

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

KAROLINE CAMILA VALERIANO

Avaliação dos desfechos de infecção *in vitro* e em modelo experimental no hamster com diferentes isolados clínicos de *Leishmania infantum*.

Ribeirão Preto
2022

KAROLINE CAMILA VALERIANO

Avaliação dos desfechos de infecção *in vitro* e em modelo experimental no hamster com diferentes isolados clínicos de *Leishmania infantum*.

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos.

Coorientador: Gabriane Nascimento Porcino.

Ribeirão Preto
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Valeriano, Karoline Camila

Avaliação dos desfechos de infecção *in vitro* e em modelo experimental no hamster com diferentes isolados clínicos de *Leishmania infantum*, Ribeirão Preto, 2021.

135 p f.

Dissertação de Mestrado, apresentada a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/ USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Santos, Isabel Kinney Ferreira de Miranda.

Coorientador: Porcino, Gabriane Nascimento

Versão corrigida

1. Leishmaniose visceral 2. Cepas clínicas 3. Infecção 4. Hamster *Mesocricetus auratus*
4. Glicosilação.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de Paulo para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dra. Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos.

Instituição: Universidade de São Paulo.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Washington Luis Conrado dos Santos

Instituição: Universidade Federal da Bahia.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Alexandre Babosa Reis

Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por sempre me acompanhar. Sem a sua presença seria impossível continuar e chegar até onde cheguei. Agradeço a Ele por me proporcionar força, proteção, principalmente durante as idas e vindas ao laboratório durante pandemia de COVID-19. Por me confortar e acalmar em momentos difíceis e de desespero e por nunca me deixar desistir mesmo errando em alguns momentos.

Aos meus pais, José Clério e Meire, e minha irmã Karine, pelo incentivo, apoio, amor e confiança. Obrigada pela compreensão, pela paciência e pela minha educação, que sempre foi priorizada mesmo em situações difíceis.

Aos meus tios Vania, Amadeu, Marco, Marcia e Gustavo, avós João, Maria Hilda, Belchor e Coladir e a toda minha família pelo apoio, compreensão e pelos incontáveis incentivos.

A minha professora orientadora Dra. Isabel K. F. M. Santos pelas conversas, conselhos e confiança depositadas em mim. Muito obrigada professora pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de estudo e por sempre me desafiar, o conhecimento que adquiri com a senhora jamais será esquecido.

A minha coorientadora Dra. Gabriane Nascimento Porcino, por ter me escolhido como técnica de seu trabalho, o que me proporcionou entrar no mestrado, pela amizade, ajuda, conselhos, paciência e pelas incontáveis reuniões para tirar dúvidas, nunca esquecerei do seu comprometimento com meu trabalho, sempre seremos a dupla “Pink e Cérebro”.

Ao Prof. Dr. Carlos e suas alunas Amanda Miranda e Natália, da Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelas reuniões online, sugestões e disponibilidade das cepas.

Ao meu primo engenheiro químico, Henrique Valeriano, pela paciência e dedicação em me ajudar em alguns procedimentos químicos.

Aos meus amigos do departamento de imunologia, que nunca negaram reagentes em épocas de escassez de material e pelo auxílio com equipamentos, experimentos, pela amizade, paciência e apoio. A Isabela Daher, Alex Moraes, Nathalia Serra, Ana Julia Bittar, Matheus Dias, Pedro Tanaka, Aline Carvalho, Ualter Cipriano, Matheus Fuji, Thales Galdino, Luiza Cunha, Sabrina Martins, Giseli Furlan, Thais Fraga, Maria Claudia Silva, Jefferson Elias, Jhefferson Guimarães, Osvaldo Campos, Fernanda Mesquita, Cleyson Oliveira, Ítalo Souza, Joseana de Oliveira, Andressa Fisch e Tamara Rodrigues.

Aos funcionários e técnicos Denise Ferraz, Ana Flávia, Rubilan Quionero, Olinda Mara, Wander Ribeiro, Rosi, Maria Ivone Fonseca, Ronaldo Campanini pela ajuda com alimentação para os animais, equipamentos e experimentos.

Aos técnicos de laboratório Wendy Martins, Izaira Brandão e Thiago Malardo pelo suporte técnico, pela amizade, conselhos e paciência em me ajudar na procura de reagentes e em experimentos.

Em especial, a técnica Dorlei Santos, pelo amor, amizade, apoio e ajuda no laboratório.

A Ana Cristine, secretária da pós-graduação, pela preocupação e auxílio durante a minha jornada como mestranda.

Aos alunos da Profa. Dra. Sandra Maruyama Alex, Luana Rogério, Nayori T. K. do departamento de imunogenética da Universidade de São Carlos (UFSCAR), que mesmo em pandemia não mediram esforços para me ajudar em experimentos.

Aos meus professores de disciplinas e do Programa de Imunologia Básica e Aplicada, Prof. Dr. Lucio Gama, Profa. Dra. Vânia Deperon Bonato, Prof. Dra Beatriz Ferreira, Prof. Dr. Marcelo Baruffi, Profa. Dra Daniela Carlos, Prof. Dr. João Santana, Prof. Dr. Geraldo Aleixo e a Profa. Dr. Flávia Karina os conhecimentos transmitidos por vocês foram fundamentais para o meu aprendizado em imunologia.

A minha amiga Isabela Mello, pela amizade, paciência, palavras de incentivo, conselho, compreensão e pela força em períodos de desânimo. Obrigada pelas horas de conversa durante o jantar, por sempre me ouvir e me questionar ao mesmo tempo, por me ajudar com os reagentes, contas e experimentos. Sua presença todos os dias foram fundamentais para o meu crescimento intelectual, pessoal e profissional.

Ao meu amigo Mateus Guilherme, pela amizade, paciência em momentos de estresse, pelos conselhos, pelas risadas em momentos de tensão e por me ajudar com experimentos e a cuidar dos meus animais.

Ao pós-doutorando Mauricio Pena, pela amizade, pelo auxílio em experimentos, pela paciência, apoio, compreensão e por sempre me ajudar com algumas dúvidas. Sua paixão por *Leishmania* nunca será esquecida.

A banca avaliadora pela participação e pela disponibilidade.

Agências de fomentos, coordenação de aperfeiçoamento pessoal de nível superior CAPES CNPq e FAPESP, juntamente com a USP e a todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho, que me proporcionaram a oportunidade de possuir pós-graduação, meus sinceros agradecimentos.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo”.

Winston Churchill

RESUMO

VALERIANO, K.C. **Avaliação dos desfechos de infecção *in vitro* e em modelo experimental no hamster com diferentes isolados clínicos de *Leishmania infantum*.** 2022. Tese (Mestrado) - Imunologia Básica e Aplicada – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, o qual é transmitido, durante o repasto sanguíneo, pelo inseto fêmea flebotomíneo contaminado. A doença possui um período de incubação assintomático com duração variável, podendo resultar em doença ativa e, se não tratada, pode ser fatal. A liberação de múltiplas citocinas e moléculas inflamatórias conhecido como “tempestade de citocinas” é uma característica comum à LV, no entanto, as alterações no perfil de N-glicana da porção Fc de IgG já foi uma característica relacionada à gravidade da doença. Neste estudo o objetivo foi caracterizar a infecção de diferentes cepas clínicas de *Leishmania* chamadas 1686, 1851, 515, 1580 oriundas da infecção de humanos diagnosticados com LV, e a cepa de referência NCL IOCL 3241; *in vitro* com macrófagos de linhagem J774 e *in vivo* com hamster *Mesocricetus auratus*. No pico de crescimento de cada cepa macrófagos J774 foram infectados com taxa de infecção avaliada em 24, 48 e 72 horas. *In vivo*, hamsters foram infectados por via intracardíaca e eutanasiados quando apresentaram perda de 20% do peso corporal e/ou sinais clínicos sugestivos de LV. Posteriormente soro, fígado e baço foram coletados para titulação, análise de glicanas em IgG total, carga parasitária por diluição limitante e qPCR, verificação do parasito por cPCR, “imprint”, quantificação de citocinas por qPCR e alterações anatopatológicas nos órgãos. Nossos resultados mostraram que a maior taxa de infecção *in vitro* foi com a cepa 1686; já *in vivo* a cepa 1686, 1580 e 1851 induziram sinais clínicos graves nos animais com alterações histológicas, macroscópicas e alta quantidade de anticorpos, com taxa de sobrevivência de 0%, 25% e 20%, respectivamente. A cepa 1580 induziu os primeiros sinais clínicos nos animais e apresentou maior carga parasitária em diluição limitante, entretanto a cepa 1686 induziu sinais clínicos em todos os animais com aumento da taxa de infecção em qPCR e alteração patológicas em fígado e baço. Já as cepas NCL IOCL 3241 e 80% dos hamsters infectados com a cepa 515 permaneceram assintomáticos; embora em todos infectados com 515 foi possível observar amastigotas em “imprint” de fígado e baço, enquanto os infectados com NCL IOCL 3241 mostraram apenas vacúolos parasitóforos vazios. Ambos os grupos tiveram alteração na glicosilação nos anticorpos desses animais. Desta forma, a cepa 1686 levou a um quadro clínico grave com maior infectividade tanto *in vitro* como *in vivo*, enquanto a cepa de referência NCL IOCL 3241 apresentou baixa infecção *in vitro* e apenas casos assintomáticos; e com diminuição na sialilação e fucosilação de IgG total. Além disso a baixa expressão de citocinas IL- 1 β hepática parece estar relacionada com a sintomatologia da LV. Por fim, reafirmamos a utilização do hamster como modelo experimental e a utilização de novas cepas como ferramentas de estudos da patologia da doença. E, para maior aprofundamento do estudo, sugerimos a duplicação do experimento e aplicação de técnicas mais sensíveis para análise das glicanas em IgG.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral, cepas clínicas, infecção, hamster *Mesocricetus auratus*, glicosilação.

ABSTRACT

VALERIANO, K.C. **Evaluation of infection outcomes in vitro and in an experimental model in hamsters with different clinical isolates of *Leishmania infantum***. 2022. Basic and Applied Immunology – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Visceral leishmaniasis (VL) is a serious disease caused by the protozoan *Leishmania infantum*, which is transmitted, during the blood meal, by the infected female sandfly insect. The disease has an asymptomatic incubation period of variable duration, which can result in active disease and, if untreated, can be fatal. The release of multiple cytokines and inflammatory molecules known as “cytokine storm” is a common feature of VL, however, changes in the N-glycan profile of the Fc portion of IgG was once a feature related to the severity of the disease. In this study, the objective was to characterize the infection of different clinical strains of *Leishmania* called 1686, 1851, 515, 1580 arising from the infection of humans diagnosed with VL, and the reference strain NCL IOCL 3241; *in vitro* with J774 lineage macrophages and *in vivo* with the hamster *Mesocricetus auratus*. At the peak of growth of each strain, J774 macrophages were infected with an infection rate assessed at 24, 48 and 72 hours. *In vivo*, hamsters were infected intracardially and euthanized when they showed a 20% loss of body weight and/or clinical signs suggestive of VL. Subsequently, serum, liver and spleen were collected for titration, analysis of glycans in total IgG, parasite load by limiting dilution and qPCR, verification of the parasite by cPCR, “imprint”, quantification of cytokines by qPCR and anatomopathological changes in the organs. Our results showed that the highest *in vitro* infection rate was with strain 1686; *in vivo* strains 1686, 1580 and 1851 induced severe clinical signs in animals with histological and macroscopic alterations and high amount of antibodies, with a survival rate of 0%, 25% and 20%, respectively. Strain 1580 induced the first clinical signs in animals and presented higher parasite load in limiting dilution, however strain 1686 induced clinical signs in all animals with increased infection rate in qPCR and pathological changes in liver and spleen. On the other hand, strains NCL IOCL 3241 and 80% of hamsters infected with strain 515 remained asymptomatic; although in all infected with 515 it was possible to observe amastigotes in liver and spleen imprint, while those infected with NCL IOCL 3241 showed only empty parasitophorous vacuoles. Both groups had alterations in glycosylation in the antibodies of these animals. Thus, strain 1686 led to a severe clinical picture with greater infectivity both *in vitro* and *in vivo*, while the reference strain NCL IOCL 3241 showed low infection *in vitro* and only asymptomatic cases; and with a decrease in sialylation and fucosylation of total IgG. Furthermore, the low expression of hepatic IL-1 β cytokines seems to be related to VL symptoms. Finally, we reaffirm the use of the hamster as an experimental model and the use of new strains as tools for studying the pathology of the disease. And, for further study, we suggest the duplication of the experiment and application of more sensitive techniques for analysis of glycans in IgG.

Key words: Visceral leishmaniasis, clinical strains, infection, *Mesocricetus auratus* hamster, glycosylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura I -	Microscopia eletrônica das formas de <i>Leishmania sp.</i>	18
Figura II -	Esquema representativo do ciclo biológico da Leishmaniose.....	20
Figura III-	Esquema representativo do sistema imunológico em resposta a infecção por <i>Leishmania</i>	23
Figura IV-	Estrutura esquemática de imunoglobulina IgG1.....	35
Figura V-	Delineamento experimental da infecção <i>in vivo</i>	45
Figura 1-	Curvas de crescimento de diferentes cepas clínicas.....	64
Figura 2-	Identificação de família <i>Trypanosomatidae</i> e gênero <i>Leishmania</i> nas formas promastigotas das cepas de estudo por cPCR.....	65
Figura 3-	Identificação da espécie <i>Leishmania infantum</i> em formas promastigotas das diferentes cepas do estudo por cPCR.....	66
Figura 4-	Índice de infecção de macrófagos de linhagem J774 infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania infantum</i> analisados após 24, 48 e 72 horas.....	67
Figura 5-	Presença de ácido siálico e fucose em antígeno NCL IOCL 3241 e avaliação da capacidade de deglicosilação da enzima GlycINATOR....	68
Figura 6-	Hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de estudo.....	71
Figura 7 -	Pesagem dos hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectado com uma das diferentes cepas de estudo.....	73
Figura 8-	Curva de sobrevivência de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas do estudo.....	74
Figura 9-	Macroscopia de fígado de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectado com diferentes cepas de estudo.....	76
Figura 10-	Macroscopia de baço de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectado com diferentes cepas de estudo.....	76
Figura 11-	“Imprint” de fígado e baço de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de estudo.....	78

Figura 12-	Diluição limitante de fígado e baço dos hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de estudo para análise da carga parasitária.....	79
Figura 13-	Identificação de <i>Leishmania infantum</i> em amostras de DNA de fígado e baço de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as cepas de estudo utilizando os iniciadores Linfseq31 pela técnica cPCR.....	81
Figura 14-	Curva padrão referente ao gene de DNA de <i>Leishmania infantum</i>	82
Figura 15-	Carga parasitária de órgãos de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com diferentes cepas de estudo analisadas por qPCR.....	83
Figura 16-	Titulação dos níveis de IgG total detectado em soro de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas.....	86
Fígura 17 -	Western blot de IgG total de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas clínicas de estudo e não infectados.	88
Figura 18-	Quantificação de IgG total de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas.....	89
Figura 19-	Histologia de fígado de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectado com os diferentes isolados clínicos e cepa de <i>Leishmania infantum</i>	91
Figura 20-	Histologia de baço de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectado com as diferentes cepas de estudo.....	92
Figura 21-	Expressão relativa de citocinas regulatória IL-4 e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , em células hepáticas e esplênicas dos hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de <i>Leishmania infantum</i>	93
Figura 22-	Expressão relativa de citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6, em células hepáticas e esplênicas dos hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de estudo.....	94
Figura 23-	Expressão relativa de citocina IL-1 β em células hepáticas de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com diferentes cepas de estudo.....	96
Figura 24-	Alterações de ácido siálico e fucose em IgG total de hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as cepas de estudo analisadas por ELLA.....	97

Figura 25-	Western blot de IgG total purificada de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados e não infectados para detecção de ácido siálico.....	99
Figura 26-	Western blot de IgG total purificada de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados e não infectados para detecção de fucose.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela I -	Sequência de iniciadores “forward e reverse”, Hsp70 específicos para identificação do gênero <i>Leishmania</i> e SSU específico para a família <i>Trypanosomatidae</i>	50
Tabela II -	Sequência de iniciadores (F) “forward”, (R) “reverse” e (P) “probe”-sonda de citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β expressas em células de fígado e baço de hamsters.....	55
Tabela 1-	Características das cepas de <i>Leishmania infantum</i> . PI: Piauí; MG: Minas Gerais; NR: não registrado.....	63
Tabela 2-	Sinais clínicos presentes nos hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as cepas de estudo <i>Leishmania infantum</i>	70
Tabela 3-	Análise macroscópica de fígado e baço de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as diferentes cepas de estudo.....	75
Tabela 4-	Análise qualitativa (cPCR) e quantitativa (qPCR) e LD de fígado.....	84
Tabela 5-	Análise qualitativa (cPCR) e quantitativa (qPCR) e LD de baço.....	85
Tabela 6-	Análise histopatológica de fígado e baço de hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) infectados com as cepas de estudo.....	90
Tabela 7-	Diferença na expressão de citocinas de fígado e baço entre hamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>) sintomáticos e assintomáticos.....	95

LISTA DE SIGLAS

A	Ampéres
A2	Proteína A2
AMA	Amastigotas por macrófago infectado
APC	Células apresentadoras de antígenos
ARG	Arginase
Asn 297	Asparagina
B2M	β -2-Microglobulin
BCA	Ácido bicinconínico
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
C	Região carboxiterminal do anticorpo
C3b	Proteína C3b do sistema complemento
CDC	Citotoxicidade dependente de complemento
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CH	Cadeia pesada do anticorpo
CH2	Domínio 2 na porção Fc
CL	Cadeia leve do anticorpo
CpB	Cisteinase b
cPCR	Reação em cadeia da polimerase convencional
Ct	Limite de ciclo na PCR
CTL	Linfócitos T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 associada a linfócitos T citotóxicos
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Nucleotídeos
ELISA	Enzyme- linked Immunosorbent Assay, ensaio de imunoabsorção enzimática.
ELLA	Enzyme- linked lectin assay, ensaio de lectina ligada a enzima
F	“Foward”
Fab	Porção variável do anticorpo
Fator H	Fator regulador do sistema complemento
Fator I	Protease plasmática
Fc	Porção contante do anticorpo
FcRs	Receptores para porção Fc
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
gDNA	DNA genômico
GlcNAc	2 N-acetilglucosamina
GP63	Glicoproteínas- 63
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCL	Ácido clorídrico
HE	Corante hematoxilina e eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
iC3b	Proteína que inativa o C3b do sistema complemento
ID	Identificação

IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
II	Índice de infecção
IL-10	Interleucina- 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina- 12
IL-13	Interleucina- 13
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-4	Interleucina -4
IVIG	Imunoglobulina intravenosa
KCL	Cloreto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LRV	Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>
LRV	Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>
LV	Leishmaniose visceral
M1	Macrófago com ativação clássica
M2	Macrófago com ativação alternativa
MAC	Complexo de ataque a membrana
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MI	Macrófago infectado
MIP-1 β	Proteína-1 beta inflamatória de macrófagos
N	Região aminoterminal do anticorpo
NaCl	Cloreto de sódio
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killer
NLR	Receptores do tipo nod “nod like receptor”
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NNN	Novy-MacNeil-Nicolle
NO	Óxido nítrico
NP	Número de parasitos na maior diluição
P	“Probe”
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
pb	Pares de base
PBMC	Célula mononuclear do sangue periférico
PBS	Tampão de salina-fosfato
PBS-T	Tampão de salina-fosfato com tween
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Morte programada 1
PF	Peso do fragmento
PKC	Proteínas quinase C

PNA	Aglutinina de amendoim
POI	Peso do órgão inteiro.
PVA	Álcool polivinílico
R	“Reverse”
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Enzima que digere RNA
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão tris- acetato- EDTA
Tfh	Células foliculares
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TGF- β	Fator de crescimento transformador
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th17	Linfócitos T auxiliares do tipo 17
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TLR	Receptores do tipo toll “tolls like receptor”
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRIS	Tampão tris HCL e KCL
VH	Porção variável da cadeia pesada do anticorpo
VL	Porção variável da cadeia leve do anticorpo
VP	Vacúolos parasitóforos
V κ	Porção variável κ
V λ	Porção variável λ
W	Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Leishmania</i>	17
1.2 Aspectos gerais da epidemiologia da leishmaniose visceral	18
1.3 Ciclo de transmissão da <i>Leishmania</i>	19
1.4 Patogenia da leishmaniose visceral	20
1.5 Resposta imunológica na leishmaniose visceral.....	21
1.6 Diagnóstico e tratamento	26
1.7 Hamster <i>Mesocricetus auratus</i> como modelo experimental para LV.....	27
1.8 Fatores para o desenvolvimento da leishmaniose.....	29
1. 8. 1 Fatores relacionados ao parasito.....	29
1. 8. 2 Fatores relacionados ao hospedeiro.....	31
1. 8 .2 .1 Glicosilação de anticorpos.....	32
2 HIPÓTESE	37
3.0 OBJETIVO	38
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Modelo experimental, considerações éticas	41
4.2 Obtenção das cepas de <i>Leishmania infantum</i>	41
4.3 Curva de crescimento das cepas de <i>Leishmania infantum</i>	42
4.4 Cultura de macrófagos murinos J774.A1	42
4.5 Infecção <i>in vitro</i>	43
4.6 Infecção de hamsters <i>Mesocricetus auratus</i>	44
4.7 Esfregaço poe aposição “imprint”	46
4.8 Histologia	46
4.9 Diluição limitante (LD)	46
4.10 Extração de DNA de fígado e baço dos hamsters	47
4.11 Extração de DNA dos isolados clínicos de <i>L. infantum</i> e das cepas HUUFS14 e NCL IOCL 3241	48
4.12 Análise dos produtos por cPCR- PCR convencional	49
4.13 Análise das diferentes cepas por cPCR	50
4.14 Construção da curva padrão para PCR em tempo real (qPCR).....	51

4.15	Análise dos produtos por qPCR	52
4.16	Extração de RNA de fígado e baço de hamsters	52
4.17	Análise do qPCR das citocinas	53
4.18	Preparação de antígeno	56
4.19	Deglicosilação de antígeno de <i>Leishmania infantum</i>	56
4.20	“Enzyme linked immuno sorbent assay” - ELISA	58
4.21	Purificação de IgG total	58
4.22	“Enzyme-linked lectin assay” (ELLA)	60
4.23	Imodeteção das glicanas por <i>Western blot</i>	61
5	RESULTADOS	63
5.1	Características dos isolados clínicos	63
5.2	Curva de crescimento para determinar prazo de cada cepa para chegar em promastigotas infectivos	64
5.3	Identificação da família <i>Trypanosomatidae</i> , gênero leishmania e espécie <i>Leishmania infantum</i> por PCR	64
5.4	Infecção <i>in vitro</i>	66
5.6	Infecção experimental em hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo	68
5.7	Curva de sobrevivência dos hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo	72
5.8	Características macroscópicas do fígado e baço dos hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo e controle	74
5.9	Esfregação por aposição “imprint”	77
5.10	Diluição limitante- LD	79
5.11	Análise da presença de <i>Leishmania infantum</i> em fígado e baço de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo por PCR	79
5.12	Análise quantitativa da carga parasitaria no fígado e baço de animais infectados com as cepas de estudo por meio de qPCR	82
5.13	Associação entre a presença de leishmania, a carga parasitária por qPCR e LD	83
5.14	Diferença nos níveis de anticorpos no soro de hamsters infectados com as cepas de estudo analisado por ELISA	86
5.15	Análise de IgG total de soro de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo ..	86
5.16	Análise das alterações histopatológicas do fígado e baço de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo	89
5.17	Avaliação da alteração de citocinas no fígado e baço de hamsters infectados com as cepas de estudo	93
5.18	Diferença da expressão de citocinas entre as infecções assintomáticas e sintomáticas	95

5.19 Perfis de ácido siálico e fucose em IgG total de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo	96
5.20 Análise da presença de ácido siálico e/ou fucose em IgG total de hamsters infectados com diferentes cepas de estudo por Western blot	97
5.21 Análise estatística	101
7 CONCLUSÃO.....	113
8 REFERÊNCIAS	115

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania*

O parasito do gênero *Leishmania* é um protozoário pertencente à ordem Kinetoplastida da família *Trypanosomatidae*, responsável por um espectro de doenças chamadas leishmanioses, as quais apresentam manifestações clínicas diversas de acordo com a espécie (ROSS, 1903; PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012). O protozoário foi identificado no século XVIII, porém em 1903 foi nomeado como *Leishmania* por Ronald Ross, que encontrou relatos em 1900 dos pesquisadores Willian Leishman e Charles Donovan, em trabalhos independentes, de soldados portadores de calazar que apresentavam formas do parasita em esfregaços de baço (ROSS, 1903; KEAN *et al.*, 1978 apud COX, 2002).

O protozoário unicelular apresenta, como característica da família, um cinetoplasto que é estrutura encontrada dentro da mitocôndria (kDNA). A morfologia do parasito é distinta conforme o hospedeiro em que se encontra: no inseto vetor é encontrada a forma flagelada e no hospedeiro vertebrado a forma é aflagelada. A forma flagelada (Figura I) apresenta formato de célula alongada e flagelo único com grande mobilidade. Essa fase possui morfotipos diferentes chamadas de promastigotas procíclicas, nectomonas, leptomonas, haptomonas, paramastigotas e metacíclicas, todas encontradas no inseto e são classificadas de acordo com seu desenvolvimento e migração da região de estômago para a proboscíte, amadurecendo de procíclica para metaciclíca, que é a fase infectante do parasito. Já a forma aflagelada, chamada amastigota, é intracelular com morfologia de célula ovoide. Geralmente é encontrada dentro de fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado (Figura I) (PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012).

Segundo Desjeux (2004), 20 espécies de *Leishmania* são patogênicas para os humanos e 30 espécies de insetos são vetores confirmados na transmissão. A doença pode manifestar de 4 maneiras diferentes: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV). O foco deste estudo foi a LV, forma mais grave da doença, e que pode levar o paciente a óbito caso não seja tratado (DESJEUX, 2004). No Brasil e em países banhados pelo mar Mediterrâneo a LV é causada pela espécie *Leishmania infantum*, (GOTIJO, 2004), no entanto, nos países do chamado velho mundo é a *Leishmania donovani*, a causadora da VL (NEWLOVE *et al.*, 2012).

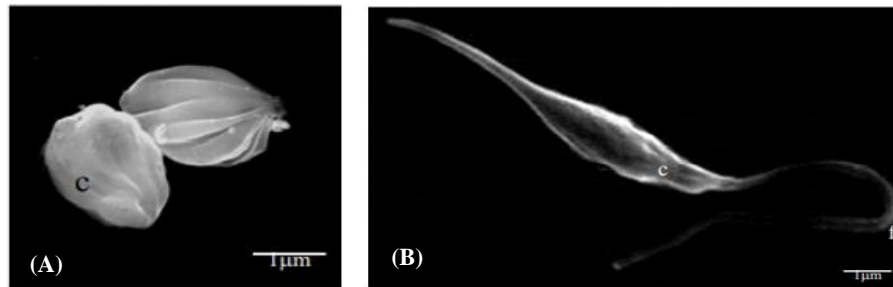


Figura I- Microscopia eletrônica das formas de *Leishmania sp.* (A) ovóide aflagelada com presença de cinetoplasto (c); (B) forma alongada com presença de flagelo (f) e cinetoplasto (c). Imagem retirada de PIMENTA; FREITAS; SECUNDINO, 2012 (Modificado).

1.2 Aspectos gerais da epidemiologia da leishmaniose visceral

A LV foi considerada endêmica em 98 países ou territórios, dos quais 6 tiveram casos reportados, em 2020. Na Região do Mediterrâneo Oriental, a LV foi endêmica em 82% (18/22) dos países e territórios, na Região Sudeste Asiático a proporção foi de 55% (6/11), na Região Europeia 51% (27/53), na Região das Américas 36% (13/36), e na Região Africana foi de 30% (14/47). A proporção na Região do Pacífico Ocidental foi menor que as outras regiões, 3% (1/31), e somente a China foi endêmica para LV. O Brasil está entre os dez países que reportaram mortes por LV entre 2019 e 2020, quando foram 196 e 151 óbitos, respectivamente. A taxa de letalidade entre todos os tipos de casos de LV foi 7,1% (151/2140) em 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

No Brasil, no período entre 2003 a 2018, foram diagnosticados mais de 51 mil casos de LV em humanos, com incidência média de 1,7 casos por 100 mil habitantes, sendo que Norte e Nordeste foram as regiões com maior incidência da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2019). Em 2019, o número de casos confirmados notificados no sistema de informações na saúde pública foi de 2.473 casos, porém mesmo com medidas implantadas na cadeia de transmissão da LV em 2004 e 2011, abordando testes de fácil manipulação com diagnósticos rápidos, para utilização de estratégias terapêuticas capazes de modular o curso da doença no início dos sinais clínicos e utilização de coleiras para cães (considerados reservatórios da LV humana), ainda há uma taxa de letalidade de 7% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Calazar ou barriga d'água, como é popularmente conhecida a LV, tem maior prevalência em populações de média e baixa renda, bem como em crianças e indivíduos imunossuprimidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Um estudo realizado no Brasil entre 2001 a 2015 analisou indicadores de desenvolvimento humano e vulnerabilidade social e os associou com a mortalidade na LV, revelando que a falta de coleta de lixo, baixa escolaridade, taxa de desemprego, baixa renda per capita e desigualdade de renda estão, de fato, associados à mortalidade por LV (NUNES *et al.*, 2020). A crescente urbanização com áreas de desmatamento, queimadas, mudanças climáticas e ausência de estruturas sanitárias, favorece a translocação do inseto do meio rural para urbano, aumentando a exposição da população ao vetor (MENDES *et al.*, 2016; LEMOS; SOUSA; SILVA, 2019).

Os principais vetores das leishmanioses no Brasil são insetos fêmeas do gênero *Lutzomyia* em destaque para as espécies *L. longipalpis* e *L. cruzi* (MISSAWA; LIMA, 2006), estes são popularmente conhecido pelos nomes, mosquito palha, tatuquira e birigui LV no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SECRETÁRIA DE ESTADO DA SAÚDE, 2020).

1.3 Ciclo de transmissão da *Leishmania*

Nas Américas os ciclos com maior ocorrência de transmissão com capacidade de infectar os humanos são o da zona-rural e o da zona-urbana. Em ambos os ciclos, os vetores chegam à região domiciliar dos humanos e transmitem a infecção, assim humanos e animais domésticos como cães e gatos podem participar como reservatórios na transmissão da *Leishmania* (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2019).

A transmissão do protozoário ocorre durante o repasto sanguíneo do inseto fêmea, (MONTEIRO; DIAS, 2005; GARCIA *et al.*, 2011; BASTOS *et al.*, 2012), o qual se contamina através da picada de um animal infectado com *Leishmania infantum*, podendo ser cão, gato, animais silvestres ou humano (ANTOINE *et al.*, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O *Lutzomyia sp.* ingere a forma amastigota que, dentro do intestino do inseto, se transforma em promastigota procíclica (BASANO; CAMARGO, 2004). Durante o repasto sanguíneo as promastigotas metacíclicas, presentes na probóscide do vetor, são injetadas no hospedeiro vertebrado e, uma vez fagocitadas pelos macrófagos do hospedeiro e por meio de diminuição de pH e aumento de temperatura, modificam-se para a forma amastigota. Essas formas se multiplicam,

rompem as células e infectam outras células (SACKS; PERKINS, 1984; MELBY, 2002) (Figura II).

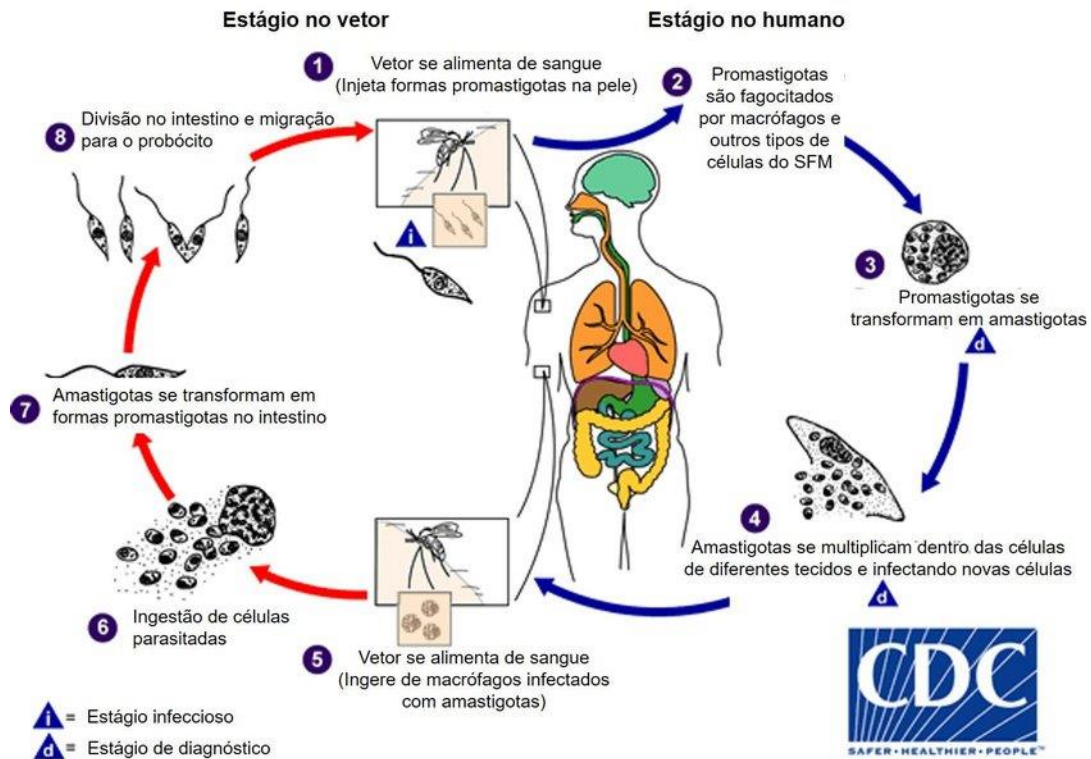


Figura II- Esquema representativo do ciclo biológico da Leishmaniose.
 Fonte: Modificado de Center for Disease control and Prevention (CDC), EUA.

1.4 Patogenia da leishmaniose visceral

As espécies de *Leishmania* viscerotrópicas residem em macrófagos de Kupffer, esplênicos e da medula óssea (BHATTACHARYA; ALI, 2013). As manifestações clínicas clássicas da LV envolvem febre prolongada, intensa perda de peso, hepatoesplenomegalia caracterizada por fígado e baço aumentados, anasarca que é o edema dos membros inferiores evoluindo para edema generalizado, icterícia na qual a pele apresenta pigmentação amarelada ou esverdeada e ascite, um acúmulo anormal de líquido na cavidade peritoneal. Nos episódios mais severos há epistaxe e gengivorragia que são sangramento pelas narinas e gengivas, respectivamente; petéquias caracterizadas por pontos hemorrágicos distribuídos pelo corpo, e infecções bacterianas. Em hemogramas e testes sorológicos observa-se diminuição de elementos celulares do sangue como

os glóbulos brancos, vermelhos (hemácias) e plaquetas chamada pancitopenia, e aumento anormal de globulinas denominada hipergamaglobulinemia. Todas essas alterações presentes podem levar o comprometimento do paciente evoluindo a óbito, quando não tratadas (BADARÓ *et al.*, 1986; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2019; BERN *et al.*, 2008; MC CALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

De acordo com MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006) aspectos clínicos da LV podem variar entre pacientes humanos. Crianças e idosos são mais susceptíveis devido a imaturidade e senescência do sistema imunológico, respectivamente, levando ao seu comprometimento que são agravados pela desnutrição. A manifestação clínica inicial pode variar desde sinais clínicos discretos a severos, classificados em três formas, período inicial com sintomas de febre, palidez, hepatomegalia, diarreia e tosse não produtiva, com duração de 15 dias a 4 semanas e cura espontânea posteriormente; o período de estado caracterizado por sinais clínicos que perduram por aproximadamente 2 meses, tais como febre recorrentes, emagrecimento progressivo, palidez, aumento de fígado e baço; e o período final, assim chamado devido a evolução dos sinais anteriores com ausência de tratamento, com quadro clínico de febre contínua, comprometimento do estado geral, desnutrição, edema de membros evoluindo para anasarca, hemorragias, ascite e infecção bacterianas como otites, piodermites, infecções do trato urinário e respiratório, levando o paciente a óbito.

1.5 Resposta imunológica na leishmaniose visceral

Após o repasto sanguíneo com o regurgitamento das promastigotas pelo vetor na pele do hospedeiro vertebrado, células como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) fagocitam ou são infectadas pelo patógeno (LIU; UZONNA, 2012). Os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio de infecção devido a alarminas liberadas em resposta a lesões capilares decorrente da picada do inseto (PETERS, 2008). Essas células após a captura das promastigotas no foco infeccioso, entram em apoptose por apresentarem vida curta, liberando proteína-1 beta inflamatória de macrófagos (MIP-1 β), uma alarmina, que recruta monócitos e macrófago para o local de infecção (VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004). Como processo de limpeza, macrófagos e DC fagocitam partículas apoptóticas dos neutrófilos contendo promastigotas, desta forma os macrófagos são ativados pela via dita alternativa, resultando em

produção maior de fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e menor de fator de necrose tumoral (TNF- α), produzindo um meio anti-inflamatório e favorecendo a sobrevivência da *Leishmania*. Assim, os neutrófilos são conhecidos como “cavalo de tróia”, servindo como esconderijo do parasito e se comportando como células hospedeiras temporárias para sobrevivência da *Leishmania* no organismo (RAES *et al.*, 2007; INIESTA, GÓMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; CECÍLIO *et al.*, 2014). Entretanto, os neutrófilos também podem emitir estruturas constituídas por componentes do nucleossomo de DNA e proteínas de grânulos citoplasmáticos formando armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Isso se deve a estímulos como a presença de microorganismos por exemplo, com o objetivo de capturá-los e matá-los (BRUSCHI *et al.*, 2021). Na LV as moléculas associadas a NETs são reguladas de forma diferente entre pacientes com LV ativa e indivíduos assintomáticos, mostrando que os neutrófilos podem ter funções distintas dependendo do estado clínico da infecção (GARDINASSI *et al.*, 2017).

Os macrófagos são as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos parasitos e células apresentadoras de antígenos (APC). As respostas dos macrófagos ao protozoário dependem da interação com moléculas de superfície presente na *Leishmania* como glicoproteínas de 63 Kda (GP63) e lipofosfoglicano (LPG) que são reconhecidos pelos receptores em macrófagos (KANE; MOSSER, 2000). Dependendo de fatores relacionados a espécie de *Leishmania* e ao microambiente no hospedeiro, essas células podem ser ativadas por duas vias com expressão de diferentes fenótipos pelos macrófagos, denominados M1 e M2 (ITALIANI; BORASCHI 2014; VOLPEDO *et al.*, 2021). M1 ou ativação clássica de macrófagos em resposta a interferon- γ (IFN- γ) é necessária para o controle da doença (RAES *et al.*, 2007) através da indução de citocinas pró-inflamatórias e fatores microbicidas como a produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCOTT; NOVAIS, 2016). Um microambiente com citocinas do tipo 2, como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) antagoniza a ativação de M1, ativando alternativamente os macrófagos, originando os macrófagos M2 (GORDON, 2003), com dominância na produção de citocinas interleucina-10 (IL-10) e IL-4 diminuindo a produção de NO (VOLPEDO *et al.*, 2021 (Figura III). Além disso, a presença de gene codificante de arginase (ARG) na *Leishmania* (DA SILVA *et al.*, 2002) favorece a competição pelo óxido nítrico indutível (iNOS) (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014) favorecendo a sobrevivência e multiplicação do parasita pela inibição da formação fatores microbicidas de macrófagos o NO (BADIRZADEH *et al.*, 2017).

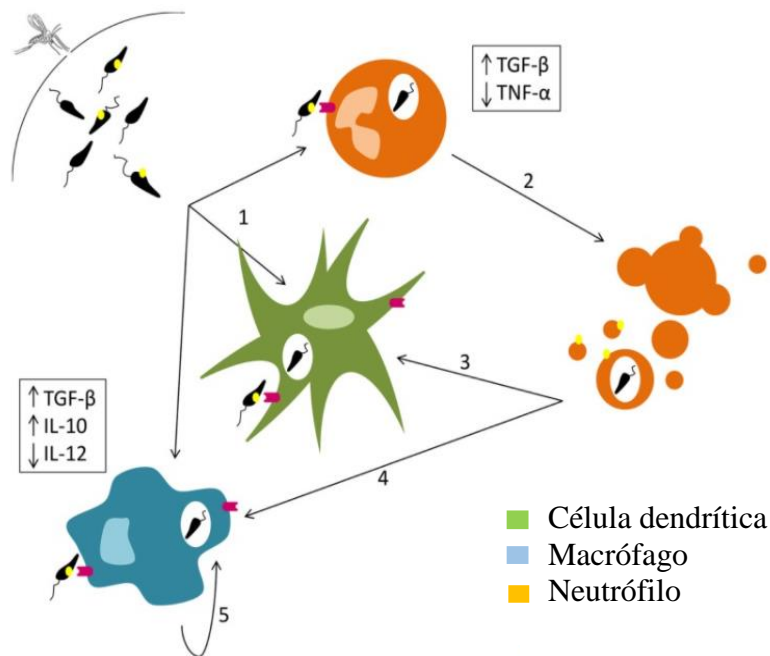


Figura III- Esquema representativo do sistema imune em resposta a infecção por *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo promastigotas são liberadas dentro do organismo do hospedeiro pelo inseto vetor (1) células dendríticas plasmocitóides e macrófagos residentes e neutrófilos fagocitam as *Leishmanias*; (2) os neutrófilos entram em apoptose liberando os corpos apoptóticos; (3 e 4) DC e macrófagos em processos de limpeza fagocitam os corpos apoptóticos contendo as *Leishmanias* e liberam citocinas anti-inflamatórias que inibe sua ativação, assim a *Leishmania* encontra meios favoráveis para se transformar em amastigota, multiplicar por fissão binária e se disseminar pelo organismo. Fonte: Modificado de CECÍLIO *et al.*, 2014.

A ativação de linfócitos T CD4+ em linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) ou do tipo 2 (Th2) está associada ao estabelecimento do padrão de infecção (SAHA *et al.*, 2007). A produção de citocinas IL-12, IFN- γ e fatores microbicidas NO e ROS estão associados a ativação de perfil Th1, conferindo proteção ao hospedeiro frente ao parasito (KAYE; SCOTT, 2011), enquanto que secreção de IL-4, IL-10 e TGF- β está relacionada à ativação de perfil Th2 favorecendo o crescimento e progressão da doença (SAMANT *et al.*, 2021).

Outras células são ativadas durante a LV como NK, monócitos (SINGH *et al.*, 2018), eosinófilos, mastócitos (SAHA *et al.*, 2004), linfócitos T CD8+ (GHOSH *et al.*, 1995) e auxiliares 17 (Th17) (PITTA *et al.*, 2009) com produção de citocinas em resposta ao patógeno.

1.5.1 Exaustão de células T e tempestade de citocinas

Durante a LV em estudos com camundongos mostrou que a resposta celular pelas células citotóxicas (CTL) juntamente com citocinas contribui para resistência e controle do parasita (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005). Em humanos com LV a exaustão e anergia de CTL, contribui para o desenvolvimento da doença, pois em estudo de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e células CD8⁺ aspiradas de baço de humanos com LV, apresentam marcadores de células anérgicas e CTL, com produção a níveis basais de IFN- γ e não em quantidades elevadas em resposta a *Leishmania*, mesmo após o bloqueio de reguladores negativos da ativação de células T como, antígeno 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e morte programada 1 (PD-1) não houve modulação para aumento de citotoxicidade pelo IFN- γ (GAUTAM *et al.*, 2014).

As células Th1 durante a LV são responsáveis por controlar infecções por parasitas intracelulares, porem durante a inflamação a patologia foi controlada por células B reguladora IgD (hi) produtora de IL-10 com eventual exaustão de célula T mediada por PD-1. A restauração da resposta por Th1 foi modulada após o bloqueio de ligantes de PD-1 (PD-L1) em células B reguladora IgD (hi) em cães com LV (SCHAUT *et al.*, 2016).

Além da exaustão de células T a LV é caracterizada pela liberação inespecíficas de várias citocinas, descritas como tempestade de citocinas (SANTOS *et al.*, 2016), que desempenham um papel fundamental na formação da resposta imunológica, gerenciando um perfil protetor ou não protetor durante a LV. Citocinas como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina -2 (IL-2), interleucina- 12 (IL-12) são responsáveis pelo efeito protetor no hospedeiro, através do controle da disseminação e destruição do patógeno, enquanto que interleucina-10 (IL-10); interleucina- 6 (IL-6); fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), estão relacionadas com a progressão da doença (COSTA *et al.*, 2013; SAMANT *et al.*, 2021).

O IFN- γ é um mediador da imunidade inata e adaptativa, por ser produzido por células *natural killer* (NK), linfócitos T *helper* tipo 1 (Th1) e linfócitos T citotóxica (CTL) tem a função de ativar macrófagos pela via clássica, diferenciar linfócitos T auxiliares TCD4⁺ em Th1 (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2005). Na LV essa citocina está relacionada com o

controle da infecção através da ativação de macrófagos com produção de fatores microbicidas como espécies reativas de óxido nítrico (ROS) (KIMA, SOONG, 2013).

O TNF- α é produzido por macrófagos, monócitos, neutrófilos, linfócitos T e NK (TRACEY; CERAMI, 1993), e desempenha o papel de orquestrar a resposta inata inflamatória, através da expressão de quimiocinas e de citocinas que promovem a adesão das células no endotélio, atração e ativação de leucócitos para o local da infecção (VARFOLOMEEV; ASHKENAZI, 2004), além de ser responsável pela formação e manutenção de granulomas visto durante a LV (BOSCH *et al.*, 2019).

A IL-1 β , produzida por macrófagos e monócitos, é induzida pelas vias de sinalização TLR (*toll like receptor*) e NLR (*nod-like receptor*) que ativam o fator nuclear kappa B (NF- κ B) com clivagem do pró- IL-1 β em IL-1 β mediada por caspase- 1 através da ativação de um complexo de proteínas (inflamassoma) (GRETEN *et al.*, 2007; LOPEZ; BROUGH, 2011), responsável por evitar a replicação intracelular da *Leishmania* nos macrófagos (LIMA- JUNIOR *et al.*, 2013; ZAMBONI; SACKS, 2019).

A IL-6 é produzida por macrófagos e monócitos em resposta a interleucina- 11 (IL-11) e a TNF- α (NASEEM; IQBAL; MUNIR, 2016). Promove a indução de reagentes de fase aguda no fígado como proteína C reativa, inibe a albumina, participa na imunidade adaptativa na produção de anticorpos e diferenciação de células T *helper* produtoras de IL-17 (Th17) (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014) além de ser mediador de febre (KOZAK *et al.*, 1998). A IL-10 é produzida por macrófagos, DC, linfócitos B, linfócitos T citotóxicos, NK, mastócitos, granulócitos, neutrófilos, eosinófilos, T reguladora e células não imunológicas como células epiteliais e queratinócitos, atuando como imunossupressor principalmente de macrófagos e monócitos através da inibição de citocinas pró-inflamatórias, diminuição da apresentação de antígeno e fagocitose (IYER; CHENG, 2012). Na LV, a IL-6 e IL-10 estão fortemente associadas á hepatoesplenomegalia, neutropenia e trombocitopenia, de modo que os níveis de IL-6 superiores a 200 pg/ml estão fortemente relacionadas ao óbito em humanos (SANTOS *et al.*, 2016).

A IL-12 é secretada por células apresentadoras de antígenos como DC e macrófagos durante a resposta imunológica inata em resposta a padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) por sinalização derivada de TLR e outros receptores (GERBER; MOSSER, 2001). A IL-12 é essencial na resposta a patógenos intracelulares através da indução de IFN- γ levando a ativação de macrófagos e diferenciação das células T *helper* em Th1 (célula T auxiliadora do tipo 1)

(MAGRAM *et al.*, 1996; GERBER; MOSSER, 2001), iniciando o controle da LV pela ativação dessas células (MURRAY *et al.*, 2000).

A IL-4 é secretada por mastócitos, basófilos, eosinófilos (GADANI *et al.*, 2012) e pelas células foliculares (Tfh) que estimula a troca da cadeia pesada de Ig da célula B para o isótipo IgE que participa em respostas alérgica e helmínticas, além de intensificar a mudança para o isótipo de IgG1 (DELL'ARINGA *et al.*, 2018). Outras funções estão relacionadas com a IL-4 como a diferenciação de linfócito T CD4+ virgem em Th2 que produz mais IL-4 e promove a polarização de macrófagos M2 induzindo propriedades anti-inflamatórias (GADANI *et al.*, 2012). O TGF- β é produzido por macrófagos ativado (VAN GINDERACHTER *et al.*, 2006) Tregs e outros tipos celulares, e tem a função de inibir a proliferação e funções efetoras dos linfócitos T e a ativação de macrófagos, sendo produzido por macrófagos ativado pela via alternativa. Além disso, suprime atividade de neutrófilos, NK, DC, mastócitos e granulócitos (LI *et al.*, 2006), participa da diferenciação e ativação de linfócitos Th17 produtoras de IL-17 (ZHANG, 2018), exerce função de quimioatração para neutrófilos, fibroblastos e macrófagos (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005) e promove o reparo tecidual após o término das reações imune e inflamatória locais por meio da indução da produção de colágeno e de enzimas modificadoras da matriz (BRANTON; KOPP, 1999). Ambas as citocinas do tipo Th2 como IL-10, IL-4 e TGF- β ou presença de IL-10 produzidas pelas células T-reg são relacionadas com a diminuição da atividade antiparasitária de macrófagos do tipo M1 e células Th1, induzindo a progressão da LV (DAYAKAR *et al.*, 2019).

1.6 Diagnóstico e tratamento

O padrão ouro de teste diagnóstico para LV é a visualização direta do parasito por microscopia óptica utilizando amostras de aspirado de medula óssea, baço ou linfonodo, sendo um método invasivo. A sensibilidade do teste depende da amostra utilizada, sendo o baço a fonte de material para o teste mais sensível e o linfonodo, o menos sensível. Utilizando amostra de sangue é possível aplicar o teste molecular PCR, que é bem sensível, mas exige um laboratório bem equipado, assim como pessoas bem treinadas, não sendo possível executá-lo a campo; além disso, para a prática clínica não é um método validado para substituir a visualização parasitológica (CHAPPUIS *et al.*, 2007; ALVES *et al.*, 2018). Os testes de diagnóstico rápido, como o sorológico baseado no antígeno de 39KDa cinesina do cinetoplasto de *Leishmania* (BURNS *et al.*, 1993), são

ideais para triagem de pacientes com suspeita de LV, com alta sensibilidade na América Latina e África oriental (CUNNINGHAM *et al.*, 2012, BOELAERT *et al.*, 2004). No entanto, a sensibilidade muda de região para região e outro aspecto negativo é que o teste não pode ser aplicado para avaliar a cura do paciente pois os níveis de anticorpos permanecem detectáveis anos após o episódio de LV (ALVES *et al.*, 2018). O antígeno 39KDa tampouco pode ser aplicado para a detecção de infecções assintomáticas (PORCINO *et al.*, 2019). A detecção de antígeno de *L. infantum* na urina é um teste altamente específico, mas não sensível o suficiente para ser utilizado para diagnóstico, embora seria ideal para ser usado como um teste não invasivo durante o tratamento antileishmania, como acompanhamento da eficácia do tratamento. (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

As opções de tratamento passaram da dependência da terapia antimonial para o desenvolvimento de novos tratamentos, incluindo diferentes formulações lipídicas de anfotericina B, o medicamento oral miltefosina e paromomicina injetável. Nos últimos anos, os dados clínicos mostraram que o mesmo medicamento e regime posológico podem não ter a mesma eficácia, dependendo da área geográfica onde é usado (ALVES *et al.*, 2018). No Brasil é recomendado o uso de Antimoniato de N-metilglucamina, desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal (ROMERO *et al.*, 2017).

O resultado do tratamento pode ser influenciado por particularidades das populações de pacientes, como características genéticas e antropométricas, estado imune e também o contexto social e epidemiológico. Além disso, as características de cada medicamento podem determinar qual deles deve ser escolhido no nível de uso individual ou coletivo, nos sistemas de atenção primária à saúde ou nos hospitais de referência, na atenção à saúde de rotina ou em um programa de eliminação e, se for o caso, nas fases de ataque ou manutenção e, finalmente, quais medicamentos usar para proteger contra resistência (ALVES *et al.*, 2018).

1.7 Hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental para LV

A escolha de um modelo experimental adequado é fundamental para compreender a fisiopatologia da LV humana, onde diversos fatores podem influenciar no desfecho da infecção. É necessário empregar uma espécie de animal hospedeiro do parasito que apresente respostas comparáveis à infecção em humanos. Ao contrário da infecção com *L. major* (MOCK *et al.*, 1985; LOEUILLET; HIDE, 2016), camundongos com diferentes origens genéticas apresentam padrão

similar de susceptibilidade à infecção por cepas de *L. infantum in vivo*, dificultando a elucidação da patogênese de LV e de mecanismos de resistência ao parasito (PÉREZ-CABEZAS *et al.*, 2019; ROSYPAL *et al.*, 2005).

A utilização de camundongos como modelo experimental para imunopatogênese da leishmaniose visceral é devido a disponibilidade de reagentes específicos para esses animais. No entanto, os fatores genéticos do modelo influenciam na resistência ou susceptibilidade à infecção, como ocorre em camundongos Balb/c que se mostraram susceptíveis à infecção por *L. donovani* (PORROZZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014). E, mesmo em camundongos Balb /c imunossuprimidos experimentalmente (CORRÊA, 2011) e Knockouts imuncocompetentes e suprimidos com *L. infantum* (ROSYPAL *et al.*, 2005) pode não ocorrer o desenvolvimento da forma grave da doença levando ao óbito, mas sim o controle da infecção, após algumas semanas, (CORRÊA, 2011) por células Th1 (LOEUILLET; BANULS; HIDE, 2016) mantendo a doença em sua forma crônica (PORROZZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014). A patogenia da LV causada por *L. donovani* em camundongos é semelhante à *L. infantum* nos mesmos modelos experimentais de camundongos Balb/c, SV/129 e C57BL/6 causando a mesma resistência parasitológica (PÉREZ-CABEZAS *et al.*, 2019). Isso reforça a importância da busca de modelos animais ideais para estudar a fisiopatologia da leishmaniose (FERREIRA-PAES *et al.*, 2020).

Os cães são excelentes modelos para o desenvolvimento da LV, visto que possuem manifestações clínicas semelhantes aos dos humanos, tais como hepatomegalia, pancitopenia, hipertermia e hipergamaglobulinemia, e sinais clínicos leves caracterizados como assintomáticos e oligoassintomáticos. No entanto, o cão pode apresentar, ainda, lesões ulcerativas cutâneas ausentes na maior parte das manifestações humanas, o modelo é importante para estudos de desenvolvimento de vacinas e entendimento da patogênese da doença. Como os demais modelos experimentais, o cão apresenta limitações no que se refere a ausência de reagentes específicos pra espécie, respostas imunológicas imprevisíveis devido a fatores genéticos e alto custo de manutenção (PORROZZI ;CAVALCANTE; CUPOLILLO, 2014; CEUA, 2018).

Neste contexto, já foi demonstrado que os hamsters infectados com *L. infantum*, comparado a outros modelos experimentais, reproduzem os mesmos sinais clínicos e patológicos que os humanos, tais como multiplicação do parasito no fígado, baço e medula óssea, induzindo sinais clínicos como anemia, hiperglobulinemia, hepatoesplenomegalia, leucopenia e caquexia, podendo levar o animal a morte (HOMMEL *et al.*, 1995; MELBY *et al.*, 2001; DE LIMA *et al.*,

2017; REQUENA *et al.*, 2000). Além disso, nem todos os animais adoecem, como ocorre na infecção em humanos (REQUENA; SOTO; DORIA; ALONSO, 2000), ou apresentam sinais clínicos em tempos diferentes (MOREIRA, 2016). No entanto, os desafios em se trabalhar com esses animais incluem o alto custo de manutenção, dificuldade de manipulação e a dificuldade na obtenção de reagentes específicos (MEARS *et al.*, 2015).

1.8 Fatores para o desenvolvimento da leishmaniose

Embora a LV seja altamente letal se não for tratada, a maioria das infecções humanas não resulta em doença (ZIJLSTRA *et al.*, 1994; BADARÓ *et al.*, 1986); sete perfis de infecção com *Leishmania infantum* foram sugeridos dos quais três são assintomáticos e quatro sintomáticos. Todos apresentam uma resposta clínica e imunológica diversa (SOSA-OCHOA *et al.*, 2020). Dentro desse contexto alguns fatores devem ser considerados no que tange ao desenvolvimento e gravidade da doença, podendo estes fatores estarem associados ao hospedeiro, ao vetor e ao próprio parasito.

1. 8. 1 Fatores relacionados ao parasito

Leishmania spp. são adaptadas para sobreviver e replicar dentro de macrófagos devido a sua capacidade de driblar a resposta imune (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005). Essa capacidade está relacionada com genes e pseudogenes de virulência encontradas na superfície de diferentes espécies de *Leishmania*, que contribuem para diferenças na patologia da doença (MC CALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Dentre os genes de virulência está o *LPG* que é codificada pela *LPG1*, uma enzima chamada de galactofuranosil transferase, que sintetiza o cerne de glicana da lipofosfoglicana, ou LPG (de lipophosphoglycan do inglês), um dos principais glicoconjugados encontrados na superfície de promastigotas (LÁZARO-SOUZA *et al.*, 2018). O LPG tem capacidade de modular a resposta de macrófagos através da inibição de proteínas quinase C (PKC, do inglês protein kinase C), influenciando a fosforilação das vias de ativação dos macrófagos (OLIVIER *et al.*, 2012). Além disso, LPG pode retardar a formação do fagolisossomo (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997) tornando o macrófago incapaz de produzir iNOS (PROUDFOOT *et al.*, 1996), aumentando a

sobrevivência intracelular e favorecendo a multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos (OLIVIER *et al.*, 2012). O LPG também protege a leishmania das ações do sistema complemento (SPATH *et al.*, 2003).

A *Leishmania* possui uma protease de superfície, leishmanolinsina (GP63), que tem capacidade de manipular o sistema complemento para invadir os macrófagos, através da conversão da proteína C3b para a forma inativa iC3b, inibindo a cascata de ativação e favorecendo a ligação da LPG no receptor de C3b (CR1), resultando na internalização silenciosa da *Leishmania* para o vacúolo parasitóforo (VP) (MOSSER; HANDMAN, 1992). Recentemente, outro mecanismo de escape em *L. infantum* foi estudado, onde foi observado interação de GP63 com fator regulador do sistema complemento (fator H) que sinaliza uma protease plasmática o (fator I) para inativar C3b aderida na superfície do protozoário, inibindo a ativação dessa cascata proteolítica (FILHO *et al.*, 2021). Assim, a capacidade desses parasitos de resistir ao complemento e infectar os macrófagos contribuirá para o estabelecimento no hospedeiro e para a gravidade da doença (CAMPOS PONCE *et al.*, 2005).

Outro fator de virulência encontrado em *Leishmania* (OLIVEIRA *et al.*, 2011; MCCALL; MATLASHEWSKI, 2012) é a expressão da proteína A2 em amastigotas (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994) e cuja função é proteger o parasito de altas temperaturas e do estresse oxidativo (MC CALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

A *Leishmania* possui cisteína proteinases B (CPB) que desempenham papéis importantes na sobrevivência, diferenciação e crescimento do parasito dentro do hospedeiro (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004; SIQUEIRA- NETO *et al.*, 2018). A *L. infantum* produz maior quantidade em comparação às espécies *L. major* e *L. tropica*, o que está associada à gravidade da doença. Além disso, dentro da mesma espécie de *L. infantum* também há diferentes níveis de produção de CPB, onde a *L. infantum* infectando indivíduos sintomáticos expressa maior quantidade de transcritos do gene quando comparado com a expressão de parasitos infectando indivíduos assintomáticos (KAZEMIRAD *et al.*, 2019).

Além dos genes de virulência codificados no genoma do parasito, a presença do vírus de RNA de *Leishmania* (LRV) no protozoário também pode estar relacionada com a gravidade da doença (IVES *et al.*, 2011). O vírus de RNA de *Leishmania* é encontrado no citoplasma de várias espécies de *Leishmania* incluindo *L. infantum*. Nas espécies *L. guyanensis* e *L. braziliensis* a presença do vírus demonstrou influenciar no desenvolvimento de lesões em mucosa e gravidade

da doença (HARTLEY, 2012; IVES *et al.*, 2011). Já em espécie vicerotrópica, paciente portador de infecção com *L. infantum* infectada com LRV apresentava resistência ao antiparasitário antimoniato de meglumina (HAJJARAN; MAHDI; MOHEBALI, 2016). Mais investigações com relação ao LRV devem ser feitas para melhor caracterização da patologia e virulência da doença, afim de modular a resposta imune e evitar a progressão da doença.

1. 8. 2 Fatores relacionados ao hospedeiro

Os fatores para o desenvolvimento de LV relacionados ao hospedeiro podem explicar o porquê de alguns pacientes desenvolverem a doença e outros não. Nesse contexto, o desempenho do sistema imune no calazar pode ser alterado devido a idade, uma vez que a incidência do calazar é menor em adolescentes e adultos quando comparada a crianças, isso porque, hipoteticamente, crianças e adultos possuem hábitos diferentes de exposição às picadas do inseto vetor (DAVIES; MAZLOUMI GAUGANI, 1999). Outro fator a ser destacado é a suscetibilidade de pacientes imunossuprimidos, como no caso de portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), os quais apresentam sistema imune debilitado com comprometimento de células da imunidade inata e linfócitos T, facilitando a progressão à LV em casos de picada do inseto contaminado por *Leishmania infantum*. Além disso, fatores como estresse e desnutrição têm capacidade de modular a resposta imunológica, predispondo ao desenvolvimento de LV em indivíduos ao serem infectados (MC CALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013; ROSENTHAL *et al.*, 1995; BADARÓ *et al.*, 1986).

As variações genéticas na população humana contribuem para a suscetibilidade ou resistência as infecções (BHARATI, 2022). Muitos genes humanos têm sido estudados por seu potencial como fatores de suscetibilidade à infecção por *Leishmania*, a expressão de determinados genes pode estar relacionada aos principais processos de resposta imune, como reconhecimento, apresentação de antígenos, produção de citocinas pró-inflamatórias, coestimulação e proliferação (AOKI *et al.*, 2019), no entanto a associação genética também pode estar relacionada a sistemas não imunológicos, como gene do metabolismo. No polimorfismo em genes de resposta imune, as alterações genéticas nos genes da resposta imune decidem a progressão ou o controle da infecção, e seu estudo pode ser didaticamente subdividido em polimorfismo em genes de citocinas e polimorfismo em genes imunes sem citocinas. No que se refere as citocinas estão inclusos genes

IL-1, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IFN- γ , TNF- α e ao TGF- β , fator inibidor de migração de macrófagos (MIF) e CXCR1. Enquanto, no que se refere ao polimorfismo em genes imunes sem citocinas estão inclusos polimorfismo no gene CD-28 e seu papel na proteção da VL ativa; variação no gene Fc γ RIIIB-NA1/NA2 que já foi descrito como fator de risco para o desenvolvimento de VL; na L-selectina o qual não se mostrou diferente entre casos de VL, controles soropositivos e negativos; mutação na MBL2 diminui níveis de Lectina de ligação à manose (MBL) no soro e pode proteger contra o desenvolvimento de VL; ficolin, onde altos níveis de ficolin-2 e a variante FCN2 foram associados com VL; receptores Toll-like (TRLs) que podem atuar com papel protetor; toll-proteína de interação (TOLLIP) associado com a infecção da doença; antígeno leucocitário humano (HLA) com papel na suscetibilidade ao VL diferente de acordo com a região; ligante de notch canônico tipo delta 1 (DLL1) contribuindo para a suscetibilidade e considerável fator de risco para a VL; e proteína SLC11A1/NRAMP encontrada no compartimento endocítico do macrófago em repouso relacionado à suscetibilidade a VL em pacientes com HIV no Brasil. O polimorfismo em genes metabólicos lipídicos envolve o resultado da infecção por *Leishmania*, e o polimorfismo em genes apoE, LPL e PPAR α pode ser fator de risco na progressão da doença em infecções por *L. infantum*. Nos estudos de associação de todo o genoma no Brasil Três regiões cromossômicas 6q27, 7q11.2 e 17q11.2-q21.3 foram associadas ao aumento da suscetibilidade à LV (revisado por BHARATI, 2022).

1. 8 .2 .1 Glicosilação de anticorpos

Os anticorpos IgG possuem cadeias pesadas que subdividem as IgGs em subclasses, e cadeias leves, as duas cadeias são conectadas por pontes de dissulfeto, formando um Y. Os anticorpos possuem regiões aminoterminais (N) e carboxiterminais (C) presentes na cadeia leve e cadeia pesada. A região N, é composta pela porção variável da cadeia leve (VL) e pela porção variável da cadeia pesada (VH) juntas formam a porção variável (Fab), a qual é responsável pelo reconhecimento do antígeno e, conseqüentemente, pode contribuir para o bloqueio ou neutralização do patógeno. A região C possui cadeia leve (CL) e não participa da função efetora dos anticorpos, e cadeia pesada (CH) que forma a porção contante (Fc) (CHUI *et al.*, 2019) (Figura IV), responsável pela interação com uma variedade de diferentes receptores Fc (FcRs), bem como proteínas do complemento, para ligar a especificidade requintada do sistema imunológico

adaptativo para as funções efetoras poderosas e atividade biológica do sistema imunológico inato (SPIEGELBERG, 1989).

A atividade biológica da região Fc depende, em nível genômico, do isótipo e subclasse do anticorpo e, em nível pós-traducional, do perfil de glicosilação. A importância da glicosilação do anticorpo está relacionada à meia-vida, secreção, imunogenicidade e função do anticorpo (ARNOLD *et al.* 2007; PINCETIC *et al.*, 2014). A IgG é glicosilada com cadeia oligossacarídica biantenária covalentemente ligada a asparagina (Asn 297) no domínio CH2 na porção Fc. São encontrados 2 N- glicanos, contendo núcleo biantenário com uma cadeia residual de 2 N-acetilglucosamina (GlcNAc) podendo ter uma fucose central. (Figura IV) (ZAUNER *et al.*, 2013, VARKI *et al.*, 2017).

Uma característica da LV é a ativação policlonal de células B, levando a hipergamaglobulinemia (RODRIGUEZ *et al.*, 2016), porém não corresponde a imunidade protetora. Uma resposta protetora vai depender da subclasse de IgG específica e da sua interação com as diferentes vias induzidas por fagócitos através da ligação nos receptores de Fc das IgGs (FcR) (LU *et al.*, 2018) presentes em células do sistema imune como monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e NK. Assim, o IgG pode interagir com receptores tanto ativadores (Fc γ RIA; Fc γ RIIA, Fc γ RIIIA e Fc γ RIIC) que sinalizam imunorreceptores com motivos de ativação baseado em tirosina (ITAM) induzindo atividade pró- inflamatória com destruição de antígenos pelas funções dos anticorpos, como inibitório (Fc γ RIIB) pela indução de imunorreceptores com motivos de inativação baseado em tirosina (ITIM) reduzindo a ativação celular mediada por anticorpos (SHADE; ANTHONY, 2013).

Além da porção Fc, cerca de 30% de IgG sérico contém glicanas na região Fab ligados a cadeia leve e pesada da região variável em κ ou λ , a maior parte desses oligossacarídeos são galactose e ácido siálico, sendo a sequência de açúcares são resultantes do processo de mutação somática, durante a seleção positiva para melhor ligação ao antígeno. A função das glicanas na porção Fab de IgG policlonal não está definida totalmente, mas em anticorpos monoclonais sugere-se que a glicosilação na porção V κ , V λ ou V H pode ser neutra, positiva ou negativa na ligação ao antígeno (JEFFERIS, 2009).

A glicosilação é uma modificação comum de proteínas e lipídios. As glicanas têm vários papéis cruciais nas respostas de células aos estímulos ambientais, bem como no crescimento e diferenciação celular; mudanças específicas na composição de glicana estão diretamente ligadas a

muitas doenças (REILY *et al.*, 2019). A glicosilação da imunoglobulina pode determinar se uma glicofórmula de anticorpo é pró-inflamatória ou anti-inflamatória através da modificação da interação com receptores de Fc presentes em células do sistema imune (BOYD; LINES; PATEL, 1995), como a ausência de fucose central em IgG1 que aumenta em até 50 vezes a afinidade de ligação de FcγRIIIA humano com NK induzindo a ADCC (SHIELDS *et al.*, 2002). E a sialilação de IgG na porção Fc reduz afinidade com receptores ativadores FcγRs tipo I em células do sistema imune reduzindo a ADCC (SCALLON *et al.*, 2007). Já o aumento da galactose terminal pode aumentar citotoxicidade dependente do complemento (CDC) pelo aumento de atividade pela proteína do sistema complemento C1q (ELASSAD *et al.*, 1994), enquanto o aumento de resíduos terminais de GlcNAc e a diminuição da galactose resulta na diminuição da ligação do anticorpo a C1q e consequentemente a redução de CDC (ELASSAD *et al.*, 1994).

Nos desfechos de infecções de humanos por *L. infantum*, indivíduos diagnosticados com LV grave possuem baixos níveis de sialilação e galactosilação e aumento de fucose na porção Fc de IgGs, que estão correlacionadas com níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias além disso, após o tratamento do paciente o perfil de sialilação e galactosilação de N-glicanas em IgG1 aumentam, indicando que com a remissão da doença o perfil de N-glicosilação pode sofrer alterações. Adicionalmente, foi visto um aumento nos níveis de fucosilação e redução da sialilação em relação aos padrões observados em IgGs de indivíduos portadores de infecções assintomáticas. E a fucosilação pode estar relacionada a hipergamoglobulinemia e a uma resposta inflamatória descontrolada com “tempestade de citocinas” típicas da LV (GARDINASSI; DE MIRANDA SANTOS, 2014).

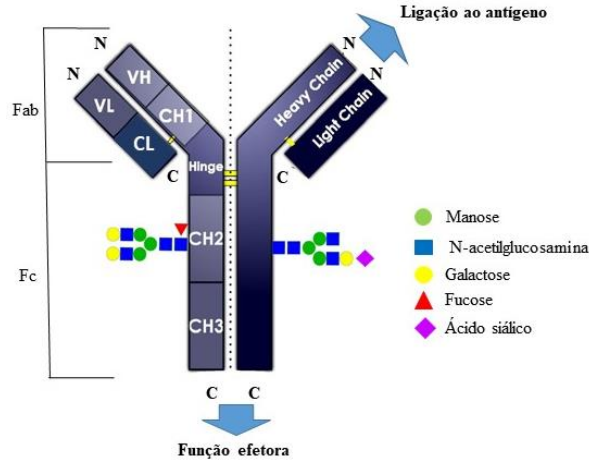


Figura IV- Estrutura esquemática de imunoglobulina IgG1. A molécula contém duas cadeias pesadas e duas cadeias leves com domínios variáveis leves (VL) e variável pesada (VH) formando o sítio de ligação ao antígeno e os domínios constantes leves (CH) e domínios constantes pesados (CH). A IgG ainda pode ser dividida em Fab (porção de ligação ao antígeno) e Fc (porção cristalizável) que induz as funções efetoras da imunoglobulina, (C) região carboxiterminal e (N) aminoterminal. Na região de CH2 observa-se a presença de glicanas, manose, N-acetilglucosamina, galactose, fucose e ácido siálico. Fonte: modificado de JANEWAY *et al.*, 2016.

Devido ao fato da captura e análise de anticorpos específicos de patógenos conhecidos serem possíveis, podemos observar como as mudanças ocorrem de maneira direcionada à infecção, e como elas acompanham a função efetora alterada de anticorpos. Assim, modelos de doenças infecciosas ajudam a elucidar o papel do controle da glicosilação do anticorpo específico do antígeno, definir o papel desses anticorpos na proteção ou patologia e apontar para novas oportunidades terapêuticas para ajustar a imunidade por meio da glicosilação do anticorpo (IRVINE; ALTER 2020).

Com as descobertas das funções da N-glicosilação, a glicoengenharia de anticorpos terapêuticos e imunoglobulina intravenosa (IVIG) tem sido usada para produzir IgGs terapêuticos com atividade personalizada, como IgG sialilada com propriedades anti-inflamatórias. Também o desenvolvimento de biomarcadores baseados em mudanças na glicosilação tem sido alvo de pesquisas recentes.

Desta forma, a análise de modelos experimentais com *Leishmanias* capazes de induzir em perfis de N- glicosilação iguais ou semelhantes a de humanos é de grande importância para prognóstico da doença e tratamento tendo em vista capacidade de modular a resposta imunológica de forma eficaz em destruição do patógeno.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Diferentes cepas de *L. infantum*, oriundas de pacientes portadores de LV que apresentam diferentes níveis de gravidade do quadro clínico podem induzir um quadro semelhante *in vitro* e *in vivo*, infectividade/virulência/ patogênese, e a gravidade da doença pode estar associada a capacidade das diferentes cepas em modificar a sialilação e fucosilação de anticorpos, pois as diferenças nos desfechos clínicos das infecções de humanos por *L. infantum*, podem estar relacionadas não somente por diferenças na composição genética do hospedeiro humano, mas por diferenças na composição genética do parasita, uma vez que as cepas isoladas de pacientes podem induzir diferenças na infecção experimental do hamster, isso porque durante a infecção o perfil de N-glicanas das regiões Fc pode modificar e afetar as funções efetoras dos anticorpos.

OBJETIVO

3.0 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi de caracterizar cepa padrão NCL e quatro cepas de *Leishmania infantum* isoladas de pacientes humanos diagnosticados com LV apresentando diferentes níveis de gravidade quanto a infectividade e patogenicidade para macrófagos de linhagem murina J774 e para hamsters *Mesocricetus auratus*.

Por meio dos resultados obtidos espera-se estabelecer a cepa a ser empregada em um modelo experimental no hamster que replique o espectro de desfechos clínicos observados em humanos infectados com *L. infantum* para permitir elucidar os mecanismos imunes de resistência e susceptibilidade a esse parasita.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a infectividade das cepas *in vitro*;
- Avaliar se há diferenças nas cepas ao nível de família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* e espécie *Leishmania infantum*.
- Analisar a infecção *in vivo* quanto a indução de sintomas em hamsters infectados;
- Analisar as modificações histopatológicas causada pelas diferentes cepas em hamsters infectados;
- Analisar qual cepa induz maior hipergamaglulinemia em hamsters infectados;
- Analisar as citocinas expressas em células hepáticas e esplênicas de hamsters infectados com as diferentes cepas, e correlacionar os níveis observados com a sintomatologia em hamsters infectados;
- Analisar as mudanças nos níveis de ácido siálico e fucose de amostras de IgG total dos grupos infectados com as diferentes cepas.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo experimental, considerações éticas

No presente estudo foi utilizado como modelo experimental hamsters machos da espécie *Mesocricetus auratus*, adquiridos da empresa Anilab (Paulínea, SP) com 2 semanas de vida. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada entre 22 e 25°C, alojados em grupos de quatro e cinco animais em caixas forradas com maravalha, com oferecimento de água e alimento *ad libitum*, diariamente. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA-FMRP) da Universidade de São Paulo, São Paulo sob o protocolo número 234/201.

4.2 Obtenção das cepas de *Leishmania infantum*

Os isolados clínicos de *Leishmania infantum*, foram obtidos por meio de uma biblioteca de amostras de pacientes do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela na região endêmica para Leishmaniose Visceral de Teresina Piauí, Brasil, e gentilmente cedidas pelo Dr. Carlos Henrique Nery Costa. As mesmas foram identificadas de forma a preservar a verdadeira identidade do paciente, de acordo com os códigos: 515, 1686, 1580 e 1851.

Após a punção da medula óssea dos pacientes com leishmaniose visceral, as amostras foram submetidas a testes para identificação do parasito por meio de coloração pelo Giemsa e cultivo em meio Novy-MacNeil-Nicolle (NNN) contendo 30 mL de sangue de carneiro; 250 mL de água destilada; 3,5 gramas de agar- Bacto™ Agar (BD-Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA); 1,5 mL de cloreto de sódio (NaCl) (Exodo científica, Sumaré, São Paulo, Brasil) e 1,25 gramas de peptone - Trypticase™ peptone (BD- Becton Dickinson, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA) por sete dias em estufa demanda bioquímica de oxigênio (BOD) (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) a 26°C e observação das formas promastigotas do parasito ao microscópio óptico. Para o armazenamento das amostras, *Leishmanias* cultivadas no meio NNN suplementado foram transferidos para o meio Schneider (Sigma-Co, Sainr Louis, EUA) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (LGC biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil); 2 % de urina humana masculina; 5 % pennicilina (100 U/ mL) e estreptomicina (100 µg/ mL) (Sigma-Co, Sanint Louis, EUA) e 1% L- glutamina por 3 a 4 dias em temperatura de 26°C e congeladas de forma lenta até a

temperatura de -195°C em nitrogênio líquido. No momento do uso as cepas foram descongeladas de forma rápida e transferidas para o meio Schneider suplementado.

Paralelamente, foi utilizado cepa padrão de *Leishmania infantum* NCL IOCL 3241 com código internacional de MHOM/BR/2005/NCL, cedida gentilmente pelo Dr. Célio Lopes do departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) na forma de promastigotas. A cepa teve passagem em camundongo para manutenção da virulência.

4.3 Curva de crescimento das cepas de *Leishmania infantum*

Para a construção da curva de crescimento dos parasitos, uma contagem inicial de 1×10^6 promastigotas/ mL foram cultivadas em garrafas de cultura de células estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY, EUA) com 5 mL de meio Schineider suplementado, conforme descrito no item 4.2, sob temperatura de 26°C durante 9 dias. Diariamente, foi realizada a observação da motilidade utilizando-se microscópio óptico invertido- Nikon- T1SM (Nikon, Minato, Tóquio, Japão). Para a contagem, as promastigotas foram diluídas 1:100 em solução formol 10 % e contadas com auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico Nikon- DS-Fi 1 (Nikon, Minato-Tóquio, Japão) na objetiva de 40 x. Os quatro quadrantes foram contados e a quantidade de promastigota/ mL foi calculada de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$n^{\circ} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10\ 000$$

Nº: número de promastigota/mL

Fator de diluição: 10^2

4.4 Cultura de macrófagos murinos J774.A1

A linhagem de macrófagos murinos J774. A1, gentilmente cedida pelo Dr. Célio Lopes, foi utilizada para a infecção *in vitro* com as diferentes cepas de *Leishmania infantum* no intuito de caracterizar a virulência dos parasitos *in vitro*. As células 1×10^7 foram cultivadas em garrafas plásticas de cultura de células com filtro (Falcon Corning, Nova York, EUA) em meio RPMI 1640 contendo L-glutamina (Corning Incorporated, Corning, Nova York, EUA) suplementado com 10 % de SFB inativado (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e 1 % de

antibiótico penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg / mL) (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenadas em estufa à temperatura de 37°C com atmosfera de 5 % de dióxido de carbono (CO₂) por sete dias, com troca de meio a cada dois dias.

4.5 Infecção *in vitro*

Após o período de 7 dias em cultura, os macrófagos foram descolados das garrafas com o auxílio de um raspador de células “cell scrap” (KASVI, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil), colocados em tubo cônico e centrifugadas a 125 x g por 7 minutos à 25°C. Em seguida, as células foram ressuspensas em 3 mL de meio RPMI 1640 suplementado conforme descrito no item 4.4, porém com apenas 1% de SFB. Uma alíquota de 10 µL foi retirada para a contagem no contador de células “countess automated cell conter” (Invitrogen, Invitrogen Life Technologies, Calsbad, California, EUA) para a padronização do número de células para a infecção. Em uma placa de cultura de células de 24 poços (EasyPath, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) com lamínulas redondas de vidro (Cover glass Knittel, Berlim, Alemanha) foram adicionados 1 x 10⁵ células/poço em um volume de 300 µL, e então armazenadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 2 horas para adesão nas lamínulas de vidro.

As promastigotas de *Leishmania infantum* em fase estacionária de crescimento oriundas de infecção em hamster, em segunda passagem, foram centrifugadas, por três vezes, a 3000 rpm sob temperatura de 4°C por 10 minutos, com PBS 1 X estéril (tampão de salina-fosfato), as células foram ressuspensas em aglutinina de amendoim “Peanult Agglutinin” (PNA) na concentração de 500 µg / mL (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) e mantidas sob temperatura ambiente (TA) por 20 minutos para seleção das promastigotas metacíclicas. Os parasitos foram, então, centrifugados a velocidade de 200 x g por 5 minutos a 4°C, por três vezes, com adição posterior de PBS 1X estéril. Após a preparação dos parasitos e retirada do meio de cultura das células, 1 x 10⁶ promastigotas em 300 µL de meio RPMI suplementado, foram adicionados em cada poço contendo os macrófagos (proporção de 10:1 *Leishmania*/ células) com interação de 4 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de interação, os parasitos não fagocitados foram retirados com a remoção completa do meio de cultura e adição de mais 500 µL de meio RPMI suplementado, sendo mantido sob mesmas condições de temperatura descritas anteriormente.

O experimento foi analisado após 24, 48 e 72 horas de infecção, e foi realizado em triplicata. Após cada período determinado, 200 µL do sobrenadante de cada poço foi armazenado a -20 °C para dosagem do Óxido nítrico (NO), em seguida os poços foram lavados com PBS 1X estéril por três vezes, fixados por incubação instantânea em metanol gelado por 10 minutos, corados com Panótico rápido (LB-Laborclin, Pinhais-PR, Brasil), retiradas da placa para montagem em lâmina (StarFrost-Knittel, Berlim, Alemanha) e montadas com Permount® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

A infecção foi contada em microscópio óptico, com objetiva de imersão (100 X). Foram analisados 100 macrófagos por lamínula e determinada a proporção de macrófagos infectados, o número de amastigotas por macrófago infectado e o índice de infecção.

$$II = MI \times AMA$$

II: índice de infecção

MI: macrófagos infectados

AMA: número de amastigotas por macrófago infectado

4.6 Infecção de hamsters *Mesocricetus auratus*

As promastigotas metacíclicas em segunda passagem foram selecionadas com PNA conforme descrito no item 4.5, ressuspensas em PBS 1X estéril e os hamsters com 3 semanas de idade foram infectados com 200 µL de PBS 1X contendo $1,7 \times 10^7$ parasitos por via intracardíaca, os animais controles receberam PBS 1X pela mesma via. Os grupos tiveram a seguinte separação: o controle que recebeu PBS 1 X com 4 animais, a cepa 1580 com 4 animais, a cepa 1686 com 4 animais, a cepa 1851 com 5 animais e a cepa 515 com 5 animais (Figura V).

Durante o experimento os hamsters foram pesados semanalmente e os sinais clínicos da doença checados constantemente. A eutanásia foi realizada quando os hamsters infectados exibiram um dos seguintes critérios: perda de peso em 20%; inapetência e incapacidade de beber água ou de responder a estímulos externos conforme descrito por Aslan e colaboradores (ASLAN *et al.*, 2013), os controles sem infecção e os assintomáticos perpetuaram por nove meses. Foi utilizado quetamina (200 mg/ kg) e xylazina (10 mg/ kg) na eutanásia.

As amostras de sangue foram retiradas por via intracardíaca, após a eutanásia dos animais, e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a TA para a obtenção de soro. Em fluxo laminar os

hamsters foram colocados em decúbito dorsal com assepsia da região abdominal e posteriormente foi feita a abertura da cavidade abdominal com auxílio de tesoura cirúrgica para a remoção do baço e fígado. Os órgãos foram analisados macroscopicamente, carimbados pelo método “imprint”, descrito no item 4.8, pesados e subdivididos em quatro fragmentos, para diluição limitante, extração de RNA, DNA e histologia.

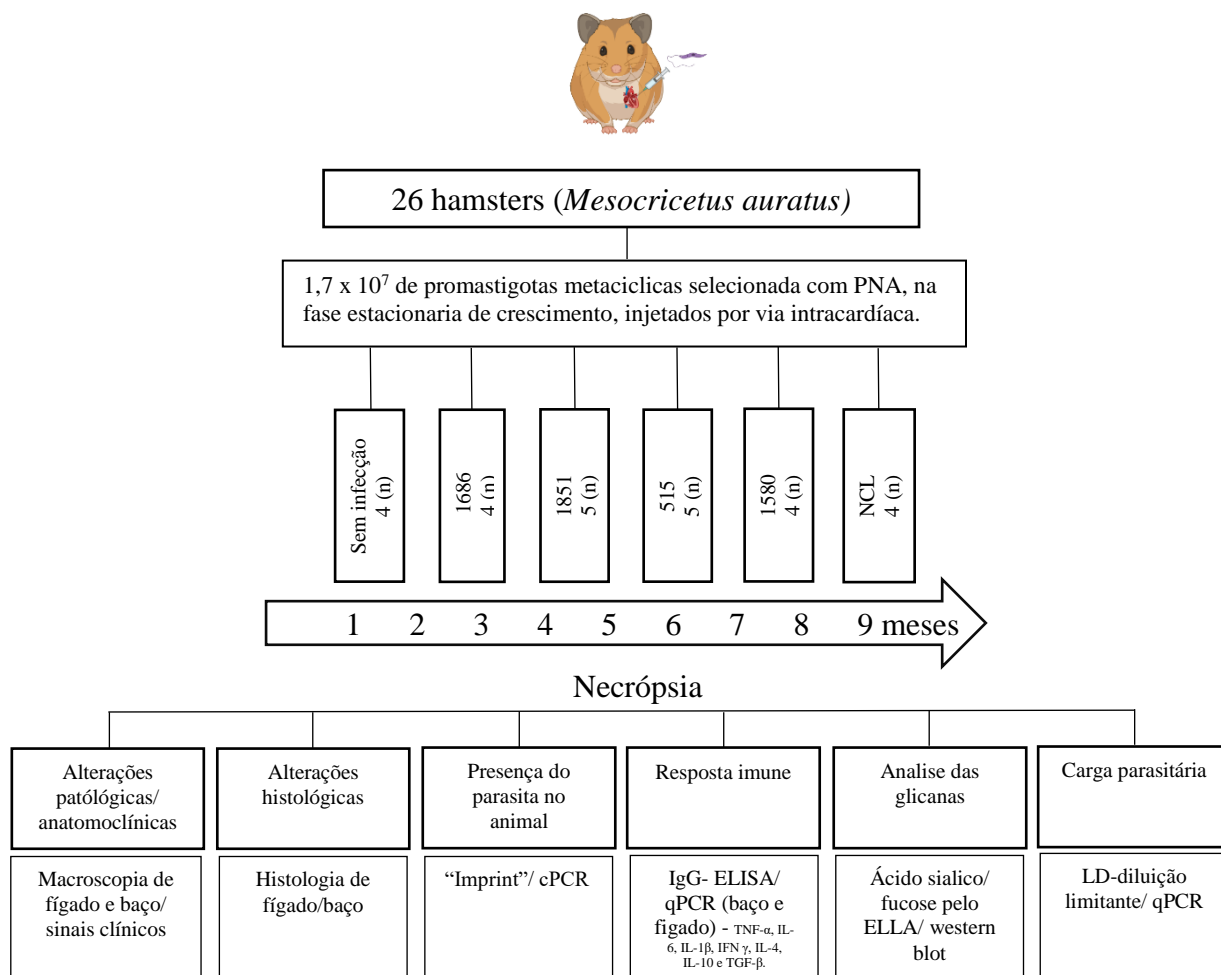


Figura V- Delineamento experimental da infecção *in vivo*. Hamster (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental, infectado por via intracardíaca.

4.7 Esfregação e aposição “imprint”

Fígado e baço foram carimbados em lâminas (StarFrost- Knittel, Berlim, Alemanha), corado com Panótico (LB-Laborclin, Pinhais-PR, Brasil) e analisado em objetiva de 100x no microscópio óptico.

4.8 Histologia

As amostras de baço (porção anterior) e fígado (lobo direito) de todos os hamsters, logo após a eutanásia, foram colocadas em formaldeído a 10% com PBS 1X por 72 horas, lavadas 3 vezes com água destilada, cortadas e colocadas em cassetes para o processo de desidratação com álcool nas concentrações de 80% por 30 minutos; 90% por 30 minutos; absoluto 1 por 30 minutos; absoluto 2 por 30 minutos; absoluto 3 por 30 minutos; absoluto 4 por e por xilol 1 por 30 minutos, xilol 2 por 30 minutos e xilol 3 por 1 hora. Os fragmentos desidratados foram embebidos em parafina 1 e 2 por 1 hora em cada parafina, armazenados no freezer e cortadas em 4-5 µm com auxílio do micrótomo, corados com hematoxilina e eosina (HE) e então avaliadas em microscopia óptica com objetiva de 20X e 40X.

As alterações foram avaliadas semi-quantitativamente, tendo em conta a extensão das alterações ao longo da secção histológica e classificadas como: 1 – sem alteração, 2 - discreto (20-30%), 3 - moderada (30-60%) e 4 - grave (> 60%).

4.9 Diluição limitante (LD)

Após a abertura da cavidade abdominal dos animais em fluxo laminar, o baço (porção apical anterior) e o fígado (lobo esquerdo) foram coletados, pesados e macerados com 2 mL de meio Schneider suplementado, conforme descrito no item 4.2, a 25 °C em filtro de células 100 µm nylon estéreis (Falcon Corning, Nova York, EUA). A suspensão foi homogeneizada, com o auxílio de uma pipeta, por dez vezes, para as amastigotas saírem dos macrófagos, o homogeneizado foi diluído em placas de 96 poços para cultura de células de fundo chato (Falcon-Becton Dickson, Franklin Lakes, EUA) na proporção de 1:10 em meio Schneider suplementado, e seguida por 12 diluições seriadas na base 10 em triplicatas, as placas foram vedadas com filme para vedação

(Parafilm® Bemis Compani, Neenah, Wisconsin, EUA) e acondicionadas em estufa biológica refrigerada BOD a 26°C por 7 dias. Após esse período foi realizada a contagem das promastigotas em câmara de Neubauer na diluição de 1:100 em formol 10% PBS 1X, de acordo com o item 4.3 (LIMA, 2010). A carga parasitária por diluição limitante (LD) foi determinada a partir da mais alta diluição que se observou o crescimento de promastigotas. A média do número de parasitos presentes na triplicata foi multiplicada pelo fator de diluição do poço correspondente, e o valor encontrado reflete a quantidade de parasitos presente no fragmento do órgão macerado (TITUS, 1985). A partir do valor encontrado para o fragmento, pode-se calcular a quantidade de parasito correspondente ao órgão inteiro, seguindo a relação:

$$\text{Número de parasitas no órgão} = \frac{\text{NP} \times \text{POI (gr)}}{\text{PF (gr)}}$$

NP: número de parasitos contatos na maior diluição, considerando todos os fatores de diluição.

POI: peso do órgão inteiro.

PF: peso do fragmento.

4.10 Extração de DNA de fígado e baço dos hamsters

Após a coleta de fígado e baço dos hamsters, os mesmos foram armazenados a -70 °C até o momento do experimento. Foram utilizados 25 mg de fígado e 10 mg de baço para a extração de DNA seguindo as instruções do kit “Pure Link Genomic DNA mini” (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, California, EUA). Inicialmente em tubo cônico os órgãos foram cortados e pesados, em seguida foi adicionado 180 µL tampão de digestão que promove a desnaturação de proteínas e facilita a ação da proteinase K, e 20 µL proteinase K aquecidos a 55 °C por 1 hora para o fígado e 3 horas para o baço com breve agitação em “vórtex mixer K45 2810” (Kasvi basic, Buenos Aires, Argentina) para a digestão dos tecidos. Após esse período as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante transferido para outro tubo cônico e adicionado 20 µL RNase A por 2 minutos em TA, para digestão e remoção do RNA, 200 µL tampão de ligação e 200 µL de álcool a 95%, ambos facilitam a ligação do DNA na membrana de sílica presentes na coluna onde será transferida a amostra para posteriores lavagens com remoção das impurezas e eluição em 100 µL de tampão de eluição.

Depois da extração de DNA, as amostras foram quantificadas no Nanodrop ND100 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e a integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% com 200 ng de DNA, 1 µL de “gelred” 1X Biotium (São Francisco, EUA) usado para corar o DNA, tampão amostra 6X (60 mM EDTA, 10 mM de Tris-HCL, pH 7.6, 0,25 % de azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol) utilizados como corantes para facilitar a visualização do DNA na eletroforese em campo elétrico, mais q.s.p. (quantidade suficiente para) de 10 µL de água livre de nuclease estéril. Por fim, foram submetidos a corrente elétrica com tampão tris-acetato-EDTA- TAE 1 nas condições de 150 W, 150 A por 1 hora e analisada no aparelho (Bio Imaging Systems- Mini Bis P DNR, Baton Rouge, Louisiana, EUA), posteriormente foi armazenada no -20 °C.

4.11 Extração de DNA dos isolados clínicos de *L. infantum* e das cepas HUUFS14 e NCL IOCL 3241

O DNA da cepa HUUFS14 de *L. infantum* foi extraído utilizando o Kit “Wizard® SV Genomic DNA Purification System” (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) de acordo com o fabricante, pelo método de isolamento de DNA genômico de cultura de células. Utilizando a microcentrifuga, 1 mL da cultura do parasito foi lavado com PBS 1X por centrifugação a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos, e colocado em tubo cônico com 150 µL de tampão de lise, em seguida homogeneizado com a pipeta, transferido para a coluna, centrifugado novamente. Em seguida a coluna contendo o DNA foi lavado e centrifugado por 4 vezes com 650 µL de solução de lavagem fornecida pelo kit, centrifugado, 2 µL de RNase A foi colocado em 30 µL de água livre de nuclease para remoção do RNA, posteriormente a amostra foi centrifugada e quantificado no Qubit^R 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenado no -20 °C.

Para a extração de DNA dos promastigotas, 1×10^8 parasitos cultivados em meio Schneider suplementado conforme descrito no item 4.2, foram centrifugadas a 3000 rpm, 4°C por 10 minutos para retirada do meio de cultura, em seguida lavadas três vezes com 1 mL de PBS 1X estéril, centrifugadas novamente sob as mesmas condições descritas acima, e ressuspensionado em 200 µL de PBS 1 X estéril. O “kit Pure Link Genomic DNA mini” (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, California, EUA), foi utilizado para a extração de DNA, de acordo com as instruções do fabricante, ao qual no término das lavagens, foram adicionados 20 µL proteinase K, 20 µL RNase A e 200 µL

tampão de ligação, e incubadas por 10 minutos a 55°C em banho-maria para promover a digestão de moléculas e proteínas. No próximo passo, foram adicionados 200 µL de álcool 100% e o conteúdo no tubo cônico foi transferido para a coluna, centrifugado a 10 000 x g por 1 minuto, em seguida lavado duas vezes com 500 µL tampão de lavagem fornecido pelo kit e entre as lavagens centrifugado a 10000 x g por 1 minuto, no fim as amostras de DNA foram eluídas em 100 µL de tampão de eluição, quantificadas no Nanodrop ND100 (Thermo Fisher Scientific- Waltham, Massachusetts, EUA) com integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% com 200 ng de DNA, 1 µL de gelred[®] 1X Biotium (São Francisco, EUA) usado para corar o DNA, tampão amostra 6X (60 mM EDTA, 10 mM de Tris-HCL, pH 7.6, 0,25 % de azul de bromofenol e 0,25% xileno cianol), utilizados como corantes para facilitar a visualização do DNA na eletroforese em campo elétrico, mais q.s.p. 10 µL de água estéril livre de nuclease. Sendo então submetido a corrente elétrica com tampão tris-acetato-EDTA- TAE 1 X nas condições de 150 W, 150 A por 1 hora e analisada no aparelho (Bio Imaging Systems- Mini Bis P DNR, Baton Rouge, Louisiana, EUA), posteriormente armazenadas em temperatura de -20 °C.

4.12 Análise dos produtos por cPCR- PCR convencional

Na cPCR foi utilizado os iniciadores LinJ31seq na concentração de 0,4 µM, direcionado para amplificação de *Leishmania infantum*, na região de 500 pb com sequência sob sigilo, doado gentilmente pela Prof. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR). A reação foi composta por tampão TRIS 1x (1mM de Triss-HCL pH=8 e 5mM de KCL), que mantém o pH ótimo para que ocorra a reação; 0,2 mM dNTP – nucleotídeos; 2 mM de MgCl₂ que otimiza a taq polimerase, 0,05U/µ Taq DNA polimerase- enzima responsável pela amplificação do DNA; 12,75 µL de água ultrapura e 3 µL de amostra com concentração de 100 ng foram utilizados em um volume total de 25 µL em tubo cônico livre de nucleasse. Em seguida, a reação foi submetida as condições de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minuto, seguida por desnaturação com 30 ciclos a 94 °C por 60 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 40 segundos e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Biometra Tone (Analytik Jena, Jena, Alemanha).

Para avaliação em eletroforese, 1 µL de marcador “ladder” Gene Ruler 1 “kilobytes” (kb) DNA Plus ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foi colocado no primeiro poço para detectar o peso molecular de cada banda, nos poços posteriores foram colocados 5 µL/ poço dos produtos da PCR, em gel de agarose a 1%, corado com “Syber Safe” na proporção de 1:10 000 (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, California, EUA), que facilita a visualização de DNA em gel de agarose sob excitação de luz ultravioleta, a corrida ocorreu em tampão TAE 1X nas condições de 80 W e 400 A por 40 minutos e analisado no ChemiDoc™ XRS. System (Bio-Rad, Hércules, Califórnia, EUA) e no software Image Lab™ 3.0.

4.13 Análise das diferentes cepas por cPCR

Na PCR convencional para análise dos diferentes isolados clínicos (515, 1686, 1851 e 1580) e das cepas (HUUFS14 e NCL IOCL 3241) de *Leishmania infantum* foram utilizados iniciadores Hsp70 (ESPADA *et al.*, 2018) que identifica o gênero *Leishmania* e iniciadores SSU (NOYES *et al.*, 1999) que identifica a família *Trypanosomatidae* com amplificação nos seguimentos de 1286 pb e 561 pb, respectivamente. Os iniciadores utilizados (Tabela I) nessas reações foram doados gentilmente pela Profa. Dra. Sandra Regina Costa Maruyama do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR), com sequências descritas em (ESPADA *et al.*, 2018) e (NOYES *et al.*, 1999).

Tabela I- Sequência de iniciadores “forward e reverse”, Hsp70 específicos para identificação do gênero *Leishmania* e SSU específico para a família *Trypanosomatidae*.

Iniciador	Sequência
Hsp70	F: 5'-GAAACAAGAAACACGGGAG-3' R: 5'-CTACTGGGCAGCTTGGAA-3'
SSU	F: 5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3' R: 5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3'

Fonte: Espada *et al.*, (2018); Noyes *et al.*, (1999).

A reação para cPCR com Hsp70 foi composta por tampão 1x (1mM de Triss-HCL pH=8 e 5mM de KCL) o qual mantém pH ótimo para que a reação ocorra; 0,2 mM dNTP- nucleotídeos; 0,2 µM de cada iniciador contendo sequência de interesse; 2 mM de MgCl₂ que otimiza a reação

da Taq polimerase; 0,05U/ μ Taq DNA polimerase, enzima responsável pela amplificação do DNA; 13,75 μ L de água ultrapura e 3 μ L de DNA na concentração de 100 ng utilizados em um total de 25 μ L em tubo cônico livre de nuclease. Já com relação a reação de cPCR para SSU foi utilizado as mesmas concentrações, exceto para cada iniciador que foi modificada para 0,4 mM; MgCl₂ a 4 mM e 10,75 μ L de água ultrapura. Ambas as reações foram submetidas as condições de desnaturação inicial a 94°C por 4 minuto, seguida por desnaturação de 30 ciclos a 94°C por 50 segundos, anelamento de 57°C por 1 minuto, extensão de 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final a 72°C por 7 minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador (Biometra Tone, Analytik Jena, Jena, Alemanha).

Para análise, foram colocados 5 μ L/ poço do produtos da PCR com um poço contendo 1 μ L do marcador “Gene Ruler 1 kb DNA Plus ladder” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), foram aplicadas na eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com “Syber Safe” (Invitrogen Life Technologies, Calsbad, California, EUA), em tampão TAE 1X nas condições de corrida 80 W, 400 A por 40 minutos e analisado no Transluminador de LED Kasvi K33-333 (KASVI, São José dos Pinhais- PR, Brasil) e fotodocumentada por aparelho fotográfico digital Sony Cyber Shot DS (Sony, Minato, Tóquio, Japão).

4.14 Construção da curva padrão para PCR em tempo real (qPCR)

A curva padrão foi feita a partir de DNA genômico (gDNA) extraído da cepa HUUF14 conforme descrito no item 4.11, para estimar a quantidade de promastigota utilizada. Para isso, foi considerado o tamanho da *L. infantum* (haplóide) 31,2 Mb (GONZÁLEZ-DE LA FUENTE *et al.*, 2017), kDNA (DNA do cinetoplasto), correspondente a 15,8% da massa total de um parasito (JARA *et al.*, 2013) e que a *Leishmania sp.* é diplóide (STERKERS *et al.*, 2011; REIS-CUNHA; VALDIVIA; BARTHOLOMEU, 2018), o valor da massa foi calculado de acordo com a referência em Applied Biosystems (2016).

Após os cálculos foram feitos seis pontos de curva em duplicata com estimativa de 1.000.000 (10⁶); 100.000 (10⁵); 10.000 (10⁴); 1.000 (10³); 100 (10²) e 10 (10¹) parasitas, desta forma foram colocados 3 μ L de gDNA de *Leishmania* de cada ponto da curva, 1 μ L de gDNA de fígado/ baço de hamster sem infecção, 5 μ L 2x SYBR green Master-mix, agente fluorescente que se liga no DNA de fita dupla que é captado pelo aparelho de PCR em tempo real (PCR Biosystems,

Reino Unido, Londres), 0,5 µL de cada iniciador LinJ31seq “forward e reverse” (2 µM), totalizando 10 µL na reação. Essas quantidades de DNA foram padronizadas de forma que o DNA do hamster presente nas amostras não interfira na eficiência dos iniciadores.

4.15 Análise dos produtos por qPCR

Para análise dos produtos item 4.10 e da curva item 4.14, foi utilizado iniciadores LinJ31seq, com sequência sob sigilo, na concentração de 2 µM, direcionado para amplificação de *L. infantum*. Nas curvas foram adicionados 4 µL de cada ponto (DNA da *Leishmania* e das amostras do item 4.11) com 5 µL de 2x SYBR green Master-mix e 0,5 µL de cada iniciador “forward e reverse” (2 µM), totalizando 10 µL na reação (item 4.14). As amostras de DNAs de fígado e baço dos hamster (item 4.10) inicialmente foram padronizadas a 20 ng de DNA com as mesmas quantidades de iniciadores e “Sybr” descritos anteriormente. Depois, reagente e amostras foram distribuídos em placas de 96 poços (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) selada com adesivos MicroAmpTM Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA), centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto em TA e colocada no aparelho 7500 “Real-Time PCR System” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) nas condições de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida por desnaturação com 40 ciclos a 94°C por 10 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e uma extensão final a 72°C por 30 segundos. Os resultados foram expressos pelo número de parasito por órgão, onde quantidade média dividido por 20 ng foram multiplicados pelo peso do órgão em miligrama.

4.16 Extração de RNA de fígado e baço de hamsters

Para a extração de RNA, a porção do processo caudado do lobo caudado do fígado (200 mg) e a região posterior do baço (100 mg) foi macerada com nitrogênio líquido, logo após a retirada nos animais, adicionado 1 mL de trizol- Tri reagent® (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) para isolar e preservar o RNA, e em seguida armazenado no -70°C até o uso.

Após o descongelamento 150 µL do homogeneizado de trizol de fígado foram colocados em tubo cônico e adicionados mais 350 µL de trizol, já para o baço foram usados 300 µL do homogeneizado em 200 µL de trizol. Em seguida foram adicionados para fígado e baço 200 µL de clorofórmio, homogeneizado com a pipeta e armazenado sobre o gelo por 5 minutos para a extração do RNA e solubilização dos lipídios permitindo a sua remoção. Depois o homogeneizado foi centrifugado a 1200 x g por 15 minutos a 4°C, para coleta da porção translúcida, contendo o RNA e acrescido 200 µL de álcool 95% para cada órgão, para promover a precipitação e limpeza dos sais presentes no RNA. O RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante através do kit “SV total isolation system” (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) com transferência do homogeneizado para coluna, que contem fibras de vidro facilitando a ligação do RNA na superfície sílica presente nas fibras de vidro, para ser centrifugado (12 000 x g por 1 minuto) e lavado com 600 µL de solução de lavagem, em seguida foram adicionados 50 µL “DNase mix” por 15 minutos, para digestão do DNA genômico contaminante. A reação foi parada com 200 µL de solução “stop” e lavado com 600 µL de solução de lavagem com centrifugação a 12 000 x g por 1 minuto com processo repetido por duas vezes, para remoção dos sais contaminantes, proteínas e impurezas celulares, e em seguida eluído em 100 µL de água livre de nuclease.

Após a extração as amostras foram quantificadas no aparelho nanodrop (Nanodrop ND100 Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e armazenadas no -70°C. O DNA complementar (cDNA) foi preparado com RNA total extraído do fígado e baço utilizando o Kit “High- Capacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, onde 1 µg de RNA total de fígado ou 0,5 µg de RNA total de baço foram adicionados em 10 µL de “2X RT master mix”, e em seguida colocados no termociclador nas condições de 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 5 minutos a 85°C e 1 ciclo a 4°C, consecutivamente. Após o término, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20 °C até o momento da amplificação por qPCR.

4.17 Análise do qPCR das citocinas

Amostras de cDNA adquiridas conforme descrito no item 4.16 foram utilizadas para a análise de citocinas. Os iniciadores e sondas para os genes que codificam para as citocinas TNF- α ,

IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β (Tabela II), foram desenvolvidos pela empresa “LCR Cientific” (Cosmópolis, São Paulo, Brasil) com sequência descrita em (ZIVCEC *et al.*, 2011) na concentrações de 0,3 μ M de cada iniciador; 0,2 μ M de sonda que possui uma sequência específica entre os iniciadores, suas extremidades possui agentes como “quencher” e “repórter” que quando juntos não emitem fluorescência, entretanto quando estão na reação com todos os componentes do PCR, a sonda se separa durante a amplificação e emite a fluorescência que é captada pelo aparelho de PCR em tempo real. Além disso, a reação é composta por 5 μ L de mix 2X qPCR BIO Probe Mix Separate Rox (PCR Biosystems-Reino Unido, Lodres), 1 μ L de cDNA e 3,2 μ L de água livre de nuclease, totalizando 10 μ L. Em seguida, as placas seladas com adesivo MicroAmpTM Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) foram centrifugadas a 1000 x g por 1 minuto em TA e colocada no aparelho 7500 “Real-Time PCR System” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) com desnaturação inicial de 95 °C por 10 minutos seguidos por 30 ciclos de desnaturação de 95°C por 15 minutos e anelamento e extensão de 58 °C para os iniciadores exceto para IL-6 com temperatura de anelamento de 56 °C por 1 minuto.

A análise da expressão relativa para cada gene alvo (citocinas) e a obtenção da quantificação relativa ou “fold chang” (QR) foi realizado pelo método Delta- Delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), no qual inicialmente é calculado os valores médios dos Δ Cts de cada amostra, através da subtração do Cts dos genes alvos (citocinas) com os Cts dos genes endógenos (“housekeeping” B2M) [Δ Ct= média dos Cts (genes alvo) - média dos Cts (genes endógenos B2M)]. Posteriormente os Δ Ct das amostras infectadas foram normalizadas pela subtração da média dos Δ Cts dos animais não infectados para obtenção do $\Delta\Delta$ Ct [$\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct (amostras) - Δ Cts (amostra normalizadora)]. Após a determinação do $\Delta\Delta$ Ct, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Tabela II- Sequência de iniciadores (F) “forward”, (R) “reverse” e (P) “probe”-sonda de citocinas TNF- α , IL-6, IL-1 β , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β expressas em células de fígado e baço de hamsters.

Gene de interesse	Sequência
β -2-Microglobulin (B2M)	F: 5'-GGC TCA CAG GGA GTT TGT AC-3' R: 5'- TGG GCT CCT TCA GAG TTA TG-3' P: FAM-CTG CGA CTG ATA AAT ACG CCT GCA
Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	F: 5'- GGA GTG GCT GAG CCA TCG T-3' R: 5'-AGC TGG TTG TCT TTG AGA GAC ATG-3' P: FAM-CCA ATG CCC TCC TGG CCA ACG
Interleucina- 6 (IL-6)	F:5'- CCT GAA AGC ACT TGA AGA ATT CC-3' R:5'-GGT ATG CTA AGG CAC AGC ACA CT-3' FAM-AGA AGT CAC CAT GAG GTC TAC TCG GCA AAA
Interleucina- 1 beta (IL-1 β)	F:5'- GGC TGA TGC TCC CAT TCG-3' R:5'- CAC GAG GCA TTT CTG TTG TTC A-3' P:FAM-CAG CTG CAC TGC AGG CTC CGA G
Interferon gama (IFN- γ)	F:5'- GGC CAT CCA GAG GAG CAT AG-3' R:5'- TTT CTC CAT GCT GCT GTT GAA-3' P:FAM-CAC CAT CAA GGC AGA CCT GTT TGC TAA CTT
Interleucina- 4 (IL-4)	F:5'- CCA CGG AGA AAG ACC TCA TCT G-3' R:5'- GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT AAA-3' P:FAM-CAG GGC TTC CCA GGT GCT TCG CAA GT
Interleucina- 10 (IL-10)	F:5'- GTT GCC AAA CCT TAT CAG AAA TGA-3' R:5'- TTC TGG CCC GTG GTT CTC T-3' P: FAM-CAG TTT TAC CTG GTA GAA GTG ATG CCC CAG G
Fator de crescimento transformador (TGF- β)	F:5'- TGT GTG CGG CAG CTG TAC A -3' R:5'- TGG GCT CGT GAA TCC ACT TC -3' P: FAM-CGA CTT TCG CAA GGA CCT GGG CT

Fonte: Zivcec *et al.*, (2011).

4.18 Preparação de antígeno

O antígeno foi feito com a cepa NCL IOCL 3241, uma vez que é a cepa de referência utilizada neste estudo, assim no dia de pico de crescimento as promastigotas metacíclicas foram selecionadas por PNA e ressuspendido em 4 mL de coquetel capaz de inibir enzimas que degradam as proteínas- inibidores de proteases composto por sacarose a 8% diluído em Tris HCL 5 mM com pH 7,4; leptina a 0,5 µg/ mL; pepstatina a 0,07 µg/ mL; tripsina 50 ng /mL e fluoreto fenilmetilsufonil 2 µg/ mL. Os parasitos foram submetidos a choques térmicos por cinco ciclos em banho-maria a 37°C e nitrogênio líquido, foram então sonicadas (Sonics-Vibra cell Biovera, Heerbrugg, Suíça) durante 5 minutos com pulso de 30 minutos por cinco vezes, para rompimento das células, em seguida a amostra foi centrifugada a 1400 x g por 5 minutos a 4°C para a coleta do antígeno solúvel. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico BCA com auxílio do kit “BCA Protein Assay, Pierce” (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Uma curva com 9 pontos contendo albumina nas diluições de: 2000; 1500; 1000; 750; 500; 250; 125; 25 µg/ mL e um ponto sem albumina foi preparada, em seguida foi feita uma diluição de 1:5 das amostras. Posteriormente, foram colocados 25 µL das amostras e das curvas em placa de fundo chato estéril individual de 96 poços (Cralplast, Cotia, São Paulo) mais 200 µL de reagente A e B na proporção de 50:1 e incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos. A leitura foi realiza após a incubação com absorvância de 562 nm utilizando um espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific- Waltham, Massachusetts, EUA).

4.19 Deglicosilação de antígeno de *Leishmania infantum*

A presença de glicanas em antígenos de *Leishmania* foi relatado em estudos para desenvolvimento de diagnósticos e de adjuvantes para vacinas (SILVEIRA; KEMMELMEIER, 1995; OSANYA *et al.*, 2011). Desta forma nós testamos a eficiência do tratamento do antígeno com a enzima GlycINATOR Endo S2 LE 2000 unidades (Genovis, Cambridge, USA) para a remoção das glicanas; afim de usar o antígeno posteriormente na técnica Enzyme-linked lectin assay (ELLA), com lectinas biotinilados específicas para detectar carboidratos na superfície de glicoproteínas (GORNIK; LAUC, 2007; THOMPSON *et al.*, 2011).

Após a preparação do antígeno de *Leishmania infantum* no item 4.18, o antígeno da cepa NCL IOCL 3241 foi deglicosilado com a enzima GlycINATOR Endo S2 2000 unidades (Genovis, Cambridge, USA) que remove as glicoformas em IgG, na proporção de 1:50 (antígeno – enzima) diluídos em PBS 1X, e incubados a 37° C em banho-maria por 30 minutos. Posteriormente, em tubos diferentes 10 µg de cada antígeno foram ressuspensos em q.s.p 30 µL de tampão de amostra 5X (Tris- HCl 125 mM pH 6,8- fornece íons para a formação na corrente na eletroforese; glicerol 20%- permite que amostra entre no poço por força de gravidade, dodecil sulfato de sódio [SDS] 8%- um detergente que desnatura as proteínas e normaliza proporção massa/carga; β-mercaptoetanol 10%- agente que cliva ligações de dissulfeto, azul de bromofenol 0,025%- corante que facilita a aplicação da amostra no gel e auxilia no monitoramento da corrida) foram aquecidas a 100°C por 5 minutos, para desnaturação. Depois, 15 µL amostra/poço foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida– SDS-PAGE 15% (Bio- Rad laboratories, Hercules, Califórnia, EUA) utilizando-se o sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, EUA) a 250 V e 0,15 A/ par de gel por 35 minutos em tampão de corrida 1X (Tris- base 25 mM; Glicina 250 mM; SDS 2%). Após, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose 0,45 µM (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA) utilizando-se o sistema Trans-Blot® SD (Bio-Rad- Hercules, California, EUA) com tampão de transferência 1X (glicina 40 mM; tris- base 48 mM; SDS 10% -3,7 mL; metanol 20%, q.s.p. 1 litro) a 25 V; 0,25 A/ gel, 300 W por 35 minutos. A membrana de nitrocelulose contendo o antígeno deglicosilado e não deglicosilado foi bloqueada com solução de 0,5% de PVA –álcool polivinílico com peso molecular 50 000 g/mol (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) diluído em PBS 1 X (solução descrita no item 4.25) por 12 horas a 4°C, um polímero que não possui interação com glicanas. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T 0,1% (PBS pH 7,4 e Tween 20 0,1%) TA por 5 minutos sob agitação orbital e incubada com lectinas biotinilada específica para ácido siálico *Sambucus nigra* (elderberry bark) (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences- California, EUA) ou para fucose *Aleuria aurantia* (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences- California, EUA) na concentração de 2 µg/ mL em PBS 1X por 1 hora sob agitação orbital em TA, em seguida foram lavadas três vezes com PBS-T 0,1% TA por 10 minutos sob agitação orbital. A streptavidina HRP (Sigma-Co, Sainr Louis, EUA), que detecta moléculas biotiniladas (Sigma-Co, Sainr Louis, EUA) diluída 1:400 em PBS 1X foi adicionada sobre a membrana e incubada por 30 minutos em PBS 1X, foram então lavadas nas mesmas condições anteriores e revelada com reagente de detecção ECL (GE

healthcare, Chicago, Illinois, EUA) em sistema ImageQuant™ LAS 500 (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA).

4. 20 “Enzyme linked immuno sorbent assay” - ELISA

As placas Nunc (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL por poço de antígeno de *Leishmania*, obtidos conforme descrito no item 4.18, na concentração de 2 µg diluído em tampão de bicarbonato pH 9,6 composto por carbonato de sódio (Na₂CO₃) 15mM e Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 35mM e armazenadas a 4°C por 12 horas, para promover a ligação dos antígenos na placa. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com PBS 1X; 0,05% de tween 20 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) (PBS-T) e bloqueadas com 200 µL de solução contendo 5% leite em pó desnatado diluído em PBS 1X e 0,05% de tween 20 por 2 horas TA, e após este tempo os soros foram adicionados a solução de bloqueio na diluição de 1:100 seguindo de diluição seriada até 1:3200 e incubação em estufa a 37 °C por 1 hora. Terminada a incubação as placas foram lavadas por duas vezes com PBS-T e uma com PBS 1X apenas, assim foram adicionados 100 µL por poço de anticorpo anti- IgG de hamster conjugado com peroxidase- KPL antibody (SeraCare life sciences, Milford, Massachusetts, EUA) na diluição 1:4000 e novamente mantido a 37 °C por 1 hora. Para a revelação, as placas foram lavadas com PBS 1X por 3 vezes, 100 µL de “Step Ultra TMB” “tetramethylbenzidine”-ELISA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) foram adicionados e por fim, a reação foi parada com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 3%. A leitura foi realizada em 450 nm no aparelho VersaMax (Molecular Devices, San José, California, EUA).

4.21 Purificação de IgG total

A purificação de IgG total foi realizada a partir do soro dos hamsters infectados e controles (sem infecção) utilizando a placa - Protein G HP Multitrap (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA), que possui proteína G HP de sefarose com alta afinidade para região Fc de IgG de várias espécies, de acordo com as instruções do fabricante, que consiste em remover a solução de armazenamento, que vem na placa de sefarose, por centrifugação a 90 x g, em seguida foram adicionados 300 µL

de tampão de ligação para equilibrar as reações na placa e centrifugada por 4 minutos a 100 g x para sua retirada, um total de 300 µL de amostra foram adicionados, sendo 200 µL de PBS 1X e 100 µL de soro, e deixado em repouso por 10 minutos, mexendo suavemente. Após esse período, a placa foi centrifugada por 30 segundos a 100 x g e lavada com 300 µL de tampão de ligação por duas vezes, entre cada lavagem as placas ficaram sob agitação em uma rotação de 12 000 rpm por 1 minuto. Em seguida as amostras foram eluídas em 200 µL tampão de eluição para uma placa contendo 15 µL de tampão neutralizador.

Após a purificação as amostras foram diluídas na proporção de 1:5 e quantificadas pelo método do ácido bicinonínico BCA a partir do kit BCA Protein Assay, Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) de acordo com o fabricante. A leitura foi a 562 nm utilizando espectrofotometro Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific- Waltham, Massachusetts, EUA), descrita no item 4.18.

A integridade foi avaliada por eletroforese gel de poliacrilamida– SDS-PAGE 15%, onde amostras contendo 5 µg de anticorpo IgG diluídas em tampão de amostra 5X aquecidas a 100°C por 5 minutos, para desnaturação. Posteriormente foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% utilizando-se o sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad- Hercules, California, EUA) a 250 V e 0,15 A por 35 minutos em tampão de corrida 1X. Após esse período o gel foi corado com azul de Coomassie (metanol 40%, ácido acético glacial 10%, Coomassie blue R250 0,1%) para visualização das proteínas sob agitação orbital por no mínimo 2 h e então descorado com solução descorante (metanol 45% e ácido acético glacial 10%) para ser analisado no fotodocumentador ImageQuant™ LAS 500 (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA).

Para imunodeteção dos anticorpos IgG, 5 µg das amostras foram submetidas a SDS-PAGE 15% conforme descrito anteriormente, e transferida do gel para membrana de nitrocelulose (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA) utilizando-se o sistema Trans-Blot® SD (Bio-Rad- Hercules, California, EUA) com tampão de transferência 1X a 25 V; 0,25 A/ gel; 300 W por 35 minutos. Em seguida, membrana de nitrocelulose contendo o anticorpo foi bloqueada com solução de bloqueio, 5% de leite em pó desnatado diluído em PBS 1X, por duas horas sob agitação orbital em TA. Logo a membrana foi lavada duas vezes com PBS-T 0,1% (PBS pH 7,4 e Tween 20 0,1%) e uma vez com PBS-1X sob agitação orbital a TA por 15 minutos e incubada com anticorpo anti- IgG de hamster conjugado com peroxidase KPL antibody (SeraCare life sciences, Milford, Massachusetts, EUA) na diluição de 1:15000 em PBS 1X por 1 hora em TA, depois lavado três vezes por 5 minutos

nas mesmas condições anteriores para ser revelado com reagente de detecção ECL (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA) em sistema ImageQuant™ LAS 500 (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA).

4.22 “Enzyme-linked lectin assay” (ELLA)

Para realização do experimento a solução de bloqueio foi feita um dia anterior ao experimento. O álcool polivinílico (PVA) com peso molecular de 50 000 g/mol (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) na concentração de 0,5% foi pesado e diluído em PBS 1X pH 7,5 em TA, em seguida foi homogeneizado em agitador e aquecido em banho-maria na temperatura de 86°C por 1 hora e 30 minutos ou até a diluição total do reagente (THOMPSON, *et al.*, 2011; PHARMA SPECIAL, s.d.).

A análise das glicanas presentes nos IgGs totais de hamsters infectados com as diferentes cepas de *L. infantum* e não infectados foi realizada aplicando a técnica do ELLA. Placas de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com os anticorpos purificados na concentração de 2 µg/poço em volume de 100 µL/ poço diluídos em tampão carbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM) por 1 hora a 37°C, para promover a ligação dos anticorpos na placa (SILVA *et al.*, 2016; BUNDO, 1985).

Em seguida as placas foram lavadas três vezes com TBS-T 1X (Triss HCL 50 mM NaCl 150 mM e 0,05% tween 20) e bloqueadas com 200 µL de solução de bloqueio por 2 horas. Após o bloqueio, as placas foram lavadas três vezes com TBS-T e as lectinas biotinizadas específica para ácido siálico *Sambucus nigra* (elderberry bark) (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences-California, EUA) ou para fucose *Aleuria aurantia* (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences-California, EUA) foram adicionadas na concentração de 2 µg/100 µL/poço em TBS 1X por 1 hora a 37°C (GORNIK; LAUC, 2007). Finalizada a incubação com as lectinas, as placas foram lavadas três vezes com TBS-T e uma vez com TBS-1X para adição de streptavidina HRP (R&D Systems a biotechne brand, Minneapolis, USA) na concentração de 1:400 diluído em TBS-1X por 1 hora a 37°C em seguida as placas foram lavadas três vezes com TBS-T e reveladas com 100 µL de Step Ultra TMB” “tetramethylbenzidine”-ELISA e paradas com 50 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) na concentração de 0,2 N. A análise da absorbância foi realizada a 450 nm no aparelho VersaMax (Molecular devices, Califórnia, EUA).

4.23 Imodetecção das glicanas por *Western blot*

Para imunodetecção das glicanas em anticorpos IgG foi feito por eletroforese gel de poliacrilamida– SDS-PAGE 15% (Bio- Rad laboratories, HErcules, Califórnia, EUA), onde amostras contendo 2 µg de anticorpo IgG diluídas em tampão de amostra 5X, aquecidas a 100°C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 15% utilizando-se o sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad laboratories, Hercules, California, EUA) a 250 V e 0,15 A por 35 minutos em tampão de corrida 1X. Logo, a transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose 0,45 µM (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA) foi feita utilizando-se o sistema Trans-Blot® SD (Bio-Rad- Hercules, California, EUA) com tampão de transferência 25 V; 0,25 A/ gel, 300 W por 35 minutos. Em seguida, membrana de nitrocelulose contendo o anticorpo foi bloqueada com 0,5% de PVA em PBS 1 X por 12 horas a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T 0,1% a TA por 5 minutos sob agitação orbital e incubada com lectina ácido siálico *Sambucus nigra (elderberry bark)* (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences- California, EUA) ou para fucose *Aleuria aurantia* (Vector Laboratories, Maravai LifeSciences- California, EUA) na concentração de 2 µg/ mL em PBS 1X por 1 hora sob agitação orbital em TA. Em seguida lavadas três vezes com PBS-T 0,1% TA por 10 minutos sob agitação orbital. A streptavidina HRP (Sigma-Co, Sainr Louis, EUA) diluída 1:400 em PBS 1X foi adicionada e incubada por 30 minutos, lavadas nas mesmas condições anteriores e revelada com reagente de detecção ECL (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA) em sistema ImageQuant™ LAS 500 (GE healthcare, Chicago, Illinois, EUA). A imagem e a mensuração da área foram feitas pelo software ImageJ na análise de plot (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Características dos isolados clínicos

Visto que as características do indivíduo podem interferir no resultado da doença, os dados dos pacientes foram verificados quanto a classificação da doença em calazar oligoassintomático, com sinais de febre, indisposição e inapetência, ou calazar grave, correspondente a sintomas severos de hemorragias, comprometimento hepático, alterações cardíacas e cianose que quando não tratado pode levar o paciente a óbito (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006); sexo do paciente, classificação etária e região também foram verificados (Tabela 1). Infelizmente não foi possível obter os dados completos de todas as amostras coletadas dos pacientes, no entanto o isolado 1686 de uma criança do sexo masculino com calazar grave e 1851 de um adulto também do sexo masculino com calazar oligoassintomático serviram como parâmetros para o desenvolvimento do nosso estudo.

Tabela 1- Características das cepas de *Leishmania*. PI: Piauí; MG: Minas Gerais; NR: não registrado.

Cepa	Classificação da doença	Sexo do paciente	Classificação etária	Localização geográfica	Método de isolamento
1686	Calazar grave	Masculino	Criança	PI- Teresina	Punção da medula óssea
1851	Calazar oligoassintomático	Masculino	Adulto	PI- Teresina	Punção da medula óssea
515	NR	NR	NR	PI- Teresina	Punção da medula óssea
1580	NR	Feminino	Criança	PI- Teresina	Punção da medula óssea
3142	NR	NR	NR	MG- Montes Claros	Punção da medula óssea

Fonte: Arquivo pessoal (2021).

5.2 Curva de crescimento para determinar prazo de cada cepa para chegar em promastigotas infectivos

A curva de crescimento foi analisada a fim de entender o comportamento dos parasitos para realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo* na fase estacionária- infectiva da *Leishmania*. Os parasitos tiveram platô de crescimento no quarto dia (Figura 1).

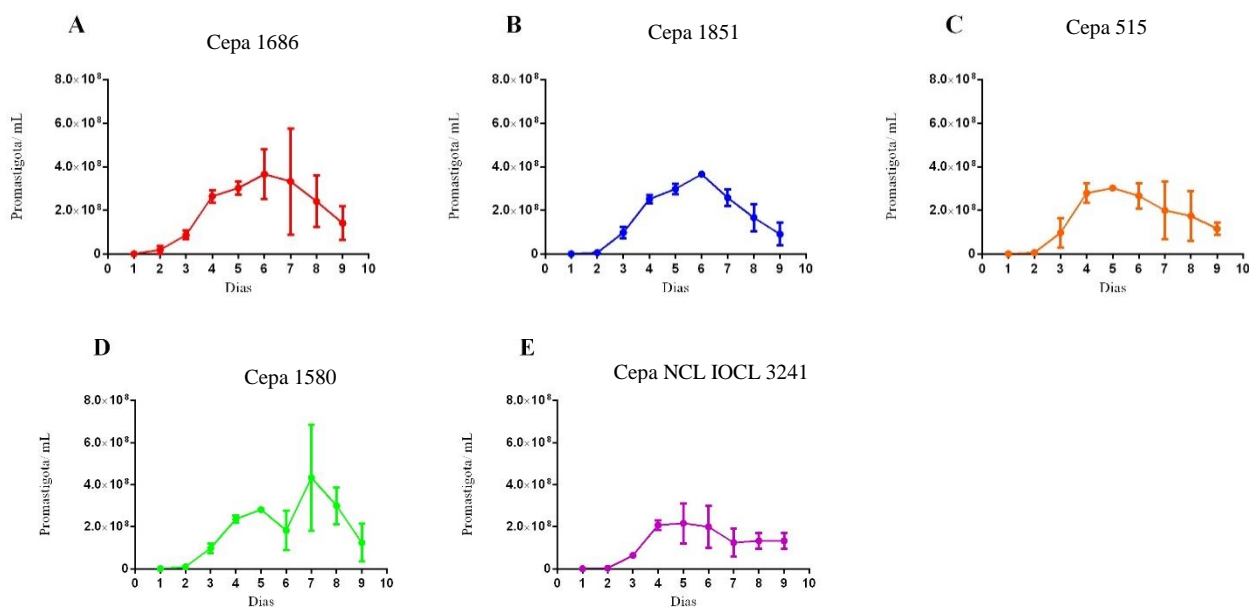


Figura 1- Curvas de crescimento de diferentes cepas (A) 1686; (B) 1851; (C) 515; (D) 1580 e (E) cepa NCL IOCL 3241 de *Leishmania infantum* com platô de crescimento no quarto dia em todas as cepas. A análise foi realizada no software GraphPad Prism e os resultados apresentados são as médias e desvios padrão das contagens.

5.3 Identificação da família *Trypanossomatidae*, gênero *leishmania* e espécie *Leishmania infantum* por PCR

Os iniciadores para SSU e HSP70 foram utilizados para detectar família *Trypanossomatidae* e gênero *Leishmania* com amplificação na região de 561 pb e 1851 pb, respectivamente indica positividade em análise por técnica PCR. Sendo assim, conforme indicado na (Figura 2A), todas as cepas apresentaram marcação e pertencem a família *Trypanossomatidae*

e (Figura 2B) ao gênero *Leishmania* apesar da 1851 apresentar banda fraca indicando que se refere ao gênero. Em ambos os experimentos foram utilizadas cepa de *Leishmania infantum* Huusp14.

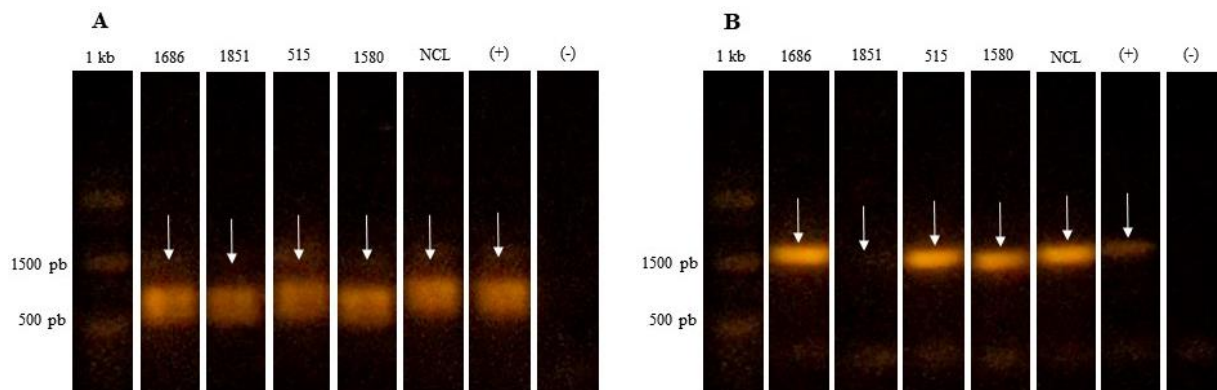


Figura 2- Identificação de família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania* nas formas promastigotas das cepas de estudo por PCR. (A) Iniciadores SSU específico para família *Trypanosomatidae* com amplificação na região de 561 pb (seta branca) em todas as cepas utilizadas neste estudo. (B) Iniciadores HSP70 que detecta o gênero *Leishmania* com amplificação na região de 1286 pb, seta branca, em todas as cepas utilizadas neste estudo. (+) a cepa Huusp14 foi utilizada como controle positivo; (-) sem amostra de DNA indicando controle negativo. Imagem capturada em transluminador LED Kasvi K33-333 e fotodocumentada por aparelho fotográfico digital Sony Cyber-Shot DSC.

Para identificar espécie *infantum* por meio de PCR, iniciadores LinJ31seq foram utilizados, os resultados positivos apresentaram amplificação na região de 500 pb. Nos dados obtidos, as cepas isoladas dos pacientes não amplificaram na região de interesse, somente a cepa de referência NCL IOCL 3241 e HUUF14 apresentaram marcação (Figura 3).

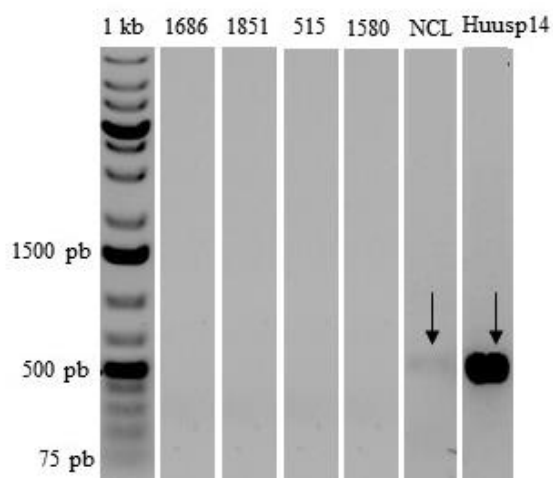


Figura 3- Identificação da espécie *Leishmania infantum* em formas promastigotas das diferentes cepas do estudo por PCR. A seta indica marcação na região de 500 pb na cepa NCL IOCL 3241 e na cepa HUUSP14 utilizando iniciadores LinJ31seq, enquanto nas outras cepas não houve amplificação. Imagem capturada por ChemiDoc™ XRS Systems (Bio-Rad) e software Image Lab™ 3.0.

5.4 Infecção *in vitro*

Para identificar qual cepa possui maior índice de infecção *in vitro*, macrófagos de linhagem J774 infectados no pico de crescimento dos parasitos foram analisados após 24, 48 e 72 horas, conforme consta o esquema na Figura 4A. A cepa 1686 apresentou o maior índice de infecção, tendo uma redução após 72 horas (Figura 4B) com destruição dos macrófagos devido a multiplicação dos parasitos e presença de amastigotas nas lamínulas entre as células. A cepa 1851 teve crescimento contínuo ao longo da infecção atingindo o maior índice após 72 horas (Figura 4C), comportamento similar de infecção ocorreu com a cepa 515, a segunda com maior índice de infecção (Figura 4D), cepa 1580 (Figura 4E) e cepa NCL IOCL 3241 (Figura 4F), de forma que as duas últimas tiveram os menores índices de infecção após 72 hora.

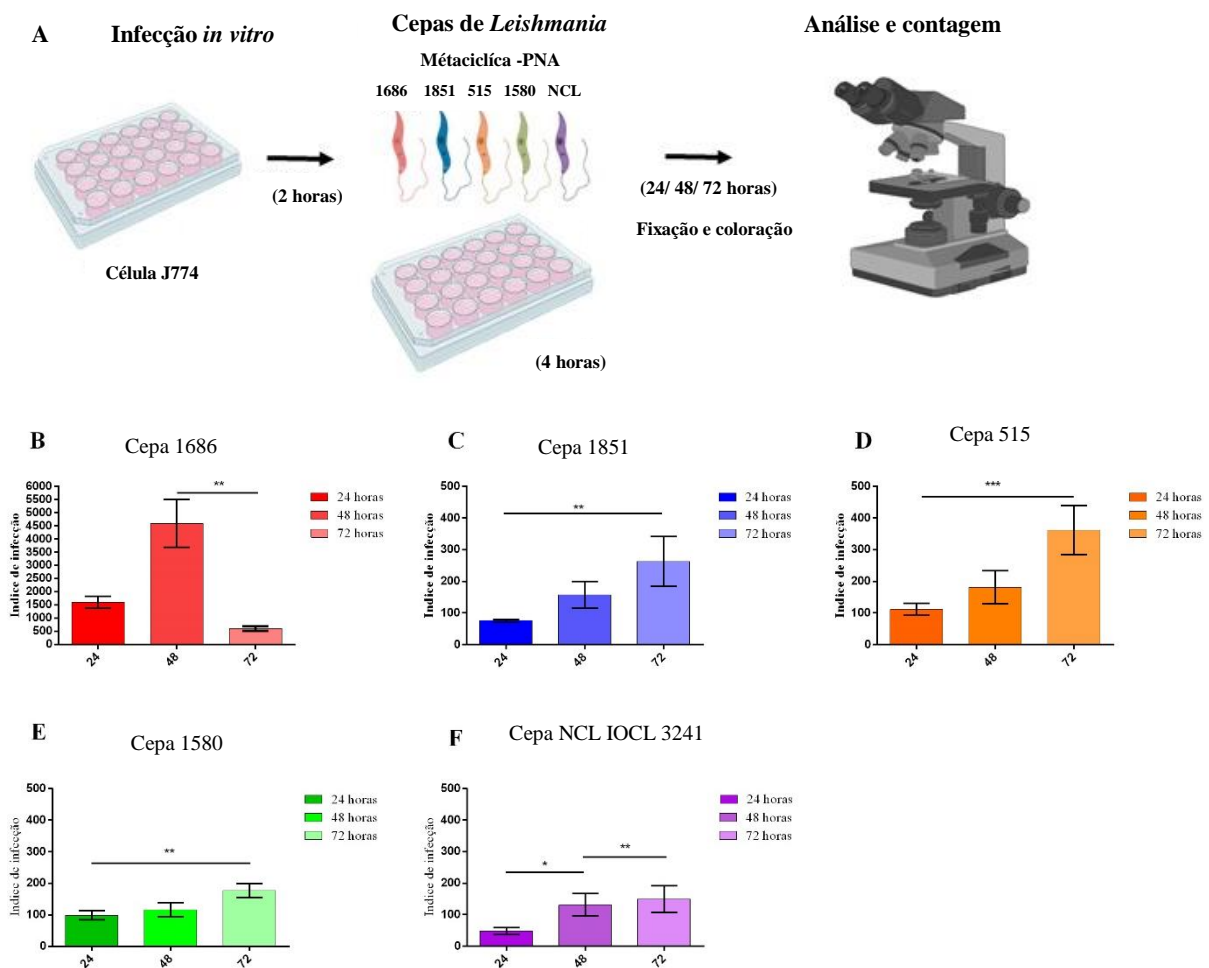


Figura 4- Índice de infecção de macrófagos de linhagem J774 infectados com as diferentes cepas de *Leishmania infantum* analisados após 24, 48 e 72 horas. (A) esquema do protocolo experimental para infecção de células *in vitro* (B) macrófagos infectados com a cepa 1686 com índice de infecção maior no tempo de 48 horas, enquanto que em macrófagos infectados com as cepas (C) cepa 1851 e (D) 515, (E) cepa 1580 e (F) cepa NCL IOCL 3241, apresentaram índice de infecção em 72 horas. Os dados foram estatisticamente analisados pelo Software GraphPad Prism usando o teste Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.5 Presença de fucose e ácido siálico no antígeno de *Leishmania infantum*

A fim de verificar a presença de fucose e ácido siálico nas formas promastigotas de *L. infantum* da cepa de referência NCL IOCL 3241 e avaliar a capacidade da enzima GlycINATOR Endo S2 (Genovis, Cambridge, USA) em deglicosilar a fucose e ácido siálico, para que o antígeno fosse posteriormente utilizado no ensaio ELLA selecionando anticorpos específicos da doença e evitando interações das lectinas com os açúcares presentes no antígeno, a técnica de western blot

(item 4.19 e 4.22) foi empregada. Os resultados foram analisados pelo cálculo da área por pixel através do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) (Figura 5C e 5D). A partir das imagens foi possível observar a presença de ácido siálico (Figura 5A) e fucose (Figura 5B), conforme esperado, e a redução, mas não a eliminação, de ambas as glicanas nos antígenos deglicosilados com a enzima (Figura 5). Esses resultados nos permitiram elaborar protocolos e avaliar a capacidade da enzima de deglicosilar o antígeno.

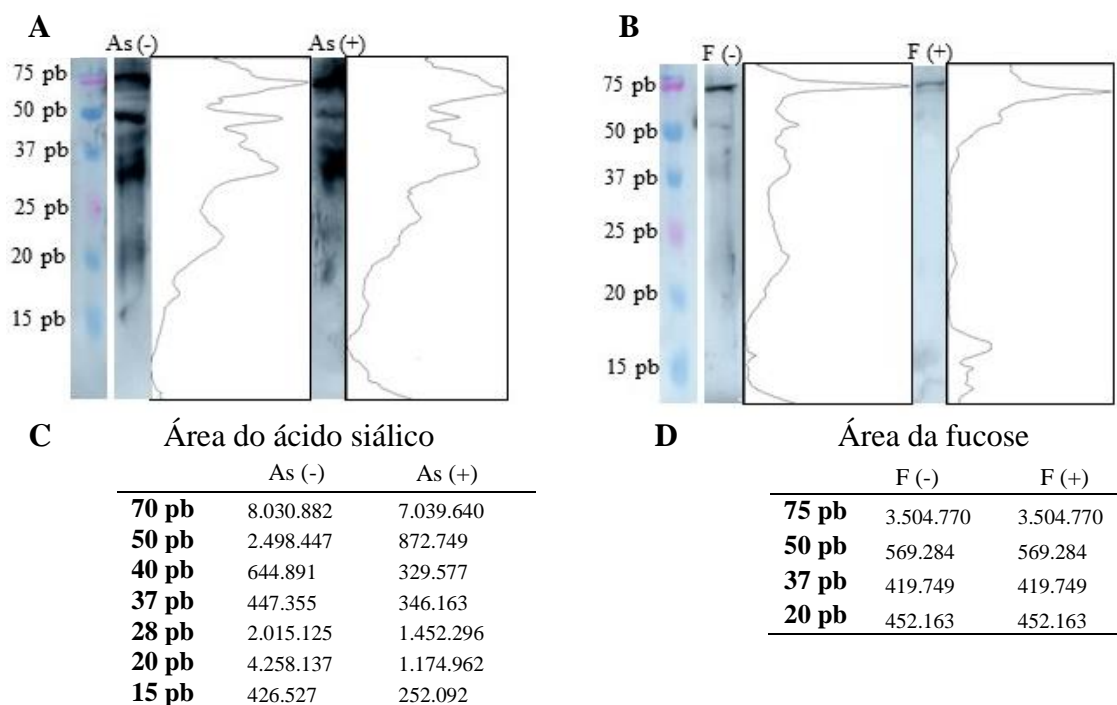


Figura 5- Presença de ácido siálico e fucose em antígeno NCL IOCL 3241 e avaliação da capacidade de deglicosilação da enzima GlycINATOR. (A) western blot mostrando a presença de ácido siálico antes da utilização da enzima – AS (-), e depois da utilização da enzima – AS (+); (B) western blot mostrando a presença de fucose antes – F (-), e após a adição da enzima – F (+), em ambos os experimentos para detecção de F e AS observa-se a presença dos açúcares mesmo após a utilização da enzima mostrando que não houve remoção total, mas sim parcial. (C) e (D) Cálculo da área da banda para analisar a diferença antes e após a deglicosilação. Os cálculos foram realizados pelo software ImageJ. As: ácido siálico, F: fucose, (-) sem a utilização da enzima e (+) com a utilização da enzima.

5.6 Infecção experimental em hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo

A infecção *in vivo* foi realizada para analisar a virulência de cada cepa, assim como avaliar os aspectos anatomo- clínicos da LV experimental em hamster. A fim de atingir nosso objetivo, os

animais foram acompanhados quanto aos sinais clínicos. A cepa 1580 foi o primeiro a induzir sinais de LV nos hamsters, 75% dos animais apresentaram sintomatologia clínica de apatia, coprofagia, desidratação, diarreia, edema de patas, emagrecimento, inapetência, incoordenação motora, lesão em mucosa oral, mucosa pálida, pelos eriçados e secreção ocular purulenta e serosa nasal e auricular (Figura 6-I) entre 15 e 30 semanas pós infecção, no entanto um animal (25%) permaneceu assintomático até o fim do estudo (Tabela 2). Enquanto que no grupo de hamsters infectados com a cepa 1686 todos os animais apresentaram sinais clínicos de LV tais como perda de peso, apatia, coprofagia, desidratação, diarreia, edema de patas, emagrecimento, inapetência, icterícia, incoordenação motora, lesão em mucosa oral, coloração pálida de mucosa, pelos eriçados e secreção ocular purulenta e serosa nasal entre 20 e 30 semanas pós infecção (Tabela 2, figura 6 - II). Já nos animais infectados com a cepa 1851 foram observados, entre 20 e 35 semanas pós infecção, coprofagia, desidratação, diarreia, edema de patas, epistaxe, emagrecimento, incoordenação motora, lesão em mucosa oral, mucosa pálida, pelos eriçados, secreção ocular purulenta e serosa nasal (Figura 6-III), e um animal permaneceu assintomático até o fim do estudo, perpetuando por 9 meses (Tabela 2). Os animais infectados com as cepas 1686, 1851 e 1580 apresentaram os sinais clínicos mais agressivos com presença de taquicardia.

Por outro lado, a cepa 515 induziu sinais clínicos aparentes faltando apenas 1 semana para completar 9 meses de infecção, e 80% dos animais permaneceram assintomáticos. A cepa NCL IOCL 3241, surpreendentemente, não induziu sintomas nos animais (Figura 6 – IV, Tabela 2), os quais apresentaram apenas alopecia na região do focinho tal como os controles (Figura 6– V, Tabela 2).

Tabela 2- Sinais clínicos presentes nos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as cepas de estudo *Leishmania infantum*. As cepas 1686, 1851 e 1580 induziram maiores quantidades de sinais clínicos de LV em hamsters. A cepa 515 induziu sinais clínicos em apenas 20% dos animais, e o restante (80%) e mais todos infectados com NCL IOCL 3241 não induziram nenhum sinal clínico de LV.

Sinais Clínicos	Cepas				
	1686	1851	515	1580	NCL
	n/t (%)	n/t (%)	n/t (%)	n/t (%)	n/t (%)
Assintomático	-	1/5 (20)	4/5 (80)	1/4 (25)	4/4 (100)
Apátia	2/4 (50)	-	-	1/4 (25)	-
Alopecia- focinho	-	-	-	-	4/4 (100)
Coprofagia	4/4 (100)	2/5 (40)	-	1/4 (25)	-
Desidratado	4/4 (100)	2/5 (40)	-	1/4 (25)	-
Diarreia	2/4 (50)	1/5 (20)	-	1/4 (25)	-
Edema de patas	1/4 (25)	4/5 (80)	-	1/4 (25)	-
Epistaxe	-	1/5 (20)	-	-	-
Emagrecimento	4/4 (100)	4/5 (80)	1/5 (20)	3/4 (75)	-
Inapetência	4/4 (100)	-	-	3/4 (75)	-
Icterícia	2/4 (50)	-	-	-	-
Incoordenação	1/4 (25)	1/5 (20)	-	1/4 (25)	-
Lesão mucosa oral	1/4 (25)	2/5 (40)	-	1/4 (25)	-
Mucosa pálida	1/4 (25)	-	-	1/4 (25)	-
Pelos eriçados	4/4 (100)	2/5 (40)	-	4/4 (100)	-
Secreção nasal	1/4 (25)	1/5 (20)	-	1/4 (25)	-
Secreção ocular	2/4 (25)	1/5 (20)	-	1/4 (25)	-
Secreção auricular	-	-	-	1/4 (25)	-
Taquicardia	4/4 (100)	4/5 (80)	-	3/4 (75)	-

n – número de animais com sintomas, t – total de animais



Figura 6- Hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de estudo. I – 1580: (A) perda de peso corporal; (B) secreção ocular; (C) lesão em mucosa oral com edema; (D) edema de patas; (E) lesão auricular (seta branca); (F) diarreia e (G) ausência de sintomas. II – 1686: Sintomático com (A) perda de peso; (B) diarreia; (C) coprofagia; (D) secreção nasal e (E) secreção ocular. III – 1851: (A) perda de peso, (B) lesão em mucosa oral, edema e escoriação ao redor do focinho (seta), (C) coprofagia, (D) edema e eritema em região plantar do membro anteriores (E) edema e eritema em região dorsal do membro anteriores e (F) ausência de sintomas. IV - 515 e cepa NCL IOCL 3241: (A) com perda de peso; (B) assintomático, sem perda de peso (C) infectado com a cepa NCL IOCL 3241 com ausência de sinais clínicos. V – Controle: sem alterações físicas. Imagens capturadas por câmera de celular Samsung galaxy A70 e editadas em aplicativo Samsung 2021. 21090. 10007.0 Microsoft Corporation.

A oscilação de peso foi o sinal clínico determinante para a eutanásia dos animais, além de ser uma das primeiras mudanças observadas. A cepa 1686 foi a que mais rápido induziu a perda de peso nos animais (Figura 7B), já aqueles infectados com as cepas 1851 (Figura 7C) e 1580 (Figura 7E) apresentaram redução de peso de forma assilar entre os animais, ou seja, houveram animais que permaneceram por mais tempo sem (ou com menor) alteração de peso/ Hamsters infectados com as cepas 515 (Figura 7D) e NCL (Figura 7F) tiveram menor oscilação de peso, de forma que apenas um animal da cepa 515 teve seu peso reduzido nos últimos dias do experimento.

5.7 Curva de sobrevivência dos hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo

Os hamsters infectados com a cepa 1580 foram eutanasiados nos dias 115, 124, 210 e 274 pós infecção com probabilidade de vida de, respectivamente, 75%, 50%, 25% e 0%. Enquanto os animais infectados com a cepa 1686 foram eutanasiados nos dias 146, 156, 161 e 163 pós infecção com a mesma probabilidade de sobrevivência da cepa 1580. A cepa 1851 induziu sintomas nos animais levando a eutanásia nos dias 146, 175, 238 e 274 pós infecção, e a probabilidade de sobrevivência foi de 80%, 40%, 20% e 0% respectivamente. Entretanto, a 515 induziu sintomas que levassem a eutanásia apenas em um animal no dia 239 pós infecção apontando uma probabilidade de sobrevivência de 80%, os demais animais foram eutanasiados no fim do estudo, tendo, portanto, neste ponto, uma probabilidade de sobrevivência de 0% em dia 274. Já os hamsters infectados com a cepa NCL, nenhum apresentou sintomas que levassem a eutanásia, de forma que chegaram até o fim do experimento, dia 274 pós infecção (Figura 7).

Comparando as curvas de sobrevivência dos hamsters infectados com as cepas houve diferença significativa com valor de $p=0,003$, porém em análises separadas a cepa 1686, 1851 e 1580 apresentou diferença significativa com relação ao controle com valores de $p= 0,0067$; $p= 0,0259$ e $p=0,0455$, respectivamente (Figura 8).

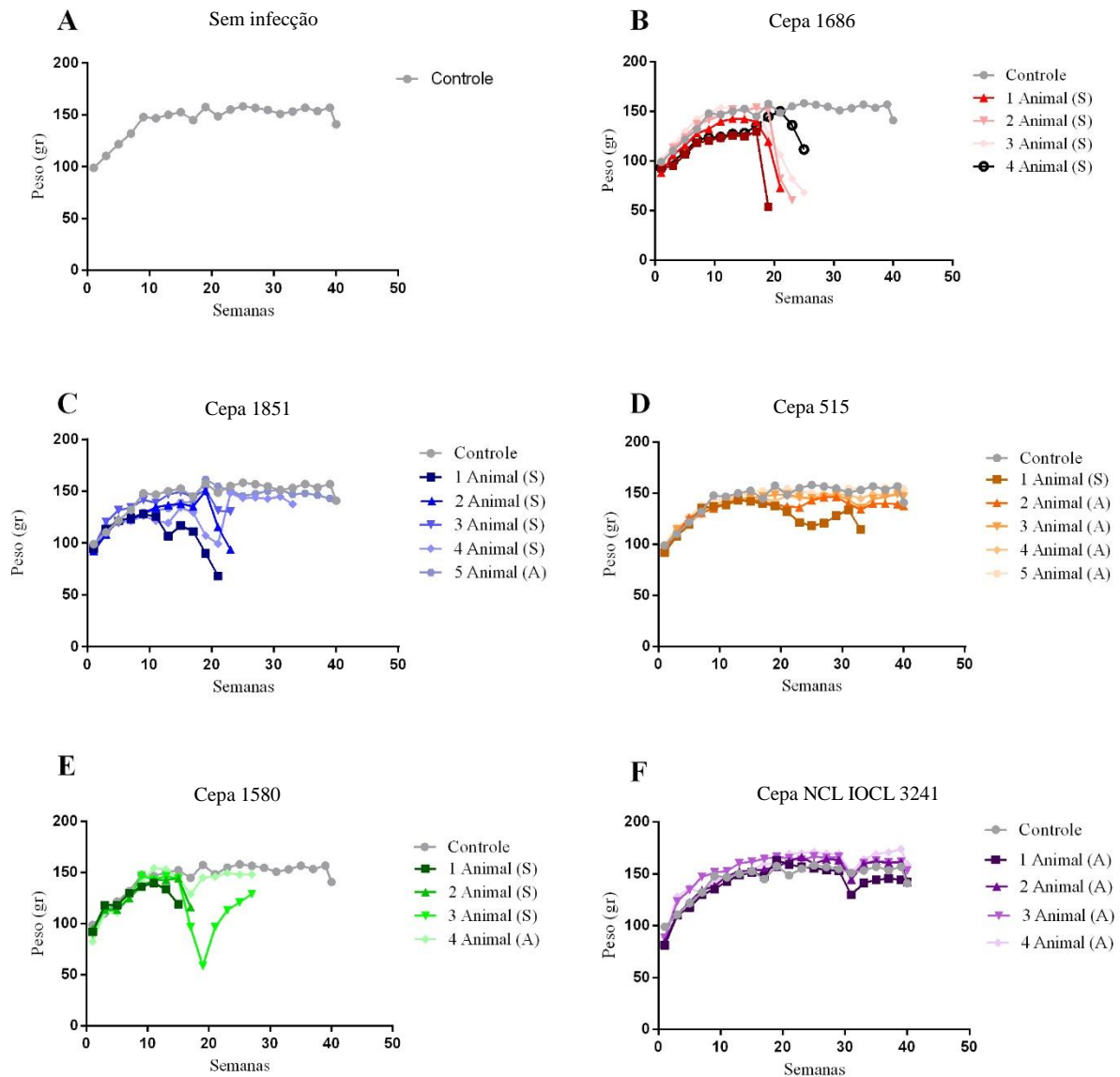


Figura 7- Pesagem dos hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com as diferentes cepas de estudo. (A) média da pesagem dos animais sem infecção; (B) animais infectados com a cepa 1686, com redução do peso em todos os animais; (C) infectados com a cepa 1851, com redução do peso de 80% dos animais; (D) infectados com a cepa 515, com redução do peso de 80% dos animais; (E) infectados com a cepa 1580 com redução do peso de 100% dos animais; (F) infectados com a cepa NCL IOCL 3241, não houve alteração do peso corporal. A análise estatística foi realizada no software GraphPad Prism e os gráficos mostram linhas referentes a oscilação de peso de cada animal medidas semanalmente.

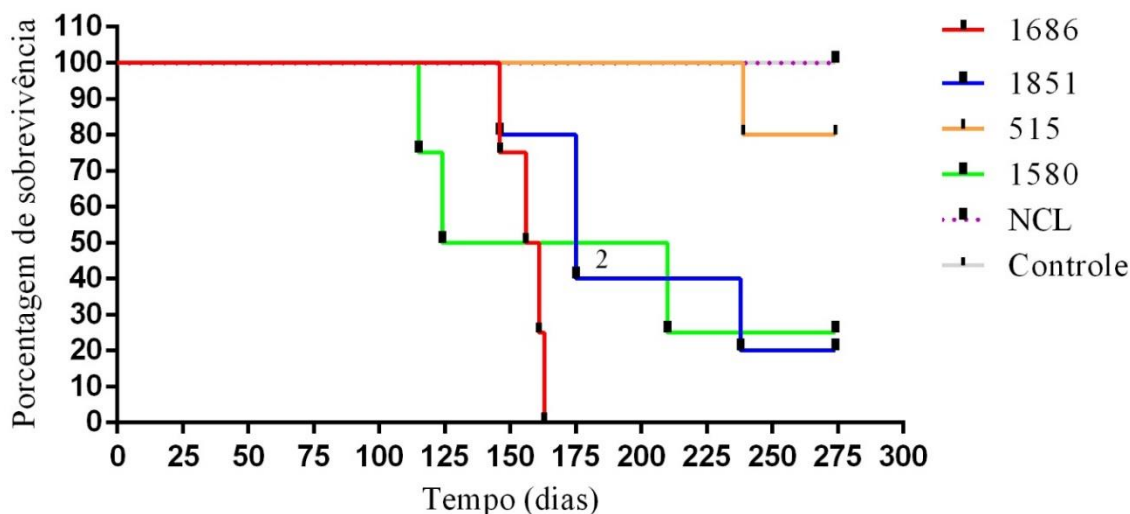


Figura 8-Curva de sobrevida de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas do estudo. Cepa 1580 foi a primeira cepa a induzir sinais clínicos no hamster após 115 dias de infecção, mas foi a cepa 1686 que induziu sinais clínicos de LV com indicação de eutanásia em todos os hamster. Teste de Kaplan-Meier foi utilizado mostrou diferença estatística entre os grupos com $p < 0,001$

5.8 Características macroscópicas do fígado e baço dos hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo e controle

É sabido que o baço e o fígado são órgãos afetados pela LV desta forma, as alterações macroscópicas desses órgãos foram avaliadas. Foi visto que os fígados de todos os animais infectados com as cepas 1686, 1580 e 1851 possuem alterações no tamanho e na coloração, já os animais infectados com as cepas 515 e NCL IOCL 3241 não apresentaram alterações anatopatológicas se mantendo similar aos controles (Tabela 3, figura 9). Com exceção dos baços de hamsters infectados com a cepa NCL IOCL 3241 e controles, todos os demais animais infectados apresentaram alterações anatômicas tais como esplenomegalia, aderência, periesplenite e perda anatômica (Tabela 3, figura 10).

Tabela 3-Análise macroscópica de fígado e baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de estudo. Cepa 1686; 1851 e 1580 induziram alterações patológicas com relação ao tamanho e coloração no fígado de todos os animais infectados com as cepas, exceto com a cepa 515 e NCL IOCL 3241. Com relação ao baço todas as cepas induziram alterações morfológicas exceto a cepa NCL IOCL 3241.

Alterações	Cepas				
	1686 n/t (%)	1851 n/t (%)	515 n/t (%)	1580 n/t (%)	NCL n/t (%)
Fígado					
Ausência	-	-	5/5 (100)	-	4/4 (100)
Cor amarelada	-	1/5 (20)	-	1/4 (25)	-
Cor alaranjada	4/4 (100)	4/5 (80)	-	-	-
Hepatomegalia	4/4 (100)	5/5 (100)	-	4/4 (100)	-
Baço					
Ausência	-	-	-	-	4/4 (100)
Esplenomegalia	4/4 (100)	5/5 (100)	5/5 (100)	4/4 (100)	-
Aderência	2/4 (50)	2/5 (40)	1/5 (20)	2/4 (50)	-
Periesplenite	2/4 (50)	1/4 (80)	-	1/4 (25)	-
Perda anatômica	-	1/5 (20)	-	-	-

n-número de animais com sintomas, t – total de animais

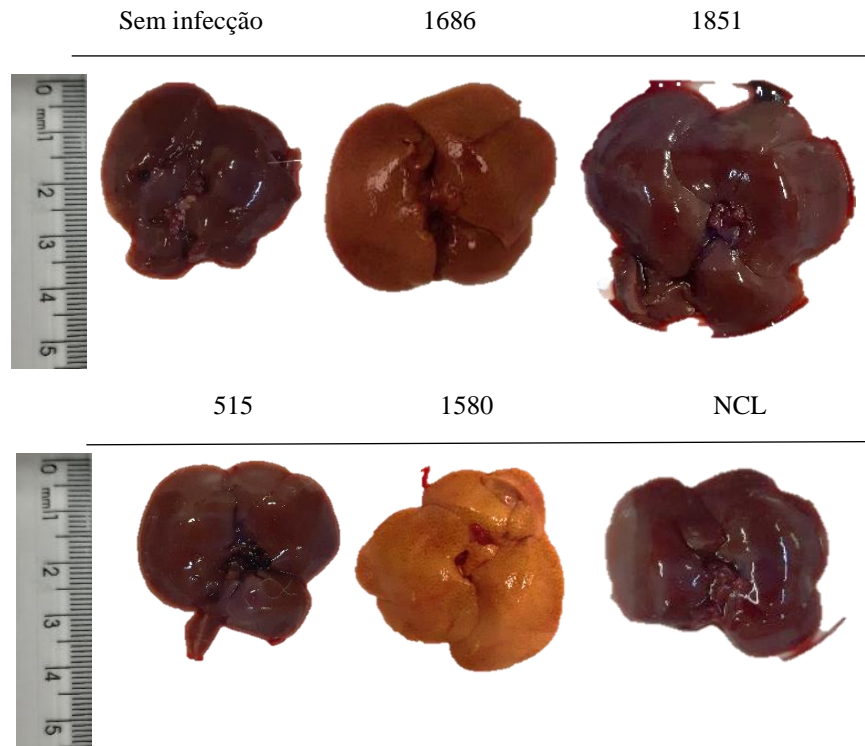


Figura 9- Macroscopia de fígado de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com diferentes cepas de estudo. Fígado de animal sem infecção e infectado com a cepa: 1686 com coloração alaranjado e tamanho aumentado; 1851 com coloração normal e tamanho aumentado; 515 com tamanho e coloração normal; 1580 com coloração amarelada e com tamanho normal; NCL 10CL 3241 (NCL) com coloração e tamanho normal. Imagens capturadas por câmera de celular Samsung galaxy A70 e editadas em aplicativo Samsung 2021. 21090. 10007.0 Microsoft Corporation.



Figura 10- Macroscopia de baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com diferentes cepas de estudo. Baço de hamster infectado com a cepa: 1686 com periesplenite (seta preta); 1851 com perda anatômica; 515 com tamanho aumentado e aderência posterior (seta branca); 1580 com tamanho aumentado e periesplenite em região central (seta preta); e NCL IOCL 3241 (NCL) sem alteração anatômica. Imagens capturadas por câmera de celular Samsung galaxy A70 e editadas em aplicativo Samsung 2021. 21090. 10007.0 Microsoft Corporation.

5.9 Esfregação por aposição “imprint”

Para fazer a verificação imediata da presença de amastigotas no fígado e baço dos animais infectados foram realizados “imprints” desses órgãos. Foi possível observar que nos animais infectados com as cepas 1686, 1851, 1580 e 515 apresentaram intensa quantidade de amastigotas no interior e fora dos macrófagos. Entretanto os animais infectados com a cepa NCL IOCL 3241 não apresentaram amastigotas no interior dos macrófagos, mas possuem vacúolos parasitóforo indicando que poderia haver a presença de amastigotas (Figura 11).

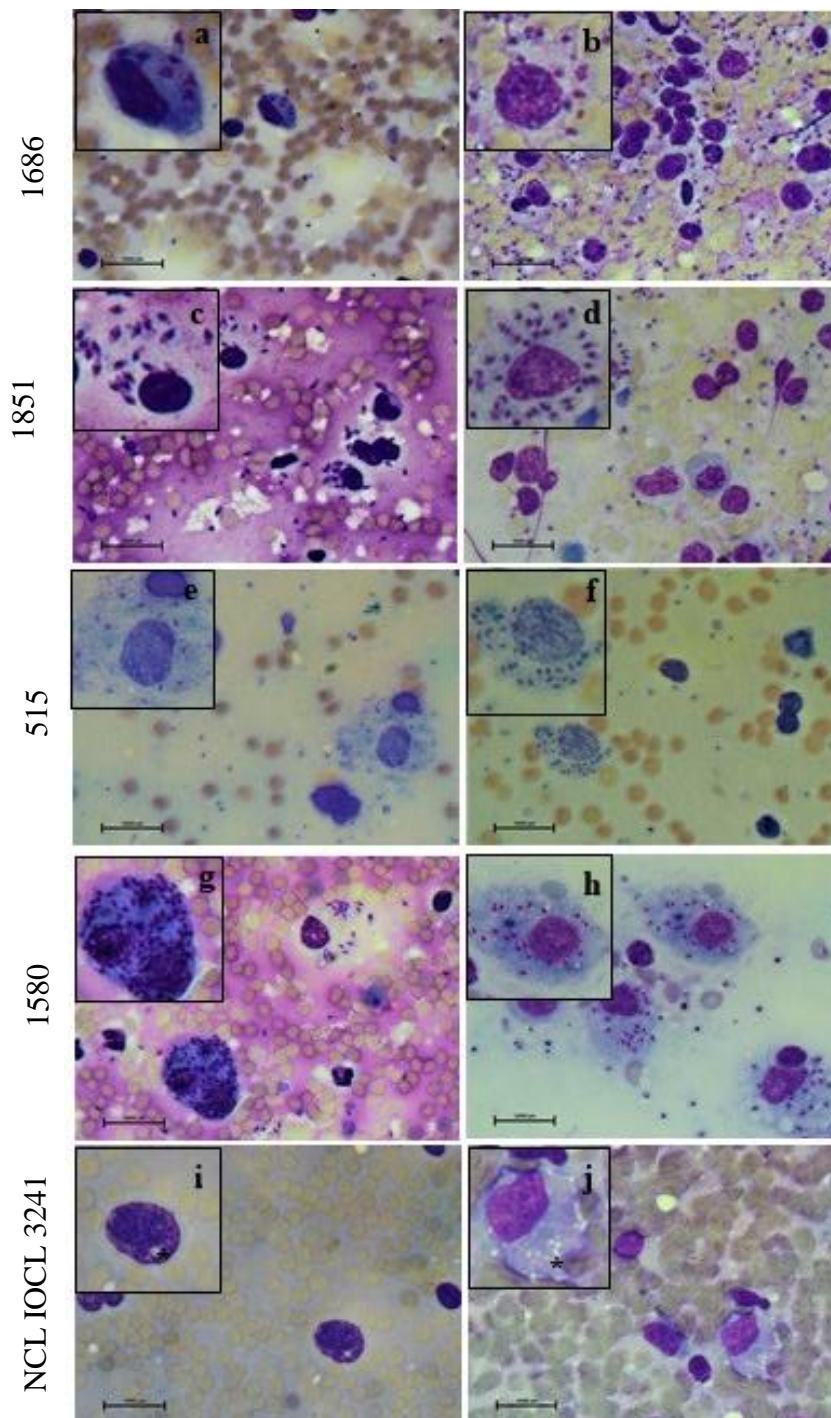


Figura 11- “Imprint” de fígado e baço de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de estudo. Nas imagens a presença de formas amastigotas de *Leishmania* dentro dos macrófagos de (a; c; e; g; i) fígado e (b; d; f; h; j) baço infectados com todas as cepas, exceto com a cepa NCL IOCL 3241 que apresentou vacúolos parasitóforos em fígado e baço; os inserts permitem melhor visualização dos parasitos. Imagens capturadas por câmera de celular Samsung galaxy A30 e editadas em aplicativo Samsung 2021. 21090. 10007.0 Microsoft Corporation. * vacúolos parasitóforos

5.10 Diluição limitante- LD

A diluição limitante foi a primeira ferramenta utilizada para analisar a carga parasitária no fígado e baço dos animais, assim que os órgãos foram coletados, de forma que poderíamos analisar as cepas que possivelmente induzem maior ou menor parasitemia nos hamsters. As análises mostraram diferença significativa entre o grupo infectado com 1580 e NCL IOCL 3241 (Figura 12 A), sendo a cepa 1580 a que induziu maior parasitemia seguida da 1851. No baço houve diferença significativa entre o grupo infectado com 1580 e 1851, cepas que induziram maior parasitemia, com NCL IOCL 3241 (Figura 12 B). As cepas 1686 e 515 foram as que mostraram menor número de parasitos por órgão enquanto para cepa NCL IOCL 3241 não houve crescimento de promastigotas durante a cultura da diluição limitante.

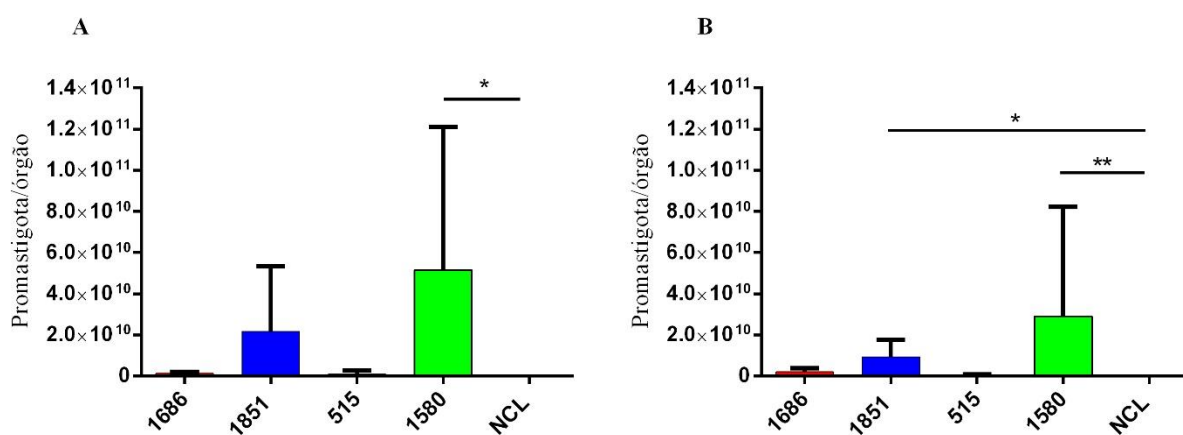


Figura 12- Diluição limitante de fígado e baço dos hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de estudo para análise da carga parasitária. Carga parasitária pela diluição limitante após 7 dias em cultura (A) em fígado, com maior carga de promastigotas na cepa 1580 com relação a NCL IOCL 3241; (B) em macerado, com maior carga parasitária nas cepas 1580 e 1851 em relação a NCL IOCL 3241. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism com teste Kruskal-wallis * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.11 Análise da presença de *Leishmania infantum* em fígado e baço de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo por PCR

Para análise qualitativa, com o objetivo de mostrar a presença ou ausência de *Leishmania infantum* nas amostras de DNA de fígado e baço de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo, foram submetidas a PCR com os iniciadores de Linj31seq específica para espécie

Leishmania infantum. Considerando como positivo à amplificação na região de 500 pb, apenas uma amostra de baço referente a infecção com a cepa 1686 foi negativa (Figura 13 A), enquanto os animais infectados com a cepa 1851 todos apresentaram a região de interesse amplificada (Figura 13 B). No que se refere aos órgãos infectados com a cepa 515, 3 das 5 amostras de fígado foram negativas, assim como 1 em 5 de baço, embora duas amostras apresentaram menor intensidade (Figura 13 C). Apenas uma amostra de baço de um animal foi negativa entre as 8 amostras infectadas com a cepa 1580 (Figura 13 D), já nas amostras infectadas com a cepa NCL IOCL 3241 todas as amostras foram negativas (Figura 13 E).

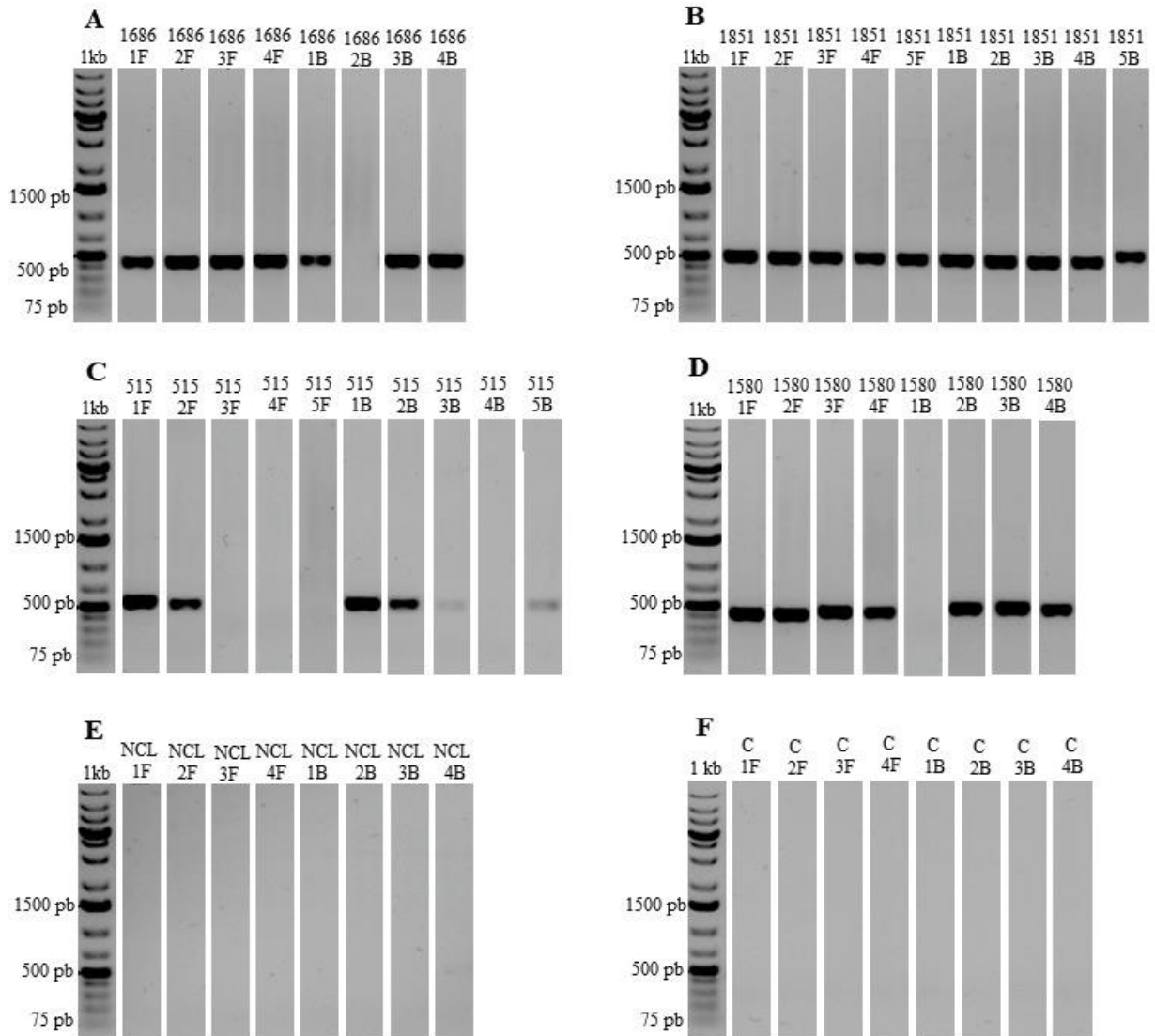


Figura 13- Identificação de *Leishmania infantum* em amostras de DNA de fígado e baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as cepas de estudo utilizando os iniciadores Linfseq31 pela técnica PCR. As ampliações das bandas de 500 pb são referentes a presença do parasito no fígado e baço infectados com as cepas (A) 1686; (B) 1851; (C) 1580; (D) 515; (E) NCL IOCL 3241 (F) sem infecção. As imagens foram capturadas por ChemiDoc™ XRS Systems (Bio-Rad) e software Image Lab™ 3. F-fígado, B-baço, C-control.

5.12 Análise quantitativa da carga parasitaria no fígado e baço de animais infectados com as cepas de estudo por meio de qPCR

A análise quantitativa da carga parasitária nos permite comparar as cepas mais virulentas, sendo assim nós avaliamos a quantidade de parasitos presentes nos órgãos fígado e baço por qPCR. A curva padrão foi construída utilizando a cepa HUUF14, específica para *Leishmania infantum*. Os resultados foram expressos pelo número de parasita por órgão (Figura 14).

Curva padrão da cepa HUUF14

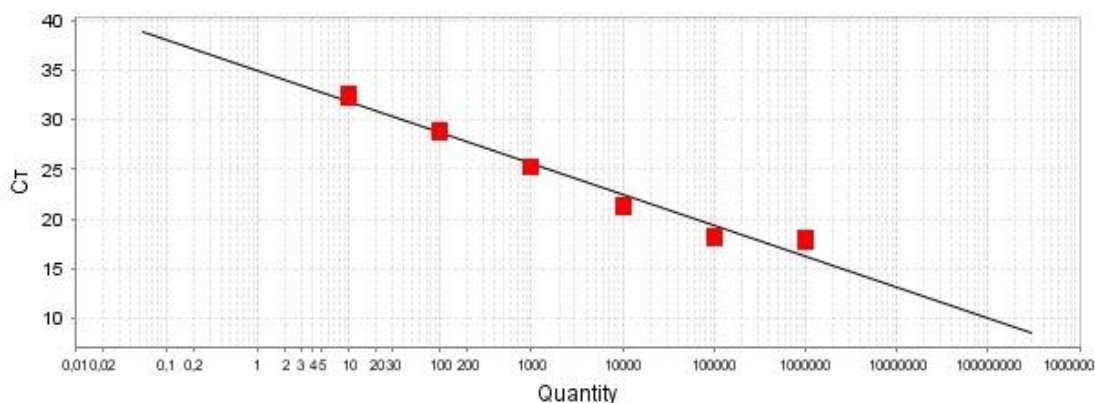
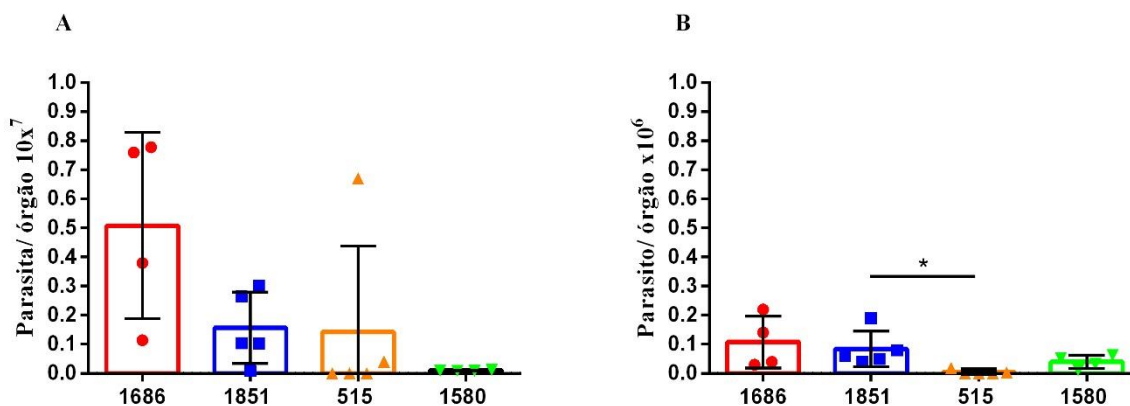


Figura 14- Curva padrão referente ao gene de DNA de *Leishmania infantum*. No eixo X corresponde aos valores de concentração de parasitos (10^6 a 10^1) e em Y os valores de ciclo limite-CT que corresponde a cada diluição. O valor de sujeira “slop” é de -3,106; coeficiente de linearidade $R^2= 0,966$ e a eficiência 109,888%.

A partir da curva padrão foi possível quantificar os parasitos presentes no fígado e no baço dos animais infectados. A cepa 1686 em fígado apresentou alta carga parasitária, porém não teve diferença significativa com relação as outras cepas (Figura 15 A), em baço a carga parasitária foi maior em cepa 1851 quando comparada com 515 (Figura 15 B).



Fígura 15- Carga parasitária de órgãos de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com diferentes cepas de estudo analisadas por qPCR. (A) carga parasitária no fígado, sem diferença estatística entre as infecções com as diferenças cepas, mas com tendência de maior quantidade de parasitos no órgão infectado com a cepa 1686; (B) carga parasitária no baço com maior quantidade de parasitos em hamsters infectados com a cepa 1851 comparado a 515. A estatística foi realizada no software GraphPad Prism 6 por meio do teste Kruskal wallis *p< 0,05.

5.13 Associação entre a presença de leishmania, a carga parasitária por qPCR e LD

De forma qualitativa a verificação de *Leishmania infantum* em órgãos como fígado e baço foi visto pelo PCR e a quantidade de parasitas/ órgão foi analisada pelo qPCR e diluição limitante (Tabela 4), desta forma fígado dos hamsters infectados com os isolados clínicos 1686 (100%), 1851 (100%); 1580 (100%) e 515 (40%) apresentaram amplificação na região de interesse pelo método cPCR e qPCR, além do crescimento detectado na LD.

Os hamsters assintomáticos (60%) não apresentaram amplificação na região de 500 pb pelo método PCR e nem pelo qPCR, porém 40% apresentaram crescimento de parasitas após 7 dias em condições de temperaturas e suplementação ideal, já 20% não foi detectado em nenhum método utilizado. A cepa NCL IOCL 3241 não induziu o crescimento e nem foi detectado a presença em *Leishmania infantum* em nenhum método realizado (Tabela 4).

Tabela 4- Análise qualitativa (PCR) e quantitativa (qPCR) e LD de fígado. Fígado de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas isoladas de paciente e cepa de referência de *L. infantum* com detecção do parasita na LD exceto a 515 5F e os hamsters infectados com a ceoa NCL IOCL 3241. ID: identificação; F: fígado, X: presença e -: ausência; LD: diluição limitante.

ID	Status	PCR	qPCR	LD
1686-1F	Sintomático	X	7789943	1056399283
1686-2F	Sintomático	X	1142929	1878014080
1686-3F	Sintomático	X	3804076	264140160
1686-4F	Sintomático	X	7764305	1791368576
1851-1F	Sintomático	X	3311285	22527393792
1851-2F	Sintomático	X	2656629	7736194048
1851-3F	Sintomático	X	1040016	1913886720
1851-4F	Sintomático	X	81681	76214886640
1851-5F	Assintomático	X	1039755	282627696
515-1F	Sintomático	X	4052679	4222976000
515-2F	Assintomático	X	67499025158	54118720,4
515-3F	Assintomático	-	-	62979956,4
515-4F	Assintomático	-	-	3821980
515-5F	Assintomático	-	-	-
1580-1F	Sintomático	X	10257840	1,51E+11
1580-2F	Sintomático	X	3464134	6111486259
1580-3F	Sintomático	X	6357115	48256082944
1580-4F	Assintomático	X	212988	177107856
NCL-1F	Assintomático	-	-	-
NCL-2F	Assintomático	-	-	-
NCL-3F	Assintomático	-	-	-
NCL-4F	Assintomático	-	-	-

Em todos os baços dos hamsters infectados com os isolados clínicos apresentaram amplificação referente a presença e ausência de *Leishmania infantum* pelo método PCR e qPCR com detecção na diluição limitante, exceto 1686 (25%), 515 (20%), 1580 (25%) que não apresentaram amplificação pelo método PCR entretanto isolados clínicos 1686 e 1580

apresentaram amplificação por qPCR e detecção de promastigotas em diluição limitante, diferente da 515 que não apresentou amplificação por PCR mas apresentaram crescimento de promastigotas em LD. A cepa NCL IOCL 3241, assim como no fígado não induziu o crescimento e nem foi detectado a presença em *Leishmania infantum* em nenhum método realizado (Tabela 5).

Tabela 5- Análise qualitativa (PCR) e quantitativa (qPCR) e LD de baço. Baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com os diferentes isolados clínicos e cepa de *L. infantum*, com detecção do parasita na LD exceto os animais infetados com a NCL IOCL 3241. ID: identificação; F: fígado, X: presença e -: ausência; LD: diluição limitante.

ID	Status	PCR	qPCR	LD
1686-1B	Sintomático	X	390521	1540923136
1686-2B	Sintomático	-	46136	320599264
1686-3B	Sintomático	X	2236250	4746666688
1686-4B	Sintomático	X	1416335	1474828480
1851-1B	Sintomático	X	670696	2563614720
1851-2B	Sintomático	X	1992832	7704472153
1851-3B	Sintomático	X	465039	15903448883
1851-4B	Sintomático	X	88331	19878187622
1851-5B	Assintomático	X	55907	1157196976
515-1B	Sintomático	X	1198545	1057127373
515-2B	Assintomático	X	3323	309317960
515-3B	Assintomático	X	27	35202614
515-4B	Assintomático	-	-	55082873
515-5B	Assintomático	X	-	39815089
1580-1B	Sintomático	-	526976	5120000000
1580-2B	Sintomático	X	3385084	1,09E+11
1580-3B	Sintomático	X	621764	1595015552
1580-4B	Assintomático	X	117662	186251616
NCL-1B	Assintomático	-	-	-
NCL-2B	Assintomático	-	-	-
NCL-3B	Assintomático	-	-	-
NCL-4B	Assintomático	-	-	-

5.14 Diferença nos níveis de anticorpos no soro de hamsters infectados com as cepas de estudo analisado por ELISA

Visto que a LV tem como característica a hipergamoglobulinemia, fomos estimulados a analisar se as cepas de estudo induziriam diferentes níveis de anticorpos nos animais infectados. Nossos resultados mostraram que a cepa 1580 foi a que induziu maior nível de IgG específico para *L. infantum* em todas as diluições, seguida pela 1686 e 1851, a qual teve aumento desde a primeira diluição e se manteve até 1:3200. Já a cepa NCL IOCL 3241 e 515 apresentou níveis de IgG semelhantes ao controle sem diferença significativa (Figuras 16).

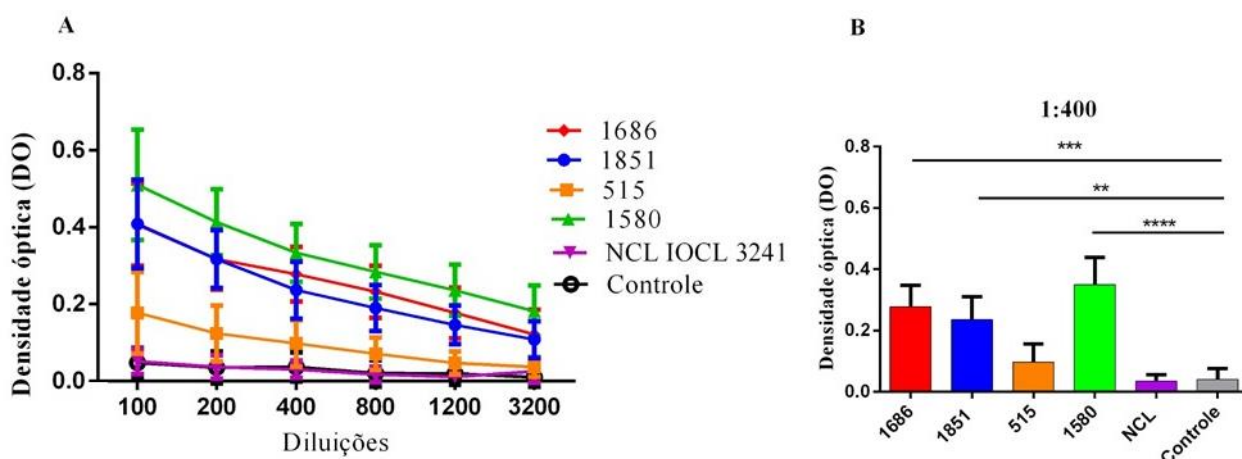


Figura 16- Titulação dos níveis de IgG específicos para *L. infantum* detectado em soro de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas. (A) titulação de IgG específico para *L. infantum* dos hamsters infectados com as diferentes cepas, com maior produção de anticorpos nos animais infectados com as cepas 1580; 1851 e 1686. (B) quantidade de IgG específicos para *L. infantum*, em diluição de 1:400, com maior quantidade de IgG de hamsters infectados com as cepas 1686, 1851 e 1580 em relação ao controle.

5.15 Análise de IgG total de soro de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo

Na detecção por western blot da cadeia pesada e leve de purificado de IgG, podemos observar o peso molecular de ambas as cadeias em 50 pb e 25 pb respectivamente (Figura 17), assim como na literatura (JANEWAY *et al.*, 2001).

Anticorpos IgG total do soro dos animais infectados foi quantificada e a cepa que induziu maior produção de IgG total comparada com controle foi o 1851, com diferença significativa, no entanto é possível observar que, respectivamente, as cepas 1580, 1686 e 515 também foram quantitativamente maiores que os controle embora não sejam significantes. A cepa NCL IOCL 3241 não induziu a produção de anticorpos (Figura 18). Esses resultados corroboram com os encontrados no ELISA.

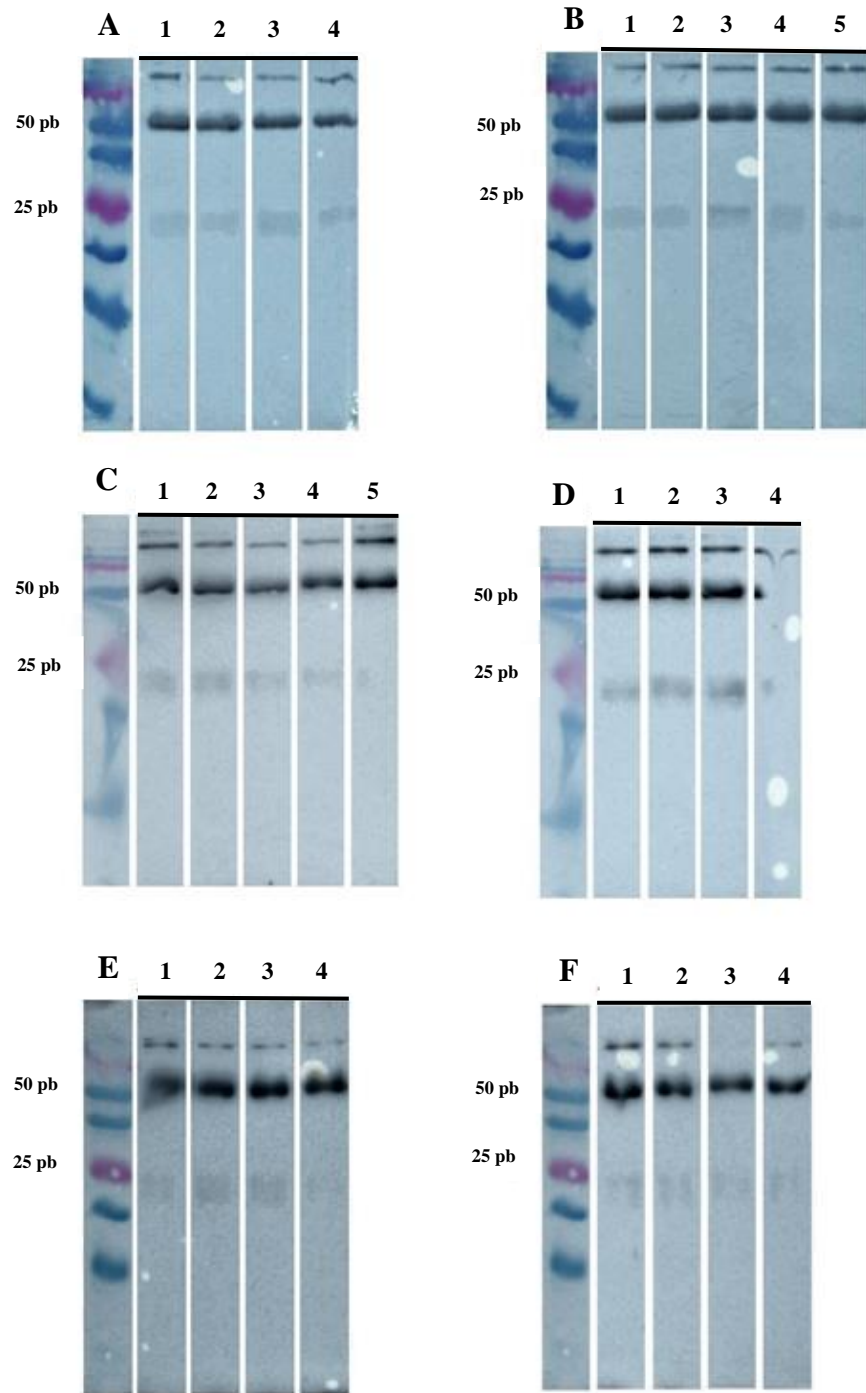


Figura 17- Western blot de IgG total de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas clínicas de estudo e não infectados. (A) cepa 1686, (B) cepa 1851, (C) cepa 515, (D) 1580, (E) cepa NCL IOCL 3241, (F) sem infecção, com amplificação em 50 pb e 25 pb, indicando a presença das cadeias pesadas e leves, respectivamente.

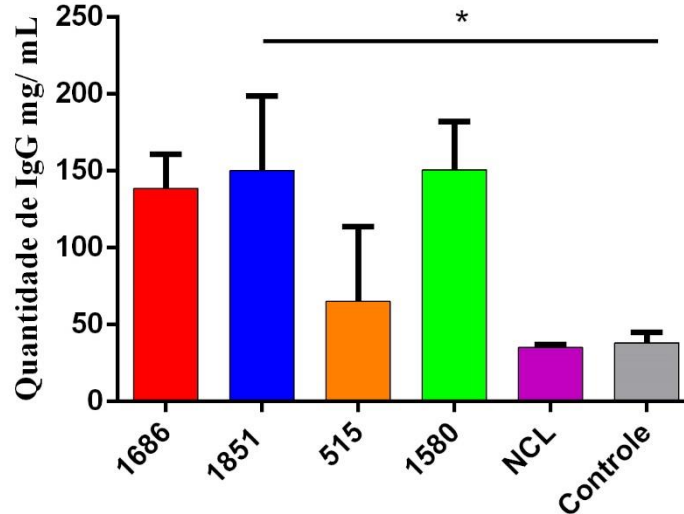


Figura 18- Quantificação de IgG total de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas. Cepa 1851 induziu maior quantidade de IgG total quando comparada com hamsters sem infecção.

5.16 Análise das alterações histopatológicas do fígado e baço de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo

A fim de analisar as possíveis alterações histopatológicas hepatoesplênicas na infecção experimental de hamster com diferentes cepas, devido a infecção dos hamster com as diferentes cepas clínicas, fígado e baço dos hamsters foram coletados e submetidos a procedimentos histológicos. Nas alterações microscópicas em órgãos infectados com a cepa 515 em fígado, apenas 20% não foram observadas, porém alterações degenerativas, presença de granulomas, esteatose, infiltrado inflamatório portal e sinusal em fígado foram observadas em fígados de hamster infectados com 1686; 1851; 1580, enquanto na presença da cepa 515 observou-se infiltrado inflamatório e granulomas em parênquima hepático. No baço observou-se capsula espessada, hipotrofia de polpa branca e hiperplasia de polpa vermelha independente da sintomatologia externa nos grupos infectados com as cepas 1686; 1851; 1580 e 515 (Tabela 6 e figura 19 e 20).

Tabela 6- Análise histopatológica de fígado e baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as cepas de estudo. Cepa 1686; 1851 e 515 induziu alterações de moderada a acentuada em fígado e baço, exceto 20% do fígado e 60% dos baços dos hamsters não apresentaram alterações infectados com a cepa 515. A cepa 1580 induziu alterações acentuadas em fígado e

moderada e acentuada em baço, enquanto que a cepa de referência não induziu alterações em baço, mas em fígado induziu alterações discretas.

Alterações	Cepas				
	1686 n/t(%)	1851 n/t(%)	515 n/t(%)	1580 n/t(%)	NCL n/t(%)
Fígado					
Ausência	-	-	1/5 (20)	-	-
Discreto (5-30%)	-	-	3/5 (60)	-	4/4 (100)
Moderado (30-60%)	3/4 (75)	4/5 (80)	1/5 (20)	-	-
Acentuado (>60%)	1/4 (25)	1/5 (20)	-	4/4 (100)	-
Baço					
Ausência	-	-	-	-	4/4 (100)
Discreto (10-30%)	-	-	3/5 (60)	-	-
Moderado (30-60%)	1/4 (25)	2/5 (40)	1/5 (20)	2/4 (50)	-
Acentuado (>60%)	3/4 (75)	3/5 (60)	1/5 (20)	2/4 (50)	-

n – número de animais com sintomas, t – total de animais.

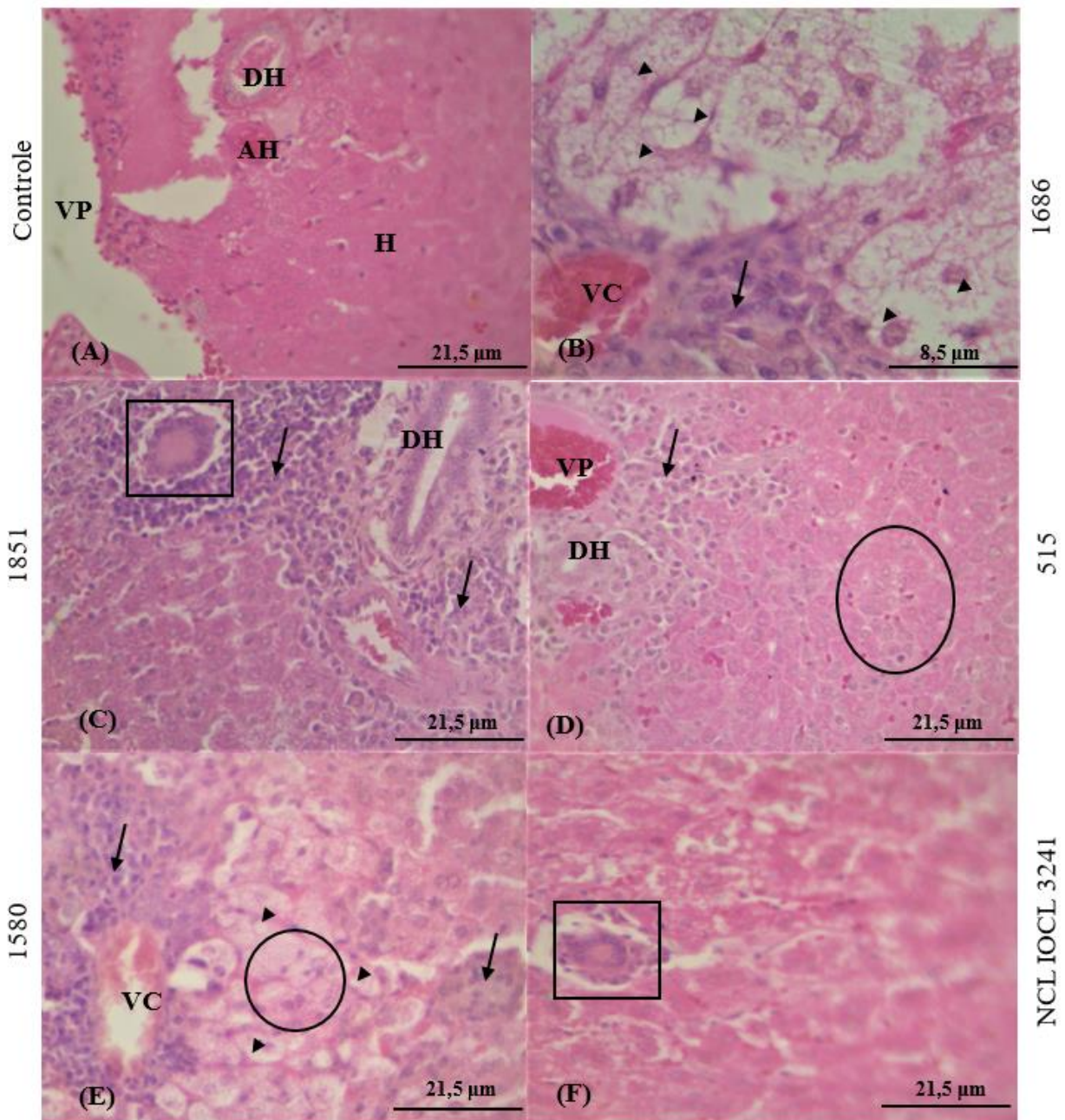


Figura 19- Histologia de fígado de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com os diferentes isolados clínicos e cepa de *Leishmania infantum*. (A) controle sem infecção; (B) infectado com a cepa 1686; (C) infectado com a cepa 1851; (D) infectado com a cepa 515; (E) infectado com a cepa 1580 e (F) infectado com a cepa NCL IOCL 3241. VP veia porta; AH artéria hepática; DH ducto hepático, H hepatócitos, VC veia centro lobular, círculo degeneração hidrópica, seta infiltrado inflamatório, cabeça de seta hepatócitos com esteatose e quadrados são células gigantes e granulomas.

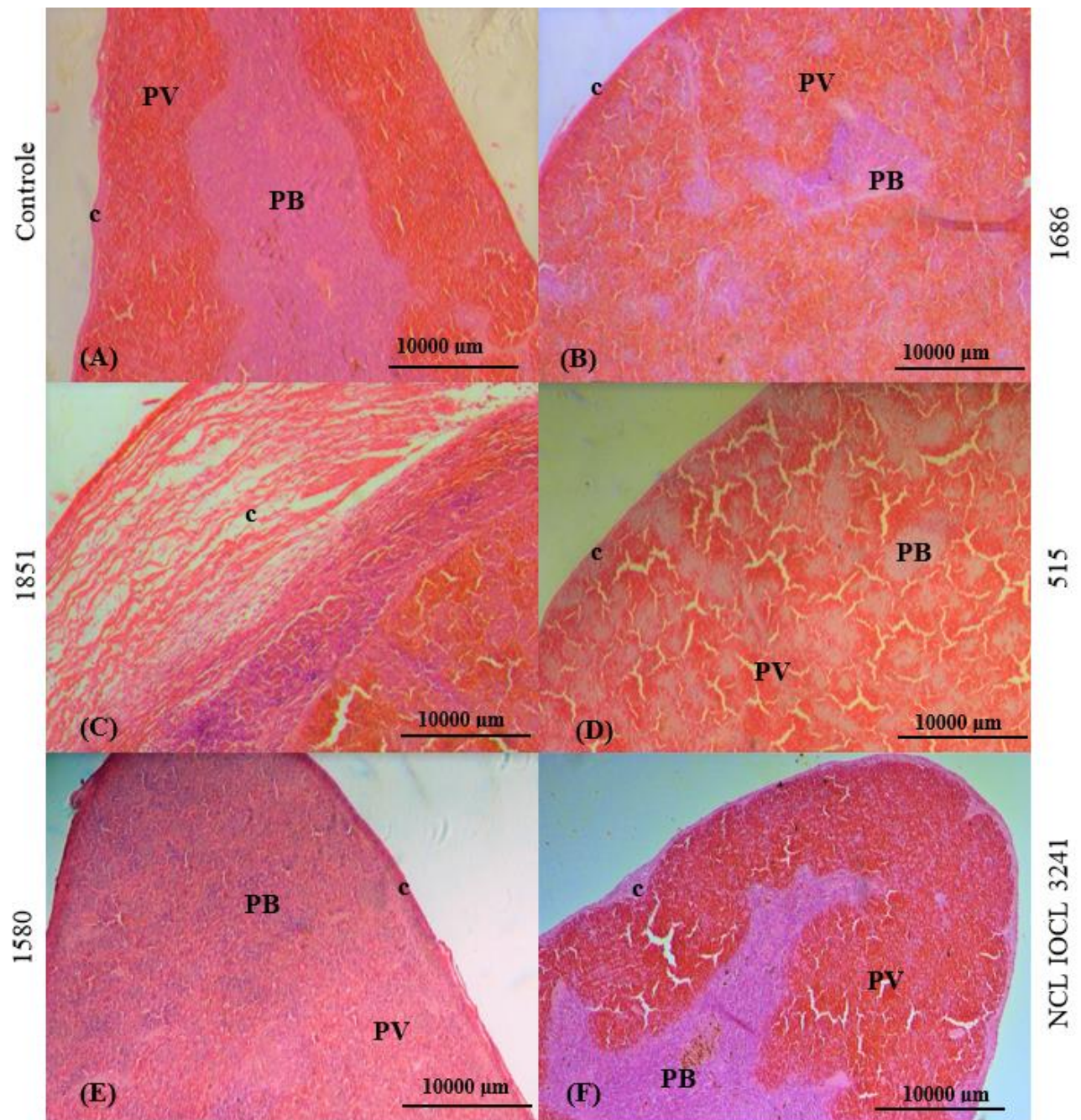


Figura 20- Histologia de baço de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com as diferentes cepas de estudo. (A) controle sem infecção; (B) infectado com a cepa 1686; (C) infectado com a cepa 1851; (D) infectado com a cepa 515; (E) infectado com a cepa 1580 e (F) infectado com a cepa NCL IOCL 3241. PB polpa branca; PV polpa vermelha; c capsula, * capsula espessada, ponta de seta hiperplasia de polpa vermelha e seta hipotrofia de polpa branca.

5.17 Avaliação da alteração de citocinas no fígado e baço de hamsters infectados com as cepas de estudo

Devido a tempestade de citocinas presente na LV, os níveis de citocinas regulatória, anti-inflamatória e inflamatória foram mensurados por meio de qPCR para avaliar a diferença da expressão nos hamsters infectados com as diferentes cepas clínicas. A expressão de citocina regulatória IL-4 em células de fígado e baço de hamsters infectados não apresentou diferença significativa (Figura 21) entre as cepas. Entretanto a IL-10, anti-inflamatória, esteve significativamente aumentada nas células do fígado dos animais infectados com as cepas 1580 em relação a 1686 (Figura 21); já nas células do baço houve diferença significativa somente entre os animais infectados com as cepas NCL IOCL 3241, nos quais houve uma elevação da expressão de IL-10 em relação a 1686 (Figura 21). A citocina anti-inflamatória TGF- β foi significativamente mais expressa nas células de fígado de hamsters infectados com as cepas 1580 quando comparada a 1851 e NCL IOCL 3241 e 1580 (Figura 21), no baço, no entanto, ocorreu diferença significativa entre 1851 e 1580, apresentando-se aumentada na última (Figura 21).

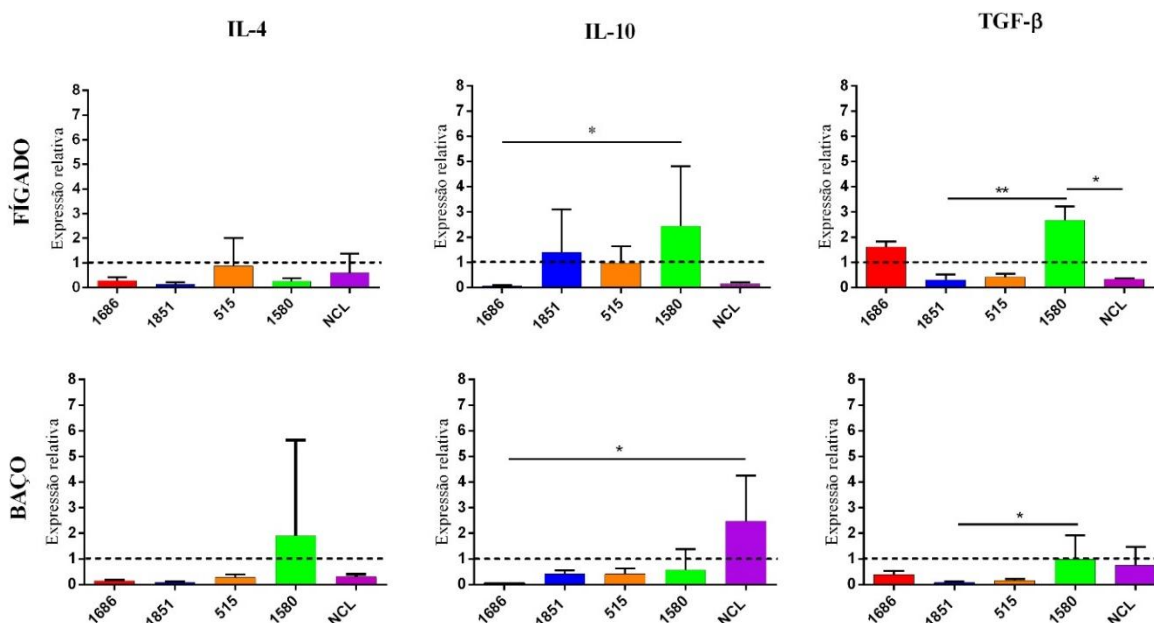


Figura 21- Expressão relativa de citocinas regulatória IL-4 e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , em células hepáticas e esplênicas dos hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de *Leishmania infantum*. Nas análises não houve alterações na expressão de citocinas IL-4 em fígado e baço, mas na IL-10 houve aumento da expressão nos fígados infectados

com a 1580 com relação a 1686, em baço houve aumento dos infectados com a NCL em relação a 1686. A expressão de TGF- β , houve aumento em fígado infectados com a 1580 em relação 1851 e NCL, em baço houve aumento da 1580 em relação a 1851. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism e o teste Kruskal wallis foi aplicado. * $p < 0,05$; $p^{**} < 0,01$.

No que tange as citocinas pró- inflamatória, IFN- γ expressa em fígado, não houve diferença significativa entre os grupos, mas apresentou alta expressão com relação a todas as cepas, enquanto que no baço dos animais infectados com a cepa NCL IOCL 3241 observamos aumento da expressão comparada a 1686. Já com relação a TNF- α , IL-1 β e IL-6 não apresentou diferença significativa em ambos os órgãos dos animais infectados com as diferentes cepas, embora haja uma tendência de aumento da expressão de TNF- α em células de fígado do grupo com a cepa 1580 e do fígado e baço infectados com NCL IOCL 3241, assim como na IL-1 β do fígado e baço e IL-6 do baço (Figura 22).

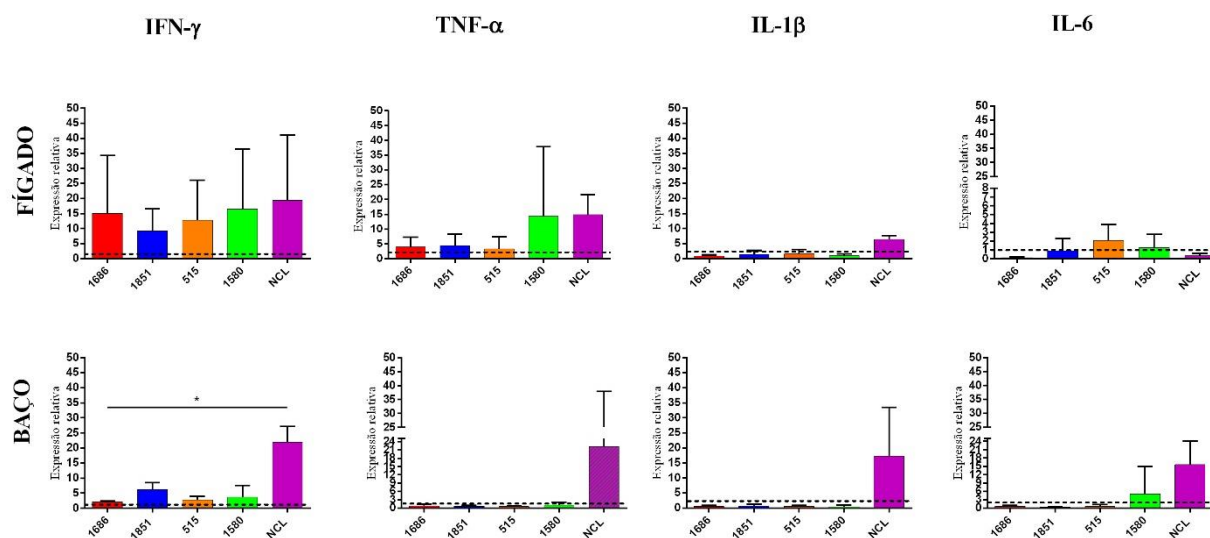


Figura 22- Expressão relativa de citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-6, em células hepáticas e esplênicas dos hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com as diferentes cepas de estudo. Houve aumento de citocina IFN- γ somente em baços infectados com a NCL em relação a 1851. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism e o teste Kruskal wallis foi aplicado. * $p < 0,05$; $p^{**} < 0,01$.

5.18 Diferença da expressão de citocinas entre as infecções assintomáticas e sintomáticas

A diferença na expressão de citocinas foi avaliada entre as infecções assintomáticas e sintomáticas para avaliar se há um marcador de sintomas. Os resultados mostraram que somente IL-1 β presente em células do fígado apresentou diferença significativa (Tabela 7), sendo menos expressa nos animais com sintomas de LV (Figura 23). As demais citocinas produzidas em células do fígado e do baço, não apresentaram significância no que se refere a presença de sintomas (Tabela 7).

Tabela 7 - Diferença na expressão de citocinas de fígado e baço entre hamsters (*Mesocricetus auratus*) sintomáticos e assintomáticos. A IL-1 β expressa no fígado foi a única citocina relacionada com a sintomatologia dos hamsters infectados. A análise estatística foi realizada no software Rstudio com a aplicação do teste Mann-Whitney * $p < 0,05$.

Citocinas	Valor (p)	BH	FC B/A	FC Log2	AUC	Mediana	Média	DP
IL-4B	0,013	0,066	2,6373	1,3991	0,8167	0,14	0,505	1,567
IL-4F	0,306	0,46	0,3233	-1,6289	0,6333	0,235	0,431	0,652
IL-6F	1,000	1	0,7073	-0,4997	0,5000	0,23	0,983	1,359
IL-6B	0,121	0,2	0,3103	-1,6885	0,7000	0,46	4,108	7,609
IL-10F	0,643	0,8	1,0821	0,1139	0,4375	0,51	1,022	1,48
IL-10B	0,022	0,086	0,2846	-1,8130	0,7917	0,365	0,745	1,135
TGF- β F	0,060	0,17	2,5136	1,3298	0,2583	0,455	1,004	0,973
TGF- β B	1,000	1	1,0887	0,1226	0,5042	0,22	0,441	0,576
IFN- γ F	0,346	0,47	0,5639	-0,8264	0,6250	8,63	14,296	15,281
IFN- γ B	0,122	0,2	0,3976	-1,3307	0,7000	3,13	7,089	7,799
TNF- α F	0,741	0,86	1,1365	0,1846	0,5458	3,425	7,791	11,009
TNF- α B	0,074	0,17	0,0889	-3,4922	0,7292	0,75	4,665	10,351
IL-1 β F	0,005	0,042*	0,2257	-2,1477	0,8417	1,17	2,193	2,312
IL-1 β B	0,080	0,17	0,08366479	-3,5792	0,7250	0,64	3,647	9,023

BH: Benajmini-Hochberg; FC (B/A): fold change: alteração da dobra; AUC: área sob a curva; DV: desvio padrão; F: fígado; B: baço.

Para uma melhor visualização, a Figura 23 mostra a diferença entre os dois grupos, sintomáticos e assintomático, referente a citocina IL-1 β expressa em células hepáticas, na qual há uma significativa redução da citocina entre os animais que apresentaram sintomas da doença. O que corrobora com as análises realizadas na figura 22 em que a IL-1 β está aumentada naqueles

animais com a cepa NCL IOCL 3241 com ausência de sintomas de LV, enquanto que em todas as outras cepas há redução da expressão da citocina.

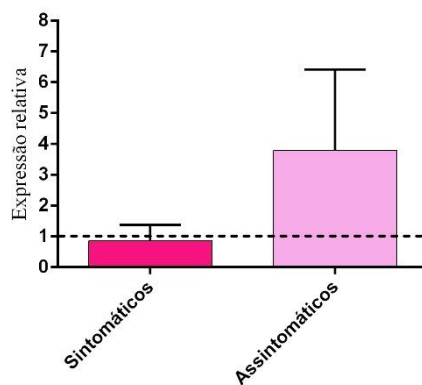


Figura 23- Expressão relativa de citocina IL-1 β em células hepáticas de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados com diferentes cepas de estudo. A citocina IL-1 β estava mais elevada em hamster assintomáticos quando comparado com sintomáticos. Análise estatística realizada no software Graph prism 6 com aplicação do teste T. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.19 Perfis de ácido siálico e fucose em IgG total de hamsters infectados com as diferentes cepas de estudo

Já foi descrito que durante doenças inflamatórias há uma alteração das glicanas presentes nas imunoglobulinas, inclusive em casos de LV, desta forma nós avaliamos se as diferentes cepas analisadas poderiam levar a alterações diferenciadas nos animais infectados. Os resultados mostraram que animais infectados com 1851, 515 e NCL IOCL 3241 apresentaram níveis de ácido siálico significativamente reduzidos quando comparado ao controle sem infecção (Figura 24A). Interessantemente, as mesmas cepas induziram a redução de fucose (Figura 24B). Ao analisar a diferença das glicanas no que se refere a presença de sintomas, observamos que tanto o ácido siálico quanto fucose tiveram níveis reduzidos em infecções assintomáticas (Figura 24C e figura 24D).

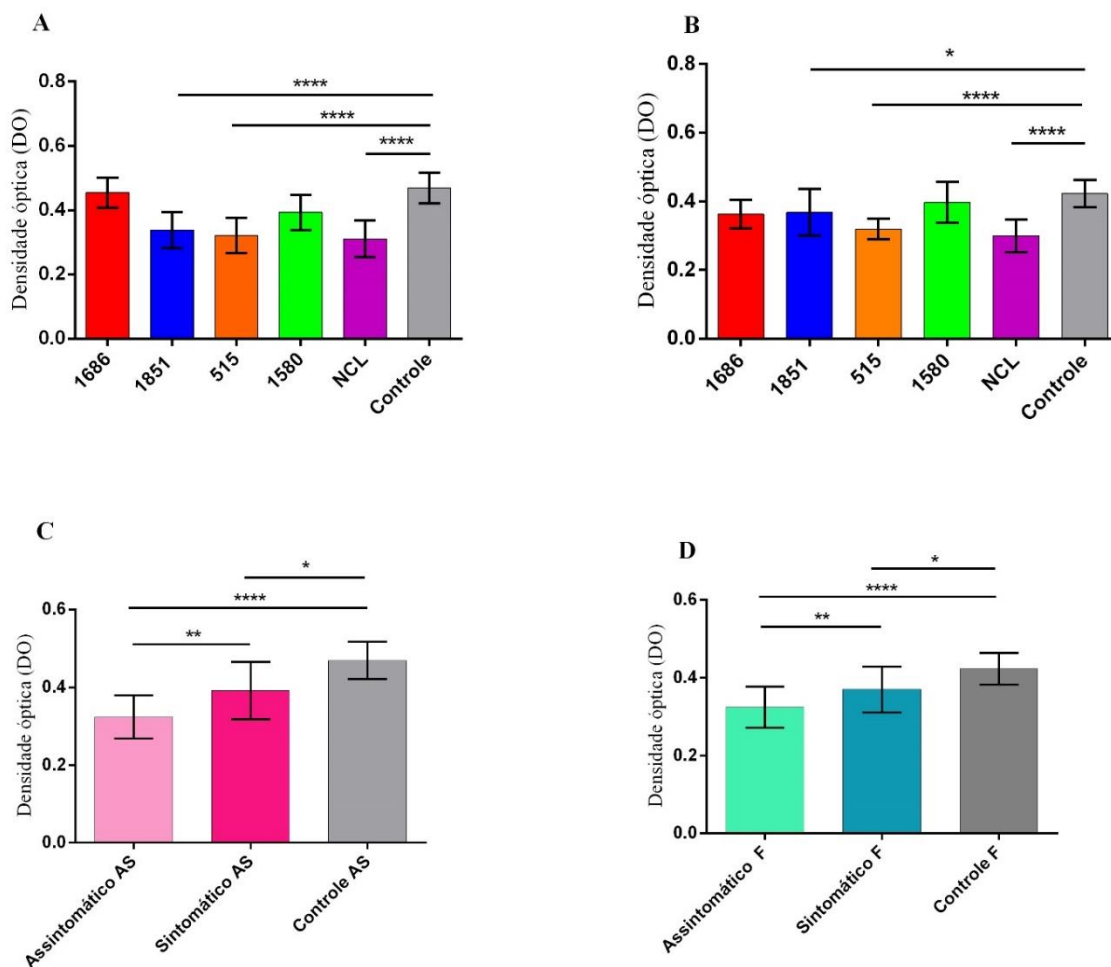


Figura 24- Alterações de ácido siálico e fucose em IgG total de hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com as cepas de estudo analisadas por ELLA. Diminuição de (A) ácido siálico e (B) fucose, nos hamsters infectados com as cepas 1851; 515 e NCL. Diminuição de (C) ácido siálico e (D) fucose nos animais sintomáticos e assintomáticos em relação ao controle. Análise estatística realizada no software GraphPad Prism 6 com o teste Kruskal wallis. * $p < 0,05$; $p^{****} < 0,0005$, $p^{*****} < 0,0001$. Assint: Assintomático; Sint. Sintomático, AS: ácido siálico e F: fucose.

5.20 Análise da presença de ácido siálico e/ou fucose em IgG total de hamsters infectados com diferentes cepas de estudo por Western blot

O “western blot” foi realizado para investigar a presença de ácido siálico e fucose em IgG total de hamsters infectados e controles. Por meio da mensuração da área pelo programa ImageJ podemos observar a variação das glicanas entre os grupos. As marcações de ácido siálico e fucose

nos anticorpos estavam presentes na cadeia pesada do anticorpo com peso molecular de aproximadamente 50 pb, e não houve marcação na banda de 25 pb referente a cadeia leve (Figura 25 e 26). Na análise da área quantificada por pixel, houve diminuição de ácido siálico nos anticorpos de todos os animais grupo 515 e NCL IOCL 3241 com relação nos anticorpos de hamsters infectados comparado ao controle. Entretanto, no que se refere a fucose não houve diferença significativa.

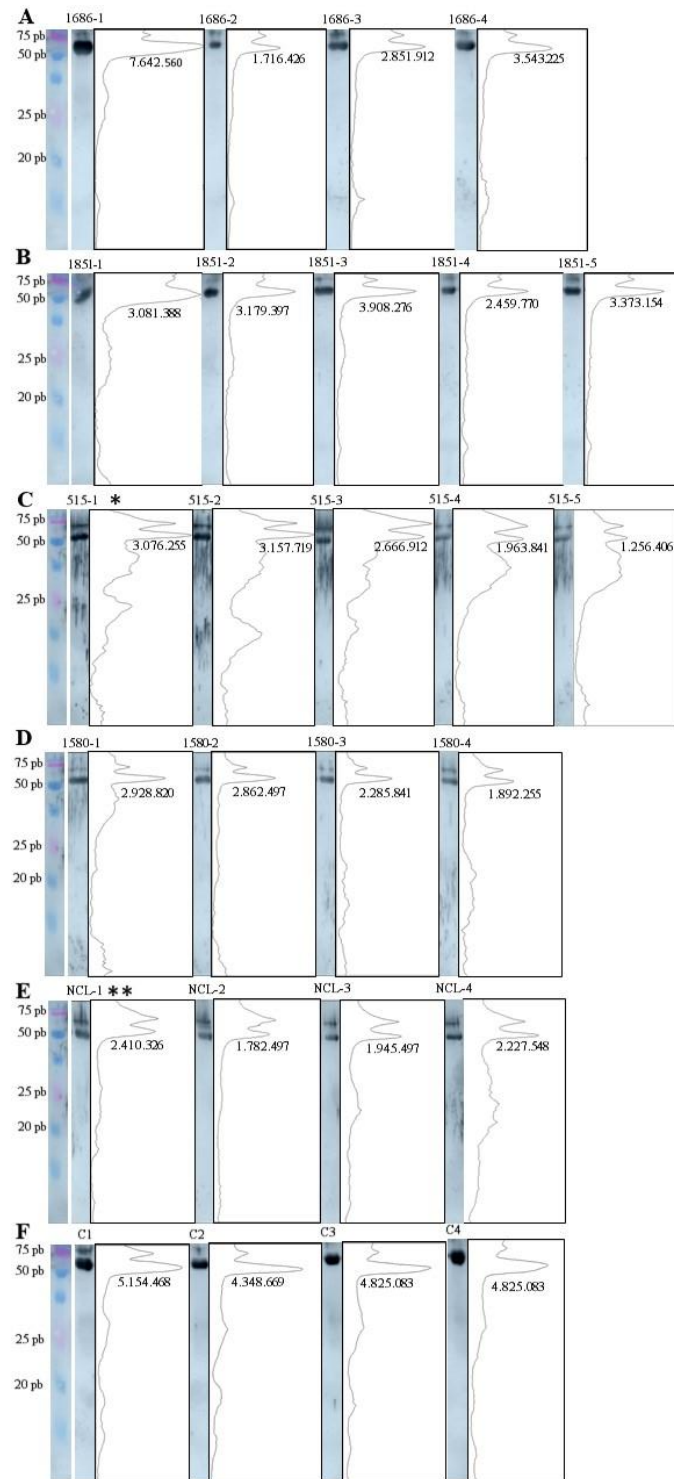


Figura 25- Western blot de IgG total purificada de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados e não infectados para detecção de ácido siálico. (A) IgG de hamster infectado com 1686; (B) IgG de hamster infectado com 1851; (C) IgG de hamster infectado com 515; (D) IgG de hamster infectado com 1580; (E) IgG de hamster infectado com NCL IOCL 3241 com diminuição da amplificação referente ao ácido siálico pela análise por pixel com relação ao (F) sem infecção.

Análise das imagens e quantificação do pixel pelo software ImageJ, estatística realizada no software GraphPad Prism 6 com o teste Kruskal wallis. * $p < 0,05$; $p^{**} < 0,001$.

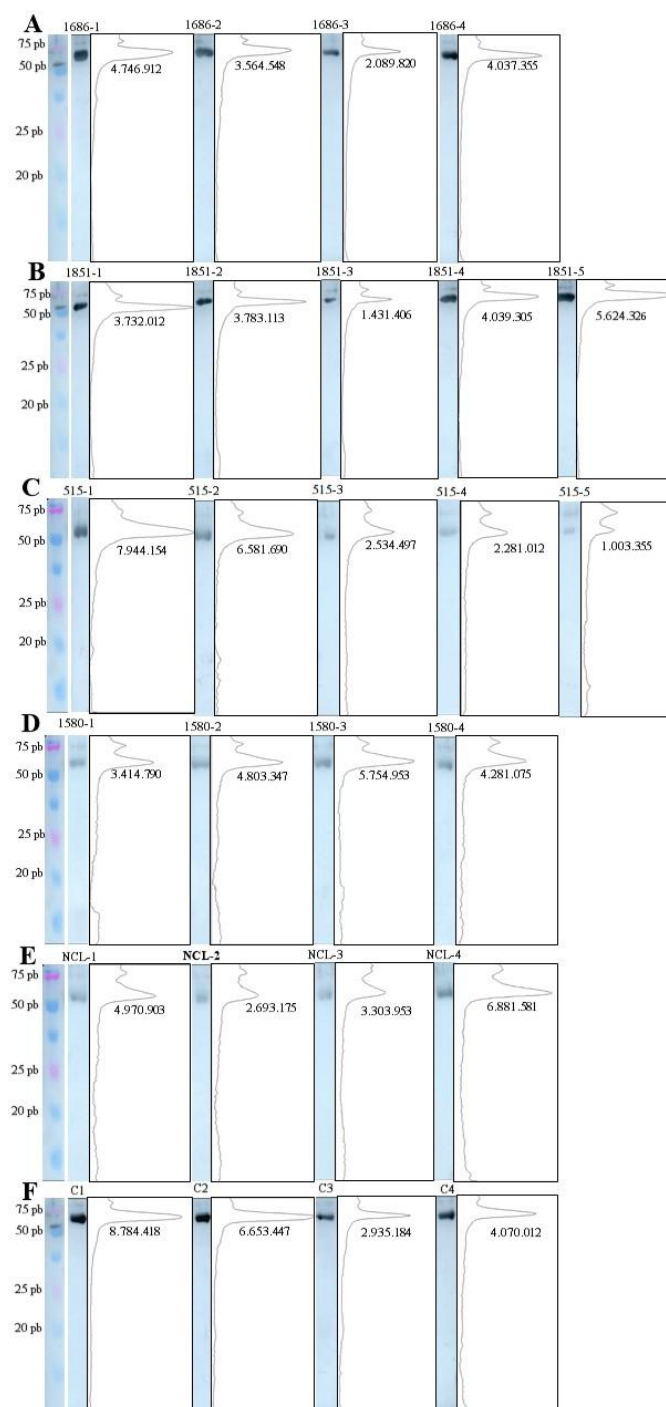


Figura 26- Western blot de IgG total purificada de hamster (*Mesocricetus auratus*) infectados e não infectados para detecção de fucose. (A) IgG de hamster infectado com 1686; (B) IgG de hamster infectado com 1851; (C) IgG de hamster infectado com 515; (D) IgG de hamster infectado com 1580; (E) IgG de hamster infectado com NCL IOCL 3241 e (F) sem infecção, nestas análises

de amplificação por pixel não houve diferença da fuçose na IgG de hamster infectados com as diferentes cepas. Análise das imagens e quantificação do pixel pelo software ImageJ, estatística realizada no software GraphPad Prism 6 com o teste Kruskal wallis.

5.21 Análise estatística

Os resultados foram representados com médias e desvio padrão, em comparação múltipla com teste Kruskal Wallis e Dunn como pós teste. As análises foram feitas com o auxílio do software GraphPad- Prism 6 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de p igual ou menor a 0,05.

A curva de sobrevivência foi realizada através do método Kuplan Meier, utilizado para estimar a função de sobrevivência a partir dos dados de vida, ou seja, mede a fração de vida por um determinado período de tempo após a infecção. Este teste utilizou o Loghank, que testa as hipóteses de sobrevivência dos hamster, pelo do software GraphPad- Prism 6 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA).

A expressão relativa das citocinas foi avaliada através do cálculo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ que descreve a mudança na expressão relativa do gene alvo em relação ao grupo sem infecção em um determinado tempo, posteriormente foi feito analise em comparação múltiplas do teste de Dunn com o auxílio do software GraphPad- Prism 6 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA).

As imagens de western blot foram analisadas pelo software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), pelo qual foi possível diferenciar a área das bandas encontradas através do cálculo da área por pixel, com análise estatística de comparação pelo software GraphPad- Prism 6 (GraphPad Software, san Diego, CA-USA).

Para análise de correlação da expressão relativa das citocinas entre os assintomáticos e sintomáticos, foi feito análises pelo software R, onde as linguagens de programação R versão 4.1.0 e no software R-Studio versão 1.4.1106, com utilização do teste Mann-Whitney (teste de soma de postos de Wilcoxon) e hipóteses corrigidos por Bonferroni que utilizou Benjamini- Hochberg. Após essa análise foi utilizado o teste T, para analise entre sintomáticos e assintomáticos pelo software Gra software GraphPad- Prism 6. Para análise de vários dados simultaneamente o valor da hipótese foi corrigido pela correção de Bonferroni, que utilizou o teste Benjamin Hotchberg (BH) que comparando a hipótese do maior e do menor valor de p. O fold change B/A (FC B/A) foi utilizado para medir o quanto uma quantidade muda entre um original (sintomático) e uma medição

subsequente (assintomático), é calculada como a razão da diferença entre o valor final e o valor inicial sobre o valor original. Enquanto que o fold change log₂ é a razão logarítmica dos valores de expressão das citocinas nas condições de sintomático e assintomático, ou presença e ausência de sintomas. Ao comparar as duas condições, obtemos valores de expressão (normalizados) que variam entre “up regulação” com valores positivos e “down regulação” com valores negativos. A área sob a curva ROC (AUC) é a área entre curvas que varia entre 0 e 1 de forma que os maiores valores são melhores por mostrarem que o modelo separa a classe da variável resposta.

Para estimar a probabilidade de sobrevivência dos animais infectados com as diferentes cepas clínicas em vários intervalos de tempo foi aplicado o teste de Kaplan –Meier, com utilização do teste logrank não paramétrico para comparação da sobrevivência entre dois grupos o infectado com as respectivas cepas clínicas com o grupo sem infecção.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

De acordo com MINISTÉRIO DA SAÚDE (2006), as manifestações clínicas da LV podem variar entre pacientes. Além disso, de acordo com Badaró e colegas (1986) as infecções com *L. infantum* podem resultar em infecções sintomáticas ou assintomáticas, sendo as assintomáticas a maioria dos casos. Embora fatores relacionados ao hospedeiro como idade, genética, desnutrição e imunossupressão (ROSENTHAL *et al.*, 1995; MC CALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013) interfiram na resposta à infecção; diferentes cepas de *Leishmania* infectando hospedeiros de uma mesma espécie podem induzir sinais clínicos diferentes (ZIJLSTRA *et al.*, 1994). Estudos anteriores mostraram que isolados de *L. infantum* pertencentes a zimodemas distintos podem apresentar sensibilidades diferentes à resposta imune do hospedeiro. Isso pode estar relacionado a fatores de virulência do parasito (SILVEIRA; CORBETT, 2010). Ainda que haja na literatura estudos demonstrando variações genéticas e moleculares específicas entre isolados de *L. infantum* de diferentes regiões geográficas (BAPTISTA-FERNANDES *et al.*, 2007) poucos estudos abordaram as diferenças biológicas e o comportamento dessas cepas durante a infecção (FERREIRA-PAES *et al.*, 2020). A variabilidade das cepas de *L. infantum* é um fator determinante e importante na evolução da LV, e tem implicações relevantes para estudos de interação patógeno-hospedeiro e também para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas (MARQUES *et al.*, 2015). Nesse contexto, o presente estudo avaliou diferentes cepas de *L. infantum* isoladas de pacientes humanos diagnosticados com LV de área endêmica de Teresina, Piauí no Brasil, para determinar a infectividade e a patogenicidade *in vitro* e *in vivo*. Além disso, incluímos a cepa padrão de *L. infantum* NCL IOCL 3241, oriunda de humanos coletada em Montes Claros- MG, depositada na Coleção de *Leishmania* da Fundação Oswaldo Cruz (CLIOC) (ESPADA *et al.*, 2021).

Embora as cepas clínicas não tenham apresentado amplificação com iniciadores específicos para espécie *Leishmania infantum*, exceto a cepa padrão NCL IOCL 3241, todas amplificaram para família Trypanosomatidae e para gênero *Leishmania*. Esse resultado não exclui que os isolados clínicos estudados nesta dissertação não contivessem a espécie *Leishmania infantum*: a obtenção de DNA das cepas foi realizada entre a quarta e a quinta passagem, depois das demais caracterizações dos componentes avaliados nos nossos experimentos, sendo possível que pacientes dos quais foram isoladas as cepas estivessem co-infectados com dois tripanosomatídeos e uma espécie predominou sobre outra nas passagens em cultura. É sabido que *Leishmania* visceralizantes perdem características de virulências rapidamente em constantes passagens em cultura celular,

devido a modificações em protease de superfície (KATAKURA; KOBAYASH, 1985; ROBERTS; WILSON; DONELSON, 1995). Dessa forma essas e outras modificações podem ter afetado a identificação específica da cepa presente no isolado primário. Infelizmente, não foi possível realizar a repetição do experimento com cepa na primeira passagem, devido ao tempo necessário para o desenvolvimento da infecção experimental e demais experimentos dentro do prazo estabelecido no mestrado para a confirmação de nossa hipótese.

Em relato de caso de um paciente com LV foi identificado a presença de duas cepas de *L. infantum* a partir de amostras de medula óssea. A segunda cepa só foi identificada após os sintomas persistirem mesmo após tratamento inicial. A análise das cepas mostrou que elas possuem comportamento diferente *in vitro* no que se refere a curva de crescimento, além disso podem apresentar resistência diferencial a determinado tratamento (ANTONIOU *et al.*, 2021). A estrutura populacional entre as diferentes cepas de *L. infantum* é complexa, e pode ter implicações inclusive no controle da doença. Em estudo recente foi relatado cepas portadoras de deleção em pelo menos 15 estados brasileiros com padrões de diversidade, e a troca genética parece comum em áreas de contato secundário e entre parasitos intimamente relacionados (SCHWABL *et al.*, 2021).

Em locais de grande exposição a colônias do inseto vetor, as chances de ser infectado com diferentes cepas aumentam (TSELENTIS; GIKAS; CHANIOTIS, 1994), conseqüentemente, uma infecção mista no mesmo macrófago com diferentes espécies de *Leishmania* é possível (ABDULLAH; FLATH; PRESBER, 1998), e leva a geração de diversidade genética dentro de uma população de *Leishmania* (CARRASCO *et al.*, 1996; KELLY *et al.*, 1991). Diferentes isolados de *Leishmania infantum* com o mesmo perfil de zimodema apresentando diferentes valores de ED50 pode ser resultado de trocas genéticas (FARAUT-GAMBARELLI *et al.*, 1997). Portanto, infecções mistas por diferentes cepas de *Leishmania* podem ser um fenômeno frequente; e podem explicar as diferenças no curso clínico da leishmaniose em muitos pacientes além de ser a razão para falhas no tratamento (ANTONIOU *et al.* 2021). Diante do relatado, as cepas clínicas devem ser melhor estudadas no que tange as diferenças genéticas.

As cepas induziram respostas diferenciadas nas infecções, e interessantemente a cepa 1686, vinda de paciente com calazar grave, teve a maior taxa de infecção *in vitro*, atingindo o pico em 48 horas, com aparente redução após 72 horas. Enquanto as demais cepas atingiram o pico de infecção, com menor taxa comparado a 1686, após 72 horas. A diferença de infectividade entre diferentes cepas de *L. infantum* também foi vista quando utilizado macrófagos caninos DH82 (RESENDE *et*

al., 2020). Em relação ao tempo de crescimento dos parasitos, em macrófagos de peritônio de camundongos BALB/c e Swiss Webster infectados com *L. infantum* e mantidos em cultura por 24 e 72 horas, tiveram pico de crescimento no maior tempo (FERREIRA-PAES *et al.*, 2020). Em outro estudo, no entanto, com infecção *in vitro*, utilizando diferentes cepas de *L. infantum* isoladas do inseto vetor e monócitos medulares murinos diferenciados em macrófagos, a maior taxa de infecção ocorreu no tempo inicial de 4 horas com declínio da infecção em 24 e 72 horas em todas as cepas (DOMÍNGUEZ-BERNAL *et al.*, 2014).

Um fator adicional que pode estar associado com a gravidade da Leishmaniose é a presença de vírus de RNA de *Leishmania*, descrito em várias espécies do protozoário. O LRV1, específico para as espécies mucocutâneas, está relacionado com a agressividade da doença, devido a ativação por TLR3 (receptores do tipo toll 3) e fator de transcrição TRIF para produção de IFN tipo 1 que induz a autofagia resultando na degradação de inflamassoma NLRP3 limitando a ativação de macrófagos pela via do inflamassoma (DE CARVALHO; LIMA JÚNIOR; DA SILVA, 2019). Em *L. infantum* foi relatado que a presença do vírus pode levar a resistência ao tratamento pelo antimoniato de meglumina, porém devido ao número limitado de espécimes analisadas não foi possível observar a correlação da gravidade da doença com o vírus (HAJJARAN; MAHDI; MOHEBALI, 2016). Dessa forma, o estudo da presença e função de LRV deve ser investigado nessas cepas.

Todos os hamsters adquiriram infecções visceralizantes em transmissão com as cepas 1686, 1580, 1851 e 515, em período entre 4 a 9 meses após a infecção, com manifestações clínicas diferenciadas em tempos diferentes. Esse resultado é corroborado com o estudo de Moreira e colegas (2016), que relata o surgimento de sinais clínicos em hamsters infectados com isolado clínico OP46 de cão sintomático inoculados por via intracardíaca e a cepa PP75 em diferente período de tempo e níveis de gravidade.

O primeiro sinal observado nos grupos de hamsters sintomáticos foi a constante perda de peso apresentada primeiramente no grupo infectado com a cepa 1580, seguido por 1686 e 1851 e por último 515. No entanto, alguns animais infectados com as cepas 1580, 1851 e 515 não apresentaram sinais externos da doença até o fim do estudo, tal como todo o grupo infectado com a cepa NCL IOCL 3241. A ausência de sinais externos também foi observada em outros estudos com hamster *Mesocricetus auratus* infectados com LV (ASLAN *et al.*, 2013; MARTÍN-MARTÍN *et al.*, 2015).

As cepas clínicas que induziram quadro clínico mais graves nos hamsters foram 1686, 1851 e 1580, além da desidratação, diarreia, incoordenação motora, lesão em mucosa oral e secreção ocular, nasal ou auricular, taquicardia; no grupo 1686 foi observado icterícia e palidez em mucosas, enquanto 1851 e 1580 apresentaram, respectivamente, epistaxe e mucosa pálida. Em humanos com LV, além dos sinais clássicos de LV, otites, problemas respiratórios e taquicardia foram observados, indicando infecção secundária (OLIVEIRA *et al.*, 2010) essas infecções secundárias podem estar associadas a transmigração da microbiota endógena, uma vez que os hamster viviam em ambientes controlados livre de patógenos (LEWIS *et al.*, 2020).

Clinicamente, a presença de ascite em humanos infectados é comum na LV em fases mais tardias da doença (QUEIROZ; ALVEZ; CORREIA, 2004). O acúmulo de líquido em membros e cavidade peritoneal ocorre por vários mecanismos relacionado anormalidade anatômicas, fisiopatológicas e bioquímicas em pacientes com comprometimento hepático (JUNIOR; GALVÃO; SANTOS; ANDRADE, 2009). Porém em caso de LV não tratada, inicialmente é visto edema de membros podendo desenvolver para anasarca (edema generalizado) (SALDANHA, *et al.*, 2006) com acúmulo de líquido na cavidade peritoneal. Por outro lado, em estudos com hamster infectado com isolado clínico de humano, somente 33,3% apresentaram ascite (OLIVEIRA *et al.*, 2010), já em Aslan, *et al.*, 2013 em infecção pelo vetor flebotomíneo nenhum hamster apresentou acúmulo de líquido em cavidade peritoneal, mas em infecções intracardíacas foi relatado a presença do sintoma. Assim no presente estudo, mesmo com alterações hepáticas observadas nos grupos 1686, 1851, 515 e 1580, não foi detectado ascite, embora animais infectados com 1686, 1580 e 1851 tenham apresentado edema de patas.

Devido ao tropismo da *Leishmania* visceral para o fígado a hepatomegalia é observada com frequência em pacientes com LV macroscopicamente (HAPPUIS *et al.*, 2007). Nós observamos em todos os hamsters infectados com as diferentes cepas, exceto 20% infectado com 515, alterações microscópicas como degeneração hidrópica devido ao acúmulo de água no meio intracelular, esteatose, que consiste no acúmulo de triacilglicerol (SILVA, GONÇAVES, 2008), granulomas e células gigantes para conter a disseminação do parasito e infiltrado inflamatório, assim como relatado por DE LIMA e colaboradores (2017). O fígado é o local de resolução aguda da infecção com desenvolvimento de granulomas inflamatórios em volta das células de kuppfer infectadas, causando danos mínimos aos tecidos (STANLEY; ENGWERDA, 2007). Macroscopicamente observamos alterações na coloração e no tamanho do órgão somente em hamster com cepas clínicas

1686, 1851 e 1580. Os baços infectados, por sua vez, apresentaram lesões tanto macroscópicas como microscópicas, independente do quadro clínico induzido pelas cepas clínicas, visto também em outros trabalhos (ASLAN *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2016). Na microscopia esplênica observou-se periesplenite, hipertrofia de polpa branca, hiperplasia de polpa vermelha, aumento de espessura da capsula e esplenomegalia, indicando parasitismo no órgão. Essas alterações também foram relatadas em infecções caninas e em hamsters infectados com LV (SANTOS *et al.*, 2017; DE LIMA *et al.*, 2017), assim durante a LV, o baço é o local inicial para geração de resposta imunes mediadas por células, mas acaba se tornando local de persistência do parasito com alterações imunopatológicas associadas (STANLEY; ENGWERDA, 2007).

Curiosamente, foi observado coprofagia nos animais infectados com as cepas clínicas 1686, 1851 e 1580, mas em estudos de infecção em hamsters (ASLAN *et al.*, 2013; MARTÍN-MARTÍN *et al.*, 2015) e em cães (ABRANCHES *et al.*, 1991; MOREIRA *et al.*, 2007), não foi relatado esse comportamento. Na medicina veterinária a coprofagia é causada por verminose, estresse, doenças metabólicas e alimentação restritiva, inadequada e/ou carente de nutrientes (MEYER, *et al.*, 2014; EDWARD, 2020). Visto que, em infecções com *L. infantum* a mudança da microbiota intestinal pode estar associada a carga parasitária e alterações histológicas (PASSOS *et al.*, 2020; LEWIS *et al.*, 2020), hipotetizamos que mudanças ocorridas na microbiota devido ao parasitismo intestinal com translocação bacteriana para o fígado e perda de peso progressiva durante a LV causando o comportamento acima descrito dos hamsters devido o comprometimento na metabolização hepática, tal relação será investigada por outro estudo realizado pelo nosso grupo. Adicionalmente, a copofragia pode estar relacionada, também, ao estresse causado pelo desconforto dos sinais clínicos e pelos distúrbios metabólitos devido às alterações hepáticas e má absorção de nutrientes pelo intestino decorrentes da LV.

A cepa 1851 induziu maior produção de IgG total, embora 1686 e 1580 também induziram altos níveis de IgG totais, assim como em pacientes humanos com LV infectados com diferentes cepas de *Leishmania* apresentam diferentes níveis de anticorpos (ELASSAD *et al.*, 1994). A hipergamaglobulinemia é um sinal clínico típico da LV tanto em humanos quanto em hamsters, e ocorre devido à ativação policlonal de linfócitos B (BUNN-MORENO *et al.*, 1985; GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1984). Os anticorpos induzidos pela *L. infantum* na LV não têm efeito protetor e podem estar envolvidos na patogenia das lesões na doença (MATHIAS *et al.*, 2001). Por outro lado, podem ser protetores nos casos de infecções assintomáticas por esse parasita pelos

mecanismos discutidos nos estudos de Gardinassi e colegas (2014 e 2017), Rodrigues e colegas (2016) e Casadevall e colegas 2003.

A reação ao antígeno solúvel de *Leishmania* foi positiva tanto no soro dos grupos de hamsters com LV ativa infectados com as cepas 1686, 1580 e 1851, quanto em assintomáticos dos grupos 1580 e 1851. No entanto, hamsters assintomáticos do grupo 515 e NCL IOCL 3241, não apresentaram diferença significativa na produção de anticorpos específicos contra *Leishmania*. Em análise realizada com indivíduos de região endêmica para LV, o ELISA foi capaz de detectar altos níveis de anticorpos específicos para *Leishmania*, no entanto não foi possível detectar todos os indivíduos assintomáticos somente por essa técnica, sendo necessária a associação com outras metodologias (PORCINO *et al.*, 2019).

Embora o “imprint” do baço e fígado dos animais tenham mostrado a presença de amastigotas; assim como houve crescimento de promastigotas em avaliação por diluição limitante, técnica de alto padrão utilizada na quantificação de parasitos nos órgãos (LIMA; BLEYENBERG; TITUS, 1997), não houve amplificação com iniciadores específicos para *L. infantum* em PCR para alguns órgãos infectados. Diferentes metodologias de análises de carga parasitária em LV podem apresentar resultados diferentes devido as limitações de cada técnica. Embora qPCR seja considerado uma técnica eficiente para avaliação da carga parasitária em fígado e baço de hamster infectados com LV, uma vez que mostrou maior sensibilidade para identificar animais com baixa carga parasitária (MOREIRA *et al.*, 2012), vale salientar que não existe um método padronizado (GALLUZZI *et al.*, 2018). Para humanos qPCR é uma ferramenta fundamental na detecção de LV por apresentar uma variação de especificidade entre 29,6-100% e sensibilidade entre 91,3 e 100% (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015).

Perfis de N-glicanas na região Fc de IgG estão sujeitas a alterações, podendo modificar a função efetora mediada por anticorpos e afetar a gravidade da LV. Pacientes com sintomas graves de LV quando comparados com assintomáticos, apresentam elevados níveis séricos de citocinas IL-1 β ; IL-6; TNF- α ; IL-12p 70; IFN- γ e proteína C-reativa, que são significativamente associados ao desenvolvimento de sintomas clínicos graves. Esses indivíduos apresentavam anticorpos com baixos níveis de ácido siálico e altos níveis de fucosilação na porção Fc de subunidades de IgG (GARDINASSI *et al.*, 2014). Embora tenhamos tentado avaliar a alteração de ácido siálico e fucose em anticorpos específicos, a remoção dos carboidratos do antígeno de *L. infantum* foi ineficiente ao utilizar a enzima Endo S, e a aplicação de novos protocolos com ácido periódico (GORNIK;

LAUC, 2007) ou com a enzima PNGase F (SHADE; ANTHONY, 2013) são necessários para testar a eficácia da deglicosilação do antígeno.

A análise de glicanas em IgG total dos hamsters infectados com as diferentes cepas mostrou redução dos níveis de ácido siálico e fucose nessas proteínas nos grupos oligossintomático e/ou assintomático 515 e assintomático NCL IOCL 3241 e 1851. É interessante salientar que a cepa NCL IOCL 3241 não induziu alterações anatomopatológicas nos hamsters e foi negativo em ensaios de detecção do parasito, embora aumento significativo da expressão de IFN- γ em células esplênicas e presença de vacúolos parasitóforos em macrófagos de fígado e baço tenham sido observados nos animais infectados com a cepa. A presença de IFN- γ pode indicar o controle da infecção por *Leishmania* devido o recrutamento de células Th1 produtoras de IFN- γ (KEMP *et al.*, 1999; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011) que em macrófagos ativados amplifica atividade microbicida sobre amastigotas (LYKENS *et al.*, 2010).

Doenças infecciosas apontam para o notável controle imunológico sobre a glicosilação de anticorpos, como ele é moldado pela inflamação e, mais importante, como pode ser controlado para dirigir a função imunológica (IRVINE; ALTER 2020; LU *et al.*, 2018). Embora os mecanismos que regulam a glicosilação de IgG não tenham sido totalmente elucidados, as citocinas, assim como células B, as células plasmáticas e as glicosiltransferases extracelulares, provavelmente influenciam as glicoformas de Fc de IgG. Na verdade, a contribuição da glicosilação de IgG para doenças infecciosas e vacinas é cada vez mais apreciada, e testes funcionais mostraram que a sialilação de IgG é responsável pela atividade antiinflamatória de IVIG *in vivo* (JONES *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017; PAGAN; KITAOKA; ANTHONY, 2018). A sialilação terminal de Fc de glicana reduz a afinidade de IgG para Fc γ Rs tipo I, e IgG sialilado tem capacidade reduzida para iniciar a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) *in vivo*. (SCALLON *et al.*, 2007). Desta forma nós sugerimos que, neste estudo, a redução do ácido siálico esteja associada ao controle da doença, embora sejam necessários mais experimentos para correlacionar o aumento de IFN- γ e a redução do ácido siálico com o controle da LV.

Por outro lado, o grupo infectado com a cepa 1580, uma das que induziu sinais de LV grave nos hamsters, apresentou expressão relativa levemente elevadas das citocinas IL-10 em fígado e TGF- β em fígado e baço. Tais citocinas ativam a enzima arginase competindo com iNOS inibindo fator microbicida dos macrófagos como NO (MOSSER, 2003; GORDON, 2003; RODRIGUEZ; CHABG; WILSON, 2004), favorecendo a sobrevivência do patógeno no interior do macrófago e

disseminação no organismo (INIESTA; GÓMEZ-NIETO; CORRALIZA, 2001). Vale ressaltar que os níveis de NO foram mensuradas em infecção *in vitro* neste estudo, porém não houve alteração (dados não mostrados). Na verdade, já foi descrito que *L. infantum* falha em induzir uma forte resposta inflamatória, e tem menor ativação e controle do parasito em monócitos humanos (VIANA *et al.*, 2018).

Aplicando a técnica do western blot com amostras de anticorpos purificados de hamsters infectados com diferentes cepas de *L. infantum* foi visto que a presença de fucose e ácido siálico somente na cadeia pesada. Houve um aumento de ácido siálico e de fucose em hamster sintomáticos em relação aos assintomáticos no experimento ELLA, e embora seja necessárias análises mais profundas com técnicas mais sensíveis, podemos inferir que houve uma modulação no perfil de glicanas nos animais, e que esse aumento pode estar relacionado a gravidade de LV em modelo experimental. Isso porque, o aumento de fucose em IgGs de pacientes com LV grave pode afetar a ligação do IgG no receptor inibidor IgG II b (FcγRIIb) nas células B, prejudicando o mecanismo reguladores da ativação de células B (SIBÉRI *et al.*, 2005; GARDINASSI *et al.*, 2014) e favorecendo a hipergamaglobulinemia. Enquanto a baixa fucosilação em IgG1 tem maior citotoxicidade *in vivo* pela ligação e ativação em receptor ativador FcγRIIIa (SHIELDS *et al.*, 2002) controlando assim a LV nos animais assintomáticos. Além disso, quantidade de IL-1β em células hepáticas de assintomáticos foi associada com a ausência de sinais clínicos de LV, o que pode ser explicado pelo fato de durante a infecção por *Leishmania* ocorrer ativação por inflamassoma NLRP3 em macrófagos para evitar replicação intracelular (LIMA- JUNIOR *et al.*, 2013; ZAMBONI; SACKS, 2019). A IL-1β é um mediador inflamatório essencial para resposta do hospedeiro e para destruição de patógenos, porém em condições exacerbadas causa danos durante infecções crônicas e lesões agudas (LOPEZ; BROUGH, 2011).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que infecção com a cepa 1686 pode levar a quadros mais graves da doença e com maior infectividade, conforme aferida nos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, essa cepa se destaca como alvo de estudo para o melhor entendimento da patogênese de LV, e pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de diagnósticos, terapias e vacinas. Por outro lado, estudos com a cepa de referência NCL IOC 3241, podem explicar a baixa infectividade e resolução da doença. A sintomatologia da LV parece estar associada a IL-1 β , além da mudança da glicosilação. Sugerimos o aprofundamento deste estudo com a aplicação da duplicata do experimento utilizando as cepas de maior destaque, e aplicação de técnicas mais sensíveis, como espectrometria de massas, no estudo da glicosilação.

Por fim, concluímos que o presente estudo é um passo para o entendimento da LV no que se refere aos fatores que levam ao desenvolvimento da doença após infecção com parasita que, na maioria dos casos, leva a infecções assintomáticas, assim como para reafirmar a utilização do hamster como modelo experimental, e sugerir que novas cepas sejam ferramentas de estudo da patologia da doença.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ABDULLAH, S. M.; FLATH, B.; PRESBER, W. Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania*. **The American Journal Tropical of Medicine and Hygiene**. v. 59, n. 2, p. 182- 188, 1998.

ABRANCHES, P.; SANTOS- GOMES, G.; RACHAMIM, N.; CAMPINO, L.; SCHNUR, L. F.; JAFEE, C.L. An experimental model for canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v.13, 5 ed., p. 537-550, 1991.

AOKI, J. I.; MUXEL, S. M.; ZAMPIERI, R. A.; MULLER, K. E.; NERLAND, A. H.; FLOETER-WINTER, L. M. Differential immune response modulation in early *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c and C57BL/6 macrophages based on transcriptome profiles. **Scientific Reports**. v. 1; n. 9, p. 19841, 2019.

ALVES, F.; BILBE, G.; BLESSON, S.; GOYAL, V.; MONNERAT, S.; MOWBRAY, C.; MUTHONI OUATTARA, G.; PÉCOUL, B.; RIJAL, S.; RODE, J.; SOLOMOS, A.; STRUB-WOURGAFT, N.; WASUNNA, M.; WELLS, S.; ZIJLSTRA, E. E.; ARANA, B.; ALVAR, J. Recent Development of Visceral Leishmaniasis Treatments: Successes, Pitfalls, and Perspectives. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 31, n. 4, e00048-18, 2018.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T.; COURRET, N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. **Trends in Microbiology**. v. 6, n. 10, p. 392-401, 1998.

ANTONIOU, M.; DOULGERAKIS, C.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P. TSELENTIS, Y. Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. **The American Journal Tropical of Medicine and Hygiene** v. 71, n. 1, p. 71- 72, 2021.

APPLIED BIOSYSTEM. **Creating Standard Curves with Genomic DNA or Plasmid DNA Templates for Use in Quantitative PCR**. Disponível em: https://isu.technion.ac.il/wp-content/uploads/2016/10/Creating_Standard_Curves.pdf, 2016. Acesso em: 03 set. 2021.

ARNOLD, J. N.; WORMALD, M. R.; SIM, R. B.; RUDD, P. M.; DWEK, R. A. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. **Annual Review of Immunology**. v. 25, p. 21–50, 2007.

ASLAN, H.; DEY, R.; MENESES, C.; CASTROVINCI, P.; JERONIMO, S. M. B.; OLIVA, G. FISCHER, L.; DUNCAN, R. C.; NAKHASI, H. L.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 207, n. 8, p. 1328–1338, 2013.

BADARÓ, R.; JONES, T. C.; LORENÇO, R.; CERF, B. J.; SAMPAIO, D.; CARVALHO, E. M.; ROCHA, H.; TEIXEIRA, R.; JOHNSON, W. D. J. A prospective study of visceral

leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **The Journal Infectious Diseases**. v. 154, n.4, p. 639-649, 1986.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismo envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêuticas**. v. 4, n. 1, p. 27-51, 2005.

BAPTISTA-FERNANDES, T.; MARQUES, C.; ROOS RODRIGUES, O.; SANTOS-GOMES, G. M. Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**. v. 30, n. 1, p. 41–53, 2007.

BADIRZADEH, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; ABDOSAMADI, Z.; HEIDARI-KHARAJI, M.; GHOLAMI, E.; SEDAGHAT, B.; NIYYATI, M.; RAFATI, S. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of *Leishmania* parasites. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 7, e0005774, 2017.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.7, n. 3, 2004.

BASTOS, M. M.; BOECHAT, N.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. S.; CAVALEIRO, J. A. S. O uso de Perforinas em terapia fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose Cutânea. **Revista Virtual de Química**. v.4, n.3, p. 257-267, 2012.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, n. 2, p. 128-134, 2013.

BHARATI, K. Human genetic polymorphism and Leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infection Diseases**, 2022.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Disease**. v. 2, n. 10, 2008.

BOELAERT, M.; RIJAL, S.; REGMI, S.; SINGH, R.; KARKI, B.; JACQUET, D.; CHAPPUIS, F.; CAMPINO, L.; DESJEUX, P.; LE RAY, D.; KOIRALA, S.; VAN DER STUYFT, P. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70, n. 1, 2004.

BOSCH-NICOLAU, P.; UBALS, M.; SALVADOR, F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; APARÍCIO, G. ERRA, A.; SALAZAR, P. M.; SULLEIRO, E. MOLINA, I. Leishmaniasis and tumor necrosis factor alpha antagonists in the Mediterranean basin. A switch in clinical expression. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 13 n. 8, 2019.

BOYD, P. N.; LINES, A. C.; PATEL, A. K. The effect of the removal of sialic acid, galactose and total carbohydrate on the functional activity of Campath-1H. **Molecular Immunology**. v. 32, n. 17-18, p. 1311- 1318, 1995.

BRANTON, M. H; KOPP, J. B. TGF-beta and fibrosis. **Microbes and Infection**. v.1, n. 15, p. 1349–1365, 1999.

BRUSCHI, M.; MORONI, G.; SINICO, R. A.; FRANCESCHINI, F.; FREDI, M.; VAGLIO, A.; CAVAGNA, L.; PETRETTO, A.; PRATESI, F.; MIGLIORINI, P.; MANFREDI, A.; RAMIREZ, G. A.; ESPOSITO, P.; NEGRINI, S.; TREZZI, B.; EMMI, G.; SANTORO, D.; SCOLARI, F.; VOLPI, S.; MOSCA, M.; TINCANI, A.; CANDIANO, G.; PRUNOTTO, M.; VERRINA, E.; ANGELETTI, A.; RAVELLI, A.; GHIGGERI, G. M. Neutrophil Extracellular Traps in the Autoimmunity Context. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**. v. 8, 2021.

BUNN-MORENO, M. M.; MADEIRA, E. D.; MILLER, K.; MENEZES, J. A.; CAMPOS-NETO, A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 59, n. 2, p. 427–434, 1985.

BUNDO, K.; IGARASHI, A. Antibody-capture ELISA for detection of immunoglobulin M antibodies in sera from Japanese encephalitis and dengue hemorrhagic fever patients. **Journal of Virological Methods**. v. 11, n. 1, p. 15-22, 1985.

BURNS, J. M.; JR SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

CAMPOS-PONCE, M.; PONCE, C.; PONCE, E.; MAINGON, R. D. *Leishmania chagasi/infantum*: further investigations on *Leishmania* tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. **Experimental parasitology**. v. 109, n. 4, p. 209–219, 2005.

CARRASCO, H. J.; FRAME, I. A.; VALENTE, S. A.; MILES, M. A. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 54, n. 4, p. 418–424. 1996.

CASADEVALL, A. Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. **Infection and Immunity**. v. 8 , n. 71, p. 4225- 4228, 2003.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; CORDEIRO DA SILVA; A. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. **Frontier Immunology**. v. 5, n. 480, 2014.

CEUA. Resolução normativa nº 41. **Guia brasileiro de manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica**. Disponível em: <https://www.ceua.ufv.br/wp-content/uploads/2018/07/RESOLU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-41-.pdf>. Acesso em: 25 maio, p.1-75, 2018.

CDC. Leishmaniasis. **Center for disease control and prevention**. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 3 set. 2021.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**. n. 5, p. 873–882, 2007.

CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. **Molecular and Cellular Biology**. v.14, n. 5, p. 2975–2984, 1994.

COSTA, D. L.; ROCHA, R. L.; CARVALHO, R. M.; LIMA-NETO, A. S.; HARHAY, M. O.; COSTA, C. H.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. P. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**. v. 107, n. 2, p. 78–87. 2013.

CORRÊA, A. P. F. L. **Resposta humoral, carga parasitária e avaliação histopatológica na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em camundongos Balb/c imunossuprimidos**. Dissertação de doutorado do curso de pós graduação em doenças tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2011.

CUNNINGHAM, J.; HASKER, E.; DAS, P.; EL SAFI, S.; GOTO, H.; MONDAL, D.; MBUCHI, M., MUKHTAR, M.; RABELLO, A.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; WASUNNA, M.; ADAMS, E.; MENTEN, J.; PEELING, R.; BOELAERT, M.; WHO/TDR Visceral Leishmaniasis Laboratory Network A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**. v. 55, n. 10, p. 1312–1319, 2012.

DAVIES, C. R.; MAZLOUMI GAVGANI, A. S. Age, acquired immunity and the risk of visceral leishmaniasis: a prospective study in Iran. **Parasitology**. v. 119, n. 3, p. 247-257, 1999.

DA SILVA, E. R.; CASTILHO, T. M.; PIOKER, F. C.; TOMICH DE PAULA SILVA, C. H.; FLOETER-WINTER, L. M. Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. **International Journal for Parasitology**. v. 32, n. 6, p. 727–737, 2002.

DA SILVA, M. F. L.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in *Leishmania*. Sub-cellular biochemistry. v. 74, p. 103–117, 2014.

DAYAKAR, A.; CHANDRASEKARAN, S.; KUCHIPUDI, S. V.; KALANGI, S. K. Cytokines: Key Determinants of Resistance or Disease Progression in Visceral Leishmaniasis: Opportunities for Novel Diagnostics and Immunotherapy. **Frontiers in immunology**. v.10, n. 670, 2019.

DE CARVALHO, R.V. H.; LIMA-JUNIOR, D. S.; DA SILVA, M. V. G. *et al.* *Leishmania* RNA virus exacerbates Leishmaniasis by subverting innate immunity via TLR3-mediated NLRP3 inflammasome inhibition. **Nature Communication**. v. 10, p. 5273, 2019.

DE LIMA, J. L. C.; VENUTO MOURA, A.P.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MATOS DE SOUSA G.; OLIVEIRA, S. S.; NORMA M. M.; TAFURI, L. W.; CARVALHO, S. C. MONTEIRO A. H. Experimental mixed infection of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* in hamster (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology**. v. 144, n. 9, p.1991- 1202, 2017.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R. C.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S.; TAVARES, D.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C.; SILVA, R.; PEREIRA, V. R. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & bioscience**. v. 5, n. 31, 2015.

DELL'ARINGA, M.; REINHARDT, R. L.; FRIEDMAN, R. S.; JACOBELLI, J. Live Imaging of IL-4-Expressing T Follicular Helper Cells in Explanted Lymph Nodes. **Methods in Molecular Biology**. v.1799, p. 225–235, 2018.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 185, n. 12, p. 2061-2068, 1997.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. v. 27, n.5, p. 305-18, 2004.

DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; JIMÉNEZ, M.; MOLINA, R. *et al.* Characterisation of the *ex vivo* virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniosis in Madrid, Spain. **Parasites Vectors**. v. 7, n. 499, 2014.

DOS SANTOS, P. L.; DE OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. L., CUNHA, L. C.; LINO, M. T.; DE OLIVEIRA, M. F.; BOMFIM, M. O.; SILVA, A. M.; DE MOURA, T. R.; DE JESUS, A. R., DUTHIE, M. S.; REED, S. G.; DE ALMEIDA, R. P. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS neglected tropical diseases**. v. 10, n. 1, 2016.

EDWARD, H. J. Malabsorption syndromes in small animals. **MSD Manual – Veterinary Manual**. 2020.

ELASSAD, A. M.; YOUNIS, S. A.; SIDDIG, M.; GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H.W. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Imunologia clínica e experimental**. v. 95, n. 2, p. 294–299, 1994.

ELASSAD, A. M.; YOUNIS, S. A.; SIDDIG, M., GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H. W. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Clinical and experimental immunology**. v. 95, n. 2, p.294–299, 1994.

ESPADA, C. R.; ORTIZ, P. A.; SHAW, J. J.; BARRAL, A. M. P.; COSTA, J. M. L.; ULIANA, S. R. B.; COELHO, A. C. Identification of *Leishmania* (*Viannia*) species and clinical isolates of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from Brazil using PCR-RFLP of the heat-shock protein 70 gene reveals some unexpected observations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 91, n. 4, p. 312-318, 2018.

ESPADA, C. R.; LEVATTI, E.V.C.; BOITÉ, M.C.; LAMOUNIER, D.; ALVAR, J. CUPOLILLO, E.; COSTA, C.H.N.; RODE, J.; ULIANA, S.R.B. *In vitro* Susceptibility to Miltefosine of *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) Isolates from Different Geographical Areas in Brazil. **Microorganisms**. v. 9, n. 6, p. 1228, 2021.

FARAUT-GAMBARELLI, F.; PIARROUX, R.; DENIAU, M.; GIUSIANO, B.; MARTY, P.; MICHEL, G.; FAUGÈRE, B.; DUMON, H. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 4, p. 827–830, 1997.

FERREIRA-PAES, T.; CHARRET, K.; RIBEIRO, M.; RODRIGUES, R. F.; LEON, L. L. Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. **Plos One**. v. 15, n. 12, e0230545, 2020.

FILHO, A.; NASCIMENTO, A.; SAAB, N.; FUGIWARA, R. T.; D'ÁVILA PESSOA, G. C.; KOERICH, L. B.; PEREIRA, M. H.; ARAÚJO, R. N.; SANT'ANNA, M.; GONTIJO, N. F. Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uLENE of factor H, a complement regulatory protein. **Acta Tropica**. v. 224, p. 106152, 2021.

GADANI, S. P.; CRONK, J. C.; NORRIS, G. T.; KIPNIS, J. IL-4 no cérebro: uma citocina para lembrar. **Journal of Immunology**. v.189, n. 9, p. 4213–4219, 2012.

GALLUZZI, L., CECCARELLI, M., DIOTALLEVI, A. MENOTTA, M.; MAGNANI, M. Aplicações de PCR em tempo real para diagnóstico de leishmaniose. **Parasites Vectors**. v. 11, n. 273, 2018.

GALVÃO-CASTRO, B.; SÁ FERREIRA, J. A.; MARZOCHI, K. F.; MARZOCHI, M. C.; COUTINHO, S. G.; LAMBERT, P. H. Ativação policlonal de células B, complexos imunes circulantes e autoimunidade na leishmaniose visceral americana humana. **Clinical Experimente Immunology**. v. 56, n. 1, p. 58- 66, 1984.

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P.; SANTOS, C. F. ALMEIDA, R. F. Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e Gastos Federais com Medicamentos. **Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada – IPEA**. Brasília, p.66, 2011.

GARDINASSI, L. G.; DOTZ, V.; HIPGRAVE EDERVEEN, A.; DE ALMEIDA, R. P.; NERY COSTA, C. H.; COSTA, D. L.; DE JESUS, A. R.; MAYBORODA, A. O.; GARCIA, G. R.;

WUHRER, M.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. Clinical Severity of visceral leishmaniasis is associated with changes. **MBio**. v. 5, n. 6, p 1- 12, 2014.

GARDINASSI, L. G.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F. Comment on “Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection” and further discussions about the role of antibodies in infections with *Leishmania*. *Parasites Vectors*. v. 9, n. 386, 2016.

GARDINASSI, L. G.; DE SOUZA-VIEIRA, T. S.; DA SILVA, N. O.; GARCIA, G. R.; BORGES, V. M.; CAMPOS, R. N. S.; DE ALMEIDA, R. P.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F.; SARAIVA, E. M. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. *Parasite Vectors*. v. 10, n. 285, 2017.

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; SINGH, N.; SINGH, A. K.; RAI, M.; SACKS, D.; SUNDAR, S.; NYLÉN, S. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **The journal of infection disease**. v.209 n. 2, p.290-299, 2014.

GERBER, J. S.; MOSSER, D. M. Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fcγ receptors. **The Journal of Immunology**. v. 166, n. 11, p. 6861- 6868, 2001.

GHOSH, M. K.; NANDY, A.; ADDY, M.; MAITRA, T. K.; GHOSE, A. C. Subpopulations of T lymphocytes in the peripheral blood, dermal lesions and lymph nodes of post kala-azar dermal leishmaniasis patients. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 41, n. 1, p. 11–17, 1995.

GONZÁLEZ-DE LA FUENTE, S.; PEIRÓ-PASTOR, R.; RASTROJO, A.; MORENO, J.; CARRASCO-RAMIRO, F.; REQUENA, J. M.; AGUADO, B. Resequencing of the *Leishmania infantum* (strain JPCM5) genome and de novo assembly into 36 contigs. **Scientific Reports**. v. 7, n. 1, p. 18050, 2017.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**. v.3, p. 23–35, 2003.

GORNIK, O.; LAUC, G. Enzyme linked lectin assay (ELLA) for direct analysis of transferrin sialylation in serum samples. **Clinical Biochemistry**. v. 40, n. 9, 2007.

GOTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, 2004.

GRETEN, F. R.; ARKAN, M. C.; BOLLRATH, J.; HSU, L. C.; GOODE, J.; MIETHING, C.; GOKTUNA, S. I.; NEUENHAHN, M.; FIERER, J.; PAXIAN, S.; VAN ROOIJEN, N.; XU, Y.; O'CAIN, T.; JAFFEE, B. B.; BUSCH, D. H.; DUYSER, J.; SCHMID, R. M.; ECKMANN, L.; KARIN, M. NF-kappaB is a negative regulator of IL-1beta secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKKbeta. **Cell**. v.130, n. 5, p.918- 31, 2007.

HAJJARAN, H.; MAHDI, M. MOHEBALI, M. et al. Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian *Leishmania* species. **Archives of virology**. v. 161, p. 3385- 3390, 2016.

HAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; ROSANNA, W. P. ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews microbiology**. n. 5, p. 873–882, 2007.

HARTLEY, M. A.; RONET, C.; ZANGGER, H.; BEVERLEY, S. M.; FASEL, N. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in Cell and Infection Microbiology**. v. 2, n. 99, 2012.

HIGEL, F.; SEIDL, A.; SORGEL, F.; FRIESS, W. N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins. **Europe Journal Pharmaceutic and Biopharmaceutic**. v. 100, p. 94-100, 2016.

HOMMEL, M.; JAFFE, C. L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 89, suppl. 1, p. 55-73, 1995.

INIESTA, V.; GÓMEZ-NIETO, L. C.; CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 193, n. 6, p. 777- 784, 2001.

IRVINE, E. B.; ALTER, G. Understanding the role of antibody glycosylation through the lens of severe viral and bacterial diseases. **Glycobiology**. v. 30, n. 4, p. 241–253, 2020.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. **Frontier Immunology**. v.5, p. 514, 2014.

IVES, A.; RONET, C.; PREVEL, F.; RUZZANTE, G.; FUERTES-MARRACO, S.; SCHUTZ, F.; ZANGGER, H.; REVAZ-BRETON, M.; LYE, L. F.; HICKERSON, S.M.; BEVERLEY, S. M.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, P.; FASEL, N.; MASINA, S. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science**. v. 331, n. 6018, p. 775-780, 2011.

IYER, S. S.; CHENG, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. **Critical Reviews in Immunology**. v. 32, n. 1, p. 23–63, 2012.

JARA, M.; ADAUI, V.; VALENCIA, B. M.; MARTINEZ, D.; ALBA, M.; CASTRILLON, C.; CRUZ, M.; CRUZ, I.; VAN DER AUWERA, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; DUJARDIN, J. C.; AREVALO, J. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 6, p. 1826–1833. 2013.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, J. P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**. 5th edition. New York: Garland Science; 2001.

The structure of a typical antibody molecule. Disponivel em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>. Acesso em: 13 dez. 2021.

JEFFERIS, R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 8, p. 226- 234, 2009.

JONES, M. B.; NASIRIKENARI, M.; LUGADE, A. A.; THANAVALA, Y.; LAU, J. T. Anti-inflammatory IgG production requires functional P1 promoter in β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6Gal-1) gene. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 87, n. 19, p. 15365- 15370, 2012.

JUNIOR, D. R. A.; GALVÃO, F. H. F.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Ascite- estado da arte baseado em evidências. **Revista Associação Médica Brasileira**. v. 55, n. 4, p. 489-496, 2009.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**. v. 7, n. 1, p. 26- 31, 2000.

KATAKURA, K; KOBAYASHI, A. Enhancement of infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes by serial mouse passages. **The Journal of Parasitology**. v. 71, n. 3, p. 393- 394, 1985.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**. v. 9, n. 8, p. 604- 615, 2011.

KAZEMIRAD, E.; NAFCHI, H. R.; LATIFI, A.; RAOOFIAN, R.; MOHEBALI, M.; HAJJAARAM, H. Comparasion of cysteine protease Bgene expression between clinical isolates of *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania infantum*. **Journal of Medical Microbiology and Infection Diseases**. v. 7, n. 3, p. 72- 78, 2019.

KEAN, B. H. A history of amebiasis, p. 1-10, 1988. In: COX, F.E.G. History of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews** . v. 15, n. 4, p. 595- 612, 2002.

KELLY, J. M.; LAW, J. M.; CHAPMAN, C. J.; VAN EYS, G. J.; EVANS, D. A. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 46, n. 2, p. 253–263, 1991.

KEMP, K.; KEMP, M.; KHARAZMI, A.; ISMAIL, A.; KURTZHALS, J. A.; HVIID, L.; THEANDER, T. G. *Leishmania*-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. **Clinical Experimental Immunology**. v. 116, n. 3, p. 500- 504, 1999.

KIMA, P. E; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. v.4, n.156, 2013.

KOZAK, W.; KLUGER, M. J.; SOSZYNSKI, D.; CONN, C. A.; RUDOLPH, K.; LEON, L. R.; ZHENG, H. IL-6 and IL-1 beta in fever. Studies using cytokine-deficient (knockout) mice. **Annals of the Nem York Academic of Science**. v. 856, p 33-47, 1998.

LÁZARO-SOUZA, M.; MATTE, C.; LIMA, J. B.; ARANGO DUQUE, G.; QUINTELA-CARVALHO, G.; DE CARVALHO VIVARINI, Á.; MOURA-PONTES, S.; FIGUEIRA, C. P.; JESUS-SANTOS, F. H.; GAZOS LOPES, U.; FARIAS, L. P.; ARAÚJO-SANTOS, T.; DESCOTEAUX, A.; BORGES, V. M. *Leishmania infantum* Lipophosphoglycan-Deficient Mutants: A Tool to Study Host Cell-Parasite Interplay. **Frontiers in Microbiology**. v. 9. P 626, 2018.

LEMOS, M. D. A.; SOUSA, O. H.; SILVA, Z. S. S. B. Perfil da Leishmaniose visceral no Brasil: Uma revisão bibliográfica. **Journal Technology Business and Facit**. v. 9, n.1, p. 93-114, 2019.

LU, L. L.; SUSCOVICH, T. J.; FORTUNE, S. M.; ALTER, G. Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases. **Nature Review Immunology**. v. 18, n. 1, p. 46-61, 2018.

LEWIS, M. D.; PAUN, A.; ROMANO, A.; LANGSTON, H.; LANGNER, C. A.; MOORE, I. N.; BOCK, K. W.; FRANCISCO, A. F.; BRENCHLEY, J. M.; SACKS, D. L. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis. **Plos Pathogens**. v. 16, n. 4, e1008456. 2020.

LI, M. O.; WAN, Y. Y.; SANJABI, S.; ROBERTSON, A. K.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. **Annual Review of Immunology**. v. 24, p. 99–146, 2006.

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L.; MINEO, T. W.; GUTIERREZ, F. R.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**. v. 19, n. 7, p. 909-915, 2013.

LIMA, I. F. S. **Avaliação da carga parasitária, produção de citocinas e alterações histológicas em camundongos BALB/c submetido á esplenectomia e ao implante autógeno de baço após infecção com *Leishmania chagasi***. Dissertação de mestrado do curso de pós-graduação em ciências biológicas na área de imunologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais 2010.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying *Leishmania* in tissues of infected animals. **Parasitology Today**. v. 13, n. 2, p. 80- 82, 1997.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cell and Infection Microbiology**. v. 2, n. 83, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. v. 25, n. 4, p. 402- 408, 2001.

LOEUILLET, C.; BANULS, A. L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites Vectors**. v. 144, n. 9, 2016.

LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine Growth Factor Reviews**. v. 22, n.4, p. 189-195, 2011.

LYKENS, J. E.; TERRELL, C. E.; ZOLLER, E. E.; DIVANOVIC, S.; TROMPETTE, A.; KARP, C. L.; ALIBERTI, J.; FLICK, M. J.; JORDAN, M. B. Mice with a selective impairment of IFN-gamma signaling in macrophage lineage cells demonstrate the critical role of IFN-gamma-activated macrophages for the control of protozoan parasitic infections in vivo. **Journal Immunology**. v. 184, n. 2, p. 877- 885, 2010.

MATHIAS, R.; COSTA, F. A. L.; GOTO, H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological research**. v. 34, n. 4, 2001.

MAGRAM, J.; CONNAUGHTON, S. E.; WARRIER, R. R.; CARVAJAL, D. M.; WU, C. Y.; FERRANTE, J.; STEWART, C.; SARMIENTO, U.; FAHERTY, D. A.; GATELY, M. K. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. **Immunity**. v. 4, n. 5, p. 471- 481, 1996.

MARTÍN-MARTÍN, I.; JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E. *et al.* Natural transmission of *Leishmania infantum* through experimentally infected *Phlebotomus perniciosus* highlights the virulence of *Leishmania* parasites circulating in the human visceral leishmaniasis outbreak in Madrid, Spain. **Veterinary Research**. v. 46, n.138, 2015.

MARQUES, F.; VALE-COSTA, S.; CRUZ, T.; MARQUES, J. M.; SILVA, T.; NEVES, J. V.; CORTES, S.; FERNANDES, A.; ROCHA, E.; APPELBERG, R.; RODRIGUES, P.; TOMÁS, A. M.; GOMES, M. S. Studies in the mouse model identify strain variability as a major determinant of disease outcome in *Leishmania infantum* infection. **Parasit Vectors**. v.8, p. 644, 2015.

MC CALL L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **Plos Pathogens**. v.9, n.1, 2013.

MEARS, E. R.; MODABBER, F.; DON, R.; JOHNSON, G. E. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLos Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 9, e0003889, 2015.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of Immunology**. v. 166, n. 3, p. 1912-1920, 2001.

MELBY, P. C. Recent developments in leishmaniasis. **Current Opinion Infection Disease**. v. 15, n. 5, p. 485-490, 2002.

MENDES, C.S.; COELHO, A. B.; FÉRES, J. G.; SOUZA, E. C.; CUNHA, D. A. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*. v. 21, n. 1, 2016.

MEYER, L. R.; ALBUQUERQUE, V. B.; OLIVEIRA, G. K. Coprofagia como distúrbio comportamental em cães: revisão de literatura. *Campo Digital*. v. 9, n. 1, p. 49- 55, 2014.

MILLER, C. H.; MAHER, S. G.; YOUNG, H. A. Clinical Use of Interferon-gamma. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 1182, p. 69–79, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da saúde. 120 p, 2006. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância e controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da saúde. 120 p, 2014. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf>. Acesso em: 08 set. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003-2019 da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. **Boletim Epidemiológico**. v. 50, p. 1-154, set 2019. Disponível em: <: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos> >. Acesso em: 14 out. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Leishmaniose visceral- casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação Brasil. **DETA-SUS- Tecnologia da Informação a serviços do SUS**. Set. 2020. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def> > . Acesso em: 14 out 2021.

MISSAWA, N. A. LIMA, G. B. M. Distribuição Espacial de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) e *Lutzomyia cruzi* (Mangabeira, 1938) no Estado de Mato Grosso-Garcia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 39, n. 4, p. 337-340, 2006.

MONTEIRO, E. M.; DIAS E. S. Leishmaniose visceral: estudos de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, n.2, 2005.

MOCK, B. A.; FORTIER, A. H.; POTTER, M.; NACY, C. A. Genetic control of systemic *Leishmania major* infections: dissociation of intrahepatic amastigote replication from control by the Lsh gene. **Infection and Immunity**. v. 2 n. 50, p. 588–591, 1985.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunology Reviews**. v. 240, n. 1, p. 286- 296, 2011.

MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M.; COURA-VITAL, W. CARDOSO, J. M.; REZENDE, M. T.; KER, H. G.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; REIS, A. B. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. **Parasites & Vectors**. v. 9, n. 181, 2016.

MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**. v. 145, n. 3-4, p. 245- 252, 2007.

MOREIRA, N. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M.; KER, H. G.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (*Leishmania infantum*): "Leishman Donovan units" versus real-time PCR. **Plos One**. v. 7, n. 10, p. 47907, 2012.

MOSSER, D. M.; HANDMAN, E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. **Journal of Leukocyte Biology**. v.52, n. 4, p. 369-376, 1992.

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**. v.7, n. 4, p. 375–381, 2004.

MURRAY, H. W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J. P. Interleukin-12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**. v.182, ed. 5, p.1497- 1502, 2000.

NASEEM, S.; IQBAL, R.; MUNIR T. Role of interleukin-6 in immunity: A Review. **International Journal of Life Sciences Research**. v. 4, ed. 2, p. 268- 274, 2016. TANAKA

NEWLOVE, T.; ROBINSON, M.; MEEHAN, S. A.; POMERANTZ, R. Old World cutaneous leishmaniasis. **Dermatology Online Journal**. v. 18, n. 12, p. 32, 2012.

NOYES, H. A.; STEVENS, J. R.; TEIXEIRA, M.; PHELAN, J.; HOLZ, P. A nested PCR for the *ssrRNA* gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma* sp. in wombats and kangaroos in Australia. **International Journal for Parasitology**. v. 29, n. 2, 1999.

NUNES, B. E. B. R.; LEAL, T. C.; PAIVA, J. P. S.; SILVA, L. F.; CARMO, R. F.; MACHADO, M. F.; ARAÚJO, M. D. P.; SANTOS, V. S.; SOUZA, C. D. F. Social determinants of mortality due to visceral leishmaniasis in Brazil (2001- 2015): na ecological study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 53, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0262-2019>>. Acesso em: 11 set. 2021.

OLIVEIRA, J. M.; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 43, n. 2, p. 188- 193, 2010.

OLIVEIRA, T. M.; de VASCONCELOS, E. J.; NAKAGHI, A. C.; DEFINA, T. P.; JUSI, M. M.; BALDANI, C. D.; CRUZ, A. K.; MACHADO, R. Z. A novel A2 allele found in *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 1, 2011.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**. v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las Leishmaniasis en las Américas**. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 166 p, 2019.

OSANYA, A.; SONG, E. H.; METZ, K.; SHIMAK, R. M.; BOGGIATTO, P. M.; HUFFMAN, E.; JOHNSON, C.; HOSTETTER, J. M.; POHL, N. L.; PETERSEN, C. A. Pathogen-derived oligosaccharides improve innate immune response to intracellular parasite infection. **The American Journal of Pathology**. v. 179, n. 3, p. 1329- 1337, 2011.

PAGAN, J. D.; KITAOKA, M.; ANTHONY, R. M. Engineered Sialylation of Pathogenic Antibodies *in vivo* Attenuates Autoimmune Disease. **Cell**. v. 172, n. 3, p. 564–577, 2018.

PASSOS, F. C.; GOIS, M. B.; SOUSA, A. D.; MARINHO, A. I. L.; CORVO, L.; SOTO, M.; BARRAL- NETTO, M.; BARRAL, A.; BACCAN, G. C. Investing associations between intestinal alterations and parasite load according to *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. abundance in the gut microbiota of hamsters infected by *Leishmania infantum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 115, 2020.

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

PÉREZ-CABEZAS, B.; CECÍLIO, P.; GASPAR, T. B.; GARTNER, F., VASCONCELLOS, R.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Understanding Resistance vs. Susceptibility in Visceral Leishmaniasis Using Mouse Models of *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 30, n. 9, 2019.

PHARMA SPECIAL. Ácool polivinílico. **Informático Técnico**. Disponível em:<
http://laboratorionutramedic.com.br/site/public_imagens/produto/8f37a424daf30dd2af64ec74c2ca4de0d.pdf > . Acesso em: 07 set. 2021.

PIMENTA, P. F. P.; FREITA V. C.; SECUNDINO N. F. C. A interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos vetores. In: **Tópicos Avançados em Entomologia Molecular**. cap. 12. Minas Gerais: INCTEM, 2012. p. 1-45.

PINCETIC, A.; BOURNAZOS, S.; DILILLO, D. J.; MAAMARY, J.; WANG, T. T.; DAHAN, R.; FIEBIGER, B. M.; RAVETCH, J. V. Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. **Nature Immunology**. v. 15, n. 8, p. 707–716. 2014.

PITTA, M. G.; ROMANO, A.; CABANTOUS, S.; HENRI, S.; HAMMAD, A.; KOURIBA, B.; ARGIRO, L.; EL KHEIR, M.; BUCHETON, B.; MARY, C.; EL-SAFI, S. H.; DESSEIN, A. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PORCINO, G. N.; CARVALHO, K. S. S.; BRAZ, D.C.; COSTA SILVA, V.; COSTA, C. H. N.; DE MIRANDA SANTOS, I. K. F. Evaluation of methods for detection of asymptomatic individuals infected with *Leishmania infantum* in the state of Piauí, Brazil. **Plos Neglectec Tropical Diseases**. v. 13, n. 7; 2019.

PORROZZI, R., CAVALCANTI, A.S., and CUPOLILLO, E. Modelos Experimentais na Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R. Leishmanioses do continente americano. **Scielo Books**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, p. 276-292.

PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A.V.; FENG, G. J.; WEI, W. Q.; FERGUSON, M. A.; BRIMACOMBE, J. S.; LIEW, F. Y. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 93, n 20, p. 10984-10989, 1996.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico- epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**. v. 80, n. 2, 2004.

RAES, G.; BESCHIN, A.; GHASSABEH, G. H.; DE BAETSELIER, P. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. **Current Opinion in Immunology**. v. 19, n. 4, p. 454- 459, 2007.

REILY, C.; STEWART, T. J.; RENFROW, M. B.; NOVAK, J. Glycosylation in health and disease. **Nature Reviews. Nephrology**. v. 15, n. 6, p. 346–366, 2019.

REIS-CUNHA, J. L.; VALDIVIA, H. O.; BARTHOLOMEU, D. C. Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. **Current Genomics**. v. 19, n. 2, p. 87- 97, 2018.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 73, n. 3-4, p. 269-281, 2000.

RESENDE, L. A., AGUIAR-SOARES, R., MOREIRA, N., FERREIRA, S. A., LANNA, M. F., CARDOSO, J., MATHIAS, F., COURA-VITAL, W., MARIANO, R., LEITE, J. C., SILVEIRA, P., DE CARVALHO, T. F., SANTOS, R. L., DA SILVEIRA-LEMOS, D., MARTINS-FILHO, O. A., DUTRA, W. O., REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C. In vitro Infectivity of Strains Isolated From Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum* Present a Distinct Pathogenic Profile in Hamsters. **Frontiers in Medicine**. v. 7, p. 496, 2020.

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasit Vectors**. p.119-118, 2016.

RODRIGUEZ, N.E.; CHANG, H.K.; WILSON, M.E. Novel program of macrophage gene expression induced by phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 4, p. 2111- 2122, 2004.

ROMERO, G.; COSTA, D. L.; COSTA, C.; DE ALMEIDA, R. P.; DE MELO, E. V.; DE CARVALHO, S., RABELLO, A.; DE CARVALHO, A. L.; SOUSA, A. Q.; LEITE, R. D.; LIMA, S. S.; AMARAL, T. A.; ALVES, F. P.; RODE, J.; Collaborative LV Brasil Group. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 6, e0005706, 2017.

ROSENTHAL, E.; MARTY, P.; POIZOT-MARTIN, I.; REYNES, J.; PRATLONG, F.; LAFEUILLADE, A.; JAUBERT, D.; BOULAT, O.; DEREURE, J.; GAMBARELLI, F.; ET AL. Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. **Transaction of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**. v. 89, n. 2, p. 159- 162, 1995.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and Donovan. **British Medical Journal**. v.2, n.2237, p. 1261-2, 1903.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; TROY, G. C.; LINDSAY, D. S. Infections in immunocompetent and immune-deficient mice with promastigotes of a North American isolate of *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**. v. 1-2, n. 30, p. 19–27, 2005.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**. v. 223, n. 4643, 1984.

SAHA, S.; MONDAL, S.; RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; MODAK, D.; MALLICK, S.; RAHMAN, M.; KAR, S.; GOSWAMI, R.; GUHA, S. K.; PRAMANIK, N.; SAHA, B.; ALI, N.

IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. **Journal of Immunology**. v. 179, n. 8, p. 5592–5603, 2007.

SAHA, B.; TONKAL, A. M.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host-pathogen interface: host-protection versus immune evasion in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 137, n. 1, p. 19–23, 2004.

SAMANT, M.; SAHU, U.; PANDEY, S.C.; KHARE, P. Role of Cytokines in Experimental and Human Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v.11, 2021. Disponível em: Acesso em: 17 nov 2021.

SANTOS, P.L.; DE OLIVEIRA, F.A.; SANTOS, M.L.; CUNHA, L.C.; LINO, M.T.; DE OLIVEIRA, M.F.; BOMFIM, M.O.; SILVA, A.M., DE MOURA, T.R.; DE JESUS, A.R.; DUTHIE, M.S.; REED, S.G.; DE ALMEIDA, R.P. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **Plos Neglected Tropical Disease**. v.10, n.1, 2016.

SANTOS, R. L.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N.M.; PIEREZAN, F.; ECCO, R.; GUEDES, R. M. C. Atlas de patologia macroscópica de cães e gatos. **Caderno Técnico de Veterinária e Zootecnia**. n.85, p.83, 2017.

SECRETÁRIA DE ESTADO ESTADO DA SAÚDE. Superintendencia de Controle de Endemias- SUCEN. **Governo do Estado de São Paulo**. 2020. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/leishmaniose-visceral/vetores#:~:text=No%20Brasil%2C%20duas%20esp%C3%A9cies%2C%20at%C3%A9,Lutzomyia%20longipalpis%20e%20Lutzomyia%20cruzi>. Acesso em: 12 jul. 2022.

SCALLON, B. J.; TAM, S. H.; MCCARTHY, S. G.; CAI, A. N.; RAJU, T. S. Higher levels of sialylated Fc glycans in immunoglobulin G molecules can adversely impact functionality. **Molecular Immunology**. v. 44, n. 7, p. 1524–1534, 2007.

SCHAUT, R. G.; LAMB, I. M.; TOEPP, A. J.; SCOTT, B.; MENDES-AGUIAR, C. O.; COUTINHO, J. F.; JERONIMO, S. M.; WILSON, M. E.; HARTY, J. T., WALDSCHMIDT, T. J.; PETERSEN, C. A. Regulatory IgDhi B Cells Suppress T Cell Function via IL-10 and PD-L1 during Progressive Visceral Leishmaniasis. **Journal of immunology**. v. 196, n. 10, p. 4100–4109, 2016.

SCHWABL, P.; BOITÉ, M. C.; BUSSOTTI, G.; JACOBS, A.; ANDERSSON, B.; MOREIRA, O; FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R.; TELLERIA, E. L.; TRAUB-CSEKO, Y.; VASELEK, S.; LESTINOVÁ, T.; VOLF, P.; MORGADO, F. N.; PORROZZI, R.; LLEWELLYN, M.; SPATH, G. F.; CUPOLILLO, E. Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas. **Communications Biology**. v. 4, n. 1, p. 139, 2021.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**. v. 16, p. 581- 592, 2016.

SHIELDS, R. L.; LAI, J.; KECK, R.; O'CONNELL, L. Y.; HONG K.; MENG, Y.G.; WEIKERT, S. H.; PRESTA, L. G. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 277, n. 30, p. 26733-26734, 2002.

SHADE. K. T.; ANTHONY, R. M. Antibody glycosylation and inflammation. **Modes of Antibody Action for Cancer Therapy**. v. 2, ed. 3, p. 392- 414, 2013.

SHIELDS, R. L.; LAI, J.; KECK, R. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. **The Journal of Biology Chemistry**. v. 277, n. 30, p. 26733- 26740, 2002.

SIBÉRI., S.; DE ROMEUF, C.; BIHOREAU, N.; FERNANDEZ, N.; METERREAU, J. L.; REGENMAN, A.; NONY, E.; GAUCHER, C.; GLACET, A.; JORIEUX, S.; KLEIN, P.; HOGARTH, M. P.; FRIDMAN, W. H.; BOUREL, D.; BÉLIARD R.; TEILLAUD, J. L. Selection of a human anti-RhD monoclonal antibody for therapeutic use: impact of IgG glycosylation on activating and inhibitory Fc γ₃ functions. **Clinical Immunology**. v.118, n. 2-3, p. 170–179, 2005.

SILVA, L. B.; GOLÇALVES, P. Degeneração gordurosa (lipidose hepática). **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 10, 2008.

SILVA, N. C.; VALE, V. F.; FRANCO, P. F.; GONTIJO, N. F.; VALENZUELA, J. G.; PEREIRA, M. H.; SANT'ANNA, M. R.; RODRIGUES, D. S.; LIMA, W. S.; FUX, B.; ARAUJO, R. N. Saliva of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) inhibits classical and alternative complement pathways. **Parasites & Vectors**. v. 9, n. 1, p. 445, 2016.

SILVEIRA, F. T.; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: indigenous or introduced? A brief review. **Revista Pan- Amazônica de Saúde**. v. 1, n. 2, p. 143- 147, 2010.

SILVEIRA, T. G.; KEMMELMEIER, C. *Leishmania braziliensis*: isolation of carbohydrate-containing antigen and possibility of its use in the immunodiagnosis of American cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 37, p. 245- 252, 1995.

SINGH, N.; KUMAR, R.; CHAUHAN, S. B.; ENGWERDA, C.; SUNDAR, S.. Peripheral Blood Monocytes With an Antiinflammatory Phenotype Display Limited Phagocytosis and Oxidative Burst in Patients With Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Infectious diseases**. v. 218, n. 7, p. 1130–1141, 2018.

- SIQUEIRA-NETO, J. L.; DEBNATH, A.; MCCALL, L. I.; BERNATCHEZ, J. A.; NDAO, M.; REED, S. L.; ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases in protozoan parasites. **Plos Neglected Tropical Diseases**. v.12, n.12, p. e0006512, 2018.
- SOSA-OCHOA, W.; ZÚNIGA, C.; CHAVES, L.F.; ARAUJO FLORES, G. V.; SANDOVAL PACHECO, C. M.; RIBEIRO DA MATTA, V. L.; PEREIRA CORBETT, C. E.; TOBIAS SILVEIRA, F.; DALASTRA LAURENTI, M. Clinical and Immunological Features of Human *Leishmania (L.) infantum*-Infection, Novel Insights Honduras. **Central America. Pathogens**. v. 9, n. 7, p. 554, 2020.
- SPATH, G. F.; GARRAWAY, L. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 100, n. 16, p. 9536- 9541, 2003.
- SPIEGELBERG H. L. Biological role of different antibody classes. **International Archives of Allergy and Applied Immunology**. v. 90, Suppl 1, p. 22–27, 1989.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C.R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**. v. 85, n. 1, p. 138-147, 2007.
- STERKERS, Y.; LACHAUD, L.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; PAGÈS, M. FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. **Cell Microbiology**. v. 13, n. 2 p. 274- 283, 2011.
- TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspective Biology**. v. 6, n.10, 2014.
- THOMPSON, R.; CREAVIN, A.; O'CONNELL, M.; O'CONNOR, B.; CLARKE, P. Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. **Analytical Biochemistry**. v. 413, n. 2, p. 114-122, 2011.
- TITUS, R. G.; MARCHAND, M.; BOON, T.; LOUIS, J. A. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**. v. 7; n. 5, p. 545-555, 1985.
- TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. **Critical Care Medicine**. p. 415-422, 1993.
- TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**. v. 54, n. 2, p. 139–146, 2005.
- TSELENTIS, Y.; GIKAS, A.; CHANIOTIS, B. Kala-azar in Athens basin. **Lancet (London, England)**. v.343, n. 8913, 1635, 1994.

- VAN GINDERACHTER, J. A.; MOVAHEDI, K.; HASSANZADEH GHASSABEH, G.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIN, A.; RAES, G.; DE BAETSELIER, P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**. v. 211, n. 6, p. 487–501, 2006.
- VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**. v. 1, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
- VARFOLOMEEV, E. E.; ASHKENAZI, A. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? **Cell**. v. 116, n. 4, p. 491-497, 2004.
- VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; STANLEY, P.; HART, G. W.; AEBI, M.; DARVILL, A. G.; KINOSHITA, T.; PACKER, N. H.; PRESTEGARD, J. H.; SCHNAAR, R. L.; SEEBERGER, P. H. **Essentials of Glycobiology**. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3 ed, 2017.
- VIANA, A. G.; MAGALHÃES, L.; GIUNCHETTI, R. C.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J. Infection of Human Monocytes with *Leishmania infantum* Strains Induces a Downmodulated Response when Compared with Infection with *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**. v. 8, p.1896, 2018.
- VOLPEDO, G.; PACHECO-FERNANDEZ, T., BHATTACHARYA, P.; OLJUSKIN, T.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; SATOSKAR, A. R.; NAKHASI, H. L. Determinants of Innate Immunity in Visceral Leishmaniasis and Their Implication in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**. v. 12, 2021.
- WANG, T. T.; SEWATANON, J.; MEMOLI, M. J.; WRAMMERT, J.; BOURNAZOS, S.; BHAUMIK, S. K.; PINSKY, B. A.; CHOKEPHAIBULKIT, K.; ONLAMOON, N.; PATTANAPANYASAT, K.; TAUBENBERGER, J. K.; AHMED, R.; RAVETCH, J. V. IgG antibodies to dengue enhanced for Fc γ RIIIa binding determine disease severity. **Science**.v.355, n. 6323, p. 395-398, 2017.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leishmaniasis surveillance: 2019- 2020, a baseline for the 2030 roadmap. **Weekly Epidemiological Record**. v. 96, n. 35, p. 401 -420. Disponível em:< <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9635-401-419>>. Acesso em: 10 nov. 2021.
- ZAMBONI, D. S.; SACKS, D. L. Inflammasomes and *Leishmania*: in good times or bad, in sickness or in health. **Current Opinion in Microbiology**. v. 52, p. 52- 70, 2019.
- ZAUNER, G.; SELMAN, M. H.; BONDT, A.; ROMBOUTS, Y.; BLANK, D.; DEELDER, A. M.; WUHRER, M. Glycoproteomic analysis of antibodies. **Molecular and Cellular Proteomics**. v. 12, n. 4, p. 856- 865, 2013.

ZHANG, D.; ZHENG, H.; ZHOU, Y. TANG, X.; YU, B.; LI, J. Association of IL-1beta gene polymorphism with cachexia from locally advanced gastric cancer. **BMC Cancer**. v.7, n. 45, 2007.

ZHANG, S. The role of transforming growth factor β in T helper 17 differentiation. **Immunology**. v. 155, n. 1, p. 24-35, 2018.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M.; ISMAEL, A.; GHALIB, H. W. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 51, n. 6, p. 826-836, 1994.

ZIVCEC, M.; SAFRONETZ, D.; HADDOCK, E.; FELDMANN, H.; EBIHARA, H. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Journal of Immunological Methods**. v. 368, n. 1-2, p. 24-35, 2011.