

FABIA TOMIE TANO

Análise comparativa do proteoma de membrana de promastigotas das cepas PH8 e LV79 de
Leishmania (Leishmania) amazonensis

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador(a): Profa. Dra. Beatriz Simonsen Stolf Carboni

Versão Corrigida

São Paulo

2021

RESUMO

TANO, Fabia Tomie. **Análise comparativa do proteoma de membrana de promastigotas das cepas PH8 e LV79 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2020. 176 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Doenças humanas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* são classificadas de acordo com suas manifestações clínicas em leishmaniose visceral e tegumentar. Recentemente, nosso grupo comparou as cepas PH8 e LV79 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil. Parasitos da cepa PH8 causam lesões maiores e com maior carga parasitária em modelos murinos. Além disso, um maior número de promastigotas de PH8 adere e é internalizado por macrófagos murinos *in vitro*, indicando uma diferença na composição da membrana das cepas. Neste projeto mostramos que promastigotas de PH8 são mais resistentes à lise por complemento (soro) murino do que os de LV79. Tendo em mente as diferenças de infectividade e sensibilidade à lise descritas, este estudo teve como objetivo principal analisar a composição da membrana de promastigotas de fase estacionária inicial de PH8 e LV79, com o intuito de identificar moléculas potencialmente envolvidas nas diferenças de fenótipo observadas. Para tal, a caracterização bioquímica preliminar do lipofosfoglicano (LPG) e a análise comparativa do proteoma de membrana foram realizadas, e os resultados dessa última foram confirmados por *western blot* e ensaios de atividade enzimática. A caracterização bioquímica preliminar indica que o LPG de PH8 possui um número menor de unidades repetitivas, que são desprovidas de cadeias laterais. Em contrapartida, o LPG de promastigotas de LV79 é formado por unidades repetitivas sem cadeia lateral ou com cadeias laterais compostas por mono- e dissacarídeos, confirmando a existência de polimorfismos entre cepas. A análise comparativa do proteoma de membrana indica que cada cepa possui um perfil característico. Das 1659 proteínas identificadas, 127 são mais abundantes em promastigotas de PH8 e 78 mais abundantes em LV79. Dentre as proteínas mais abundantes em LV79, a maioria participa da síntese proteica (47%), do metabolismo de aminoácidos (21%) e do metabolismo de nucleotídeos (14%). Por outro lado, as proteínas mais abundantes em PH8 estão envolvidas principalmente no metabolismo de carboidratos (21%), na composição do citoesqueleto (17%) e no tráfego de vesículas e membrana (13%). Proteínas relacionadas à virulência como o transportador putativo ABC (*ATP-binding cassette*) da subfamília G, membro 1 e a enolase foram identificadas como mais abundantes em PH8, em contrapartida a glicoproteína 63 (GP63) foi identificada como mais abundante em LV79. As

análises da abundância da GP63 e da enolase por *western blot* confirmam o que foi observado na análise proteômica. Contudo, ensaios de atividade enzimática obtiveram resultados dissonantes, indicando que a atividade dessas proteínas pode ser regulada e não necessariamente corresponde a sua expressão. Ao todo, nossos resultados indicam que as composições da membrana de promastigotas de PH8 e LV79 diferem entre si. Experimentos adicionais precisam ser realizados para determinar as implicações dessas diferenças nos fenótipos das duas cepas.

Palavras-chave: Cepas. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Proteínas de membrana. Proteoma.

ABSTRACT

TANO, Fabia Tomie. **Comparative analysis of the membrane proteome of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes of PH8 and LV79 strains.** 2020. 176 f. Master thesis (Biology of Host-Pathogen Interaction) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Human diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* are classified according to their clinical manifestations into visceral and cutaneous leishmaniasis. Recently, our group compared the PH8 and LV79 strains of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, one of the main etiologic agents of cutaneous leishmaniasis in Brazil. Parasites of the PH8 strain cause larger lesions with greater parasite load in murine models. In addition, a greater number of PH8 promastigotes adhere to and are internalized by murine macrophages *in vitro*, indicating a difference in the membrane composition between these strains. In this project, we show that promastigotes of PH8 are more resistant to lysis by murine complement (serum) than LV79. Bearing in mind the differences in infectivity and sensitivity to lysis described, this study aimed to analyze the membrane composition of PH8 and LV79 early stationary phase promastigotes in order to identify proteins potentially involved in the phenotypic differences observed. To accomplish this task, the preliminary biochemical characterization of the lipophosphoglycan (LPG) and the comparative analysis of the membrane proteome were performed, and the results of the latter were confirmed by western blot and enzymatic activity assays. The preliminary biochemical characterization indicates that LPG from PH8 promastigotes has a smaller number of repetitive units, which are devoid of side chains. In contrast, LPG from LV79 promastigotes is composed by repetitive units without side chains or with side chains composed of mono- and disaccharides, confirming the existence of polymorphisms between strains. The comparative analysis of the membrane proteome indicates that each strain has a characteristic profile. Of the 1659 proteins identified, 127 are more abundant in PH8 promastigotes and 78 more abundant in LV79. Among the proteins more abundant in LV79, most of them participate in processes such as protein synthesis (47%), amino acid metabolism (21%), and nucleotide metabolism (14%). On the other hand, the proteins more abundant in PH8 are involved in carbohydrate metabolism (21%), cytoskeleton composition (17%), and vesicle and membrane trafficking (13%). Virulence-related proteins such as the putative ABC (ATP-binding cassette) transporter subfamily G, member 1 and enolase were identified as more abundant in PH8, whereas glycoprotein 63 (GP63) was identified as more abundant in LV79. Analysis of the abundance of GP63 and enolase by western blot confirmed what was observed in the proteomic analysis.

However, enzymatic activity assays obtained dissonant results, indicating that the activity of these proteins can be regulated and does not necessarily correspond to their expression. Altogether, our results indicate that membrane composition of the PH8 and LV79 promastigotes differ from each other. Additional experiments must be carried out to determine the implications of these differences on the strains' phenotypes.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Membrane proteins. Proteome. Strains.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* pertence à classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae. Até o momento, foram identificadas mais de 50 espécies de *Leishmania*, que estão distribuídas entre as linhagens filogenéticas Paraleishmania e Euleishmania (AKHOUNDI et al., 2016; CUPOLILLO et al., 2000). Essa última linhagem é composta pelos subgêneros *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia* (ESPINOSA et al., 2018).

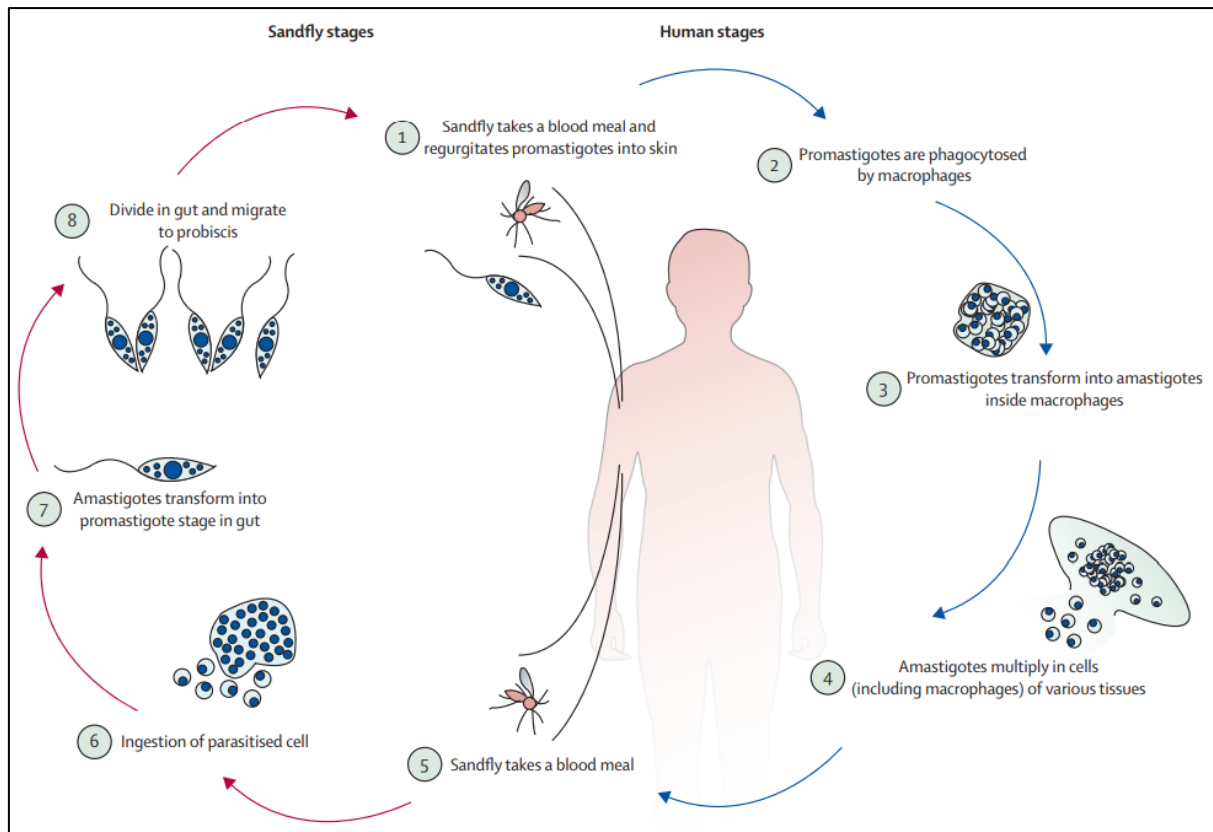
Em 1979, as espécies de *Leishmania* foram classificadas de acordo com o seu local de desenvolvimento no intestino do vetor em hipopilária (intestino posterior), peripilária (intestino posterior e piloro) e suprapilária (anterior ao piloro) (LAINSON; READY; SHAW, 1979). Com base nessa classificação foram criados os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, compreendendo as espécies suprapilárias e perilárias, respectivamente (LAINSON; SHAW, 1987). Posteriormente essa classificação foi confirmada por meio de análises filogenéticas com base em vários genes (FRAGA et al., 2010; LUYO-ACERO et al., 2004; ZELAZNY et al., 2005).

Das 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos 20 são patógenos humanos, e a grande maioria delas pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (AKHOUNDI et al., 2016).

1.2 Ciclo biológico

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico (Figura 1). Seus hospedeiros invertebrados são fêmeas de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* (África, Ásia e Europa) e *Lutzomyia* (Américas), que são infectadas ao ingerir macrófagos parasitados por amastigotas durante o seu repasto sanguíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Figura 1 – Ciclo biológico de parasitos do gênero *Leishmania* causadores de doença humana



Fonte: REITHINGER et al., 2007

Em resposta à distensão abdominal resultante do repasto sanguíneo, as células do intestino médio do vetor secretam quitina e outras proteínas e glicoproteínas que se organizam para formar a matriz peritrófica, uma membrana semipermeável que confina o bolo alimentar e os parasitos ao lúmen do intestino médio (GEMETCHU, 1974; LEHANE, 1997). No espaço endoperitrófico, os amastigotas tipificados pelo formato ovóide, flagelo rudimentar e falta de motilidade se diferenciam em promastigotas procíclicos replicativos, com corpo mais alongado, flagelo curto e baixa motilidade (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012).

Logo após o repasto sanguíneo, os parasitos estão vulneráveis à digestão por enzimas proteolíticas secretadas pelo vetor, sobretudo tripsinas e quimiotripsinas (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012). Contudo, já foi demonstrado que diversas espécies de *Leishmania* são capazes de alterar a cinética temporal da expressão e os níveis de atividade enzimática dessas proteases (DOSTÁLOVÁ; VOLFF, 2012). Além disso, promastigotas procíclicos secretam proteofosfoglicanos (PPG) que revestem sua superfície, formando uma barreira física que impede o acesso das enzimas digestivas (SECUNDINO et al., 2010). A própria matriz

peritrófica também limita a difusão de proteases e favorece a sobrevivência do parasito (PIMENTA et al., 1997).

Quando os promastigotas procíclicos se convertem em promastigotas nectomonas de alta motilidade, a membrana peritrófica começa a ser desintegrada (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Dessa forma, os promastigotas nectomonas podem escapar do espaço endoperitrófico e aderir ao epitélio do intestino médio, impedindo sua eliminação durante a evacuação (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Em *P. papatasi*, a ancoragem de *L. (L.) major* é mediada em parte pela interação de seu lipofosfoliglicano (LPG) com a galectina PpGalec presente nas microvilosidades do intestino médio do vetor (KAMHAWI et al., 2004; SACKS et al., 1994; SACKS et al., 2000). Acredita-se que o LPG é essencial para adesão do parasito em vetores específicos, mas não em vetores permissivos (MYSKOVA et al., 2007). A título de exemplo, a falta de LPG não impede o desenvolvimento de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) major* em *Lu. longipalpis*, que não é vetor natural desses parasitos (MYSKOVA et al., 2007; ROGERS et al., 2004).

Em seguida, os parasitos perdem sua adesão ao epitélio intestinal e migram em direção ao intestino médio anterior (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Ao alcançar a válvula estomodeal, os parasitos se diferenciam em promastigotas leptomonas, formas replicativas que secretam PPG filamentosos formando uma substância gelatinosa que obstrui o intestino do vetor (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012; STIERHOF et al., 1999). Por fim, promastigotas leptomonas dão origem a promastigotas metacíclicos e haptomonas; estes últimos se ligam à válvula estomodeal por intermédio de hemidesmossomos e danificam sua estrutura (ROGERS et al., 2008; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992; VOLF et al., 2004). Durante um próximo repasto sanguíneo, a obstrução do intestino em conjunto com os danos causados à válvula estomodeal favorecem a transmissão dos parasitos aos hospedeiros vertebrados (BEACH; KIILU; LEEUWENBURG, 1985; ROGERS; BATES, 2007; ROGERS; CHANCE; BATES, 2002; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992; VOLF et al., 2004).

No hospedeiro vertebrado, os neutrófilos são as primeiras células recrutadas ao sítio de infecção e as primeiras a serem parasitadas (PETERS et al., 2008). Contudo, o estabelecimento de uma infecção duradoura depende da fagocitose dos parasitos por macrófagos. No macrófago, os parasitos residem em fagossomos denominados vacúolos parasitóforos (VP), onde se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária até a sua liberação para a infecção de novas células.

1.3 As leishmanioses e sua epidemiologia

Doenças humanas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* são classificadas de acordo com suas manifestações clínicas em leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT), endêmicas em 75 e 87 países respectivamente (Organização mundial da saúde (OMS), 2017a). O tipo de manifestação e sua gravidade dependem principalmente de características do parasito e do hospedeiro (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009; SCOTT; NOVAIS, 2016). Aproximadamente 200 mil casos novos de LT e 20 mil casos novos de LV foram notificados em 2015, porém esses números representam apenas uma pequena porcentagem dos casos que ocorrem de fato anualmente, estimados entre 600 mil e um milhão para LT e entre 50 e 90 mil para LV (OMS, 2017a; OMS, 2020).

As leishmanioses acometem predominantemente populações em regiões tropicais e subtropicais afetadas pela pobreza, onde as condições precárias de habitação e saneamento básico favorecem a exposição ao vetor (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Além disso, o acesso limitado à educação e aos serviços de saúde dificulta o diagnóstico e o tratamento da doença, permitindo sua progressão e prejudicando seu controle (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006). Os altos custos diretos e indiretos impostos pela leishmaniose agravam ainda mais as dificuldades financeiras dos pacientes, resultando em um círculo vicioso (OKWOR; UZONNA, 2006). Fatores como os desmatamentos, urbanização e conflitos armados também podem favorecer surtos e sua expansão geográfica (BERRY; BERRANG-FORD, 2016; ORYAN; AKBARI, 2016).

Em 2015, o Brasil notificou 3336 casos de LV, o equivalente a 14 por cento dos casos reportados mundialmente (OMS, 2017a). A LV é a forma mais grave, causada pela disseminação dos parasitos aos órgãos internos e infecção das células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos, presentes no fígado, baço, linfonodos e medula óssea (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Seus sintomas são a hepatoesplenomegalia, febre, perda de peso e apetite, fraqueza e pancitopenia, sendo geralmente fatal se não tratada (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Os agentes etiológicos mais comuns da LV são *L. (L.) donovani* (Ásia e África) e *L. (L.) infantum* (Mediterrâneo, Ásia Central, Oriente médio e Américas), contudo casos excepcionais de visceralização de espécies dermatóricas já foram reportados (DE SOUZA et al., 2018; SILVA et al., 2002). De acordo com o seu perfil de transmissão, as infecções causadas por *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum* são classificadas como antroponoses e zoonoses, respectivamente.

Grande parte dos casos de LT se concentram na Síria, Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque, Colômbia, Argélia, Tunísia e Peru (OMS, 2017a). O Brasil é o país que reporta o maior número de casos de LT na América Latina, por volta de 19 mil em 2015, o que corresponde a quase dez por cento do total notificado nesse ano no mundo (OMS, 2017a). Atualmente, 52 por cento da população brasileira reside nos 1673 municípios endêmicos para a doença (OMS, 2017b). Um total de sete espécies dermatrópicas já foram identificadas no Brasil, das quais *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* se destacam como as mais comuns (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.4 Leishmaniose tegumentar

Infecções por espécies dermatrópicas geralmente resultam em lesões cutâneas localizadas (LCLs), que se iniciam como uma única pápula no local da picada e evoluem para úlceras com bordas definidas e elevadas (TORRES-GUERREIRO et al., 2017). Essas LCLs usualmente se curam de maneira espontânea em um processo lento que pode se prolongar por anos, resultando em cicatrizes atróficas e hipopigmentadas (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Não obstante, o tratamento é necessário para acelerar a recuperação, minimizar as sequelas e evitar a disseminação do parasito. Embora seja considerada a forma menos grave, as cicatrizes resultantes da LCL podem gerar distúrbios psicológicos e discriminação social, visto que a maioria ocorre em áreas expostas e visíveis, como a face e as extremidades (BENNIS et al., 2018; YANIK et al., 2004).

Em uma pequena porcentagem dos casos, parasitos das espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* podem se disseminar pelas vias linfática e sanguínea até a mucosa oronasofaríngea, onde a resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro pode causar a ulceração e destruição do tecido, resultando na leishmaniose mucocutânea (HANDLER et al., 2015; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Além de graves deformações, esse quadro pode causar problemas respiratórios, odinofagia, desnutrição, caquexia e até mesmo óbito (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; TORRES-GUERREIRO et al., 2017). As lesões mucosas podem coexistir com a LCL primária ou surgir anos após sua resolução (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Raramente, infecções pelas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, e mais raramente por *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) major* podem resultar em casos de leishmaniose cutânea difusa, na qual a ausência de resposta imune celular (anergia) aos antígenos do parasito permite sua metástase e a formação de diversas lesões nodulares e papulares ricas em amastigotas (BRYCESON, 1969; PETERSEN et al., 1982;

SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Essas lesões chegam às centenas cobrindo grandes áreas do corpo e podem até mesmo coalescer formando grandes placas (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). As espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamanensis*, *L. (V.) guyanensis* e eventualmente *L. (L.) amazonensis* também podem causar a leishmaniose disseminada. Essa manifestação é tipificada pela mistura de lesões acneiformes, nodulares, papulares e ulceradas em duas ou mais regiões não contíguas do corpo (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

1.5 Controle e diagnóstico

Indivíduos infectados com parasitos do gênero *Leishmania* desenvolvem certa imunidade às infecções subsequentes, indicando que o desenvolvimento de vacinas é possível. No entanto, inúmeras tentativas de obtenção de vacinas para humanos foram realizadas sem nenhum sucesso (IBORRA et al., 2018; PORROZZI et al., 2004). A única estratégia que se provou eficiente foi a leishmanização, que consiste no inóculo de parasitos virulentos de *L. (L.) major* em áreas não expostas do corpo (MOHEBALI; NADIM; KHAMESIPOUR, 2019). Por décadas a leishmanização foi adotada em países como Irã, Israel e Uzbequistão, entretanto sua prática foi interrompida devido à dificuldade de manter a virulência dos parasitos em cultura e ao risco de desenvolvimento de lesões graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (MOHEBALI; NADIM; KHAMESIPOUR, 2019).

Outras medidas profiláticas são o controle de vetores e de reservatórios. Os flebotomíneos são insetos pequenos, com 1,5 a 3 mm de comprimento, caracterizados por corpo corcunda densamente piloso e pelas asas lanceoladas que se mantém eretas em um ângulo de 40° quando em repouso (KILLICK-KENDRICK, 1999). O controle vetorial pela aplicação de inseticidas de efeito residual no interior de casas e pela utilização de telas impregnadas com inseticidas se mostrou útil em países como Afeganistão, Venezuela e Sudão (KROEGER; AVILA; MORISON, 2002; REYBURN et al., 2000; RITMEIJER et al., 2007). Contudo, a implementação dessas estratégias em áreas endêmicas pode ser complicada por motivos financeiros e logísticos, além de ser ineficaz em locais onde os flebotomíneos se alimentam predominantemente em áreas externas (ALEXANDER; MAROLI, 2003). O controle de reservatórios é extremamente complexo devido a diversidade de animais silvestres infectáveis pelo parasito (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Dessa maneira, as práticas de controle e vigilância se limitam à prevenção da infecção de cães (principal reservatório de *L. (L.) infatum*) por meio da vacinação e coleiras impregnadas com

inseticida (DANTAS-TORRES et al., 2020). No entanto, não há evidências de que as vacinas atualmente disponíveis reduzem de fato o risco de infecção em humanos e muitos donos não possuem os recursos para pagá-las (DANTAS-TORRES et al., 2020). No Brasil, a eutanásia de cães infectados era recomendada, mas a eficiência dessa estratégia nunca foi demonstrada e atualmente o tratamento com mitelfosina é oferecido como opção, embora também contestável (DANTAS-TORRES et al., 2019; DANTAS-TORRES et al., 2020).

Devido à impraticabilidade do controle vetorial e de reservatórios e à ausência de vacinas contra a leishmaniose humana, o controle da doença depende principalmente do diagnóstico e tratamento de pacientes (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A LT possui uma ampla gama de manifestações clínicas com lesões que podem se assemelhar às aquelas ocasionadas por outras doenças como a hanseníase, câncer de pele, tuberculose e micoses cutâneas (ESCOBAR et al., 1992). Do mesmo modo, a hepatoesplenomegalia e a febre características da LV são comuns em várias outras patologias (EJAZI; ALI, 2013). Portanto, além dos aspectos clínicos e epidemiológicos, exames laboratoriais devem ser realizados para confirmação do diagnóstico (GOTO; LINDOSO, 2010).

O diagnóstico parasitológico é geralmente realizado pela observação direta de macrófagos infectados por amastigotas em amostras biológicas coradas com Giemsa com o auxílio de um microscópio (TORRES-GUERREIRO et al., 2017). Devido a sua alta especificidade, a análise microscópica é considerada o diagnóstico de referência para leishmaniose. Entretanto, sua sensibilidade geralmente é baixa para LT, além de ser extremamente variável dependendo do método de coleta, do tipo de amostra biológica e do tipo de lesão (GOTO; LINDOSO, 2010; TORRES-GUERREIRO et al., 2017; VEGA-LÓPEZ, 2003). A cultura dos parasitos pode oferecer mais informações sobre o agente etiológico, porém essa prática está restrita aos laboratórios de referência devido à necessidade de perícia técnica, infraestrutura e tempo (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

A despeito de suas limitações, como a incapacidade de distinguir infecções presentes de passadas e a soropositividade de indivíduos assintomáticos, vários testes sorológicos para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* estão disponíveis (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; SRIVASTAVA et al., 2011). Testes sorológicos simples e que dispensam equipamentos sofisticados, como o teste de aglutinação direta e o teste imunocromatográfico com o antígeno recombinante K39, são comumente utilizados na prática para auxiliar o diagnóstico da LV (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). No entanto, infecções por espécies dermatóricas não incitam forte resposta humoral, e por essa baixa sensibilidade os testes sorológicos são raramente empregados no diagnóstico de LT (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

Testes moleculares baseados na detecção e amplificação do DNA dos parasitos por reação de polimerase em cadeia foram desenvolvidos, alguns deles com alta sensibilidade e especificidade (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Estes testes são particularmente úteis em casos em que as lesões possuem poucos parasitos, como lesões mucocutâneas (REITHINGER et al., 2007). No entanto, essas são técnicas demoradas e dispendiosas que exigem equipamentos e perícia indisponíveis em áreas endêmicas, limitando seu uso rotineiro (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Ainda faltam técnicas com alta especificidade e sensibilidade, acessíveis, fáceis e rápidas para o diagnóstico das leishmanioses, principalmente da LT (REITHINGER; DUJARDIN, 2007).

1.6 Tratamento

A despeito da grande variabilidade de manifestações clínicas e agentes etiológicos, um número bastante limitado de drogas está disponível para o tratamento da leishmaniose (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Os principais fármacos utilizados atualmente são o antimônio pentavalente (SbV), a anfotericina B, a miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). No Brasil, o SbV é preconizado como a droga de primeira escolha pelo Ministério da Saúde. Quando sua utilização não é possível ou em casos de falha terapêutica, a anfotericina B e a pentamidina são adotadas como drogas de segunda escolha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Os mecanismos de ação do SbV ainda não foram inteiramente elucidados, contudo a hipótese comumente aceita é a de que ele é um pró-fármaco cuja redução a antimônio trivalente no macrófago ou no amastigota é necessária para desencadear seus efeitos leishmanicidas (SHAKED-MISHAN et al., 2001). Apesar de sua alta toxicidade e administração parenteral, o SbV é amplamente utilizado no tratamento da leishmaniose desde 1940 (FRÉZARD; MONTENETO; REIS, 2014). Entretanto, a queda gradual de sua eficácia tem sido observada em diversas regiões, sobretudo em Bihar (Índia), onde pacientes refratários e recidivas chegam a representar mais de 60 por cento dos casos de LV (OLLIARO et al., 2005).

Em virtude da crescente falha terapêutica do tratamento com SbV, a OMS passou a recomendar a anfotericina B lipossomal para o tratamento da LV, mas seu alto custo é uma limitação para a grande maioria das regiões endêmicas (OMS, 2010). Em contrapartida, a anfotericina deoxicolato, uma formulação mais barata e igualmente eficaz, é altamente tóxica e precisa ser administrada lentamente pela via intravenosa (ULIANA; TRINCONI; COELHO,

2018). Por essa razão, muitos países mantêm o SbV como medicamento de primeira escolha para o tratamento da LV e da LT (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

A miltefosina é a única droga administrada pela via oral à disposição para o tratamento da leishmaniose (SUNDAR et al., 2002). Tendo em vista o sucesso inicial observado em um ensaio clínico de fase III, a miltefosina foi introduzida na Índia em lugar do SbV para o tratamento de LV (SUNDAR et al., 2002). No entanto, sua eficiência foi inferior ao que havia sido prevista e a miltefosina deixou de ser adotada como droga de primeira escolha (OMS, 2010; RAHMAN et al., 2011; RIJAL et al., 2013; SUNDAR et al., 2012). Sua aplicabilidade como recurso terapêutico para LT ainda não foi determinada e ensaios clínicos demonstraram resultados variáveis (CHRUSCIAK-TALHARI et al., 2011; MACHADO et al., 2010; SOTO; BERMAN, 2006).

Assim como a miltefosina, outras drogas empregadas na quimioterapia das leishmanioses possuem aplicações limitadas. Devido aos graves efeitos colaterais decorrentes da administração parenteral da pentamidina, sua utilização é recomendada em casos de LT causados por *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis* em algumas áreas da América Latina (OMS, 2010). Já a paromomicina é usada principalmente em combinação com outras drogas ou como agente tópico para o tratamento de LCL causadas por *L. (L.) major* (OMS, 2010). Nas Américas, a terapia local é raramente utilizada por causa do risco de disseminação e das baixas taxas de cura espontânea (JIRMANUS et al., 2012; COTA et al., 2016).

Como mostrado, todos os tratamentos disponíveis para a leishmaniose possuem graves limitações como a alta toxicidade, a administração parenteral, a baixa eficiência, o alto custo e a emergência de parasitos resistentes (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Por essa razão, a implementação de combinações terapêuticas e a procura de novos fármacos é imprescindível (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018).

1.7 Interações entre promastigotas e hospedeiro vertebrado

Pouco tempo após a inoculação no hospedeiro vertebrado, os promastigotas metacíclicos de *Leishmania* entram em contato com o sistema complemento, composto por aproximadamente 30 proteínas solúveis e de membrana que fazem parte do sistema imune inato (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). Sua ativação ocorre por três vias: a clássica (ativada pela ligação de anticorpos ao patógeno), a das lectinas (ativada pela ligação das lectinas ligadora de manose e ficolinas ao patógeno) e a alternativa (ativada pela clivagem espontânea de C3) (GURUNG; KANNEGANTI, 2015). Independentemente da via, uma cascata de clivagem e

ativação de zimógenos é desencadeada, resultando na opsonização de patógenos (pela opsonina C3b), produção de anafilatoxinas estimuladoras da resposta pró-inflamatória e lise do parasito pela formação do complexo de ataque à membrana (GURUNG; KANNEGANTI, 2015).

Os promastigotas de *Leishmania* adquirem resistência ao complemento durante a metaciclogênese (FRANKE et al., 1985; PUENTES et al., 1988). Em algumas espécies, a metaciclogênese é acompanhada pela modificação das moléculas de LPG e por alterações da expressão da glicoproteína 63 (GP63) (MCCONVILLE et al., 1992; PIMENTA; SARAIVA; SACKS, 1991; YAO; DONELSON; WILSON, 2003). O papel de ambas moléculas na evasão foi evidenciado pelo aumento da susceptibilidade à lise por complemento mediante a sua deleção em promastigotas (JOSHI et al., 2002; SPÄTH et al., 2003; THIAKAKI et al., 2006). Os mecanismos de ação desses fatores de virulência serão descritos em detalhes posteriormente (ver 1.9)

Nos primeiros momentos, os neutrófilos são as células predominantes no sítio de infecção por *Leishmania*, atuando como células hospedeiras temporárias dos parasitos (PETERS et al., 2008). O dano tecidual causado pela probóscide do vetor ou pela agulha induz o rápido recrutamento de neutrófilos, que em infecções naturais pode ser potencializado pela saliva e pela microbiota do flebotômíneo (DE MOURA et al., 2010; DEY et al., 2018; PETERS et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2005). Posteriormente, fatores quimiotáticos produzidos pelo próprio parasito e por células do hospedeiro estimulam a migração adicional de neutrófilos (HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016).

Os neutrófilos são importantes células do sistema imune com um arsenal extenso de mecanismos microbicidas (AMULIC et al., 2012). Eles são capazes de fagocitar patógenos e eliminá-los por meio da exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs), enzimas proteolíticas e inúmeras moléculas antimicrobianas (AMULIC et al., 2012). Além disso, neutrófilos são capazes de secretar armadilhas extracelulares (NETs do inglês *neutrophil extracellular traps*), formadas por DNA, histonas e inúmeros peptídeos e enzimas antimicrobianas, que aprisionam e destroem patógenos (AMULIC et al., 2012). A interação entre neutrófilos e parasitos do gênero *Leishmania* é extremamente complexa e apesar de extensivamente estudada, as consequências exatas desta interação são desconhecidas (CARLSEN et al., 2015). Funções deletérias e benéficas dos neutrófilos no estabelecimento da infecção já foram demonstradas (CARLSEN et al., 2015; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). De fato, vários trabalhos induziram a neutropenia em modelos animais por depleção com anticorpos, e os resultados obtidos foram extremamente variados de acordo com a espécie de parasito, modelo animal, local de inóculo, tipo de anticorpo e duração da depleção (CARLSEN

et al., 2015; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Além disso, os anticorpos utilizados nesses estudos não são ideais, pois nenhum deles é capaz de causar a depleção específica, completa e duradoura de neutrófilos (CARLSEN et al., 2015; RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Em um modelo murino desprovido de neutrófilos maduros, a neutropenia parece facilitar a resolução de infecções por *L. (L.) mexicana* (HURRELL et al., 2015; ORDOÑEZ-RUEDA et al., 2012).

A capacidade dos neutrófilos em produzir NETs quando expostos a promastigotas de *Leishmania* já foi demonstrada para diversas espécies, todavia sua capacidade de eliminar os parasitos varia (HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016). Enquanto promastigotas de *L. (L.) amazonensis* são vulneráveis aos efeitos citotóxicos das histonas presentes na NETs, promastigotas das espécies *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) mexicana* possuem mecanismos de evasão que possibilitam sua sobrevivência e até mesmo escape (GABRIEL et al., 2010; GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; GUIMARÃES-COSTA et al., 2014; HURRELL et al., 2015). Ademais, em infecções naturais a endonuclease Lundep presente na saliva de *Lu. longipalpis* pode degradar as NETs, auxiliando o parasito (CHAGAS et al., 2014).

Os neutrófilos são capazes de fagocitar e eliminar promastigotas de *Leishmania* de maneira eficiente (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). No entanto, trabalhos demonstraram que uma fração dos parasitos é capaz de resistir aos mecanismos microbicidas e sobreviver nos neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (GUEIRARD et al., 2008; LAUFS et al., 2002; MOLLINEDO et al., 2010; PETERS et al., 2008; RIBEIRO-GOMES et al., 2012; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Os mecanismos de evasão parecem variar de acordo com a espécie de *Leishmania*. Em neutrófilos infectados com *L. (L.) donovani*, a presença de promastigotas intactos nos fagossomos evita a fusão com lisossomos, prevenindo sua digestão proteolítica (GUEIRARD et al., 2008). Na infecção de neutrófilos humanos, os fagossomos contendo promastigotas de *L. (L.) major* evitam a fusão com grânulos secundários e terciários, inibindo a produção de EROs e a acidificação (MOLLINEDO et al., 2010).

Alguns dias após a infecção, macrófagos são recrutados e rapidamente a maioria dos parasitos passa a residir nessas células (PETERS et al., 2008). A fagocitose de neutrófilos apoptóticos infectados com parasitos viáveis por macrófagos foi descrita *in vitro* para *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* (GUEIRARD et al., 2008; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). A internalização de parasitos por meio deste mecanismo, processo conhecido como “cavalo de Tróia”, favoreceria a sobrevivência do parasito por evitar seu contato direto com o macrófago e por estimular a resposta anti-inflamatória (GUEIRARD et al., 2008; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Posteriormente, foi proposto que os parasitos escapam dos neutrófilos apoptóticos,

mas ainda assim a fagocitose concomitante de células apoptóticas beneficiaria o parasito (PETERS et al., 2008).

A fagocitose de parasitos pode ser mediada por diversos receptores dependendo das moléculas presentes na superfície do parasito e da célula hospedeira (UENO; WILSON, 2012). A composição da membrana pode variar entre espécies e até mesmo cepas, variando também ao longo do desenvolvimento do parasito (UENO; WILSON, 2012).

O envolvimento do receptor do complemento (CR) 3 na fagocitose de *Leishmania* foi constatado pela redução na internalização de promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* após seu bloqueio em macrófagos peritonias murinos (MPMs) (BLACKWELL, 1985; MOSSER; EDELSON, 1985). O CR3 possui um sítio de ligação tipo lectina e um sítio de ligação específico para iC3b, fragmento inativo de C3b (ROSS; CAIN; LACHMANN, 1985). O bloqueio de qualquer um dos dois reduz a adesão de promastigotas de *L. (L.) donovani* de fase estacionária a macrófagos derivados de monócitos humanos (MDMHs) (WILSON; PEARSON, 1988). Entretanto, estudos realizados em MPM indicam que a fagocitose de promastigotas metacíclicos depende principalmente da ligação direta do parasito ao CR3 e a de promastigotas procíclicos, da ligação por iC3b (COOPER; ROSEN; BLACKWELL, 1988). A GP63, PSA2 e LPG são algumas moléculas do parasito capazes de se ligar diretamente ao CR3, porém sua contribuição para fagocitose ainda não foi totalmente esclarecida (KEDZIERSKI et al., 2004; RUSSELL; WRIGHT, 1988; TALAMÁS-ROHANA et al., 1990). Na fagocitose de *L. (L.) major* foi demonstrado que CR1 e CR3 de MDMH podem atuar de maneira cooperativa (ROSENTHAL et al., 1996). CR1 provavelmente se liga a C3b e possibilita sua clivagem em iC3b pelo fator I, favorecendo assim a adesão do parasito e sua fagocitose por CR3 (SUTTERWALA; ROSENTHAL; MOSSER, 1996).

Acredita-se que a fagocitose mediada por CR3 não incita o burst oxidativo, favorecendo a sobrevivência do parasito (MARTH; KELSALL, 1997; MOSSER; EDELSON, 1987; WRIGHT; SILVERSTEIN, 1983). Além disso, a infecção de macrófagos derivados de medula óssea murinos (MDMOs) por promastigotas metacíclicos de *L. (L.) major* inibe, por mecanismos dependentes de CR3, a produção de NO e da citocina pró-inflamatória interleucina-12 (IL-12) em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) (RICARDO-CARTER et al., 2013). A ausência da subunidade CD11b de CR3 altera a cinética de maturação de fagossomos contendo promastigotas metacíclicos de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (POLANDO et al., 2013; DIXIT et al., 2020). Por outro lado, a fagocitose de promastigotas metacíclicos e a diferenciação e multiplicação dos amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* são equivalentes entre MDMOs selvagem e nocaute para CD11b (POLANDO et al.,

2013). Curiosamente, apenas a sobrevivência de amastigotas de *L. (L.) infantum* é prejudicada pela deleção (DIXIT et al., 2020).

O receptor de manose também participa da internalização de promastigotas, dependendo da espécie e fase de desenvolvimento do parasito (UENO; WILSON, 2012). Em MDMO e MDMH, o bloqueio simultâneo de receptores de manose e de CR3 sugere que eles atuam em sinergia na fagocitose de promastigotas de *L. (L.) donovani* de fase estacionária (WILSON; PEARSON, 1988). Contudo, a deleção do receptor de manose em MDMO não interfere na infecção por promastigotas metacíclicos purificados de *L. (L.) donovani* e de *L. (L.) major*, indicando que sua atuação é restrita a promastigotas procíclicos (AKILOV et al., 2007). Em concordância, VPs de MDMHs contendo promastigotas de *L. (L.) infantum* de fase exponencial são revestidos por receptores de manose e CR3, enquanto promastigotas metacíclicos residem em VPs revestidos unicamente por CR3 (UENO et al., 2009). Não obstante, já foi demonstrado que a interação do parasito com o receptor de manose pode alterar as vias de sinalização das células hospedeiras (POLANDO et al., 2018). De fato, a deleção desse receptor modifica o processo de maturação do fagossomo e de recrutamento de actina em MDMO infectados por promastigotas metacíclicos de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) major* (POLANDO et al., 2018). As consequências da internalização pelo receptor de manose são controversas: enquanto diversos estudos sugerem que fagocitose mediada por esse receptor resulta em um perfil pró-inflamatório, o oposto também já foi observado (UENO; WILSON, 2012).

Receptores de fibronectina também podem atuar na fagocitose de *Leishmania*. A incubação de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de fase estacionária com fibronectina aumenta sua adesão aos MDMHs, ao passo que anticorpos anti-fibronectina causam efeito oposto (WYLER; SYPEK; MCDONALD, 1985). Ademais, o bloqueio dos receptores de MDMOs com anticorpo anti-integrina $\beta 1$ reduz a internalização desses parasitos (BRITTINGHAM et al., 1999). Acredita-se que a fibronectina pode atuar como uma ponte entre o parasito e sua célula hospedeira. Todavia, há indícios de que promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também são capazes de se ligar diretamente à integrina $\alpha 4 \beta 1$ através da proteína GP63, que possui propriedades semelhantes a fibronectina (BRITTINGHAM et al., 1999).

Outros receptores do macrófago podem participar da adesão e internalização de promastigotas, incluindo receptores do tipo toll (TLR), receptores “scavenger”, receptor Siglec 1, receptor para produtos finais de glicação avançada e proteoglicanos de heparan sulfato (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006; MACIEJ-HULME; SKIDMORE; PRICE, 2018; MARTINS et al., 2015; ROY; MANDAL, 2016; SCHÖNLAU et al., 2000).

A endocitose de promastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* por macrófagos murinos é mediada por cavéolas e dependente da polimerização de filamentos de actina (KUMAR et al., 2019; RODRÍGUEZ; GAUR; WILSON, 2006; ROY et al., 2014). Normalmente, fagossomos passam por um processo de maturação caracterizado por eventos de fusão e fissão com compartimentos endossomais e lisossomais (PAUWELS et al., 2017). Durante a maturação, a composição dos fagossomos é modificada pela aquisição de enzimas hidrolíticas, da H⁺-ATPase e da NADPH oxidase (PAUWELS et al., 2017). A H⁺-ATPase e a NADPH oxidase promovem, respectivamente, a acidificação do fagolissossomo e a produção de EROs, criando um ambiente propício para a eliminação de microorganismos (PAUWELS et al., 2017). Em fagossomos contendo promastigotas de fase estacionária de *L. (L.) donovani* e promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major*, a fusão com outras vesículas é inibida, retardando o processo de maturação (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; SPÄTH et al., 2003). Esse retardo era considerado uma estratégia mediada pelo LPG do parasito para protegê-lo até sua diferenciação para forma amastigota, mais adaptada a sobreviver em ambiente ácido. Entretanto, promastigotas de *L. (L.) major* nocaute para LPG são resistentes ao baixo pH e à digestão por proteases (SPÄTH et al., 2003). Ainda, a sobrevivência intracelular dos parasitos nocautes é resgatada pela deleção de *phox* nos MPMs, indicando que o LPG auxilia na sobrevivência do parasito pela proteção contra o estresse oxidativo (SPÄTH et al., 2003).

1.8 Diferenciação e sobrevivência de amastigotas

A temperatura elevada do hospedeiro vertebrado e a acidificação do VP são provavelmente os fatores responsáveis por induzir a conversão dos promastigotas metacíclicos em amastigotas. Em concordância, o cultivo de promastigotas de algumas espécies de *Leishmania* mimetizando as condições de temperatura e pH do VP resulta na sua diferenciação em amastigotas axênicos (BATES et al., 1992; DEBRABANT et al., 2004). Ainda, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* cultivados em meio sem ferro ou na presença de doses não tóxicas de peróxido de hidrogênio se diferenciam em formas semelhante à amastigotas, sugerindo que outros fatores também podem contribuir para esse processo (KHAN; ANDREWS; MITTRA, 2018; MITTRA et al., 2013).

Os VPs normalmente se dividem concomitantemente com a multiplicação do parasito, dando origem a um VP individual para cada amastigota. As espécies pertencentes ao complexo *L. (L.) mexicana*, porém, formam grandes VP comunais contendo até trinta amastigotas (BENCHIMOL; DE SOUZA, 1981). A lise da célula hospedeira era vista como necessária para

a liberação de amastigotas e infecção de novos macrófagos. Anos atrás, outros mecanismos pelos quais o parasito se dissemina foram descritos, incluindo a liberação de amastigotas por MDMOs apoptóticos em um processo semelhante à exocitose (REAL et al., 2014). Esses parasitos estão associados a proteínas características do VP e envoltos parcial ou completamente pela membrana do macrófago, o que pode auxiliá-los na evasão do sistema imune (REAL et al., 2014).

A composição da membrana do parasito é radicalmente modificada durante sua diferenciação; por conseguinte, os mecanismos envolvidos na fagocitose de amastigotas são divergentes daqueles empregados para promastigotas (UENO; WILSON, 2012). Estudos *in vitro* indicam que amastigotas de *L. (L.) mexicana* recuperados de lesões interagem preferencialmente com receptores Fc e que a opsonização de amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana* por anticorpos específicos favorece a sua internalização por MDMO (GUY; BELOSEVIC, 1993; PETERS et al., 1995). Em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) amazonensis*, a ausência de anticorpos circulantes ou do receptor Fc resulta em lesões menores e com menor carga parasitária (KIMA et al., 2000). Em conjunto, esses estudos apontam para participação do receptor Fc na fagocitose de amastigotas.

Assim como observado em promastigotas, o bloqueio de CR3 em MPM reduz a fagocitose de amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* (BLACKWELL, 1985; GUY; BELOSEVIC, 1993). Em contrapartida, amastigotas de *L. (L.) mexicana* derivados de lesão não formam interações de alta afinidade com os receptores CR3 devido à ausência de fragmentos de C3 em sua superfície (PETERS et al., 1995). O receptor de fibronectina também foi implicado na internalização de amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) amazonensis*, entretanto ainda se sabe muito pouco sobre a sua relevância *in vivo* (WYLER; SYPEK; MCDONALD, 1985). Amastigotas de *L. (L.) amazonensis* também podem ser internalizados pela macropinocitose mediada por um fosfolipídio semelhante a fosfatidilserina, que é exposto na superfície de parasitos viáveis em um processo denominado mimetismo apoptótico (WANDERLEY et al., 2006). O reconhecimento desse fosfolipídio pelos macrófagos induz a produção das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e fator de crescimento transformante beta e inibe a produção de NO, o que pode beneficiar o parasito (DE FREITAS BALANCO et al., 2001; WANDERLEY et al., 2006).

As EROs e de ERNs são importantes moléculas microbidas produzidas pelos macrófagos (BABIOR, 2000). A NADPH oxidase é essencial para a produção de EROs pelo macrófago, e é formada por duas proteínas integrais de membrana (gp91^{phox} e p22^{phox}) e quatro proteínas citoplasmáticas (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} e a GTPase Rac) (GROEMPING;

RITTINGER, 2005). A montagem do complexo enzimático ativo depende da fosforilação de p47^{phox} e da ligação da Rac com GTP. Esses dois eventos promovem a translocação das subunidades citoplasmáticas à membrana do fagossomo, permitindo sua interação com o heterodímero composto por gp91^{phox} e p22^{phox} (GROEMPING; RITTINGER, 2005). A NADPH oxidase ativa catalisa a produção de superóxido através da transferência de elétrons para o O₂ (GROEMPING; RITTINGER, 2005). O superóxido ainda pode dar origem a outras EROs microbicidas (peróxido de hidrogênio, hidroxila e o íon hipoclorito), que podem causar danos ao DNA, proteínas e lipídeos do parasito (BABIOR, 2000).

A relevância de NADPH oxidase para o controle da infecção em modelo murino depende da espécie de *Leishmania*, do órgão afetado e do estágio da doença (BLOS et al., 2003; MURRAY; NATHAN, 1999). A deleção de gp91^{phox} em camundongos resistentes infectados por *L. (L.) donovani* resulta no aumento da carga parasitária no fígado somente nas duas primeiras semanas, indicando que a NADPH oxidase auxilia o controle do parasito durante a sua fase aguda, mas não é essencial para a resolução da infecção (MURRAY; NATHAN, 1999). Na infecção por *L. (L.) major*, a NADPH oxidase é necessária para conter a replicação do parasito no fígado durante a fase aguda e também na derme e nos linfonodos durante a fase crônica (BLOS et al., 2003). Consequentemente, camundongos nocaute para gp91^{phox} são mais propícios à reativação de infecções latentes (BLOS et al., 2003).

A produção de EROs é deflagrada durante a fagocitose de promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Não obstante, o parasita tem algumas estratégias para prevenir a ativação da NADPH oxidase (VAN ASSCHE et al., 2011). Amastigotas de *L. (L.) donovani* inibem a fosforilação de p47^{phox} pela proteína quinase C (PKC), impedindo o recrutamento dos componentes citosólicos à membrana do fagossomo (LODGE; DESCOTEAUX, 2006; OLIVIER; BROWNSEY; REINER, 1992). Além disso, esses parasitos provocam a desorganização dos microdomínios lipídicos do fagossomo, o que pode causar a dissociação da NADPH oxidase (LODGE; DESCOTEAUX, 2006). O LPG de promastigotas de *L. (L.) donovani* inibe a formação da NADPH oxidase de maneira semelhante, no entanto as moléculas encarregadas desse processo em amastigotas ainda são desconhecidas (DERMINE et al., 2005). Em macrófagos de linhagem RAW 264.7, a infecção por *L. (L.) pifanoi* e *L. (L.) donovani* eleva a expressão da heme oxigenase 1, provocando a degradação do grupo heme necessário para maturação de gp91^{phox} (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005; SAHA et al., 2019).

A produção de NO e L-citrulina é catalisada pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS) a partir da oxidação de L-arginina. Ao contrário das outras isoformas da NOS, que são expressas constitutivamente, a transcrição de iNOS requer a combinação de dois sinais para recrutar

simultaneamente o fator nuclear kappa B (NF- κ B) e os transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STAT) à região promotora do gene (FARLIK et al., 2010). Múltiplos estímulos são capazes de induzir a síntese de iNOS, contudo os fatores envolvidos no contexto da infecção por *Leishmania* ainda não foram inteiramente elucidados (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015). Durante os primeiros dias da infecção por *L. (L.) major*, a indução de iNOS em camundongos depende da ativação da via janus quinase (JAK)-STAT por interferon- α/β (IFN- α/β), papel desempenhado posteriormente pela citocina IFN- γ secretada por linfócitos T auxiliares (DIEFENBACH et al., 1998; SWIHART et al., 1995).

MPMs infectados por *L. (L.) major* e tratados com IFN- γ *in vitro* secretam fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que atua de maneira autócrina estimulando a geração de NO (GREEN et al., 1990). Em camundongos resistentes, o TNF- α é essencial para promover a resolução da lesão, entretanto sua contribuição para o controle da infecção por *L. (L.) major* ainda é incerta (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015). Diversos estudos foram realizados com diferentes cepas de *L. (L.) major* e diferentes linhagens de camundongos (OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015). Alguns deles indicam que TNF- α é dispensável para expressão de iNOS e eliminação do parasito, sugerindo que outros fatores como citocinas inflamatórias, antígenos dos parasitos ou moléculas coestimuladoras devem estar envolvidos na ativação dos macrófagos *in vivo* (CHAKOUR et al., 2003; DE KOSSODO et al., 1994; NASHLEANAS; KANALY; SCOTT, 1998).

Embora seja gerado no citosol, o NO pode se difundir através da membrana do VP e da membrana plasmática, possibilitando sua ação direta nos parasitos (OLEKHNOVITCH et al., 2014). O NO é relativamente estável, no entanto em combinação com o superóxido gera peroxinitrito, que pode promover a nitração e oxidação de inúmeras moléculas (BABIOR, 2000). Em camundongos resistentes, a iNOS contém a infecção por *L. (L.) major* desde seu estágio inicial e sua deleção resulta em lesões progressivas e incuráveis (BLOS et al., 2003; DIEFENBACH et al., 1998; MURRAY; NATHAN, 1999). Mesmo após a resolução da infecção, a iNOS é fundamental para evitar a multiplicação dos amastigotas de *L. (L.) major* remanescentes (STENGER et al., 1996). Tal como em infecções cutâneas, camundongos nocaute para iNOS são incapazes de limitar a replicação de amastigotas de *L. (L.) donovani* (MURRAY; NATHAN, 1999).

Parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de impedir a produção de NO de maneira direta e indireta. Uma das estratégias utilizada é a depleção da arginina, substrato da iNOS. A infecção de macrófagos de linhagem THP-1 por *L. (L.) major*, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) tarentolae* eleva a atividade da arginase da célula hospedeira, que catalisa a conversão da arginina em

ornitina e ureia (BADIRZADEH et al., 2017). Desta maneira, o parasito favorece a biossíntese de poliaminas em detrimento da síntese de NO, propiciando sua sobrevivência e proliferação intracelular (BADIRZADEH et al., 2017). O aumento da atividade da arginase também foi observado *in vivo* em lesões e linfonodos drenantes de camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados por *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* (BADIRZADEH et al., 2017). A abundância de NO e poliaminas também pode ser regulada pela arginase e NOS-like do próprio parasito (MUXEL et al., 2018). A deleção da arginase de *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* reduz a infectividade do parasito em MDMO e eleva a produção de NO (GAUR et al., 2007; MUXEL et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que a infecção de células THP-1 e MDMO por *L. (L.) amazonensis* resulta em alterações epigenéticas que inibem a expressão de iNOS (CALEGARI-SILVA et al., 2018; MUXEL et al., 2017).

A transcrição de vários genes envolvidos na resposta inflamatória e microbicida depende da ativação da via de sinalização JAK-STAT. A ligação com IFN- γ resulta na multimerização de seu receptor, possibilitando a transfosforilação e ativação das proteínas JAK, que por sua vez promovem a fosforilação, dimerização e translocação das STATs ao núcleo, onde elas atuam como fator de transcrição (RAWLINGS; ROSLER; HARRISON, 2004). Os parasitos possuem diversos mecanismos para reprimir a ativação da via e promover sua sobrevivência (ATAYDE et al., 2016). Em macrófagos de linhagem infectados por *L. (L.) donovani*, a inibição da cascata de sinalização é mediada pela desfosforilação das proteínas JAK1, JAK2 e STAT1 pelas tirosinas fosfatases, em particular a SHP1 (BLANCHETTE et al., 1999; NANDAN; REINER, 1995). Outros mecanismos de repressão da via JAK-STAT empregados por *Leishmania* já foram descritos, incluindo a indução do supressor de sinalização de citocina 3, a degradação de STAT1 mediada por proteassomos e bloqueio da translocação de STAT ao núcleo (BERTHOLET et al., 2003; FORGET; GREGORY; OLIVIER, 2005; MATTE; DESCOUTEAUX, 2010).

Várias alterações na via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) também foram detectadas após infecção por *Leishmania*. A ausência de fosforilação das proteínas quinase regulada por sinal extracelular 1/2, da c-Jun N-terminal quinase e de p38 em MDMO e em macrófagos de linhagem RAW 264.7 sugere que a via MAPK não é ativada durante a infecção por *L. (L.) donovani* (BANERJEE et al., 2016; PRIVÉ; DESCOUTEAUX, 2000). Semelhante ao que foi observado na via JAK/STAT, a ativação dessa via em resposta ao IFN- γ ou LPS é inibida em macrófagos murinos infectados por *L. (L.) donovani* devido à desfosforilação das proteínas por tirosinas fosfatases (FORGET et al., 2006; GHOSH et al., 2001; NANDAN; LO; REINER et al., 1999). Além disso, já foi demonstrado que proteases do

parasito podem promover diretamente a degradação de fatores de transcrição como a proteína ativadora-1 (AP-1) e o NF- κ B (CONTRERAS et al., 2010; GREGORY et al., 2008).

A infecção por *Leishmania* ainda pode alterar diversas funções dos macrófagos, incluindo sua capacidade de apresentar antígenos. Estudos *in vitro* mostram que macrófagos contendo amastigotas apresentam menos antígenos do parasito aos linfócitos T auxiliares, porém o mesmo não é observado na infecção por promastigotas (COURRET et al., 1999; KAYE et al., 1993; KIMA et al., 1996; WOLFRAM et al., 1995). A apresentação de antígenos depende da translocação do complexo formado pela molécula de MHC de classe II com o antígeno até a superfície do macrófago, onde elas podem ser reconhecidas pelos linfócitos. A infecção *in vitro* com amastigotas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* inibe a expressão de MHC de classe II induzida pelo tratamento com IFN- γ em MPM e MDMH, respectivamente (DE ALMEIDA; CARDOSO; BARRAL-NETTO, 2003; REINER; NG; MCMASTER, 1987). Contudo, esse fenômeno não é observado na infecção de macrófagos murinos por *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e nem mesmo por outra cepa de *L. (L.) donovani*, indicando que os amastigotas possuem outros meios de evadir o reconhecimento por linfócitos T (ANTOINE et al., 1999; FRUTH; SOLIOZ; LOUIS, 1993; LANG et al., 1994b; PRINA et al., 1993).

Complexos formados pelas moléculas de MHC de classe II com o antígeno LACK foram observados na membrana do VP de macrófagos isolados de linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. (L.) major* (MURAILLE et al., 2010). Contudo, esses complexos não estão presentes na superfície celular de macrófagos, indicando que a infecção impede sua translocação para membrana plasmática (MURAILLE et al., 2010). Em MDMO infectados *in vitro*, amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* estão aparentemente associados ao MHC de classe II presente na membrana do VP, o que poderia reter essas moléculas no vacúolo (ANTOINE et al., 1999; LANG et al., 1994a). Amastigotas dessas espécies também são capazes de internalizar as moléculas de MHC de classe II e promover sua degradação por cisteína proteases (CP) (ANTOINE et al., 1999; DE SOUZA LEO et al., 1995). Além disso, a infecção por *L. (L.) donovani* altera a fluidez da membrana plasmática de MPMs, resultando em alterações conformacionais das moléculas de MHC de classe II que propiciam a sua dissociação de peptídeos (CHAKRABORTY et al., 2005; ROY et al., 2016).

Além das moléculas de MHC, a presença de moléculas de adesão e moléculas coestimuladoras na superfície da célula apresentadora de antígeno é necessária para promover o reconhecimento e ativação dos linfócitos T auxiliares. Em MDMO, a infecção por *L. (L.) donovani* não estimula a expressão da molécula coestimuladora B7 na membrana plasmática e

ainda inibe a sua indução por estímulos como o LPS (KAYE et al., 1994; SAHA et al., 1995). A CD40 é outra importante molécula coestimuladora. Sua expressão não foi alterada em MPM infectados com *L. (L.) major*, mas há indícios de que a infecção promove alterações a jusante da via de sinalização intracelular de CD40 (AWASTHI et al., 2003).

Além dos neutrófilos e macrófagos, as células dendríticas (CDs) também são infectadas por *Leishmania*. As CDs são células apresentadoras de antígeno com papel essencial no desenvolvimento da resposta imune adaptativa. A secreção de IL-12 por essas células promove e mantém a resposta Th1 necessária para o controle da infecção (MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2018). O reconhecimento do parasito por receptores como TLR2, TLR4 e TLR9 promove a maturação de CDs, processo caracterizado pelo aumento da expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimuladoras na membrana plasmática e da secreção de citocinas (TIBÚRCIO et al., 2019). Já foi demonstrado que os receptores Fc, CR3 e CD-209 participam na fagocitose de *Leishmania* por CDs (TIBÚRCIO et al., 2019). Além disso, marcadores como mieloperoxidase e elastase estão presentes em CDs infectadas por *L. (L.) major* recuperadas da derme de camundongos C57BL/6, indicando que a aquisição de parasitos por essas células pode ocorrer por meio da fagocitose de neutrófilos parasitados (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). As CDs recuperadas de camundongos neutropênicos possuem expressão elevada de MHC de classe II e moléculas coestimuladoras e induzem maior secreção de IFN- γ por linfócitos T auxiliares *in vitro*, indicando que a fagocitose de neutrófilos infectados inibe o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa efetiva (RIBEIRO-GOMES et al., 2012).

Diversos estudos indicam que a infecção por *Leishmania* pode alterar a maturação das CDs, dependendo do subtipo das CDs e da espécie, cepa e fase do parasito (TIBÚRCIO et al., 2019). Além disso, há indícios de que a infecção por *Leishmania* também pode causar alterações na migração das CDs aos linfonodos drenantes, impedindo a sua interação com linfócitos T (TIBÚRCIO et al., 2019). A incubação *in vitro* com moléculas secretadas por *L. (L.) major* reduz a motilidade de células de Langerhans provenientes de camundongos BALB/c (JEBBARI et al., 2002). Em um modelo murino de peritonite crônica, a migração das CDs aos linfonodos drenantes é inibida pela infecção por *L. (L.) amazonensis* (HERMIDA et al., 2014). Os mecanismos responsáveis pelas alterações no padrão migratório não foram inteiramente elucidados, contudo já foi demonstrado que a infecção *in vitro* por promastigotas de *L. (L.) major* altera a expressão de receptores de quimiocinas em CDs murinas (STEIGERWALD; MOLL, 2005). A falha ou retardo da maturação e migração das CDs pode comprometer o desenvolvimento de linfócitos T auxiliares, criando condições propícias para o estabelecimento da infecção por *Leishmania*.

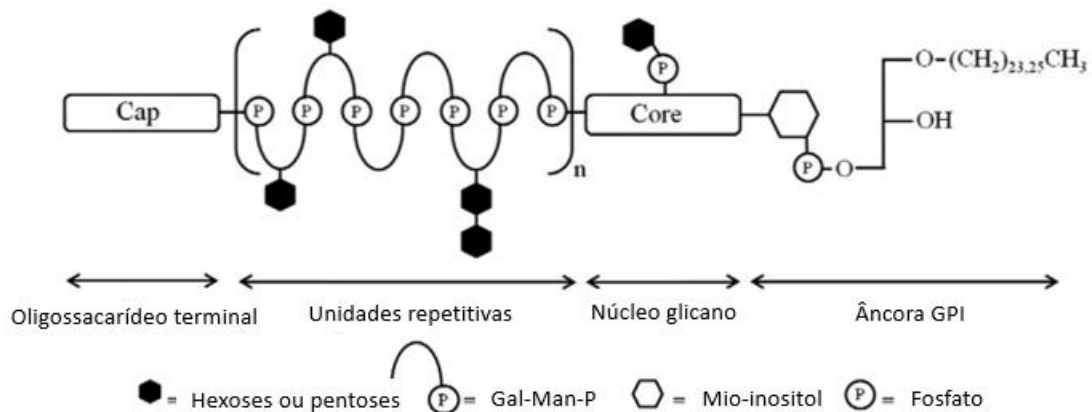
As respostas imunes inata e adaptativa são mutuamente interferentes e importantes para o desfecho da infecção por *Leishmania*. A infecção de camundongos C57BL/6 por *L. (L.) major* resulta na diferenciação de células T naive em células T Th1, produtoras de citocinas como IFN- γ , IL-2 e TNF- α , que promovem a ativação clássica de macrófagos e a eliminação do parasito (LOHOFF et al., 1998). Por outro lado, camundongos BALB/c desenvolvem a resposta Th2, caracterizada pela produção de citocinas como IL-13 e IL-4 favorecendo a ativação alternativa do macrófago (LOHOFF et al., 1998). Entretanto, essa correlação não é tão clara em infecções humanas e nem mesmo em infecções murinas por outras espécies de *Leishmania*. Infecções por *L. (L.) amazonensis* geralmente resultam em respostas mistas (Th1/Th2) (AFONSO; SCOTT, 1993; JI et al., 2002). Além disso, o desenvolvimento de lesões nos primeiros meses após infecção por *L. (L.) amazonensis* em camundongos nocaute para IFN- γ é equivalente àquele observado em camundongos selvagens, indicando que essa citocina não é essencial para o controle inicial da infecção (PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007).

1.9 Fatores de virulência

Para sobreviver e se desenvolver nas condições inóspitas às quais é submetida, a *Leishmania* é dotada de moléculas denominadas fatores de virulência, cujas abundâncias podem variar de acordo com a espécie, cepa e estágio de desenvolvimento do parasito. A função dos glicoconjugados presentes na superfície do parasito tem sido extensivamente investigada, especialmente da GP63 e do LPG.

O LPG é um dos componentes mais abundantes do glicocálice de promastigotas, que possuem milhões de LPGs recobrimdo toda sua superfície (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). As moléculas de LPG são compostas por quatro domínios: uma âncora glicosilfosfatidilinositol (GPI), um núcleo glicano, unidades repetitivas de Gal(α 1-4)Man(α 1-)PO₄ e um oligossacarídeo neutro terminal (Figura 2) (TURCO; DESCOTEAUX, 1992). A âncora de GPI e o núcleo glicano são domínios conservados, mas há variações interespecíficas e intraespecíficas na composição do oligossacarídeo neutro e no número de unidades repetitivas e suas cadeias laterais (DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

Figura 2 - Estrutura das moléculas de LPG



Fonte: Adaptado de DE ASSIS et al., 2012

Em virtude de sua alta heterogeneidade, os papéis exercidos pelo LPG podem também variar. De fato, o LPG é um importante fator de virulência em promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major*, mas sua deleção em promastigotas de *L. (L.) mexicana* não altera sua capacidade de estabelecer infecções *in vitro* e *in vivo* (ILG, 2000; SPÄTH et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado que LPGs provenientes de diferentes espécies e cepas podem incitar respostas distintas em macrófagos (CARDOSO et al., 2020; COELHO-FINAMORE et al., 2011; IBRAIM et al., 2013; VIEIRA et al., 2019). A título de exemplo, MPMs estimulados com LPG purificado de promastigotas da cepa M2903 de *L. (V.) braziliensis* produzem maiores quantidades de citocinas pró-inflamatórias e NO em comparação àqueles estimulados com LPG da cepa BH46 de *L. (L.) infantum* (IBRAIM et al., 2013).

A estrutura e abundância do LPG também variam durante o ciclo biológico do parasito, facilitando sua adaptação a diferentes microambientes. Conforme já mencionado, o LPG é essencial para a adesão de algumas espécies de *Leishmania* ao intestino médio de vetores específicos (MYSKOVA et al., 2007). Durante a metaciclogênese, as moléculas de LPG sofrem alterações que permitem seu desligamento do epitélio intestinal e a migração do parasito à válvula estomodeal (MAHONEY et al., 1999; MCCONVILLE et al., 1992; PIMENTA et al., 1992; SACKS et al., 1995; SOARES et al., 2002). Em *L. (L.) major*, uma arabinose terminal é adicionada às cadeias laterais do LPG de promastigotas metacíclicas, ocultando os resíduos de galactose que previamente se ligavam às galectinas de *P. papatasi* (MCCONVILLE et al., 1992; PIMENTA et al., 1992).

Além de garantirem seu desenvolvimento no vetor, as modificações do LPG durante a metaciclogênese contribuem para a sobrevivência dos parasitos no hospedeiro vertebrado. O aumento no número de unidades repetitivas do LPG é comumente observado em promastigotas

metacíclicos de *Leishmania* (MCCONVILLE et al., 1992; SACKS et al., 1995; SOARES et al., 2002; SOARES et al., 2005). Acredita-se que essas longas moléculas dificultam o acesso à superfície do parasito por impedimento estérico (PUENTES et al., 1990; SACKS; BRODIN; TURCO, 1990). Dessa forma, o LPG inibe a formação do complexo de ataque à membrana sem comprometer a ativação das vias do complemento, a opsonização do parasito por C3b e a fagocitose mediada por CR1 e CR3 (PUENTES et al., 1988; PUENTES et al., 1990; RAMER-TAIT et al., 2012; SACKS, 1992).

Ao serem fagocitados por macrófagos, os promastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* retardam a maturação dos VPs ao impedir sua fusão com endossomos e lisossomos (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1997; DERMINE et al., 2000; SCIANIMANICO et al., 1999; SPÄTH et al., 2003). Em infecções por *L. (L.) donovani*, acredita-se que a inibição da PKC α e a ativação da GTPase Cdc42 mediadas pelo LPG resultam no acúmulo de filamentos de actina ao redor dos VPs (HOLM et al., 2001; LERM et al., 2006; LODGE; DESCOTEAUX, 2005). O revestimento pela actina cria uma barreira física que pode afetar o transporte vesicular para o VP, inibindo assim sua maturação (HOLM et al., 2001). Ainda, as moléculas de LPG são capazes de se inserir na membrana do fagossomo e desorganizar seus microdomínios lipídicos, comprometendo o recrutamento de (H⁺)-ATPases e das subunidades citoplasmáticas da NADPH oxidase (DERMINE et al., 2005; LODGE; DIALLO; DESCOTEAUX, 2006; VINET et al., 2009).

Os promastigotas podem ainda empregar o LPG para manipular as vias de sinalização intracelular do hospedeiro como, por exemplo, inibir a PKC e regular a via MAPK (DESCOTEAUX; TURCO, 1993; PRIVÉ; DESCOTEAUX, 2000). Em síntese, o LPG exerce funções essenciais para o desenvolvimento do promastigotas no hospedeiro invertebrado e vertebrado. Entretanto, após a diferenciação para forma amastigota sua abundância cai drasticamente, e por essa razão, ele provavelmente não exerce um papel relevante nessas formas intracelulares (TURCO; SACKS, 1991).

Outro importante fator de virulência é a metaloprotease dependente de zinco GP63. A GP63 encontra-se majoritariamente ancorada à superfície do parasito, no entanto uma fração desta glicoproteína é liberada ao meio extracelular através de exossomos e da clivagem de sua âncora GPI pela fosfolipase C (ATAYDE et al., 2016). Múltiplos genes localizados nos cromossomos 10, 28 e 31 codificam a GP63 (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Devido às variações na região 3' não traduzida, os genes de GP63 possuem padrões de expressão distintos durante as fases de desenvolvimento do parasito (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012). Em *L. (L.) major*, cinco genes são expressos abundantemente em promastigotas, um gene é expresso

constitutivamente e um gene é expresso somente em amastigotas e promastigotas metacíclicos (KELLY; NELSON; MCMASTER, 2001).

A GP63 é uma enzima promíscua que pode atuar em vários estágios da infecção (ATAYDE et al., 2016). Na matriz extracelular, a GP63 cliva colágeno e fibronectina, auxiliando a locomoção do promastigota (MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003). Além disso, a GP63 pode clivar C3b em C3bi, o que impede a ativação do sistema complemento e favorece a internalização do parasito por CR3 (BRITTINGHAM et al., 1995; MOSSER; EDELSON, 1985). Os receptores de fibronectina também podem atuar de maneira cooperativa ao interagir com a GP63 e fortalecer a adesão do parasito ao macrófago (BRITTINGHAM et al., 1999).

Uma vez dentro do macrófago, a GP63 é capaz de se translocar ao citoplasma da célula hospedeira, onde ela cliva inúmeros substratos e manipula as vias de sinalização (ATAYDE et al., 2016). Dentre seus alvos intracelulares estão proteínas tirosina fosfatases como a SHP-1 (GOMEZ et al., 2009; HALLÉ et al., 2009). A clivagem e consequente ativação de SHP-1 regula negativamente a via de sinalização JAK/STAT. A inibição ou deleção da SHP-1 em modelo murino resulta no aumento da produção de NO e no controle da infecção por parasitos do gênero *Leishmania*, demonstrando a importância da ativação da SHP-1 pela GP63 (FORGET et al., 2001; FORGET et al., 2006; MATTE et al., 2000). Além disso, já foi demonstrado que a GP63 pode degradar as nucleoporinas e permitir sua translocação ao núcleo do macrófago (ISNARD et al., 2015). Desta maneira, a GP63 é capaz de degradar diretamente fatores de transcrição como AP-1, importante para regulação da resposta imune inata (CONTRERAS et al., 2010).

A GP63 é a proteína de superfície mais abundante em promastigotas (YAO; DONELSON; WILSON, 2003). Sua expressão diminui após a diferenciação do parasito em amastigotas, mas seus níveis se mantêm detectáveis em amastigotas de todas as espécies analisadas até o momento (YAO; DONELSON; WILSON, 2003). A função exata da GP63 nesta fase é desconhecida, mas foi mostrado que o revestimento de proteínas pela GP63 purificada as protege da degradação nos fagolisossomos (CHAUDHURI et al., 1989). Além disso, o silenciamento do gene de GP63 por RNA anti-senso em *L. (L.) amazonensis* detém a expansão de amastigotas intracelulares em macrófagos de linhagem J774, indicando que GP63 é fundamental para sua sobrevivência ou replicação intracelular (CHEN et al., 2000).

Glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) são glicoconjugados de baixo peso molecular cuja abundância se mantém elevada ao longo do ciclo biológico do parasito (DE ASSIS et al., 2012). Esses glicolípídios apresentam polimorfismos entre espécies, entretanto todos possuem uma

estrutura conservada composta por um resíduo de Man α 1-4GlcN ligado por meio de um fosfatidilinositol à um alquil-acil-glicerol ou à um liso-alquil-glicerol (DE ASSIS et al., 2012). Cada célula possui aproximadamente 10 milhões de cópias de GIPLs, porém informações sobre o seu papel biológico ainda são limitadas (FORESTIER; GAO; BOONS, 2015). Acredita-se que os GIPLs de algumas espécies de *Leishmania* auxiliam na entrada silenciosa do parasito por meio da manipulação das vias de sinalização do macrófago, inibindo a produção de NO (DE ASSIS et al., 2012).

Além dos glicoconjugados de superfície e GP63, proteínas intracelulares e secretadas podem atuar como fatores de virulência. A CP é um importante fator de virulência em *Leishmania* (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Diversas CPs já foram identificadas, sendo que CPA, CPB e CPC são as mais bem caracterizadas (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). A CPA e a CPC são codificadas por um único gene e a CPB é codificada por múltiplos genes arranjados *in tandem* (MOTTRAM; COOMBS; ALEXANDER, 2004). Parasitos de *L. (L.) mexicana* nos quais os 19 genes da CPB são deletados causam lesões menores e que demoram para evoluir em camundongos BALB/c (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; MOTTRAM et al., 1996; SOUZA et al., 1992). Sua virulência só é restaurada quando múltiplas cópias da CPB voltam a ser expressas, indicando que os genes de CPB possuem papéis complementares (DENISE et al., 2003). A deleção de CPB em *L. (L.) mexicana* mostrou ainda que essa protease é capaz de induzir a clivagem de NF- κ B e inibir os fatores de transcrição STAT-1 α e AP-1, reduzindo a produção de IL-12 e NO em macrófagos infectados *in vitro* (ABU-DAYYEH et al., 2010; CAMERON et al., 2004). Já em camundongos BALB/c, CPB estimula a produção da citocina IL-4 característica da resposta Th2, favorecendo a sobrevivência do parasito (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998).

Diversos outros fatores de virulência podem contribuir para o sucesso da infecção ao auxiliar processos como o combate ao estresse oxidativo e a aquisição de nutrientes pelo parasito (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015), e optamos por citar apenas os mais estudados. A interação entre parasito e hospedeiro vertebrado é extremamente complexa e ainda há muito a ser elucidado.

1.10 Técnicas de análise proteômica para identificação de fatores de virulência

O proteoma é definido como o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em um determinado tempo e condição (WILKINS et al., 1996). O

aperfeiçoamento da instrumentação e da análise computacional permitiu a popularização das técnicas de análise proteômica (COX; MANN, 2011). A análise do proteoma de *Leishmania* tem sido amplamente utilizada para elucidar a biologia do parasito, incluindo os mecanismos envolvidos em seu desenvolvimento, virulência e resistência a drogas (CAPELLI-PEIXOTO et al., 2019).

A comparação de parasitos com virulências distintas pode auxiliar na identificação de fatores de virulência. A título de exemplo, a cepa BH400 de *L. (L.) infantum* infecta mais macrófagos *in vitro* e causa infecções com maior carga parasitária e quadro clínico mais grave em hamsters do que a cepa BH46. Na comparação do proteoma de promastigotas por eletroforese diferencial em gel foram identificados 96 *spots* diferencialmente abundantes entre as duas cepas. Vinte proteínas eram mais abundantes na cepa BH400, entre elas fatores de virulência como a proteína de membrana de kinetoplastídeos 11 e a enolase, proteases, chaperonas e proteínas do sistema de defesa antioxidante. Estas proteínas, em conjunto com várias outras, devem atuar de maneira coordenada para promover a maior virulência da cepa BH400 (DA FONSECA PIRES et al., 2014).

A infectividade *in vivo* e *in vitro* de promastigotas da cepa PH8 de *L. (L.) amazonensis* é atenuada com o cultivo axênico prolongado. A comparação do proteoma de culturas com diferentes passagens mostra que a abundância de fatores de virulência como a triparedoxina peroxidase (TXNPx), metalopeptidases, proteína de choque térmico 70 (HSP70) e proteína disulfeto isomerase decai ao longo da cultura. Em contrapartida, foi observado um aumento da abundância de diversas proteínas metabólicas em promastigotas cultivados por 150 dias (MAGALHÃES et al., 2014).

Durante seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado, os parasitos de *Leishmania* se diferenciam de promastigotas procíclicos em promastigotas metacíclicos infectantes. A análise das alterações decorrentes da metaciclogênese também pode auxiliar na caracterização de proteínas envolvidas no estabelecimento inicial do parasito no hospedeiro vertebrado (CAPELLI-PEIXOTO et al., 2019).

A metaciclogênese também ocorre em culturas axênicas e é estimulada pela queda do pH e pela falta de nutrientes como a purina; conseqüentemente promastigotas metacíclicos são mais abundantes durante a fase estacionária da cultura (BATES; TETLEY, 1993; SACKS, 1989; SACKS; PERKINS, 1984; SERAFIM et al., 2012). A análise proteômica comparativa de promastigotas de *L. (L.) pifanoi* provenientes de diferentes fases da cultura constatou um enriquecimento de proteínas pertencentes à via glicolítica na fase estacionária tardia (ALCOLEA et al., 2016). O fator de enlogação 2, HSP70, TXNPx, aldeído desidrogenase,

aconitase e 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA sintase também foram identificados como mais abundantes nessa fase (ALCOLEA et al., 2016).

Embora culturas de fase estacionária sejam enriquecidas em promastigotas metacíclicas, ainda apresentam composição mista. Para uma análise mais precisa, promastigotas metacíclicas podem ser purificadas por meio de centrifugação por gradiente de densidade ou com auxílio de lectinas e anticorpos monoclonais específicos, que variam dependendo da espécie de *Leishmania* (CHAVES et al., 2003; DA SILVA; SACKS, 1987; SPÄTH; BEVERLEY, 2001). No proteoma de membrana de *L. (L.) chagasi*, quatro isoformas da GP63 e uma da GP64 foram detectadas apenas em promastigotas metacíclicas, enquanto diversos transportadores de nutrientes e prótons foram identificados exclusivamente em promastigotas procíclicas (YAO et al., 2010). Apesar do enriquecimento de proteínas de membrana, várias proteínas citoplasmáticas também foram detectadas (YAO et al., 2010). Algumas delas, relacionadas à tradução e transporte de proteínas, estão presentes apenas na forma não infectante, em concordância com o que foi observado na análise proteômica de *L. (L.) major* (MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008; YAO et al., 2010). Além dessas proteínas, β -tubulina, α -tubulina e proteína paraflagelar rod 1D foram identificadas como mais abundantes em promastigotas metacíclicas de *L. (L.) major* (MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008). Na análise comparativa do proteoma de promastigotas de *L. (L.) infantum*, as proteínas mais abundantes em promastigotas metacíclicas participam principalmente de processos como o ciclo do ácido cítrico, glicólise, metabolismo de manose, metabolismo de piruvato, fosforilação oxidativa, defesa antioxidativa, proteólise e motilidade (MOREIRA et al., 2014).

A grande maioria dos estudos em *Leishmania* realiza a análise proteômica por meio de eletroforese bidimensional seguida de espectrometria de massa (MS). No entanto, um número limitado de proteínas pode ser identificado por meio dessa abordagem. Recentemente, o desenvolvimento de técnicas *gel-free* viabilizou a análise mais abrangente das proteínas diferentemente expressas durante a metaciclogênese de *L. (L.) major* e *L. (L.) tropica* (AMIRI-DASHATAN et al., 2020; AMIRI-DASHATAN; REZAEI-TAVIRANI; AHMADI, 2020). No proteoma de *L. (L.) major* foram identificadas 179 proteínas, 50 delas detectadas apenas em promastigotas metacíclicas e 35 em promastigotas procíclicas (AMIRI-DASHATAN et al., 2020). Diversas proteínas participantes do metabolismo de carboidratos e da cadeia de transporte de elétrons foram identificadas como mais abundantes em promastigotas metacíclicas, assim como as proteínas HSP 60, glutatona peroxidase, TXNPx e peroxiredoxina 2 (AMIRI-DASHATAN et al., 2020). Além disso, a paraflagelar Rod 2C e 1D, a α -tubulina e a cadeia leve de dineína estão entre as proteínas exclusivamente detectadas em promastigotas

metacíclicos (AMIRI-DASHATAN et al., 2020). Por outro lado, algumas subunidades ribossômicas, o fator de alongação 2 e o fator de alongação 1 β são mais abundantes em promastigotas procíclicos (AMIRI-DASHATAN et al., 2020).

Apesar das variações entre espécies, as análises proteômicas indicam que a metaciclogênese é acompanhada pelo aumento da expressão de proteínas do citoesqueleto e do flagelo, compatível com o aumento de motilidade do parasito após sua diferenciação (AMIRI-DASHATAN et al., 2020; MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008; MOREIRA et al., 2014). Diversos estudos também demonstraram maior abundância de proteínas pertencentes à via glicolítica e à fosforilação oxidativa em promastigotas metacíclicos, indicando maior gasto energético por essas células (ALCOLEA et al., 2016; AMIRI-DASHATAN et al., 2020; MOREIRA et al., 2014; YAO et al., 2010). Além de gerar ATP, a cadeia de transporte de elétrons é a maior fonte endógena de EROs. Como esperado, a conversão para forma infectante é coincidente com o aumento da abundância de proteínas que fazem parte dos mecanismos de defesa antioxidante (AMIRI-DASHATAN et al., 2020). Em compensação, proteínas relacionadas à síntese e transporte de proteínas são mais abundantes em promastigotas procíclicos replicativos (AMIRI-DASHATAN et al., 2020; MOJTAHEDI; CLOS; KAMALI-SARVESTANI, 2008; YAO et al., 2010).

As análises proteômicas podem ainda ser utilizadas para determinar o papel de proteínas específicas na virulência do parasito. A título de exemplo, a oligopeptidase B (OPB) é um importante fator de virulência de *Trypanosoma cruzi* envolvido na invasão da célula hospedeira, contudo o seu papel em parasitos do gênero *Leishmania* ainda não foi esclarecido (CALER et al., 1998). Análise proteômica comparativa e ensaios de infecção *in vivo* com promastigotas de *L. (L.) donovani* selvagem e nocaute para OPB foram realizados com o intuito de esclarecer a sua função (SWENERTON et al., 2011). A deleção da OPB retarda o desenvolvimento da lesão em camundongos BALB/c e, curiosamente, promove o acúmulo de uma isoforma inativa da enolase na superfície dos promastigotas, como observado na análise proteômica (QUÍÑONES et al., 2007; SWENERTON et al., 2011). Já foi demonstrado que a enolase se liga ao plasminogênio, o que levou os autores a sugerir que em promastigotas a expressão de uma isoforma inativa da enolase em sua superfície pode facilitar a entrada do parasito nos macrófagos (SWENERTON et al., 2011; VANEGAS et al., 2007).

1.11 Cepas PH8 e LV79 de *L. (L.) amazonensis*

Recentemente, nosso grupo comparou a virulência das cepas PH8 e LV79 de *L. (L.) amazonensis*. Em camundongos C57BL/6 e BALB/c, promastigotas e amastigotas da cepa PH8 causam lesões significativamente maiores e com maior carga parasitária do que parasitos da cepa LV79. Ensaios de MTT e de quantificação de atividade tripsina-*like* indicam que amastigotas da cepa PH8 provenientes de lesões possuem maior viabilidade e, em concordância, geraram culturas com maior quantidade de promastigotas. Mesmo após a normalização pelo número de amastigotas viáveis, parasitos da cepa PH8 continuam a gerar lesões maiores, indicando que viabilidade por si só não é responsável pela diferença de virulência observada (DE REZENDE et al., 2017).

Na análise dos proteomas de frações solúveis de amastigotas de PH8 e LV79 recuperados de lesões de camundongos BALB/c foram identificadas 301 proteínas no total. Dessas proteínas, 267 foram detectadas nas duas cepas, das quais 12 foram significativamente mais abundantes em PH8 e 25 em LV79, indicando que as cepas possuem perfis de expressão bastante distintos. Curiosamente, as proteínas TXNPx, HSP70 e superóxido dismutase, associadas à resistência ao estresse oxidativo e térmico, foram mais abundantes em LV79. Em contrapartida, a GP63 se mostrou mais abundante em frações solúveis da cepa PH8, o que pode contribuir para sua virulência elevada (DE REZENDE et al., 2017).

Assim como os amastigotas, promastigotas das duas cepas apresentam fenótipos diferentes. Em ensaio de fagocitose *in vitro*, um maior número de promastigotas da cepa PH8 adere e é internalizado por MDMO após cinco minutos de interação (DE REZENDE et al., dados não publicados). Análises de *western blot* e imunofluorescência utilizando um anticorpo anti-LPG que reconhece as unidades repetitivas da molécula (CA7AE) mostraram maior marcação em LV79, indicando maior abundância de LPG nessa cepa ou diferenças na composição da molécula (DE REZENDE et al., dados não publicados).

Nossa hipótese é que a composição ou abundância de moléculas presentes na membrana de promastigotas das cepas PH8 e LV79 sejam responsáveis pelas diferenças de aderência e fagocitose observadas. Com exceção de GP63, pouco se sabe sobre o papel das proteínas de membrana na virulência de *Leishmania*. Por essa razão, o enfoque principal deste projeto foi identificar proteínas potencialmente envolvidas na adesão e internalização de promastigotas por meio na análise comparativa do proteoma de membrana dos promastigotas das duas cepas.

5. CONCLUSÃO

Em comparação à cepa LV79, promastigotas de fase estacionária inicial de PH8 estabelecem infecções *in vitro* com maior carga parasitária e possuem maior resistência à lise mediada pelo complemento murino. A análise bioquímica preliminar do LPG indicou que a composição dessa molécula difere entre as cepas. Além disso, observamos que cada cepa possui um perfil característico na análise comparativa do proteoma de membrana. Essas diferenças entre as cepas podem auxiliar a elucidar os mecanismos e moléculas empregados pelo parasito na adesão e fagocitose por macrófagos e na resistência à lise pelo complemento. A título de exemplo, as proteínas LABCG1 e enolase, sabidamente associadas com virulência, foram detectadas como mais abundantes em promastigotas de PH8 e podem contribuir para sua maior infectividade. Curiosamente, o fator de virulência GP63 foi encontrado como mais abundante em promastigotas de LV79 na análise proteômica e na validação por *western blot*. No entanto, a zimografia mostra que a atividade proteolítica de GP63 é superior em PH8. Esse e outros ensaios de atividade enzimática indicam que a atividade das proteínas pode ser regulada e não é diretamente proporcional a sua expressão. Estudos funcionais adicionais precisam ser realizados para melhor compreender e confirmar o papel de proteínas individuais na infectividade das duas cepas. Uma análise de funções indicou que as proteínas mais abundantes em PH8 participam principalmente do metabolismo de carboidratos, composição do citoesqueleto e do tráfego de vesículas. Esse perfil é semelhante ao descrito na literatura para promastigotas metacíclicos. A análise morfológica indicou que promastigotas leptomonas são a população predominante nas culturas das duas cepas e que, ao contrário do que se esperava, promastigotas metacíclicos são mais abundantes na cultura de LV79. Essas análises precisam ser repetidas para confirmar de fato a composição das culturas e para determinar qual seria a sua interferência na análise proteômica.

Além das diferenças de adesão e fagocitose observadas previamente, esse trabalho mostrou que promastigotas das cepas PH8 e LV79 diferem na infectividade *in vitro* e na resistência à lise por complemento murino. Mostramos também diferenças na composição do LPG e na abundância de proteínas entre as duas cepas. Acreditamos que estudá-las com maior profundidade irá contribuir para a compreensão das diferenças de fenótipos observadas entre as cepas. Nossos dados reforçam a robustez da análise proteômica para comparação de cepas de *Leishmania* e sua empregabilidade na busca de fatores de virulência, contudo também chamam atenção para a existência de mecanismos de regulação da atividade enzimática que ainda não são compreendidos.

REFERÊNCIAS

- ABU-DAYYEH, I. et al. Comparative study of the ability of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes to alter macrophage signaling and functions. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2438–2445, jun. 2010.
- ACUÑA, S. M. et al. Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187186, nov. 2017.
- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, jul. 1993.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, mar. 2016.
- AKILOV, O. E. et al. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 5, p. 1188-1196, maio 2007.
- ALCOLEA, P. J. et al. Proteome profiling of the growth phases of *Leishmania pifanoi* promastigotes in axenic culture reveals differential abundance of immunostimulatory proteins. **Acta Tropica**, v. 158, p. 240-247, jun. 2016.
- ALEXANDER, B.; MAROLI, M. Control of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, n. 1, p. 1-18, mar. 2003.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of Immunology**, v. 161, n. 12, p. 6794-6801, dez. 1998.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. DeepLoc: prediction of protein subcellular localization using deep learning. **Bioinformatics**, v. 33, n. 21, p. 3387-3395, nov. 2017.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552-557, dez. 2006.
- ALVES, M. J. et al. Comprehensive glycoprofiling of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 182-192, jan. 2017.
- AMIRI-DASHATAN, N. et al. Quantitative proteomic analysis reveals differentially expressed proteins in *Leishmania major* metacyclogenesis. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104557, dez. 2020.
- AMIRI-DASHATAN, N.; REZAEI-TAVIRANI, M.; AHMADI, N. A quantitative proteomic and bioinformatics analysis of proteins in metacyclogenesis of *Leishmania tropica*. **Acta Tropica**, v. 202, p. 105227, fev. 2020.
- AMULIC, B. et al. Neutrophil function: from mechanisms to disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459-489, jan. 2012.

ANTOINE, J. C. et al. H-2M molecules, like MHC class II molecules, are targeted to parasitophorous vacuoles of *Leishmania*-infected macrophages and internalized by amastigotes of *L. amazonensis* and *L. mexicana*. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 15, p. 2559-2570, ago. 1999.

ATAYDE, V. D. et al. *Leishmania* exosomes and other virulence factors: Impact on innate immune response and macrophage functions. **Cell Immunology**, v. 309, p. 7-18, nov. 2016.

AVILÁN, L. et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 932549, abr. 2011.

AWASTHI, A. et al. CD40 signaling is impaired in *L. major*-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory T cell response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 8, p. 1037-1043, abr. 2003.

BABIOR, B. Phagocytes and oxidative stress. **The American Journal of Medicine**, v. 109, n. 1, p. 33-44, jul. 2000.

BADIRZADEH, A. et al. Arginase activity of *Leishmania* isolated from patients with cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 9, set. 2017.

BANERJEE, S. et al. Attenuated *Leishmania* induce pro-inflammatory mediators and influence leishmanicidal activity by p38 MAPK dependent phagosome maturation in *Leishmania donovani* co-infected macrophages. **Scientific reports**, v. 6, p. 22335, mar. 2016.

BARTHEL, D.; SCHINDLER, S.; ZIPFEL, P. F. Plasminogen is a complement inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 22, p. 18831-18842, maio 2012.

BATES, P. A. et al. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. **Parasitology**, v. 105, n. 2, p. 193-202, out. 1992.

BATES, P. A.; TETLEY, L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. **Experimental Parasitology**, v. 76, n. 4, p. 412-423, jun. 1993.

BEACH, R.; KIILU, G.; LEEUWENBURG, J. Modification of sand fly biting behavior by *Leishmania* leads to increased parasite transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 34, n. 2, p. 278-282, mar. 1985.

BENCHIMOL, M.; DE SOUZA, W. *Leishmania mexicana amazonensis*: attachment to the membrane of the phagocytic vacuole of macrophages *in vivo*. **Zeitschrift fur Parasitenkunde**, v. 66, n.1, p. 25-29, 1981.

BENNIS, I. et al. Psychosocial burden of localised cutaneous Leishmaniasis: a scoping review. **BMC Public Health**, v. 18, n. 1, p. 358, mar. 2018.

BERNSEL, A. et al. TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. W465-W468, jul. 2009.

BERRY, I.; BERRANG-FORD, L. Leishmaniasis, conflict, and political terror: A spatio-temporal analysis. **Social Science & Medicine**, v. 167, p. 140-149, out. 2016.

BERTHOLET, S. et al. *Leishmania donovani*-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 2095-2101, abr. 2003.

BLACKWELL, J. M. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 606-612, jan. 1985.

BLANCHETTE, J. et al. *Leishmania*-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 11, p. 3737-3744, nov. 1999.

BLOS, M. et al. Organ-specific and stage-dependent control of *Leishmania major* infection by inducible nitric oxide synthase and phagocyte NADPH oxidase. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1224-1234, maio 2003.

BOUVIER, J.; ETGES, R. J.; BORDIER, C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 29, p. 15504-15509, dez. 1985.

BRITTINGHAM, A. et al. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 9, p. 4477-4484, set. 1999.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of Immunology**, v. 155, n. 6, p. 3102-3111, set. 1995.

BROTHERTON, M. C. et al. Analysis of membrane-enriched and high molecular weight proteins in *Leishmania infantum* promastigotes and axenic amastigotes. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 8, p. 3974-3985, ago. 2012.

BRYCESON, A. D. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 6, p. 708-737, jan. 1969.

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

CALEGARI-SILVA, T. C. et al. *Leishmania amazonensis* downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1188-1198, jul. 2018.

CALER, E. V. et al. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **EMBO Journal**, v. 17, n. 17, p. 4975-4986, set. 1998.

CAMERON, P. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 3297-3304, set. 2004.

CAMPOS-SALINAS, J. et al. LABC2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, p. e2179, abr. 2013.

CAPELLI-PEIXOTO, J. et al. Proteomics and Leishmaniasis: Potential Clinical Applications. **Proteomics Clinical Applications**, v. 13, n. 6, p. e1800136, nov. 2019.

CARDOSO, C. A. et al. Lipophosphoglycans from dermatropic *Leishmania infantum* are more pro-inflammatory than those from viscerotropic strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200140, set. 2020.

CARLSEN, E. D. et al. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 182, n. 2, p. 109-118, nov. 2015.

CHAGAS, A. C. et al. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n.2, p. e1003923, fev. 2014.

CHAKOUR, R. et al. Both the Fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 5287-5295, set. 2003.

CHAKRABORTY, D. et al. *Leishmania donovani* affects antigen presentation of macrophage by disrupting lipid rafts. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 3214-3124, set. 2005.

CHAUDHURI, G. et al. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 13, p. 7483-7489, maio 1989.

CHAVES, C. S. et al. Characterization of the species- and stage-specificity of two monoclonal antibodies against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 103, n. 3-4, p. 152-159, mar./abr. 2003.

CHEN, D. Q. et al. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 80-86, jan. 2000.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255-260, fev. 2011.

COELHO-FINAMORE, J. M. et al. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 3-4, p. 333-342, mar. 2011.

CONTRERAS, I. et al. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001148, out. 2010.

COOPER, A.; ROSEN, H.; BLACKWELL, J. M. Monoclonal antibodies that recognize distinct epitopes of the macrophage type three complement receptor differ in their ability to inhibit binding of *Leishmania* promastigotes harvested at different phases of their growth cycle. **Immunology**, v. 65, n. 4, p. 511–514, dez. 1988.

CORDWELL, S. J.; THINGHOLM, T. E. Technologies for plasma membrane proteomics. **Proteomics**, v. 10, n. 4, p. 611-627, fev. 2010.

COTA, G. F. et al. The Cure Rate after Placebo or No Therapy in American Cutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149697, fev. 2016.

COURRET, N. et al. Presentation of the *Leishmania* antigen LACK by infected macrophages is dependent upon the virulence of the phagocytosed parasites. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 3, p. 762-773, mar. 1999.

COX, J.; MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1367-1372, dez. 2008.

COX, J.; MANN, M. Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 273-299, jun. 2011.

CREPALDI, F. et al. Mapping Alterations Induced by Long-Term Axenic Cultivation of *Leishmania amazonensis* Promastigotes With a Multiplatform Metabolomic Fingerprint Approach. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 9, p. 403, dez. 2019.

CUPOLILLO, E. et al. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142-144, abr. 2000.

DA FONSECA PIRES, S. et al. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 4, p. 1860-1872, abr. 2014.

DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. 2802-2806, nov. 1987.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine Leishmaniasis Control in the Context of One Health. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 12, p. 1–4, dez. 2019.

DANTAS-TORRES, F. et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 3, p. 171-176, mar. 2020.

DE ALMEIDA, M. C.; CARDOSO, S. A.; BARRAL-NETTO, M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 153-162, fev. 2003.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1354-1365, set. 2012.

DE FREITAS BALANCO, J. M. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1870-1873, nov. 2001.

DE KOSSODO, S. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and TNF-beta and their receptors in experimental cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1414-1420, abr. 1994.

DE MOURA, T. R. et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e712, jun. 2010.

DE REZENDE, E. et al. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006090, nov. 2017.

DE SOUZA, C. S. F. et al. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. **Histology and Histopathology**, v. 33, n. 7, p. 705-716, jul. 2018.

DE SOUZA LEO, S. et al. Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 10, p. 3219-3231, out. 1995.

DEBRABANT, A. et al. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 2, p. 205-217, fev. 2004.

DENISE, H. et al. Expression of multiple CPB genes encoding cysteine proteases is required for *Leishmania mexicana* virulence *in vivo*. **Infection and immunity**, v. 71, n. 6, p. 3190-3195, jun. 2003.

DERMINE, J. F. et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan disrupts phagosome microdomains in J774 macrophages. **Cell Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1263-1270, set. 2005.

DERMINE, J. F. et al. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. **Cell Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 115-126, abr. 2000.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1455, n. 2-3, p. 341-352, out. 1999.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. The lipophosphoglycan of *Leishmania* and macrophage protein kinase C. **Parasitology Today**, v. 9, n. 12, p. 468-471, dez. 1993.

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

DEY, R. et al. Gut Microbes Egested during Bites of Infected Sand Flies Augment Severity of Leishmaniasis via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host and Microbe**, v. 23, n. 1, p. 134-143.e6, jan. 2018.

DIEFENBACH, A. et al. Type 1 interferon (IFN α / β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, v. 8, n. 1, p. 77-87, jan. 1998.

DIXIT, U. G. et al. Complement receptor 3 mediates ruffle-like, actin-rich aggregates during phagocytosis of *Leishmania infantum* metacyclics, **Experimental Parasitology**, 107968, ago. 2020. No prelo.

DOEHL, J. S. et al. *Leishmania* HASP and SHERP Genes Are Required for *In Vivo* Differentiation, Parasite Transmission and Virulence Attenuation in the Host. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006130, jan. 2017.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 276, dez. 2012.

DUBOIS, M. et al. A colorimetric method for the determination of sugars. **Nature**, v. 168, n. 4265, p. 167, jul. 1951.

EJAZI, S. A.; ALI, N. Developments in diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis during the last decade and future prospects. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 1, p. 79-98, jan. 2013.

ESCOBAR, M. A. et al. American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis (Tegumentary): A Diagnostic Challenge. **Tropical Doctor**, v. 22, n. S1, p. S69-78, 1992.

ESPIAU, B. et al. A soluble pyrophosphatase, a key enzyme for polyphosphate metabolism in *Leishmania*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1516-1523, jan. 2006.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, abr. 2018.

FARLIK, M. et al. Nonconventional initiation complex assembly by STAT and NF- κ B transcription factors regulates nitric oxide synthase expression. **Immunity**, v. 33, n. 1, p. 25-34, jul. 2010.

- FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411-420, fev. 2006.
- FORESTIER, C. L.; GAO, Q.; BOONS, G. J. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate?. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 4, p. 193, jan. 2015.
- FORGET, G.; GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Proteasome-mediated degradation of STAT1alpha following infection of macrophages with *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 34, p. 30542-30549, ago. 2005.
- FORGET, G. et al. Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 11, p. 3185-3196, nov. 2001.
- FORGET, G. et al. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani*-induced inhibition of nitric oxide production. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6272-6279, nov. 2006.
- FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 2, p. 238-245, mar. 2010.
- FRANKE, E. D. et al. Growth cycle-dependent generation of complement-resistant *Leishmania* promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 134, n. 4, p. 2713-2718, abr. 1985.
- FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. G. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119-132, mar. 2014.
- FRUTH, U.; SOLIOZ, N.; LOUIS, J. A. *Leishmania major* interferes with antigen presentation by infected macrophages. **Journal of Immunology**, v. 150, n. 5, p. 1857-1864, mar. 1993.
- FUJIKI, Y. et al. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. **Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 1, p. 97-102, abr. 1982.
- GABRIEL, C. et al. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **Journal of Immunology**, v. 185, n.7, p. 4319-4327, out. 2010.
- GAUR, U. et al. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446-8453, dez. 2007.
- GEMETCHU, T. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (*Diptera: Psychodidae*). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 68, n. 1, p. 111-124, mar. 1974.
- GHOSH, S. et al. Generation of ceramide in murine macrophages infected with *Leishmania donovani* alters macrophage signaling events and aids intracellular parasitic survival. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 223, n. 1-2, p. 47-60, jul. 2001.

GOLDBERG, T. et al. LocTree3 prediction of localization. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. W350–W355, jul. 2014.

GOMEZ, M. A. et al. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. **Science Signaling**, v. 2, n. 90, p. ra58, set. 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, abr. 2010.

GREEN, S. J. et al. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4290-4297, dez. 1990.

GREGORY, D. J. et al. A novel form of NF-kappaB is induced by *Leishmania* infection: involvement in macrophage gene expression. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 1071-1081, abr. 2008.

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

GUEIRARD, P. et al. Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. **Cell Microbiology**, v. 10, n. 1, p.100-111, jan. 2008.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 4, p. 1732–1740, abr. 2014.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, abr. 2009.

GURUNG, P.; KANNEGANTI, T. D. Innate immunity against *Leishmania* infections. **Cell Microbiology**, v.17, n. 9, p. 1286–1294, ago. 2015.

GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1553-1558, abr.1993.

HALLÉ, M. et al. The *Leishmania* surface protease GP63 cleaves multiple intracellular proteins and actively participates in p38 mitogen-activated protein kinase inactivation. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 11, p. 6893–6908, mar. 2009.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926; p. 927-928, dez. 2015.

HASSANI, K. et al. Absence of metalloprotease GP63 alters the protein content of *Leishmania* exosomes. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e95007, abr. 2014.

HERMIDA, M. D. et al. *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, p. 450, ago. 2014.

HOLM, A. et al. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC α and defective phagosome maturation. **Cell Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 439-447, jul. 2001.

HORTON, P. et al. WoLF PSORT: protein localization predictor. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W585-W587, jul. 2007.

HURRELL, B. P. et al. Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004929, maio 2015.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392-401, maio 2016.

IBORRA, S. et al. Vaccine candidates against *Leishmania* under current research. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 4, p. 323-334, abr. 2018.

IBRAIM, I. C. et al. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 54, mar. 2013.

ILG, T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. **The EMBO journal**, v. 19, n. 9, p. 1953–1962, maio 2000.

ISNARD, A. et al. Impact of *Leishmania* infection on host macrophage nuclear physiology and nucleopore complex integrity. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 3, p. e1004776, mar. 2015.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 72, maio 2012.

JEBBARI, H. et al. *Leishmania major* promastigotes inhibit dendritic cell motility in vitro. **Infection and immunity**, v. 70, n. 2, p. 1023–1026, fev. 2002.

Jl, J. et al. Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 338-345, abr. 2002.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426-433, mar. 2012.

JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 33-40, mar. 2002.

KAMHAWI, S. et al. A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 329–341, out. 2004.

KAYE, P. M. et al. Antigens targeted to the *Leishmania* phagolysosome are processed for CD4+ T cell recognition. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 9, p. 2311-2319, set. 1993.

KAYE, P. M. et al. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 24, n. 11, p. 2850-2854, nov. 1994.

KEDZIERSKI, L. et al. A leucine-rich repeat motif of *Leishmania* parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 8, p. 4902-4906, abr. 2004.

KELLY, B. L.; NELSON, T. N.; MCMASTER, W. R. Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of L. major leishmanolysin genes (GP63). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 101-104, ago. 2001.

KHAN, Y. A.; ANDREWS, N. W.; MITTRA, B. ROS regulate differentiation of visceralizing *Leishmania* species into the virulent amastigote form. **Parasitology Open**, v. 4, p. e9, 2018.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, maio/jun. 1999.

KIMA, P. E. et al. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 6, p. 1063-1068, mar. 2000.

KIMA, P. E. et al. *Leishmania*-infected macrophages sequester endogenously synthesized parasite antigens from presentation to CD4+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 12, p. 3163-3169, dez. 1996.

KROEGER, A.; AVILA, E. V.; MORISON, L. Insecticide impregnated curtains to control domestic transmission of cutaneous leishmaniasis in Venezuela: cluster randomised trial. **The BMJ**, v. 325, n. 7368, p. 810-813, out. 2002.

KUMAR, A. et al. Proteomic analyses of membrane enriched proteins of *Leishmania donovani* Indian clinical isolate by mass spectrometry. **Parasitology International**, v. 64, n. 4, p. 36-42, ago. 2015.

KUMAR, G. A. et al. *Leishmania donovani* Internalizes into Host Cells via Caveolin-mediated Endocytosis. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p. 12636, set. 2019.

LAINSON, R.; READY, P. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian “uta”, as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Great Britain, v. 206, n. 1164, p. 307–318, dez. 1979.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. **Evolution, classification and geographical distribution.** In: PETERS, W.; KILLICK KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine Volume I.* Londres: Academic Press, 1987. p. 1–120.

LANG, T. et al. Distribution of MHC class I and of MHC class II molecules in macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 1, p. 69-82, jan. 1994a.

LANG, T. et al. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. **Journal of Cell Science**, v. 107, n. 8, p. 2137-50, ago. 1994b.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, fev. 2002.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 525-550, jan. 1997.

LERM, M. et al. *Leishmania donovani* requires functional Cdc42 and Rac1 to prevent phagosomal maturation. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2613-2618, maio 2006.

LINCOLN, L. M. et al. Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 137, n. 1, p.185-189, set. 2004.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes induce periphagosomal F-actin accumulation through retention of the GTPase Cdc42. **Cell Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1647-1658, nov. 2005.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania donovani* amastigotes is Rac1 dependent and occurs in the absence of NADPH oxidase activation. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 10, p. 2735-2744, out. 2006.

LODGE, R.; DIALLO, T. O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cell Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1922-1931, dez. 2006.

LOHOFF, M. et al. The Th1/Th2 paradigm and experimental murine leishmaniasis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 115, n. 3, p. 191-202, mar. 1998.

LUYO-ACERO, G. E. et al. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. **Parasitology**, v. 128, n. 5, p. 483-491, maio 2004.

LYNN, M. A.; MARR, A. K.; MCMASTER, W. R. Differential quantitative proteomic profiling of *Leishmania infantum* and *Leishmania mexicana* density gradient separated membranous fractions. **Journal of Proteomics**, v. 82, p. 179-192, abr. 2013.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, dez. 2010.

MACIEJ-HULME, M. L.; SKIDMORE, M. A.; PRICE, H. P. The role of heparan sulfate in host macrophage infection by *Leishmania* species. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 4, p. 789-796, ago. 2018.

MAGALHÃES, R. D. et al. Identification of differentially expressed proteins from *Leishmania amazonensis* associated with the loss of virulence of the parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2764, abr. 2014.

MAHONEY, A. B. et al. Intra-species and stage-specific polymorphisms in lipophosphoglycan structure control *Leishmania donovani*-sand fly interactions. **Biochemistry**, v. 38, n. 31, p. 9813-9823, ago. 1999.

MALDONADO, J. et al. A study of cutaneous lesions caused by *Leishmania mexicana* in plasminogen-deficient mice. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 80, n. 3, p. 289-94, jun. 2006.

MANZANO, J. I. et al. *Leishmania* LABC1 and LABC2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 267, maio 2017.

MARTH, T.; KELSALL, B. L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 11, p. 1987-1995, jun. 1997.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. et al. *Leishmania* Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 883, maio 2018.

MARTINS, T. V. et al. *Leishmania chagasi* heparin-binding protein: Cell localization and participation in *L. chagasi* infection. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 204, n. 1, p. 34-43, nov. 2015.

MATTE, C.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* amastigotes impair gamma interferon-induced STAT1alpha nuclear translocation by blocking the interaction between STAT1alpha and importin-alpha5. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3736-3743, set. 2010.

MATTE, C. et al. Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 9, p. 2555-2564, set. 2000.

MCCONVILLE, M. J. et al. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 10, p. 3593-600, out. 1992.

MCGWIRE, B. S.; CHANG, K. P.; ENGMAN, D. M. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 1008-1010, fev. 2003.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n.1, p. 7-14, jan. 2014.

MCKEAN, P. G. et al. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. **Cell Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 511-523, ago. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, 2017. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_BR_A.pdf?ua=1. Acesso em: 15 de nov. 2020

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose visceral**. Brasília, 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscerai_1edicao.pdf. Acesso em: 15 de nov. 2020

MITTRA, B. et al. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 401-416, fev. 2013.

MOHEBALI, M.; NADIM, A.; KHAMESIPOUR, A. An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines. **Acta Tropica**, v. 200, p.105173, dez. 2019.

MOJTAHEDI, Z.; CLOS, J.; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 422-429, jul. 2008.

MOLLINEDO, F. et al. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 45, p. 34528–34536, ago. 2010.

MOREIRA, W. et al. Proteomic analysis of metacyclogenesis in *Leishmania infantum* wild-type and PTR1 null mutant. **EuPA Open Proteomics**, v. 4, p. 171–183, set. 2014.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785-2789, out. 1985.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. **Nature**, v. 327, n. 6120, p. 329-31, maio/jun. 1987.

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, ago. 2004.

MOTTRAM, J. C. et al. Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 6008-6013, jun. 1996.

MURAILLE, E. et al. Direct visualization of peptide/MHC complexes at the surface and in the intracellular compartments of cells infected in vivo by *Leishmania major*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001154, out. 2010.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741-746, fev. 1999.

MUXEL, S. M. et al. Arginine and Polyamines Fate in *Leishmania* Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2682, Jan. 2018.

MUXEL, S. M. et al. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. **Scientific Reports**, v. 7, p. 44141, mar. 2017.

MYSKOVA, J. et al. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 3, p. 317-324, mar. 2007.

NANDAN, D.; LO, R.; REINER, N. E. Activation of phosphotyrosine phosphatase activity attenuates mitogen-activated protein kinase signaling and inhibits c-FOS and nitric oxide synthase expression in macrophages infected with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4055-4063, ago. 1999

NANDAN, D.; REINER, N. E. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1. **Infection and immunity**, v. 63, n. 11, p. 4495-4500, nov. 1995.

NASHLEANAS, M.; KANALY, S.; SCOTT, P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 11, p. 5506-5513, jun. 1998.

NOGUEIRA, P. M. et al. Lipophosphoglycan polymorphisms do not affect *Leishmania amazonensis* development in the permissive vectors *Lutzomyia migonei* and *Lutzomyia longipalpis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 608, dez. 2017.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 3, p. 489-493, mar. 2016.

OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653-664, dez. 2015.

OLEKHNOVITCH, R. et al. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 4, p. 1711-1722, abr. 2014.

OLIVEIRA, I. H. R. et al. Assessing the composition of the plasma membrane of *Leishmania (Leishmania) infantum* and *L. (L.) amazonensis* using label-free proteomics. **Experimental Parasitology**, v. 218, p. 107964, nov. 2020.

OLIVIER, M.; BROWNSEY, R. W.; REINER, N. E. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7481-7485, ago. 1992.

OLLIARO, P. L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 763-774, dez. 2005.

ONG, G. L.; BAKER, A. E.; MATTES, M. J. Analysis of high complement levels in *Mus hortulanus* and BUB mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 154, n. 1, p. 37-45, set. 1992.

ONG, G. L.; MATTES, M. J. Mouse strains with typical mammalian levels of complement activity. **Journal of Immunological Methods**, v. 125, n. 1-2, p. 147-158, dez. 1989.

ORDOÑEZ-RUEDA, D. et al. A hypomorphic mutation in the Gfi1 transcriptional repressor results in a novel form of neutropenia. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 9, p. 2395-2408, set. 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis & World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. Geneva, 2010. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44412>. Acesso em: 30 de jan. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **Weekly Epidemiological Record**, v. 92, n. 38, p. 557-565, set. 2017a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis country profile — 2015 Brazil**. Geneva, 2017b. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Brazil_2015-hl3.pdf?ua=1. Data do último acesso: 30 de jan 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Geneva, 2020. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em: 15 de jan 2020.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925-932, ago. 2016.

PARANAÍBA, L. F. et al. *Leishmania enriettii*: biochemical characterisation of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. **Parasites & vectors**, v. 8, p. 31, jan. 2015.

PAUWELS, A. M. et al. Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 6, p. 407-422, jun. 2017.

PETERS, C. et al. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 12, p. 3715–3724, dez. 1995.

PETERS, N. C. et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, ago. 2008.

PETERSEN, E. A. et al. Specific inhibition of lymphocyte-proliferation responses by adherent suppressor cells in diffuse cutaneous leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 306, n. 7, p. 387-392, fev. 1982.

PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322-8333, dez. 2005.

PIMENTA, P. F. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, n. 4, p. 359-369, abr. 1997.

PIMENTA, P. F. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1812-1815, jun. 1992.

PIMENTA, P. F.; SARAIVA, E. M.; SACKS, D. L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Experimental Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 191-204, fev. 1991.

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 79-82, fev. 2007.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, jan. 2015.

POLANDO, R. E. et al. Mannose receptor (MR) and Toll-like receptor 2 (TLR2) influence phagosome maturation during *Leishmania* infection. **Parasite Immunology**, v. 40, n. 4, p. e12521, abr. 2018.

POLANDO, R. E. et al. The roles of complement receptor 3 and Fcγ receptors during *Leishmania* phagosome maturation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 6, p. 921-932, jun. 2013.

PORROZZI, R. et al. Cross-immunity experiments between different species or strains of *Leishmania* in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 297-305, set. 2004.

PRINA, E. et al. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 4, p. 2050-2061, ago. 1993.

PRIVÉ, C.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the activation of mitogen-activated protein kinases p38, c-Jun N-terminal kinase, and extracellular signal-regulated kinase-1/2 during infection of naive macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 8, p. 2235-2244, ago. 2000.

PROUDFOOT, L. et al. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 20, p. 10984–10989, out. 1996.

PUENTES, S. M. et al. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania* major promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 3, p. 887-902, mar. 1988.

PUENTES, S. M. et al. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4311-4316, dez. 1990.

QUEIROZ, R. M. et al. Comprehensive proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigote cell surface proteins by two complementary methods. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 7, p. 3255-3263, jul. 2013.

QUIÑONES, W. et al. *Leishmania mexicana*: molecular cloning and characterization of enolase. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 241-251, jul. 2007.

RAHMAN, M. et al. Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 66-69, jul. 2011.

RAMER-TAIT, A. E. et al. Differential surface deposition of complement proteins on logarithmic and stationary phase *Leishmania chagasi* promastigotes. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 6, p. 1109-1116, dez. 2012.

RAMOS, C. S. et al. *Leishmania amazonensis* META2 protein confers protection against heat shock and oxidative stress. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 228-237, jan. 2011.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281-1283, mar. 2004.

REAL, F. et al. Cell-to-cell transfer of *Leishmania amazonensis* amastigotes is mediated by immunomodulatory LAMP-rich parasitophorous extrusions. **Cell Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 1549-1564, out. 2014.

REINER, N. E.; NG, W.; MCMASTER, W. R. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. **Journal of Immunology**, v. 138, n. 6, p. 1926-1932, mar. 1987.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, jan. 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, set. 2007.

REYBURN, H. et al. A randomized controlled trial of insecticide-treated bednets and chaddars or top sheets, and residual spraying of interior rooms for the prevention of cutaneous

leishmaniasis in Kabul, Afghanistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 361-366, jul./ago. 2000.

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002536, fev. 2012.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 59, maio 2012.

RICARDO-CARTER, C. et al. *Leishmania major* inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 12, p. 409-420, dez. 2013.

RIJAL, S. et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 11, p. 1530-1538, jun. 2013.

RITMEIJER, K. et al. Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. **Tropical Medicine & International Health**, v. 12, n. 3, p. 404-414, mar. 2007.

RODRÍGUEZ, N. E.; GAUR, U.; WILSON, M. E. Role of caveolae in *Leishmania chagasi* phagocytosis and intracellular survival in macrophages. **Cell Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1106–1120, jul. 2006.

ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, n. 3, v. 6, p. e91, jun. 2007.

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, n. 5, p. 495–507, maio 2002.

ROGERS, M. E. et al. *Leishmania* chitinase facilitates colonization of sand fly vectors and enhances transmission to mice. **Cell Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1363–1372, jun. 2008.

ROGERS, M. E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463-467, jul. 2004.

ROSENTHAL, L. A. et al. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 6, p. 2206-2215, jun. 1996.

ROSS, G. D.; CAIN, J. A.; LACHMANN, P. J. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. **Journal of Immunology**, v. 134, n. 5, p. 3307-3315, maio 1985.

ROY, K. et al. Cholesterol Corrects Altered Conformation of MHC-II Protein in *Leishmania donovani* Infected Macrophages: Implication in Therapy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004710, maio 2016.

ROY, S. et al. Integrity of the actin cytoskeleton of host macrophages is essential for *Leishmania donovani* infection. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1838, n. 8, p. 2011–2018, ago. 2014.

ROY, S.; MANDAL, C. *Leishmania donovani* Utilize Sialic Acids for Binding and Phagocytosis in the Macrophages through Selective Utilization of Siglecs and Impair the Innate Immune Arm. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004904, ago. 2016.

RUSSELL, D. G.; WRIGHT, S. D. Complement receptor type 3 (CR3) binds to an Arg-Gly-Asp-containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 168, n. 1, p. 279-292, jul. 1988.

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

SACKS, D. L. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. **Infectious Agents and Diseases**, v. 1, n. 4, p. 200-206, ago. 1992.

SACKS, D. L.; BRODIN, T. N.; TURCO, S. J. Developmental modification of the lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes during metacyclogenesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 225-233, set./out. 1990.

SACKS, D. L. et al. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 2, p. 685-697, fev. 1995.

SACKS, D. L. et al. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 406-411, jan. 2000.

SACKS, D. L. et al. The role of the lipophosphoglycan of *Leishmania* in vector competence. **Parasitology**, v. 108, n. S1, p. S55-S62, 1994.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417-1419, mar. 1984.

SAHA, B. et al. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 9, p. 2492-2498, set. 1995.

SAHA, S. et al. *Leishmania donovani* Exploits Macrophage Heme Oxygenase-1 To Neutralize Oxidative Burst and TLR Signaling-Dependent Host Defense. **Journal of Immunology**, v. 202, n. 3, p. 827-840, fev. 2019.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 383–391, ago. 2009.

SANTOS, M. G. et al. Correlation of meta 1 expression with culture stage, cell morphology and infectivity in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 190-193, mar. 2011.

SARAIVA, E. M. et al. Flow cytometric assessment of *Leishmania spp* metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, n. 1, p. 39-47, maio 2005.

SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 20, p. 9944–9948, out. 1992.

SCHÖNLAU, F. et al. In experimental leishmaniasis deficiency of CD18 results in parasite dissemination associated with altered macrophage functions and incomplete Th1 cell response. **European Journal of Immunology**, v. 30, n. 9, p. 2729-2740, set. 2000.

SCIANIMANICO, S. et al. Impaired recruitment of the small GTPase rab7 correlates with the inhibition of phagosome maturation by *Leishmania donovani* promastigotes. **Cell Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 19-32, jul. 1999.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, jun. 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, set. 2016.

SECUNDINO, N. et al. Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies. **Cellular Microbiology**, v. 12, n.7, p. 906–918, jul. 2010.

SERAFIM, T. D. et al. *Leishmania* metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 9, p. e1833, set. 2012.

SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, fev. 2001.

SILVA, E. S. et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 145-149, maio/jun. 2002. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652002000300006&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 14 nov. 2020.

SOARES, R. P. et al. *Leishmania braziliensis*: a novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 3, p. 245-253, mar. 2005.

SOARES, R. P. et al. *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 121, n. 2, p. 213-224, maio 2002.

SOARES, R. P. et al. *Leishmania tropica*: intraspecific polymorphisms in lipophosphoglycan correlate with transmission by different *Phlebotomus* species. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 1-2, p. 105-114, maio/jun. 2004.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 100, n. S1, p. S34-40, dez. 2006.

SOUZA, A. E. et al. Characterization of a multi-copy gene for a major stage-specific cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*. **FEBS Letters**, v. 311, n. 2, p. 124-127, out. 1992.

SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. **Experimental Parasitology**, v. 99, n. 2, p. 97-103, out. 2001.

SPÄTH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 9258-9263, ago. 2000.

SPÄTH, G. F. et al. 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, ago. 2003.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p.1-6, jan. 2011.

STEIGERWALD, M.; MOLL, H. *Leishmania major* modulates chemokine and chemokine receptor expression by dendritic cells and affects their migratory capacity. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2564-2567, abr. 2005.

STENGER, S. et al. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1501-1514, abr. 1996.

STIERHOF, Y. D. et al. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European Journal of Cell Biology**, v.78, n. 10, p. 675-689, out. 1999.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543-550, ago. 2012.

SUNDAR, S. et al. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 22, p. 1739-1746, nov. 2002.

SUTTERWALA, F. S.; ROSENTHAL, L. A.; MOSSER, D. M. Cooperation between CR1 (CD35) and CR3 (CD 11b/CD18) in the binding of complement-opsonized particles. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, n. 6, p. 883-890, jun. 1996.

SWENERTON, R. K. et al. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 1, p. 429-440, jan. 2011.

SWIHART, K. et al. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania major* but mount a polarized T helper cell 1-type CD4+ T cell response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 3, p. 961-971, mar. 1995.

TALAMÁS-ROHANA, P. et al. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3 and LFA-1 family of leukocyte integrins. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4817-4824, jun. 1990.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346-8353, dez. 2005.

THIAKAKI, M. et al. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. **Microbes Infection**, v. 8, n. 6, p. 1455-1463, maio 2006.

TIBÚRCIO, R. et al. Molecular Aspects of Dendritic Cell Activation in Leishmaniasis: An Immunobiological View. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 227, fev. 2019.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 65-94, out. 1992.

TURCO, S. J.; SACKS, D. L. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 45, n. 1, p. 91-99, mar. 1991.

TYANOVA, S. et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. **Nature Methods**, v. 13, n. 9, p. 731-740, set. 2016.

TYANOVA, S.; TEMU, T.; COX, J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. **Nature Protocols**, v. 11, n. 12, p. 2301-2319, dez. 2016.

UENO, N. et al. Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes. **Cell Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 1827-1841, dez. 2009.

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

ULIANA, S. R. B.; TRINCONI, C. T.; COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 464-480, abr. 2018.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, jul. 2011.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521-6525, dez. 2004.

VANEGAS, G. et al. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. **Parasitology Research**, v. 101, n. 6, p. 1511-1516, nov. 2007.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97-101, abr. 2003.

VIEIRA, T. et al. Intraspecies Polymorphisms in the Lipophosphoglycan of *L. braziliensis* Differentially Modulate Macrophage Activation via TLR4. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 240, jul. 2019.

VINET, A. F. et al. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000628, out. 2009.

VOLF, P. et al. Blocked stomodeal valve of the insect vector: similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal of Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 1221-1227, out. 2004.

WANDERLEY, J. L. et al. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1834-1839, fev. 2006.

WILKINS, M. et al. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. **Nature Biotechnology**, v. 14, n.1, p. 61-65, jan. 1996.

WILSON, M. E.; PEARSON, R. D. Roles of CR3 and mannose receptors in the attachment and ingestion of *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 2, p. 363-369, fev. 1988.

WOLFRAM, M. et al. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 4, p. 1094-1100, abr. 1995.

WRIGHT, S. D.; SILVERSTEIN, S. C. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 158, n. 6, p. 2016-2023, dez. 1983.

WYLER, D. J.; SYPEK, J. P.; MCDONALD, J. A. *In vitro* parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. **Infection and Immunity**, v. 49, n. 2, p. 305-311, ago. 1985.

YANIK, M. et al. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 464-446, set. 2004.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, nov. 2003.

YAO, C. et al. Proteomic examination of *Leishmania chagasi* plasma membrane proteins: Contrast between avirulent and virulent (metacyclic) parasite forms. **Proteomics Clinical applications**, v. 4, n. 1, p. 4–16, jan. 2010.

XIANG, L. et al. Ascorbate-Dependent Peroxidase (APX) from *Leishmania amazonensis* is a Reactive Oxygen Species-Induced Essential Enzyme That Regulates Virulence. **Infection and immunity**, v. 87, n. 12, p. e00193-19, nov. 2019.

ZELAZNY, A. M. et al. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmania* spp. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 4, p. 415–420, abr. 2005.

ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Deletion of an ATP-binding cassette protein subfamily C transporter in *Leishmania donovani* results in increased virulence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 165-169, out. 2012