2005; Wanasen *et al.*, 2007; Lentini *et al.*, 2023). Além disso, o aumento da atividade da Arg-1 durante a infecção por *Leishmania* pode estar relacionado ao aumento da produção de IL-10 e IL-4 pelos macrófagos infectados, em um cenário de retroalimentação positiva (Costa *et al.*, 2011; Mandal *et al.*, 2017). Desse modo, o desvio metabólico da L-arginina é estratégico para a sobrevivência da *Leishmania* sp., estando ligado à capacidade do parasito de evadir a ação protetora dos agentes redutores, a exemplo do NO, além de garantir o suprimento de L-arginina para a nutrição do

parasito (Zilberstein; Myler, 2021). Ainda, a L-arginina é importante para a resposta imune adaptativa na leishmaniose, e o aumento do desvio metabólico desse aminoácido para a síntese de poliaminas limita sua disponibilidade às células T específicas para *Leishmania*, levando à diminuição da resposta dessas células (Munder *et al.*, 2009).

Os GIPLs prejudicam a translocação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), inibem a síntese de óxido nítrico e promovem uma resposta com elevados níveis de IL-4 no início da infecção, diminuindo a resposta inflamatória e induzindo as vias anti-inflamatórias, o que favorece a entrada do parasito e a progressão da leishmaniose (Liu *et al.*, 2009; Argueta-Donohué *et al.*, 2008; Silva-Almeida *et al.*, 2012). Os GIPLs podem também contribuir para um ambiente mais permissivo à infecção por *Leishmania* por meio da manipulação das funções dos macrófagos ao inibir a produção de IL-12 nos estágios iniciais da infecção, o que altera o equilíbrio das respostas Th1/Th2, favorecendo, portanto, a sobrevivência do parasito e sua evolução para a forma amastigota (McNeely *et al.*, 1989; Assis *et al.*, 2012).

Destaca-se também a proteína KMP-11, uma molécula com propriedades imunomoduladoras capaz de induzir a expressão de IL-10, que regula negativamente a expressão de IL-6, IL-12 e TNF- α , condições favoráveis ao perfil M2 (Carvalho *et al.*, 2005; Silva-Almeida *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2023). Nesse ponto, os macrófagos infectados por *Leishmania* sp. têm a produção de IL-10 aumentada, inibindo as suas funções microbidas (Elmahallawy *et al.*, 2021). Ainda, o aumento de IL-10 acompanhado da redução de IL-6 constitui um dos mecanismos que *L. infantum* utiliza na infecção das células dendríticas (Neves *et al.*, 2010).

Por fim, o Gene A2, exclusivo de espécies que causam leishmaniose visceral (*L. donovani* e *L. infantum*), é expresso na forma amastigota do parasito e está localizado junto à proteína BiP no retículo endoplasmático. Esse gene é fundamental na proteção contra o estresse térmico durante a visceralização, pois permite a sobrevivência em temperaturas elevadas (Kumari *et al.*, 2022; Matlashewski, 2001).

Assim, essa complexa modulação se dá pela manipulação dos sinais de entrada nas células hospedeiras, pelo bloqueio de vias de sinalização, pela inibição dos mecanismos leishmanicidas mediados pelos macrófagos pró-inflamatórios e pela supressão de genes reguladores de intermediários metabólicos, o que influencia a dinâmica funcional das células efectoras do hospedeiro, a persistência da *L. infantum* e o desfecho clínico da doença (Atayde *et al.*, 2016; Paixão *et al.*, 2021).

1.6 Diagnóstico, tratamento e controle

1.6.1 Diagnóstico

A leishmaniose configura-se como um desafio para o diagnóstico, tendo em vista as limitações dos testes disponíveis e as dificuldades impostas pela doença, pois os sinais e sintomas se sobrepõem aos de muitas outras doenças infecciosas (Akhoundi *et al.*, 2017). O diagnóstico adequado é fundamental para o controle da patologia e o sucesso do tratamento, evitando a progressão para formas clínicas graves. Assim, a falha no diagnóstico tem consequências diretas no aumento da letalidade da doença (Alvar *et al.*, 2008; Nharwal *et al.*, 2025).

Nesse contexto, o diagnóstico de infecção por *Leishmania* spp. é realizado em etapas que envolvem um teste provisório, com base na apresentação clínica e nos sintomas do paciente, seguido de um teste confirmatório laboratorial, que pode ser parasitológico, sorológico ou molecular (Louizi *et al.*, 2023; Assolini *et al.*, 2022). Compreende o método parasitológico a cultura *in vitro*, a histopatologia e a microscopia direta de esfregaços (corados com Giemsa) ou aspirados do baço, dos linfonodos ou da medula óssea. Esse método é considerado o padrão-ouro para o diagnóstico, devido à sua elevada especificidade e por avaliar recidivas de leishmaniose visceral, muito embora apresente baixa sensibilidade, necessite de profissionais especializados e, por ser invasivo, possa levar a complicações como dor, sangramento e cicatrizes (Nath-Chowdhury *et al.*, 2016; Churiso *et al.*, 2020; Zaho *et al.*, 2024; Pareyn *et al.*, 2025).

O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) integra o grupo de testes sorológicos e possui boa sensibilidade, entretanto os desafios relacionados ao teste incluem a necessidade de equipe de laboratório profissional, períodos de incubação longos e etapas de lavagem trabalhosas (Zaho *et al.*, 2024). Ainda nesse grupo, os testes rápidos rK39 são aplicados para o diagnóstico da leishmaniose visceral especialmente em áreas com recursos limitados e/ou endêmicas (Reimão *et al.*, 2020). Destacam-se pela facilidade de uso — aplicáveis, inclusive, ao diagnóstico em campo —, pelo baixo custo e pela estabilidade em temperatura ambiente. No entanto, dependendo da região geográfica, a sensibilidade dos testes rK39 pode sofrer variações (Reimão *et al.*, 2020; Nharwal *et al.*, 2025).

Por fim, o método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que faz parte dos testes moleculares, destaca-se pela alta especificidade, sensibilidade e rapidez, auxiliando até mesmo na identificação da espécie do parasito — fundamental para o sucesso do tratamento.

Todavia, também possui limitações que estão relacionadas ao alto custo e à demanda por equipamentos especializados (Nath-Chowdhury *et al.*, 2016; Orucho *et al.*, 2025).

1.6.2 Tratamento

O tratamento se baseia, principalmente, no uso de antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina) e do estibogluconato de sódio, considerados fármacos de primeira escolha para várias formas clínicas da leishmaniose, além da anfotericina B e da miltefosina em casos de resistência ao antimônio (De Araújo *et al.*, 2017; Oryan *et al.*, 2018). A eficácia dessas opções pode variar de acordo com o estado imunológico do hospedeiro e a localização geográfica onde a infecção por *Leishmania* spp. foi adquirida (Van Griensven *et al.*, 2019). Nesse sentido, nas formas mais graves da doença, a terapia representa um desafio constante, pois esses medicamentos apresentam limitações consideráveis: o alto custo, a necessidade de longos períodos de administração, a elevada toxicidade e a ocorrência de efeitos colaterais frequentes e graves, incluindo a intolerância hematológica e a toxicidade renal, cardíaca e pancreática (Pandey *et al.*, 2005; Espinoza-Hicks *et al.*, 2019; Dupont, 2002; Chaves *et al.*, 2020). A toxicidade sistêmica é provocada, em parte, pelo baixo índice de seletividade (IS) da maioria dos fármacos convencionais disponíveis, os quais não são capazes de distinguir com eficácia entre o parasito e as células do hospedeiro, causando danos às células humanas (Sousa *et al.*, 2023). Essas limitações prejudicam a adesão dos indivíduos infectados ao tratamento, principalmente nas zonas rurais e áreas de difícil acesso, e consequentemente, permitem que cepas mais resistentes do parasito sejam selecionadas (Roatt *et al.*, 2020).

Embora o tratamento para a leishmaniose visceral tenha passado por avanços consideráveis na última década, com o aprimoramento da anfotericina B em sua formulação lipossomal, que reduziu uma parte dos efeitos colaterais, e a introdução do medicamento oral miltefosina e da paromomicina injetável, o impacto financeiro dessas terapias nas regiões economicamente desfavorecidas ainda preocupa, pois são caras e não estão prontamente disponíveis à maior parte da população (Alves *et al.*, 2018; Kobets *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de uma vacina para a leishmaniose ainda continua sendo um desafio significativo devido à grande variedade de espécies de *Leishmania*, cada qual com suas particularidades, e à complexa relação parasito-hospedeiro que impacta diretamente a segurança do imunizante para o ser humano, o que agrava o cenário atual (Roatt *et al.*, 2020; Assolini *et al.*, 2022; Madusanka *et al.*, 2022). Desse modo, tendo em vista todas essas limitações das terapias convencionais, é urgente considerar o desenvolvimento de terapias

alternativas inovadoras, seguras e eficazes, adaptadas à espécie, à forma clínica e aos padrões de resistência, além de levar em consideração as características sociais e geográficas da população (Alves *et al.*, 2018, Chaves *et al.*, 2020; Brunetto *et al.*, 2026).

1.6.3 Controle

O controle das manifestações clínicas da leishmaniose e a definição de uma estratégia terapêutica adequada estão condicionados ao diagnóstico correto e precoce, fundamental para amenizar ou, até mesmo, evitar a toxicidade medicamentosa (Madusanka *et al.*, 2022; Pareyn *et al.*, 2025). Assim, as características epidemiológicas da leishmaniose, ocasionadas pela diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores, aliadas à complexidade da relação parasito-hospedeiro e à desigualdade social, evidenciam a relevância de medidas de controle que sejam flexíveis, distintas e adequadas às particularidades de cada região (Brasil, 2017). Somada a isso, a subnotificação é outro fator que dificulta ações de saúde pública direcionadas para o controle da leishmaniose, sendo prejudicial à população que reside em regiões endêmicas, remotas ou afetadas por conflitos, onde a real prevalência da doença é desconhecida (Costa *et al.*, 2008; Alencar *et al.*, 2023; Pareyn *et al.*, 2025).

Nesse cenário, o controle vetorial é imprescindível na gestão epidemiológica da doença, sendo recomendado o uso combinado de ferramentas seguras e economicamente eficazes (WHO, 2017). Uma das estratégias aplicadas é o controle químico, com a pulverização residual intradomiciliar, instituída na esfera da proteção coletiva, sendo destinada ao inseto adulto; além disso, é recomendado o uso de mosquiteiros impregnados com inseticida e de repelentes principalmente nas áreas endêmicas, associados ao manejo ambiental, com melhorias nas condições de moradia e no saneamento básico. Tais estratégias têm como finalidade prevenir o contato entre o flebotomíneo e o ser humano na residência, interromper o ciclo de transmissão e, portanto, reduzir a probabilidade de infecção (Brasil, 2017; WHO, 2017; 2023; Pareyn *et al.*, 2025).

Da mesma forma, o controle do reservatório canino é complexo e necessita de uma abordagem integrada e adaptada à situação de cada local (WHO, 2010; 2023). A ideia de que todos os cães diagnosticados com a doença deveriam ser sacrificados é ultrapassada por razões éticas e por não ter demonstrado eficácia na contenção da infecção em vários países, incluindo o Brasil (WHO, 2010, Sevá *et al.*, 2016). Assim, as estratégias aplicadas priorizam a detecção e o tratamento de cães infectados, além da vacinação e do uso de coleiras impregnadas com deltametrina. Essa estratégia já se demonstrou eficaz na redução da leishmaniose visceral em

países como Itália, Tunísia e Brasil (Reithinger *et al.*, 2004, WHO, 2010). Ressalta-se que os medicamentos aplicados no tratamento da leishmaniose em humanos não devem ser usados para o tratamento da leishmaniose canina, pois não são eficazes e podem levar à resistência parasitária (WHO, 2010; 2023; Brasil, 2017; Oryan, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral representa um grave problema de saúde pública no Brasil, onde a progressiva urbanização e a expansão geográfica do vetor têm elevado o número de infecções por *L. infantum*. A ausência de vacina humana, as limitações das opções terapêuticas e os obstáculos ao controle do vetor e do reservatório canino reforçam a necessidade de compreender os mecanismos imunológicos que determinam o sucesso ou fracasso no controle da doença.

Os macrófagos ocupam papel central na leishmaniose, atuando, simultaneamente, como células hospedeiras do parasito e como células efectoras da resposta imunológica do hospedeiro. Embora o modelo de polarização seja bem estabelecido na literatura, o comportamento de *L. infantum* frente aos macrófagos diferenciados em fenótipos M1 e M2 permanece pouco explorado de forma comparativa e sistemática. Não está elucidado se a capacidade de infecção de *L. infantum*, pode variar em virtude do perfil funcional dos macrófagos.

De igual forma, não está claro se a polarização prévia dos macrófagos condiciona os mecanismos de evasão empregados por *L. infantum* para subverter as funções efectoras dos macrófagos M1, nem em que medida o parasito é capaz de repolarizá-los em direção ao perfil M2, comprometendo a produção de mediadores pró-inflamatórios vitais ao controle da infecção. Dessa maneira, percebe-se que a relação entre o perfil dos macrófagos e a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, após a infecção por *L. infantum*, possui implicações diretas e importantes na compreensão do desequilíbrio do eixo Th1/Th2, como observado em pacientes sintomáticos.

Assim, o presente estudo se justifica pela necessidade de expandir a compreensão dos mecanismos empregados por *L. infantum* na interação com macrófagos M1 e M2, contribuindo para o entendimento da imunopatogênese da leishmaniose visceral, inclusive nos casos de falhas terapêuticas, e subsidiando pesquisas futuras voltadas ao desenvolvimento de novas terapias para a doença.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o papel da *Leishmania infantum* na imunomodulação de macrófagos murinos de perfil M1 e M2 in vitro

3.2 Objetivos específicos:

- Induzir a diferenciação de macrófagos J774 em M1 e M2 in vitro.
- Determinar a taxa de infecção e a carga parasitária em macrófagos murinos J774 de perfil M1 e M2 infectados por *L. infantum*.
- Determinar a produção de TNF- α , IL-10 e IL-4 em macrófagos de perfil M1 e M2 infectados por *L. infantum*.
- Determinar a produção de NO em macrófagos de perfil M1 e M2 infectados por *L. infantum*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Polarização de macrófagos J774

A linhagem celular de macrófagos murinos J774, obtida do Instituto Gonzalo Moniz (Fiocruz-Bahia), foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 2 mM de L-glutamina e solução antibiótico-antimicótica a 1%, e incubada em estufa umidificada (Thermo Electron Corporation) a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Para a etapa de plaqueamento, os macrófagos foram centrifugados a 1.500 rpm, durante 10 min a 4°C, ressuspensos em 1 mL de meio RPMI suplementado e quantificados em câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para a concentração de 1×10^6 células/mL e distribuída em câmaras Lab-Tek de 8 poços em alíquotas de 300 µL (Thermo Scientific). As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C por 24h para adesão das células.

Decorrido esse período, foi realizada a polarização dos macrófagos. Para a indução do fenótipo M1, foi utilizado 1 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma) por 24 horas, ao passo que a indução do fenótipo M2 foi realizada utilizando 10 ng/mL de IL-4 por 24 horas (Brito Sousa *et al.*, 2020). Em ambos os casos, os estímulos foram diluídos em RPMI suplementado, e 300 µL de cada diluição foram adicionados aos respectivos poços previamente lavados para a remoção das células não aderidas, seguidos de incubação a 37 °C, 5% de CO₂ por 4 horas. As células não estimuladas constituíram o grupo controle, correspondendo ao fenótipo M0. Ao término desse período, as células foram lavadas duas vezes com solução salina estéril e utilizadas nos experimentos subsequentes.

4.2 Infecção dos macrófagos

A cultura de promastigotas de *Leishmania infantum* em fase estacionária de crescimento foi submetida à centrifugação a 2.500 rpm por 15 minutos a 4 °C, seguida pela contagem em câmara de Neubauer. A concentração de parasitos foi ajustada para 1×10^7 parasitos/mL em meio RPMI suplementado. A infecção dos macrófagos foi realizada na proporção de 10 parasitos para 1 macrófago, pela adição de 270 µL de meio RPMI suplementado e 30 µL da suspensão de parasitos por poço, seguida de incubação por 4 h. Após esse período, os poços foram lavados com 300 µL de salina estéril e receberam 300 µL de meio RPMI suplementado. As placas contendo os macrófagos infectados foram incubadas em estufa

a 37 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade por 24 e 48 horas. Ao término de cada período, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80 °C para posterior análise de citocinas e mediadores pró e anti-inflamatórios. As lâminas foram removidas das placas, coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) e analisadas em microscópio óptico para determinação da taxa de infecção e da carga parasitária dos macrófagos.

4.3 Determinação da taxa de infecção e da carga parasitária

Para quantificar a taxa de infecção e a carga parasitária de *L. infantum* nos diferentes perfis de macrófagos, as lâminas foram removidas das placas, coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich) e analisadas em microscópio óptico com aumento de 100× em óleo de imersão. Para a taxa de infecção, em cada lâmina foi determinado o número de macrófagos nos fenótipos M0, M1 e M2 infectados. Para a carga parasitária, em cada lâmina foi determinado o número de amastigotas por célula, nos fenótipos M0, M1 e M2. Em ambas as contagens se utilizou áreas com 100 macrófagos. Para a taxa de infecção, os resultados foram expressos como N° de macrófagos infectados/100 macrófagos. Já para os resultados da carga parasitária como N° de amastigotas/100 macrófagos.

4.4 Dosagem de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias

A dosagem dos níveis das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-4 obtidas dos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados por *L. infantum* foi realizada por meio da técnica ELISA, conforme as recomendações do fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA), nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção. Para isso, placas de 96 poços (Nunc-Immuno) foram sensibilizadas com anticorpo anti-citocina purificado (anticorpo de captura) por 12 a 18 horas. Em seguida, as placas foram lavadas com a solução de lavagem PBS + Tween 20 a 0,05%, bloqueadas com PBS acrescido de soro fetal bovino (SBF 10%) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse período, realizou-se nova lavagem com PBS + Tween 20 e foram adicionados 100 μ L das amostras e das diluições seriadas do padrão de citocinas para a elaboração da curva padrão. Todas essas diluições e amostras foram avaliadas em triplicata. A placa foi então incubada por um período de 2 horas em temperatura ambiente e submetida a nova lavagem. Após esse intervalo, o anticorpo de detecção conjugado à enzima peroxidase foi adicionado e a placa foi incubada por mais 1 hora em temperatura ambiente. Após isso, a placa foi novamente lavada, seguida pela adição do substrato e incubada por 30 minutos à temperatura

ambiente. A reação foi interrompida pela adição da solução de parada contendo ácido fosfórico (1:20). A absorbância foi mensurada em leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm, e os dados foram processados no software SoftMax v.5 (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.5 Determinação da produção de Óxido Nítrico

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela quantificação de nitrito por meio da reação de Griess. Para tanto, 100 µL do sobrenadante foram misturados a 100 µL do reagente de Griess, composto por 0,1% de dihidrocloreto de N-(1-naftil) etilenodiamida (NED), 1% de sulfanilamida e 5% de ácido fosfórico (H₃PO₄). As amostras dos sobrenadantes das culturas de macrófagos, junto com os reagentes de Griess, foram incubadas em placas de 96 poços por 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e a concentração de nitrito foi calculada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio, com uso do software SoftMax PRO (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA, USA), e os resultados expressos em µmol/mL.

4.6 Análise estatística

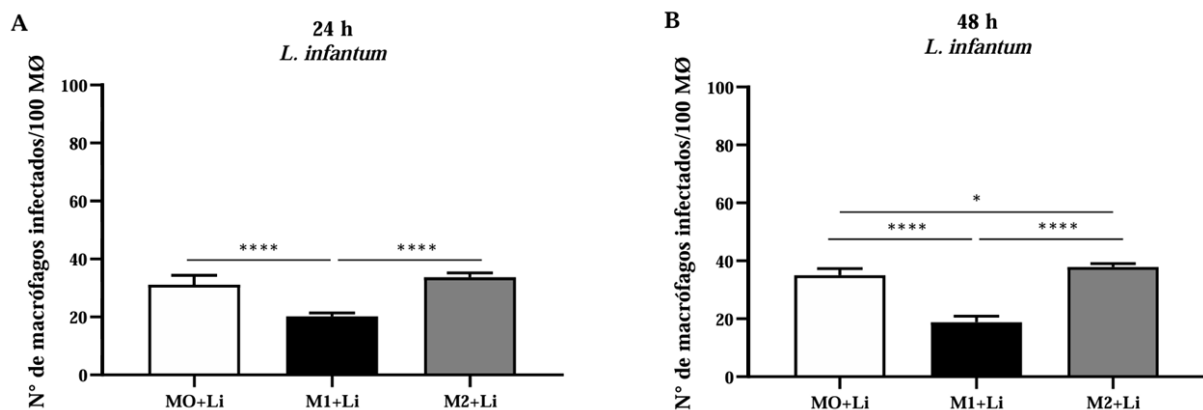
Para a comparação múltipla entre os grupos M0, M1 e M2, foi utilizada a Análise de Variância de uma via (one-way ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas com uso do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), com nível de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Taxa de infecção dos macrófagos infectados com *Leishmania infantum*

O grupo M1+Li apresentou, nas primeiras 24 horas, o menor valor de macrófagos infectados ($20,17 \pm 0,47$ macrófagos infectados/100 macrófagos), quando comparado aos valores dos grupos M0+Li ($31,14 \pm 1,22$ macrófagos infectados/100 macrófagos) e M2+Li ($33,71 \pm 0,56$ macrófagos infectados/100 macrófagos). Desse modo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li. Entretanto, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos M0+Li e M2+Li (Figura 6A). Após 48 horas de infecção, o grupo M1+Li permaneceu com a menor taxa de infecção ($18,75 \pm 0,75$ macrófagos infectados/100 macrófagos), ao passo que os grupos M0+Li e M2+Li apresentaram valores de $35,00 \pm 0,87$ macrófagos infectados/100 macrófagos e $37,86 \pm 0,95$ macrófagos infectados/100 macrófagos, respectivamente. Nesse cenário, houve diferenças estatisticamente significativas entre o grupo M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li. Além disso, observou-se diferença significativa entre os grupos M0+Li e M2+Li, diferentemente do que ocorreu em 24 h, com maior taxa de infecção no grupo M2+Li (Figura 6B). Checar se é em negrito ABNT

Figura 6 – Taxa de infecção dos macrófagos.

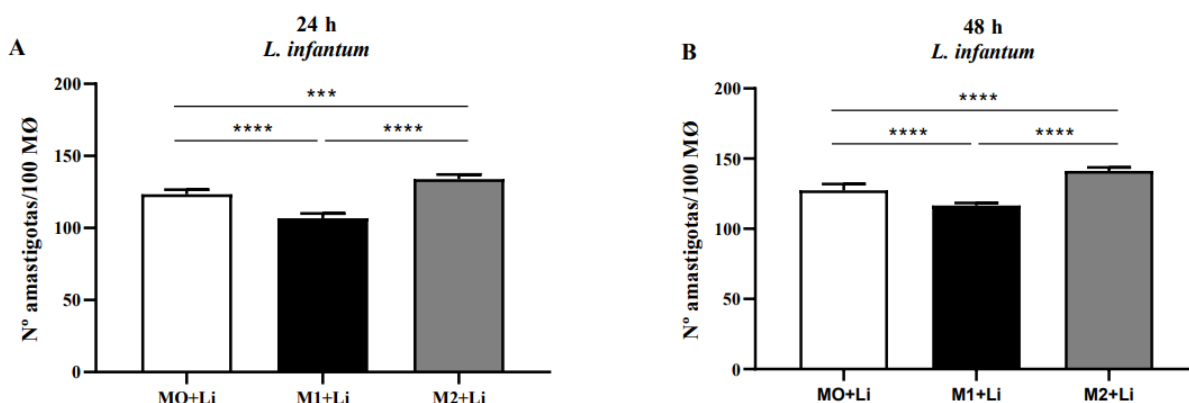


Fonte: Elaborado pelo autor. Taxa de infecção em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.2 Carga parasitária dos macrófagos infectados com *Leishmania infantum*

O grupo M1+Li apresentou a menor carga parasitária ($106,7 \pm 1,38$ amastigotas/100 macrófagos), no tempo de 24 h, valor este, inferior ao observado nos grupos M0+Li ($123,3 \pm 1,30$ amastigotas/100 macrófagos) e M2+Li ($133,5 \pm 1,30$ amastigotas/100 macrófagos). Foram observadas diferenças significativas entre o grupo M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li, bem como entre os grupos M0+Li e M2+Li, indicando maior carga parasitária no grupo M2+Li (Figura 7A). Além disso, após 48 horas, observou-se em todos os grupos um aumento da carga parasitária, em relação ao tempo de 24 h. Nesse contexto, o grupo M1+Li apresentou o menor número de amastigotas ($116,5 \pm 0,80$ amastigotas/100 macrófagos), seguido pelo grupo M0+Li ($127,3 \pm 1,85$ amastigotas/100 macrófagos), enquanto o grupo M2+Li apresentou a maior carga parasitária ($141,2 \pm 1,04$ amastigotas/100 macrófagos). Verificou-se, portanto, que as diferenças entre os grupos foram estatisticamente significativas, conforme indicado na Figura 7B.

Figura 7 – Carga parasitária dos macrófagos.



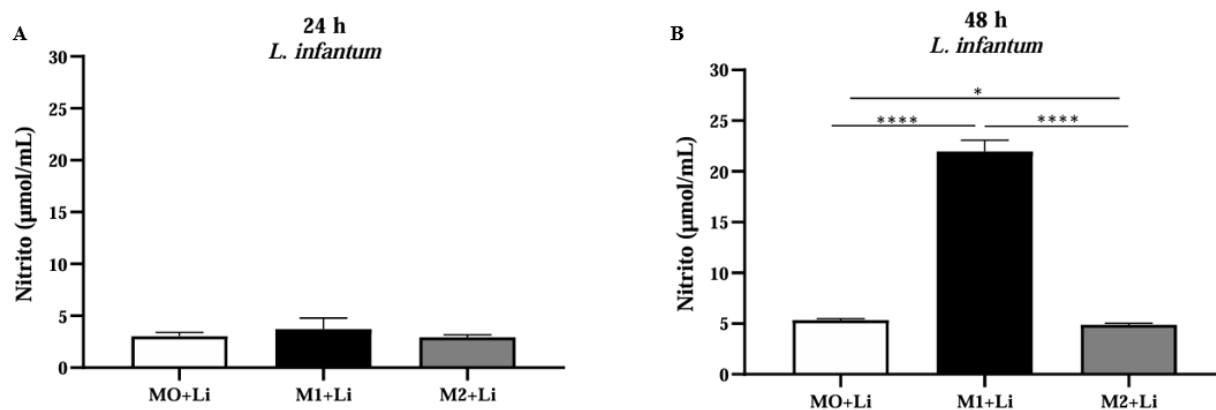
Fonte: Elaborado pelo autor. Carga parasitária em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.3 Produção de óxido nítrico em macrófagos infectados com *L. infantum*.

Os grupos M0+Li, M1+Li e M2+Li apresentaram valores de $3,01 \pm 0,13$ $\mu\text{mol/mL}$, $3,71 \pm 0,37$ $\mu\text{mol/mL}$ e $2,93 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/mL}$, respectivamente, em 24 h, sem apresentarem

diferenças estatisticamente significativas entre eles durante o período avaliado (Figura 8A). Em contraste, após 48 horas de infecção, o grupo M1+Li demonstrou aumento significativo na produção de nitrito ($21,95 \pm 0,40 \mu\text{mol/mL}$), em comparação aos grupos M0+Li ($5,33 \pm 0,05 \mu\text{mol/mL}$) e M2+Li ($4,87 \pm 0,05 \mu\text{mol/mL}$). Nesse mesmo intervalo de tempo, foram observadas diferenças estatisticamente significativas não só entre o grupo M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li, mas também entre os grupos M0+Li e M2+Li (Figura 8B).

Figura 8 - Níveis de óxido nítrico produzidos pelos macrófagos.



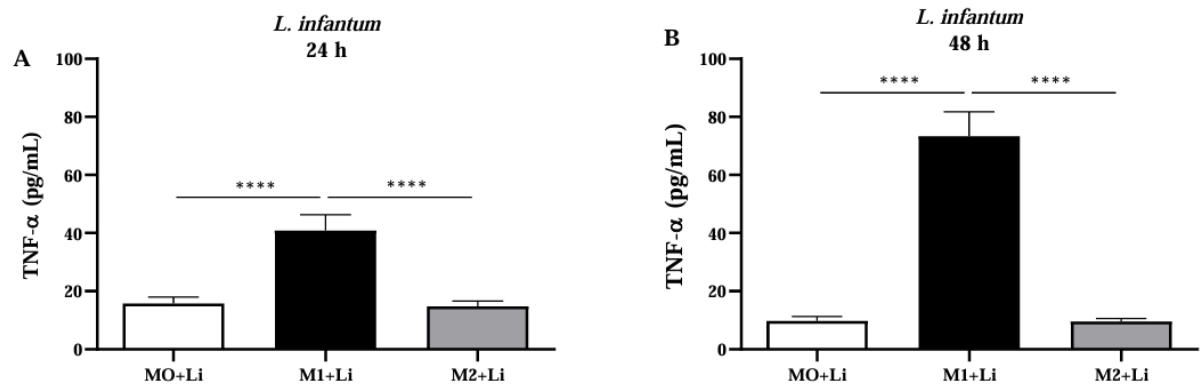
Fonte: Elaborado pelo autor. Níveis de óxido nítrico em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.4 Produção de TNF- α nos macrófagos infectados com *L. infantum*.

O grupo M1+Li apresentou concentração de TNF- α maior ($40,84 \pm 2,74 \text{ pg/mL}$) com 24 h, quando comparado aos grupos M0+Li ($15,80 \pm 1,09 \text{ pg/mL}$) e M2+Li ($14,77 \pm 0,91 \text{ pg/mL}$). Nesse sentido, foram identificadas diferenças significativas entre o grupo M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li. Todavia, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos M0+Li e M2+Li (Figura 9A). Após 48 h de infecção, o grupo M1+Li manteve os maiores níveis de TNF- α ($73,41 \pm 4,15 \text{ pg/mL}$), ao passo que os grupos M0+Li e M2+Li apresentaram concentrações de $9,81 \pm 0,74 \text{ pg/mL}$ e $9,57 \pm 0,52 \text{ pg/mL}$, respectivamente. Assim, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo

M1+Li e os grupos M0+Li e M2+Li, de modo que não se identificou diferença estatisticamente significativa entre os grupos M0+Li e M2+Li (Figura 9B).

Figura 9 - Níveis de TNF- α produzidos pelos macrófagos.

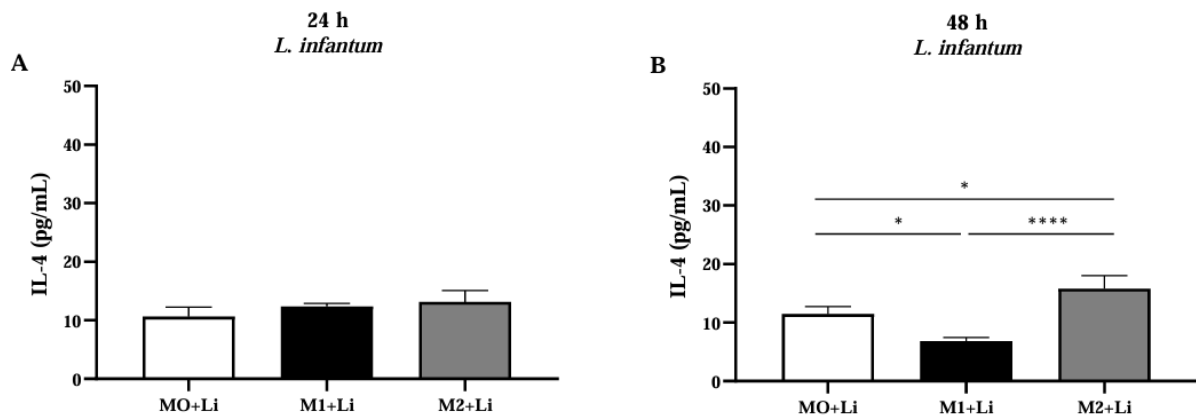


Fonte: Elaborado pelo autor. Níveis de TNF- α em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.5 Produção de IL-4 nos macrófagos.

Os grupos M0+Li, M1+Li e M2+Li apresentaram concentrações de $10,63 \pm 0,81$ pg/mL, $12,21 \pm 0,24$ pg/mL e $13,15 \pm 0,97$ pg/mL, respectivamente, com 24 h. Ainda que tenha sido observada uma tendência de aumento nos níveis de IL-4 no grupo M2+Li, não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos neste tempo de avaliação (Figura 10A). Após 48 h de infecção, os níveis de IL-4 foram de $11,46 \pm 0,72$ pg/mL no grupo M0+Li, $6,87 \pm 0,28$ pg/mL no grupo M1+Li e $15,83 \pm 1,08$ pg/mL no grupo M2+Li. Observou-se redução significativa da produção de IL-4 no grupo M1+Li quando comparado aos grupos M0+Li e M2+Li. Além disso, o grupo M2+Li apresentou níveis significativamente maiores de IL-4 em relação ao grupo M0+Li (Figura 10B).

Figura 10 - Níveis de IL-4 produzidos pelos.

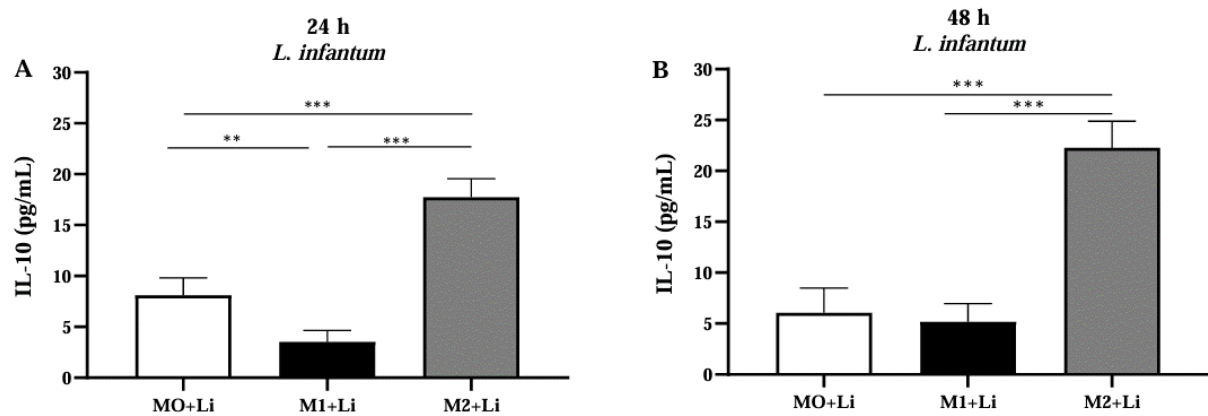


Fonte: Elaborado pelo autor. Níveis de IL-4 em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

5.6 Produção de IL-10 nos macrófagos.

No tempo de 24 h, os grupos M0+Li, M1+Li e M2+Li apresentaram concentrações de $8,09 \pm 0,86$ pg/mL, $3,50 \pm 0,56$ pg/mL e $17,74 \pm 0,90$ pg/mL, respectivamente. Observou-se que o grupo M2+Li apresentou os maiores níveis de IL-10, diferindo significativamente dos grupos M0+Li e M1+Li. Além disso, o grupo M1+Li apresentou níveis significativamente menores de IL-10 quando comparado ao grupo M0+Li (Figura 11A). Após 48 h de infecção, os grupos M0+Li, M1+Li e M2+Li apresentaram concentrações de IL-10 iguais a $6,05 \pm 2,17$ pg/mL, $5,19 \pm 0,88$ pg/mL e $22,25 \pm 1,31$ pg/mL, nessa ordem. O grupo M2+Li manteve os maiores níveis de IL-10, apresentando diferenças significativas em relação aos grupos M0+Li e M1+Li. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos M0+Li e M1+Li neste tempo de avaliação (Figura 11B).

Figura 11 - Níveis de IL-10 produzidos pelos macrófagos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Níveis de IL-10 em macrófagos J774 infectados com *L. infantum* nos tempos de 24 e 48 horas após infecção. M0+Li = macrófago não polarizado infectado com *L. infantum*. M1+Li = macrófago polarizado para o perfil M1 infectado com *L. infantum*. M2+Li = macrófago polarizado para o perfil M2 infectado com *L. infantum*. Os valores representam a média aritmética $\pm$ erro padrão da média, com nível de significância $p < 0,05$ (One-way ANOVA, pós-teste de Tukey).

6 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral resulta de uma interação dinâmica e multifatorial entre *Leishmania infantum* e o sistema imunológico do hospedeiro, na qual os macrófagos ocupam posição central, pois são, simultaneamente, o principal nicho intracelular do parasito e a principal célula fagocítica responsável por sua eliminação. Em um sistema imunológico complexo, a polarização dessas células aos perfis fenotípicos M1 e M2 tem, portanto, repercussões consideráveis sobre o controle ou a persistência da infecção, respectivamente (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que os macrófagos M1+Li apresentaram as menores taxas de infecção e as menores cargas parasitárias em ambos os tempos avaliados, sugerindo que a polarização para o fenótipo M1 favoreceu o estabelecimento de um ambiente intracelular hostil ao parasito. Esse controle foi acompanhado pela maior produção de TNF- α e óxido nítrico, achados compatíveis com o perfil funcional associado ao eixo Th1/M1. Embora IL-12 e IFN- γ não tenham sido avaliadas no presente estudo, a literatura demonstra que essas citocinas constituem os principais indutores da ativação clássica dos macrófagos e atuam sinergicamente com o TNF- α na amplificação da resposta imunológica e na resistência à infecção por *Leishmania* spp. (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019; Carneiro *et al.*, 2021; Ansari *et al.*, 2025). Em modelos resistentes à infecção por *L. infantum*, respostas associadas à produção simultânea de IFN- γ e TNF- α estão relacionadas à redução da carga parasitária e ao desenvolvimento de imunidade protetora (Pérez-Cabezas *et al.*, 2019), o que torna os elevados níveis de TNF- α observados no grupo M1+Li consistentes com esse papel imunomodulador.

Entre os mecanismos microbicidas empregados pelos macrófagos M1, a produção de óxido nítrico é considerada a principal estratégia imunológica no combate à leishmaniose visceral (Olekhnovitch e Bousso, 2015). No presente estudo, o grupo M1+Li apresentou os maiores níveis de NO, especialmente com 48 h, coincidindo com as menores taxas de infecção do período. O NO atua diretamente sobre as amastigotas intracelulares, interferindo na respiração mitocondrial, reduzindo a produção de ATP e promovendo danos oxidativos a proteínas, lipídios e ácidos nucleicos do parasito (Liew *et al.*, 1994; Olekhnovitch *et al.*, 2014).

Além disso, o NO pode difundir-se pelo microambiente celular, ampliando a atividade antiparasitária para células vizinhas infectadas (Olekhnovitch *et al.*, 2014). A relevância desse mediador para o controle parasitário é respaldada por diversas evidências experimentais. Liew *et al.* (1994) demonstraram que a inibição de NO reduz significativamente a atividade leishmanicida dos macrófagos. Por sua vez, um estudo de Gantt *et al.* (2001)

evidenciou que espécies reativas de nitrogênio e oxigênio atuam de forma complementar na destruição intracelular de *Leishmania*. Por fim, Ribeiro *et al.* (2020) observaram que monócitos humanos infectados por *L. infantum* apresentam aumento concomitante de TNF- α e NO associado ao controle da infecção. Em conjunto, esses achados reforçam que os elevados níveis de TNF- α e NO observados no grupo M1+Li contribuíram diretamente para a redução da taxa de infecção e da carga parasitária.

Em contraste, o grupo M2+Li apresentou as maiores taxas de infecção e cargas parasitárias, acompanhadas de aumento significativo de IL-10 e IL-4 e redução de TNF- α e NO. Os macrófagos M2 estão associados a mecanismos regulatórios, anti-inflamatórios e de reparo tecidual, frequentemente relacionados à suscetibilidade à leishmaniose visceral (Maspi *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2023). Nesse contexto, IL-10 e IL-4 não representam apenas marcadores funcionais do perfil M2, mas atuam diretamente na retroalimentação negativa dos mecanismos efetores responsáveis pela eliminação do parasito (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Lodi *et al.*, 2024).

A citocina IL-10 destaca-se como um dos principais mediadores envolvidos na progressão da leishmaniose visceral. Sua sinalização promove ativação da STAT3 e reduz a expressão de moléculas associadas à resposta inflamatória, incluindo mediadores essenciais para a indução de iNOS e produção de NO (Murray *et al.*, 2002; Kupani *et al.*, 2021). Nesse sentido, Verma *et al.* (2010) demonstraram correlação positiva entre níveis elevados de IL-10 e aumento da carga parasitária em pacientes com LV ativa. Além disso, Mesquita *et al.* (2018) evidenciaram, em modelo murino transgênico, que a superexpressão precoce de IL-10 durante infecção por *L. donovani* suprimiu o desenvolvimento de células T CD4⁺ em Th1 e reduziu a razão IFN- γ /IL-10, estabelecendo um microambiente permissivo à progressão parasitária com maior carga no baço e no fígado. Murray *et al.* (2002) complementaram esses achados ao demonstrar que o bloqueio da sinalização de IL-10 resultou em maior expressão de IL-12, IFN- γ e iNOS, com controle acelerado da infecção. Em pacientes humanos com LV, Kupani *et al.* (2021) observaram que níveis elevados de IL-10 estavam associados ao aumento da atividade da arginase, resultando em supressão da produção de NO. Adicionalmente, Cardoso *et al.* (2021) demonstraram, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, que o bloqueio do receptor de IL-10 reduziu significativamente a infectividade do parasito e aumentou a produção de TNF- α , corroborando com os achados do presente estudo.

Além de seu papel como marcador do perfil M2, a elevada produção de IL-10 observada no grupo M2+Li pode refletir mecanismos imunomoduladores explorados por *L. infantum* para favorecer sua sobrevivência intracelular, tendo em vista a possibilidade de o

parasito explorar circuitos regulatórios do hospedeiro, estimulando a produção de IL-10 e comprometendo a ativação de respostas efetoras dependentes do eixo Th1/M1 (Nylen & Sacks, 2007; Toepp & Petersen, 2020). Castelli *et al.* (2019) acrescentaram que a liberação de exossomos por *L. infantum* é capaz de induzir aumento da produção de IL-10 em macrófagos infectados, sugerindo que os altos índices dessa citocina no grupo M2+Li podem não representar apenas uma consequência da polarização alternativa, mas também um mecanismo ativo de evasão imunológica mediado pelo próprio parasito.

Em conjunto com IL-10, a citocina IL-4 também exerceu papel relevante na permissividade à infecção. O grupo M2+Li apresentou aumento dessa citocina concomitantemente ao aumento da carga parasitária e à redução de NO, especialmente após 48 h. A sinalização mediada por IL-4 ativa a via STAT6 e promove a expressão de genes característicos do fenótipo M2, incluindo a arginase-1 (Biswas *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2023).

Vouldoukis *et al.* (1997) demonstraram que IL-10 e IL-4 reduzem significativamente a capacidade leishmanicida de macrófagos humanos, principalmente por interferirem nos mecanismos dependentes de NO. Biswas *et al.* (2011) refinaram essa compreensão ao demonstrarem que IL-10, apesar de não induzir arginase-1 de forma independente, atua sinergicamente com IL-4 por meio de uma cascata STAT3-dependente que amplifica a expressão do receptor IL-4R α , potencializando a sinalização via STAT6/CEBP β para a indução de arginase-1 e desviando o metabolismo da L-arginina da via iNOS/NO para a via da arginase.

Assim, a concomitante elevação de IL-10 e IL-4 no grupo M2+Li sugere que a maior carga parasitária observada não resulta apenas da redução dos mecanismos efetores, mas da combinação entre supressão inflamatória e estabelecimento de condições metabólicas favoráveis à replicação parasitária, fenômeno coerente com o modelo atualmente aceito para a progressão da leishmaniose visceral (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2023; Ansari *et al.*, 2025).

Adicionalmente, os resultados indicam que, para os parâmetros de taxa de infecção, carga parasitária e produção de NO, o grupo M0+Li apresentou um comportamento mais próximo ao observado em M2+Li do que em M1+Li, sugerindo que, na ausência de um estímulo polarizador pró-inflamatório, os macrófagos permanecem relativamente permissivos ao estabelecimento e à sobrevivência de *L. infantum*. Essa observação levanta a hipótese de que a ativação clássica dos macrófagos seja determinante para o desenvolvimento de mecanismos efetores capazes de restringir a infecção.

Por fim, é válido destacar que, em um hospedeiro mamífero, a coexistência dos mecanismos pró-inflamatórios (via Th1/M1) e regulatórios (via Th2/M2) representa uma característica fundamental da resposta imune frente à leishmaniose visceral. As respostas regulatórias são essenciais para limitar o dano tecidual provocado pela inflamação excessiva. O problema surge quando esse equilíbrio é deslocado em favor dos mecanismos anti-inflamatórios, favorecendo a sobrevivência e a multiplicação de *L. infantum* no interior dos macrófagos (Almeida *et al.*, 2023; Lodi *et al.*, 2024).

Nesse sentido, os dados do presente estudo são compatíveis com a hipótese de que *L. infantum* seja capaz de explorar e potencializar o microambiente imunológico associado ao perfil M2, amplificando a produção de IL-10 e IL-4 possivelmente por meio de mecanismos imunomoduladores, o que comprometeria a manutenção da resposta leishmanicida. No entanto, dado o delineamento *in vitro* do estudo, não é possível afirmar se *L. infantum* é capaz de repolarizar ativamente macrófagos com fenótipo M1 estabelecido em direção ao perfil M2, o que constitui uma limitação relevante e uma questão a ser investigada em estudos futuros.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a polarização de macrófagos para os perfis M1 e M2 in vitro é determinante na resposta imune à infecção por *Leishmania infantum*. Macrófagos M1 apresentaram maior capacidade leishmanicida, sustentada pela produção elevada de óxido nítrico e TNF- α , enquanto macrófagos M2 mostraram-se permissivos à infecção, com maior carga parasitária associada ao aumento de IL-10 e IL-4. Macrófagos M0, por sua vez, exibiram perfil mais próximo ao observado em M2, reforçando a relevância da ativação clássica para a contenção do parasito. Em conjunto, esses achados reforçam a centralidade do eixo M1/M2 na imunopatogênese da leishmaniose visceral e apontam sua modulação como via promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

REFERÊNCIAS

- ABADIÁS-GRANADO, I. *Leishmaniasis* cutánea y mucocutánea. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, [S.L.], v. 112, n. 7, 2021. DOI: 10.1016/j.ad.2021.02.008.
- ABBAS, A. K. *et al*, **Imunologia Celular e Molecular**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023. E-book. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595158924/>. Acesso em: 20 mar. 2026.
- AKHOUNDI, M. *et al*. Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 6, 2016. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004770.
- ALENCAR, L. S. *et al*. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana no Nordeste brasileiro entre 2013 e 2022: um problema de subnotificação? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 27, n. 1. P. 103529, 2023. DOI: 10.1016/j.bjid.2023.103529.
- ALIZADEH, Z. *et al*. Unraveling the role of natural killer cells in *Leishmaniasis*. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 114, p. 109596, 2023. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109596.
- AL-KAEEBI, S. R. A. *et al*. Gene Expression Profile of Virulence Factors of *Leishmania infantum* During Developmental Phases. **J. Anim. Health Prod**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 722-731, 2025.
- ALMEIDA, F. S. *et al*. *Leishmaniasis*: Immune Cells Crosstalk in Macrophage Polarization. **TropicalMed**, [S.L.], v. 8, n. 5, p. 276, 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8050276.
- ALVAR, J. *et al*. *Leishmaniasis* Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS One**, [S.L.], v. 7, n. 5 p. 35671, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035671.
- ALVAR, J. *et al*. The Relationship between *Leishmaniasis* and AIDS: the Second 10 Years. **Clin Microbiol Rev**, [S.L.], v. 21, n. 2, 2008. DOI: 10.1128/cmr.00061-07.
- ALVAR, J. *et al*. Towards the elimination of visceral *Leishmaniasis* as a public health problem in east Africa: reflections on an enhanced control strategy and a call for action. **The Lancet Global Health**, [S.L.], v. 9, n. 12 p. 1763-1769, 2021. DOI: 10.1016/S2214-109X(21)00392-2.
- ALVES, F. *et al*. Recent Development of Visceral *Leishmaniasis* Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clin Microbiol Rev**, [S.L.], v. 31, n. 4, p. 30, 2018. DOI: 10.1128/cmr.00048-18.
- ANDRADE, Y. M. F. S. *et al*. Arachidonic Acid Metabolism and HETEs-PGs Imbalance in *L. infantum* Infection: Implications for Visceral *Leishmaniasis* Progression. **ACS Omega**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 43767-43778, 2025. DOI: 10.1021/acsomega.5c04179.
- ANDREANI, G. *et al*. *Leishmania infantum* Amastigotes Trigger a Subpopulation of Human B Cells with an Immunoregulatory Phenotype. **PLoS Negl Trop Dis**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. e0003543, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003543.

ANSARI, Z. *et al.* Comprehensive insights into *Leishmaniasis*: From etiopathogenesis to a novel therapeutic approach. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 204, n. 107535, 2025. DOI: 10.1016/j.micpath.2025.107535.

ANTONIA, A. L. *et al.* Variation in *Leishmania* chemokine suppression driven by diversification of the GP63 virulence factor. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 10, n. 10, p. e0009224, 2021. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009224.

ARGUETA-DONOHUÉ, J. *et al.* *Leishmania mexicana*: Participation of NF- κ B in the differential production of IL-12 in dendritic cells and monocytes induced by lipophosphoglycan (LPG). **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 120, n. 1, p. 1-9, 2008. DOI: 10.1128/IAI.01447-08.

ASSIS, R. R. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 1-11, 2012.

ASSOLINI, J. *et al.* Nanomedicine in *Leishmaniasis*: A promising tool for diagnosis, treatment and prevention of disease - An update overview. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 923, p. 174934, 2022. DOI: 10.1016/J.EJPHAR.2022.174934.

ATAYDE, V. D. *et al.* *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, [S.L.], v. 309, p. 7-18, 2016. DOI: 10.1016/j.cellimm.2016.07.013.

ATRI, C. *et al.* Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **IJMS**, [S.L.], v. 19, n. 6, p. 1801, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061801.

AYALA, A. *et al.* Advances in *Leishmania* Vaccines: Current Development and Future Prospects. **Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 812, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13090812.

BISWAS, A. *et al.* Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4Ra is required for induction of arginase 1 in visceral *Leishmaniasis*. **Eur. J. Immunol**, [S.L.], v. 41, p. 992–1003, 2011. DOI: 10.1002/eji.201040940.

BACELLAR, O.; CARVALHO, M. E. Immunopathogenesis of Visceral *Leishmaniasis*. **Gaz. méd. Bahia**, Salvador, Bahia, v. 1, n. 75, p. 24-34, 2005.

BOHR, R. *et al.* Cytokine saga in visceral *Leishmaniasis*. **Cytokine**, [S.L.], v. 147, n. 1, p. 155322, 2021. DOI: 10.1016/j.cytok.2020.100041.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. 120 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerall.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 189 p. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf.

BRITO SOUSA, K. *et al.* Differential expression of inflammatory and anti-inflammatory mediators by M1 and M2 macrophages after photobiomodulation with red or infrared lasers. **Lasers Med Sci**, [S.L.], v. 35, p. 337-343, 2020. DOI: 10.1007/s10103-019-02817-1.

BRUNETTO, F. *et al.* Piperine and its derivatives as a therapeutic alternative against *Leishmaniasis*: A comprehensive review. **European Journal of Pharmacology**, [S.L.], v. 1010, 2026. DOI: 10.1016/j.ejphar.2025.178413.

BURZA, S. CROFT, S. L.; BOELAERT, M. *Leishmaniasis*. **The Lancet**, [S.L.], v. 392, n. 10151, p. 951-970, 2018.

CARDOSO, J. M. O. *et al.* IL-10 receptor blockade controls the in vitro infectivity of *Leishmania infantum* and promotes a Th1 activation in PBMC of dogs with visceral *Leishmaniasis*. **Molecular Immunology**, [S.L.], v. 137, p. 20-27, 2021. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.06.014.

CARNEIRO, M. B. *et al.* Regulation of macrophage subsets and cytokine production in *Leishmaniasis*. **Cytokine**, [S.L.], v. 147, p. 155309, 2021. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155309.

CARVALHO, L. P *et al.* Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal *Leishmaniasis* patients. **Scand J Immunol**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 337-342, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2005.01581.x.

CASTELLI, G. *et al.* Exosome secretion by *Leishmania infantum* modulate the chemotactic behavior and cytokine expression creating an environment permissive for early infection. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 198, p. 39-45, 2019. DOI: 10.1016/j.exppara.2019.01.014.

CAVALCANTE, K. *et al.* Epidemiological Aspects and High Magnitude of Human Visceral *Leishmaniasis* in Ceará, Northeast of Brazil, 2007–2021. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], 2022. DOI: 10.1590/0037-8682-0684-2021.

CEARÁ. Secretaria de Saúde do Ceará. **Boletim Epidemiológico: Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral nº.01**. 2025. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/Boletim-LV-2024_1-.pptx.pdf.

CHAVES, M. M; *et al.* Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in *Leishmaniasis*. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 9, n. 489, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1781-1.

CHAVES, O. *et al.* Elucidation of the interaction between human serum albumin (HSA) and 3,4-methylenedioxyde-6-iodo-benzaldehyde-thiosemicarbazone, a potential drug for *Leishmania amazonensis*: Multiple spectroscopic and dynamics simulation approach. **Journal of Molecular Liquids**, [S.L.], v. 310, p. 113117, 2020. DOI: 10.1016/J.MOLLIQ.2020.113117.

CHEN, S. *et al.* Macrophages in immunoregulation and therapeutics. **Sig Transduct Target Ther**, [S.L.], v. 8, n. 207, 2023. DOI: 10.1038/s41392-023-01452-1.

CHURISO, G. *et al.* Minimally Invasive Microbiopsies as an Improved Sampling Method for the Diagnosis of Cutaneous *Leishmaniasis*. **Open Forum Infectious Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 9, 2020. DOI: 10.1093/ofid/ofaa364.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. Leishmanioses do continente americano. **FIOCRUZ**, Rio de Janeiro. p. 511, 2014. DOI: 10.7476/9788575415689.

CONDE, L. *et al.* Humoral response in *Leishmaniasis*. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, [S.L.], v. 12, p. 1063291, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.1063291.

CONTRERAS, I. *et al.* *Leishmania*-Induced Inactivation of the Macrophage Transcription Factor AP-1 Is Mediated by the Parasite Metalloprotease GP63. **Plos Pathogenes**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. e1001148, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001148.

COSTA, D. L. *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**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. e965, 2011. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000965.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gaz. méd**, Bahia, v. 75, n. 1. P. 3-17, 2008. Disponível em: <https://gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/view/346>. Acesso em: 07 fev. 2026.

COSTA-DA-SILVA, A. C. *et al.* Immune Responses in *Leishmaniasis*: an overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 54, 2022.

DE ARAÚJO, M. *et al.* Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 176, p. 46-51, 2017. DOI: 10.1016/J.EXPPARA.2017.02.004.

DE FIGUIREDO, A B. *et al.* Purinergic signaling and infection by *Leishmania*: A new approach to evasion of the immune response. **Biomedical Journal**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 244-250, 2016. DOI: 10.1016/j.bj.2016.08.004.

DE MELO, C. V. B. *et al.* Splenic Transcriptional Responses in Severe Visceral *Leishmaniasis*: Impaired Leukocyte Chemotaxis and Cell Cycle Arrest. **Front. Immunol**, [S.L.], v. 12, p. 716314, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.716314.

DE MENEZES, J. P. *et al.* The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 9, n. 264, p. 812, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1540-3.

DEAK, E. *et al.* Murine visceral *Leishmaniasis*: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. **European Journal of Immunology**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 1355-1368, 2010. DOI: 10.1002/eji.200939455.

DESJEUX, P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 305-318, 2024. DOI: 10.1016/j.cimid.2004.03.004.

DESTÁLOVÁ, A; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites Vectors**, [S.L.], v. 5, n. 576, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-276.

DIRKX, L. *et al.* Effect of *Leishmania infantum* infection on B cell lymphopoiesis and memory in the bone marrow and spleen. **The FASEB Journal**, [S.L.], v. 38, n. 16, p. e23893, 2024. DOI: 10.1096/fj.202400715R.

DIVENUTO, F. *et al.* Role of Treg, Breg and other cytokine sets in host protection and immunopathology during human *Leishmaniasis*: Are they potential valuable markers in clinical settings and vaccine evaluation? **Acta Tropica**, [S.L.], v. 240, 2023. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.106849.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 31-36, 2002. DOI: 10.1093/jac/49.suppl_1.31.

ELMAHALLAWY, E. K. *et al.* Host immune response against *Leishmaniasis* and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 139, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111671.

ESPINOZA-HICKS, J. *et al.* Novel prenyloxy chalcones as potential leishmanicidal and trypanocidal agents: Design, synthesis and evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 167, p. 402- 413, 2019. DOI: 10.1016/J.EJMECH.2019.02.028.

FONTES, J.L. M. *et al.* An integrated analysis of the structural changes and gene expression of spleen in human visceral *Leishmaniasis* with and without HIV coinfection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [S.L.], v. 4, n. 6, p. e0011877, 2024. DOI: 10.1371/journal.pntd.0011877.

FORESTIER, C.L. *et al.* *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [S.L.], v. 4, 2015. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00193.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania* chagasi. **J Imuno**, [S.L.], v. 167, n. 2, p. 893-901, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.167.2.893.

GHAFOURI-FARD, S. *et al.* The impact of non-coding RNAs on macrophage polarization. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 142, p. 112112, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112112.

Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2023 (GBD 2023) Results. **Institute for Health Metrics and Evaluation**. Disponível em: <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>. Acesso em 20 jan. 2026.

GONÇALVES, R. *et al.* Humoral immunity in *Leishmaniasis* – Prevention or promotion of parasite growth? **Cytokine: X**, [S.L.], v. 2, n. 4, p. 100046, 2020. DOI: 10.1016/j.cyttox.2020.100046.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. leishmaniose tegumentar americana. **Soc. Sutiãs. Med. Tropa**, [S.L.], v. 36, n. 1, 2003. DOI: 10.1590/S0037-86822003000100011.

GONTIJO, V. S. *et al.* *In vivo* evaluation of anti-*Leishmania* activity of alkyltriazoles and alkylphosphocholines by oral route. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 226-227, n. 108123, 2021. DOI: 10.1016/j.exppara.2021.108123.

GOTO, Y.; MIZOBUCHI, H Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. **Parasitology International**, [S.L.], v. 94, p. 102738, 2023. DOI: 10.1016/j.parint.2023.102738.

GOTOH, T.; MORI, M. Arginase II Downregulates Nitric Oxide (NO) Production and Prevents NO-mediated Apoptosis in Murine Macrophage-derived RAW 264.7 Cells. **J Cell Biol**, [S.L.], v. 144, n. 3, p. 427- 434, 1999. DOI: 10.1083/jcb.144.3.427.

HU, S. *et al.* The role of monocytes in models of infection by protozoan parasites. **Molecular Immunology**, [S.L.], v. 88, p. 174-184, 2017. DOI: 10.1016/j.molimm.2017.06.020.

IBRAIM, I.C. *et al.* Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 6, n. 54, 2013. DOI: 10.1186/1756-3305-6-54.

INIESTA, V. *et al.* Arginase I Induction during *Leishmania major* Infection Mediates the Development of Disease. **Infection and Immunity**, [S.L.], v. 73, n. 9, p. 6085- 6090, 2005. DOI: 10.1128/iai.73.9.6085-6090.2005.

KANE, M. M.; MOSSER. D. M. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in *Leishmaniasis*. **The Journal of Immunology**, [S.L.], v. 166, n. 2, p. 1441-1147, 2001. DOI: 10.4049/jimmunol.166.2.1141.

KATO, H. *et al.* Epidemiology of *Leishmaniasis*: Risk factors for its pathology and infection. **Parasitology International**, [S.L.], v. 105, 9. 102999, 2025. DOI: 10.1016/j.parint.2024.102999.

KAYE, P. M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral *Leishmaniasis*. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 201, n. 1, p. 239-253, 2004. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2004.00188. x.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, [S.L.], v. 17, n. 3, p. 279-289, 1999.

KOBETS, K. *et al.* Novel Loci Controlling Parasite Load in Organs of Mice Infected With *Leishmania major*, Their Interactions and Sex Influence. **Microbial Immunology**, [S.L.], v. 10, p. 1083, 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01083.

- KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**, 10^a ed, Rio de Janeiro, GEN Guanabara Koogan, 2023. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788595159174/>. Acesso em: 25 mar. 2026.
- KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Kumar Patologia Básica**, 11^a ed., Rio de Janeiro, GEN Guanabara Koogan, 2025. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9786561110143/>. Acesso em: 25 mar. 2026.
- KUMARI, D. *et al.* Virulence factors of *Leishmania* parasite: Their paramount importance in unraveling novel vaccine candidates and therapeutic targets. **Life Sciences**, [S.L.], v. 306, p. 120829, 2022. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120829.
- KUPANI, M. *et al.* IL-10 and TGF- β Induced Arginase Expression Contributes to Deficient Nitric Oxide Response in Human Visceral *Leishmaniasis*. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [S.L.], v. 10, p. 614165, 2021. DOI: 10.3389/fcimb.2020.614165.
- LAMPIASI, N. *et al.* The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. **BioMed Research International**, [S.L.], v. 2016, n. 1, p. 9089610, 2016. DOI: 10.1155/2016/9089610.
- LENTINI, G. *et al.* Intracellular Parasites: Kinetoplastids. **Ber Encyclopedia of Cell Biology**, [S.L.], v. 3, p. 371- 385, 2009. DOI: 10.1016/B978-0-12-821618-7.00074-2.
- LESTINOVA, T. *et al.* Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 7, 2017. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005600.
- LIEW, F. Y. *et al.* Regulation of nitric oxide synthesis in infectious and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, [S.L.], n. 43, p. 95-98, 1994.
- LIU, D. *et al.* *Leishmania major* Phosphoglycans Influence the Host Early Immune Response by Modulating Dendritic Cell Functions. **Infect Immun**, [S.L.], v. 77, n. 8, p. 3272- 3283, 2009. DOI: 10.1128/IAI.01447-08.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. *The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response*. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, [S.L.], v. 2, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00083.
- LODI, L. *et al.* Immune response to viscerotropic *Leishmania*: a comprehensive review. **Parasite Immunology**, [S.L.], v. 15, p. 1402539, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1402539.
- LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. The role of monocytes/macrophages in *Leishmania* infection: A glance at the human response. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 207, p. 105456, 2020. DOI: 10.1016/j.actatropica.2020.105456.
- LUPI, O. *et al.* Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S.L.], v. 60, n. 6, p. 897-925, 2009. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.03.004.

MADUSANKA, R. K. *et al.* Treatment of Cutaneous *Leishmaniasis* and Insights into Species-Specific Responses: A Narrative Review. **Infect Dis Ther**, [S.L.], v. 11, p. 695-711, 2022. DOI: 10.1007/s40121-022-00602-2.

MANDAL, A. *et al.* L-Arginine Uptake by Cationic Amino Acid Transporter Promotes Intra-Macrophage Survival of *Leishmania donovani* by Enhancing Arginase-Mediated Polyamine Synthesis. **Front. Immunol**, [S.L.], v. 8, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00839.

MASPI, N. *et al.* Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous *Leishmaniasis*: a review. **Pathogens and Global Health**, [S.L.], v. 8, 2017. DOI: 10.1080/20477724.2016.1232042.

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. **Medical Microbiology and Immunology**, [S.L.], v. 110, n. 6, p. 247-260, 2016. DOI: 10.1186/1756-3305-5-160.

MAURÍCIO, I. L. Taxonomia da *Leishmania*. **Springer**, [Bruschi, F., Gradoni, L. (eds) As Leishmanioses: Doenças Tropicais Antigas e Negligenciadas], v. 36, n. 1, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-72386-0_2.

MCNEELY, T. B. *et al.* Inhibitory effects on protein kinase C activity by lipophosphoglycan fragments and glycosylphosphatidylinositol antigens of the protozoan parasite *Leishmania*. **The Biochemical Journal**, [S.L.], v. 259, n. 2, p. 601- 604, 1989.

MELO, S. N. *et al.* Spatio-temporal relative risks and priority areas for visceral *Leishmaniasis* control in Brazil, between 2001 and 2020. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 242, 2023. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.106912.

MESQUITA, I. *et al.* The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral *Leishmaniasis*. **Cytokine**, [S.L.], v. 112, p. 16-20, 2018. DOI: 0.1016/j.cyto.2018.07.001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **Leishmaniose: Saúde lança painéis para monitorar Leishmanioses no Brasil**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 21 jan. 2026.

MIRZAEI, A. *et al.* A historical review of the role of cytokines involved in *Leishmaniasis*. **TropicalMed**, [S.L.], v. 145, p. 155297, 2021. DOI: 10.1016/j.cyto.2020.155297.

MONTES DE OCA, M. *et al.* Cytokines and splenic remodelling during *Leishmania donovani* infection. **Cytokine**: [S.L.], v. 2, n. 4, p. 100036, 2020. DOI: 10.1016/j.cyttox.2020.100036.

MUNDER, M. *et al.* L-Arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. **Immunity to infection**, [S.L.], v. 39, n. 8, p. 2161- 2172, 2009. DOI: 10.1002/eji.200839041.

MURRAY, H. W. *et al.* Interleukin-10 (IL-10) in Experimental Visceral *Leishmaniasis* and IL-10 Receptor Blockade as Immunotherapy. **Infection and Immunity**, [S.L.], v. 70, n. 11, p. 6284–6293, 2002. DOI: 10.1128/IAI.70.11.6284–6293.2002.

NEVES, B. M. *et al.* Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and Impairment of Nuclear Factor- κ B. **The American Journal of Pathology**, [S.L.], v. 177, n. 6, p. 2898-2911, 2010.

NHARWAL, L. *et al.* Emerging trends and Innovative strategies for the diagnosis of *Leishmaniasis*: A quantum leap from classical to modern era. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 270, n. 107820, 2025. DOI: 10.1016/j.actatropica.2025.107820.

NUNES, A. P. *et al.* Under pressure: Updated insights into the mechanisms of *Leishmania*'s defense in response to oxidative stress. **Life Sciences**, [S.L.], v. 377, p. 123779, 2025. DOI: 10.1016/j.lfs.2025.123779.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral *Leishmaniasis*. **Trends in Immunology**, [S.L.], v. 8, n. 9, 2007. DOI: 10.1016/j.it.2007.07.004.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends in Parasitology**, [S.L.], v. 31, n. 12, 2015. DOI: 10.1016/j.pt.2015.08.001.

OLEKHNOVITCH, R. *et al.* Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. **J Clin Invest**, [S.L.], v. 124, n. 4, p. 1711-1722, 2014. DOI: 10.1172/JCI72058.

OLIVEIRA, D. K. F. Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica: Dossiê Temático Doenças infecciosas e Parasitárias**, [S.L.], v. 23, n. 2, 2021. DOI: 10.46551/ruc.v23n2a03.

OLIVEIRA, I. R. H. *et al.* Assessing the effects of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *L. (L.) amazonensis* infections in macrophages using a quantitative proteome approach. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 243, p. 108413, 2022. DOI: 10.1016/j.exppara.2022.108413.

OMACHI, S. *et al.* B-cell activating factor deficiency suppresses splenomegaly during *Leishmania donovani* infection. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 489, n. 4, p. 528-533, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.06.005.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose: Relatório Epidemiológico para as Américas. Nº 13, dezembro de 2025.** (2025). Disponível em: <https://iris.paho.org/items/2c3f6729-277a-438c-a342-dcc8bcb37742>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Leishmaniose: Relatório Epidemiológico para as Américas. Nº 14, dezembro de 2024.** (2024). Disponível em: https://iris.paho.org/handle/10665.2/63165_2.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas.** 2ª edição. Washington, DC: OPAS; 2022. DOI: 37774/9789275725030.

ORUCHO, V. O. *et al.* Diagnostic techniques for visceral *Leishmaniasis*: An overview of methods used in East Africa. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S.L.], v. 111, n. 3, 2025. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2024.116655.

ORYAN, A. *et al.* Emerging role of amiodarone and dronedarone, as antiarrhythmic drugs, in treatment of *Leishmaniasis*. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 185, p. 34-41, 2018. DOI: 10.1016/J.ACTATROPICA.2018.04.022.

ORYAN, A.; AKBARY. M. Worldwide risk factors in *Leishmaniasis*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.L.], v. 9, n. 10. p.925-932, 2016. DOI: 10.1016/j.apjtm.2016.06.021.

PAIXÃO, A.R. *et al.* Investigating the Phagocytosis of *Leishmania* using Confocal Microscopy. **Immunology and Infection**, [S.L.], n. 173, p. e62459, 2021. DOI: 10.3791/62459.

PALACIOS, G. *et al.* Evolving immunometabolic response to the early *Leishmania infantum* infection in the spleen of BALB/c mice described by gene expression profiling. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 247, p. 107005, 2023. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.107005.

PANDEY, S. *et al.* Chemotherapy of *Leishmaniasis* part II: Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as anti-*Leishmanial* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 40, p. 751-756, 2005. DOI: 10.1016/j.ejmech.2005.02.007.

PAREYN, M. *et al.* An integrative approach to identify sand fly vectors of *Leishmaniasis* in Ethiopia by morphological and molecular techniques. **Parasites Vectors**, [S.L.], v. 13, n. 580, 2020. DOI: 10.1186/s13071-020-04450-2.

PAREYN, M. *et al.* *Leishmaniasis*. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 11, n. 81, DOI: 10.1038/s41572-025-00663-w.

PATEL, U. *et al.* Macrophage polarization in response to epigenetic modifiers during infection and inflammation. **Drug Discovery Today**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 186- 193, 2017. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.08.006.

PEREIRA-FILHO, A. A. *et al.* Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of C4bBP, a complement regulatory protein, and probably by the action of GP63 on C4b molecules deposited on parasite surface. **Acta Tropica**, [S.L.], v. 242, p. 106908, 2023. DOI: 10.1016/j.actatropica.2023.106908.

PÉREZ-CABEZAS, B. *et al.* Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral *Leishmaniasis* Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [S.L.], v. 9, n. 30, 2019. DOI: 10.3389/fcimb.2019.00030.

PETERSON, A.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous *Leishmaniasis* in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **International Journal for Parasitology**, [S.L.], v. 33, n. 9, p. 919-931, 2003. DOI: 10.1016/S0020-7519(03)00094-8.

PORTA, C. *et al.* Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. **Seminars in Immunology**, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 237- 248, 2015. DOI: 10.1016/j.smim.2015.10.003.

POULAKI, A. *et al.* Effects of Visceralising *Leishmania* on the Spleen, Liver, and Bone Marrow: A Pathophysiological Perspective. **Microorganisms**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 759, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9040759.

PRATES, D. B; *et al.* *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 90, n. 3, p. 575- 582, 2011. DOI: 10.1189/jlb.0211105.

QUINTELA-CARVALHO, G. *et al.* *Leishmania infantum* Defective in Lipophosphoglycan Biosynthesis Interferes With Activation of Human Neutrophils. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, [S.L.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.788196.

RABHI, S. *et al.* Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. e0148640, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0148640.

RAHIM, S.; KARIM. M. M. The Elimination Status of Visceral *Leishmaniasis* in Southeast Asia Region. **Acta Parasitologica**, [S.L.], v. 69, p. 1704-1716, 2024. DOI: 10.1128/cmr.00061-07.

RATH, M. *et al.* Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. **Front. Immunol**, [S.L.], v. 5, n. 532, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532.

REGLI, I. B. *et al.* Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. **Microbial Immunology**, [S.L.], v. 8, p. 1558, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01558.

REIMÃO, J. Q. *et al.* Laboratory Diagnosis of Cutaneous and Visceral *Leishmaniasis*: Current and Future Methods. **Microorganisms**, [S.L.], v. 8, n. 11. p. 1632, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8111632.

REITHINGER, R. *et al.* Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral *Leishmaniasis* in Brazil? **International Journal for Parasitology**, [S.L.], v. 34, n. 1. p.55-52, 2004. DOI: 10.1016/j.ijpara.2003.09.006.

REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous *Leishmaniasis*. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 7, n. 9. p.581-596, 2007. DOI: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8.

REY, L. **Parasitologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. E-book. Disponível em: <https://app.minhabiblioteca.com.br/reader/books/978-85-277-2027-4/pageid/375>. Acesso em: 20 jan. 2026.

RIBEIRO, C. V. *et al.* *Leishmania infantum* induces high phagocytic capacity and intracellular nitric oxide production by human proinflammatory monocyte. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 115, p. e190408, 2020. DOI: 10.1590/0074-02760190408.

RIBEIRO DA SILVA, R.C. *et al.* Occurrence of Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) in Urban *Leishmaniasis* Transmission Foci in North-Eastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, [S.L.], v. 56, n. 1, p. 247–253, 2019. DOI: 10.1093/jme/tjy182.

RIOS-BARROS, L. V. *et al.* Chapter Seven - *Leishmania* plasma membrane – general composition, structure and biological functions. **Current Topics in Membranes**, [S.L.], v. 95, p. 215-247, 2025. DOI: 10.1016/bs.ctm.2025.06.009.

ROATT, B. M. *et al.* Recent advances and new strategies on *Leishmaniasis* treatment. **Appl Microbiol Biotechnol**, [S.L.], v. 104, p. 8965-8977, 2020. DOI: 10.1007/s00253-020-10856-w.

RODRIGUES, A. V. *et al.* Zoonotic Visceral *Leishmaniasis*: New Insights on Innate Immune Response by Blood Macrophages and Liver Kupffer Cells to *Leishmania infantum* Parasites. **Biology**, [S.L.], v. 11, n. 9, 2022. DOI: 10.3390/biology11010100.

RODRIGUES, V. *et al.* Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 9, n. 118, 2016. DOI: 10.1186/s13071-016-1412-x.

ROHOŠOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, [S.L.], v. 53, p. 161- 171, 2006.

ROLÃO, N. *et al.* *Leishmania infantum*: Mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, [S.L.], v. 115, n. 3, p. 270-276, 2007. DOI: 10.1016/j.exppara.2006.09.013.

SALGUERO, F. J. *et al.* Histopathological and immunohistochemical characterisation of hepatic granulomas in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice: a time-course study. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 11, n. 73, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2624-z.

SALOMÓN, O. D. *et al.* *Leishmaniasis* and climate change-Case study: Argentina. **Journal of Tropical Medicine**, [S.L.], 2012. DOI: 10.1155/2012/601242.

SCORZA, B. M. *et al.* Cutaneous manifestations of human and murine *Leishmaniasis*. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 6, p. 1296, 2017. DOI: 10.3390/ijms18061296.

SERAFIM, T. D. *et al.* *Leishmaniasis*: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, [S.L.], v. 37, n. 11, 2021. DOI: 10.1016/j.pt.2021.07.003.

SERAFIM, T. D.; INIGUEZ, E.; OLIVEIRA, F. *Leishmania infantum*. **Trends In Parasitology**, [S.L.], v. 36, n. 1, p. 80-81, 2020.

SEVÁ, P. A. *et al.* Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral *Leishmaniasis* in Brazil. **PLOS One**, [S.L.], v. 9, n. 11. p.925-932, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0162854.

- SHEIKH, S, Y. *et al.* A review on potential therapeutic targets for the treatment of *Leishmaniasis*. **Parasitology International**, [S.L.], 2024. DOI: 10.1016/j.parint.2024.102863.
- SHIO, M. T. *et al.* Host Cell Signalling and *Leishmania* Mechanisms of Evasion. **The Biochemical Journal**, [S.L.], p. 1- 14, 2011. DOI: 10.1155/2012/819512.
- SICA, A. *et al.* Macrophage plasticity and polarization in liver homeostasis and pathology. **Hepatology**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 2034-2042, 2013. DOI: 10.1002/hep.26754.
- SILVA-ALMEIDA, M. S. *et al.* Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors**, [S.L.], v. 5, n. 160, 2012. DOI: 10.1186/1756-3305-5-160.
- SINGH, B. *et al.* *Leishmania donovani* infection-driven high levels of IL-10 causes hypoalbuminemia in human visceral *Leishmaniasis*. **Cytokine**, [S.L.], v. 193, p. 156981, 2025. DOI: 10.1016/j.cyto.2025.156981.
- SOLANO-GÁLVEZ, S. G. *et al.* Artemisinin: An Anti-*Leishmania* Drug that Targets the *Leishmania* Parasite and Activates Apoptosis of Infected Cells. **Archives of Medical Research**, [S.L.], v. 55, n. 6, p. 103041, 2024. DOI: 10.1016/j.arcmed.2024.103041.
- SOUSA, J. *et al.* Anti *Leishmanial* activity of 2-amino-thiophene derivative SB-200. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 123, p. 113117, 2023. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110750.
- SUKHUMAVASI, W. *et al.* Liver- and Spleen-Specific Immune Responses in Experimental *Leishmania martiniquensis* Infection in BALB/c Mice. **Front. Vet. Sci**, [S.L.], v. 8, p. 794024, 2021. DOI: 10.3389/fvets.2021.794024.
- TEIXEIRA-NETO, R. G. *et al.* Canine visceral *Leishmaniasis* in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites Vectors**, [S.L.], v. 7, n. 485, 2014. DOI: 10.3390/pathogens13060455.
- TENNENBAUM, J. *et al.* Dysfonction splénique au cours de la drépanocytose: mise au point. **La Revue de Médecine Interne**, [S.L.], v. 44, n. 7, p. 335-343, 2023. DOI: 10.1016/j.revmed.2023.01.005.
- TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, [S.L.], v. 130, p. 19-25, 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.02.004.
- TOMIOTTO-POLLISSIER, F. *et al.* Macrophage Polarization in *Leishmaniasis*: Broadening Horizons. **Front. Immunol**, [S.L.], v. 10, p. 2529, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02529.
- TOUN, F. F. *et al.* Treatment of New World cutaneous *Leishmaniasis* – a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, [S.L.], v. 47, n. 2, p. 109-124, 2018. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2008.03417. x.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, [S.L.], v. 28, n. 8, p. 335-344, 2012. DOI: 10.1016/j.pt.2012.05.002.

VOULDOSKIS, I. *et al.* Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **Eur. J. Immuno**, [S.L.], v. 27, p. 860-865, 1997.

VAN GRIENSVEN, J. *et al.* Visceral *Leishmaniasis*: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infectious Disease Clinics of North America**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 79-99, 2019. DOI: 10.1016/J.IDC.2018.10.005.

VERNA, S. *et al.* Quantification of Parasite Load in Clinical Samples of *Leishmaniasis* Patients: IL-10 Level Correlates with Parasite Load in Visceral *Leishmaniasis*. **PLoS ONE**, [S.L.], v. 5, n. 4, p. e10107, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0010107.

VILAS-BOAS, D. *et al.* Global Distribution of Canine Visceral *Leishmaniasis* and the role of the Dog in the Epidemiology of the Disease. **Pathogens**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 455, 2024. DOI: 10.3390/pathogens13060455.

WANASEN, N. *et al.* L-Arginine and Cationic Amino Acid Transporter 2B Regulate Growth and Survival of *Leishmania amazonensis* Amastigotes in Macrophages. **Infection and Immunity**, [S.L.], v. 75, n. 6, p. 2802- 2810, 2007. DOI: 10.1128/iai.00026-07.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Controle das leishmanioses: OMS TRS Nº 949**. (2010). Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-TRS-949>. Acesso em: 06 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Vector Control Response 2017-2030**. (2017). Disponível em: <https://www.who.int/teams/control-of-neglected-tropical-diseases/Leishmaniasis/vector-control>. Acesso em: 06 fev. 2026.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. (2024). Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Leishmaniasis>. Acesso em: 20 jan. 2026.

YANNICK, O. A.; MUELLER, S. N. Splenic stromal niches in homeostasis and immunity. **Nature Reviews Immunology**, [S.L.], v. 23, p. 705-719, 2023. DOI: 10.1038/s41577-023-00857-x.

YASMIN, H. *et al.* Host–Pathogen Interaction in *Leishmaniasis*: Immune Response and Vaccination Strategies. **Immuno**, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 218-254, 2022. DOI: 10.3390/immuno2010015.

ZAHO, X. *et al.* Rapid and reliable detection of *Leishmania* antibodies in canine serum with double-antigen sandwich homogeneous chemical luminescence. **Parasites Vectors**, [S.L.], v. 17, n. 323, 2024. DOI: 10.1186/s13071-024-06389-0.

ZAMORA-CHIMAL, J. *et al.* NKT cells in *Leishmaniasis*. **Immunobiology**, [S.L.], v. 222, n. 4, p. 641-646, 2017. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.11.014.

ZILBERSTEIN, D.; MYLER, P. Arginine sensing in intracellular parasitism of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, [S.L.], v. 64, p. 41- 46, 2021. DOI: 10.1016/j.mib.2021.09.003.