

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL

FLÁVIA REGINA NOVAIS DE FREITAS

Avaliação imune e parasitológica da infecção experimental múltipla por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em camundongos BALB/c *wild type* e *knockout* de IFN- γ

São Paulo
2023

FLÁVIA REGINA NOVAIS DE FREITAS

Avaliação imune e parasitológica da infecção experimental múltipla por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em camundongos BALB/c *wildtype* e *knockout* de IFN- γ

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Junior

São Paulo
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Flávia Regina Novaes de

Avaliação imune e parasitológica da infecção experimental múltipla por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em camundongos BALB/c *wild type* e *knockout* de IFN- γ / Flávia Regina Novaes de Freitas. -- São Paulo, 2023.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional.

Orientador: Heitor Franco de Andrade Junior.

Descritores: 1.Camundongos *Knockout* 2.Modelos animais 3.*Leishmania (Leishmania) infantum* 4.Resistência à doença 5.Leishmaniose visceral 6.Suscetibilidade a doenças.

USP/FM/DBD-375/2023

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: FREITAS, Flavia Regina Novais de

Título: Avaliação imune e parasitológica da infecção experimental múltipla por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em camundongos BALB/c *wildtype* e *knockout* de IFN- γ

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Profa. Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof.Dr. _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

RESUMO

Freitas FRN. Avaliação imune e parasitológica da infecção experimental múltipla por promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* em camundongos BALB/c *wildtype* e *knockout* de IFN- γ [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais causadas por protozoários do gênero *Leishmania sp.*. A LV (LV) é a forma mais severa, podendo ser fatal se não tratada. A LV afeta principalmente crianças, adultos acima de 50 anos, pessoas com comorbidades ou imunossuprimidas. A maioria dos casos de LV ocorre no Brasil, leste da África e Índia. A transmissão é feita por flebotomíneos, com os cães atuando como fontes principais de infecção para esses vetores. Muitos infectados não apresentam sintomas, indicando uma resposta imune eficaz. Esse estudo busca entender como a resposta imune eficaz funciona em pacientes assintomáticos com LV. Isso é importante para desenvolver vacinas e tratamentos eficazes. O objetivo deste estudo é investigar o impacto das múltiplas infecções na carga parasitária em camundongos. Para tal, avaliamos como diferentes quantidades de inóculos de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* influenciam na infecção experimental. Inicialmente, padronizamos o modelo utilizando camundongos BALB/c do tipo selvagem (*wildtype*, WT). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, denominados respectivamente como Grupo Controle, Grupo G1 e Grupo G2. Os animais do Grupo Controle permaneceram sem qualquer infecção, enquanto os do Grupo G1 foram submetidos a uma única inoculação contendo 1×10^7 promastigotas de *L. (L) infantum*. Por sua vez, os animais do Grupo G2 foram submetidos a quatro inoculações semelhantes. Posteriormente, para análise e comparação entre os grupos, o tamanho amostral foi aumentado. Além disso, para investigar o papel do interferon-gama (IFN- γ), camundongos *knockout* para esse gene (GKO) foram incluídos no estudo e distribuídos em grupos semelhantes aos do modelo WT. Após 30 dias da infecção, os animais foram eutanasiados e amostras biológicas (sangue da cauda, sangue total, baço, fígado) foram coletadas. Usamos PCR em tempo real para medir a densidade parasitária (parasitas/mg de proteínas) nos órgãos. Realizamos ensaios sorológicos, incluindo ELISA convencional (ELISAc) para anticorpos IgG anti-*Leishmania*, e ELISA dissociativo (ELISAd) para imunocomplexos circulantes (CIC). Utilizamos citometria de fluxo para analisar linfócitos. Também examinamos tecidos por microscopia corada com hematoxilina e

eosina. Foi observado que uma única dose de promastigotas de *L. (L) infantum* é mais eficaz para induzir infecção no fígado e baço em comparação com múltiplas doses. Isso resultou em menor produção de anticorpos específicos e não foi influenciado pelo IFN- γ . O estudo também estabeleceu uma medida de densidade parasitária nos órgãos, permitindo quantificar a infecção por *L. (L) infantum* nos camundongos BALB/c. Com inóculos semanais repetidos, observou-se menor infecção nos tecidos, aumento da produção de anticorpos e aumento das células produtoras de anticorpos nos camundongos. A ausência IFN- γ não afetou a infecção única nem os efeitos de múltiplos inóculos no modelo experimental, conforme comparado com os resultados obtidos em animais selvagens. Os resultados do estudo podem ajudar a compreender melhor a transmissão da doença e contribuir para estratégias de controle mais eficazes. Além disso, esses resultados fornecerão *insights* sobre a imunopatologia da doença em modelos animais e caninos.

Palavras chaves: Camundongos *Knockout*. *Leishmania (Leishmania) infantum*. LV. Modelos animais. Resistência à doença. Suscetibilidade a doenças.

ABSTRACT

Freitas FRN. Immune and parasitological evaluation of experimental multiple infection with *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes in BALB/c wild type and IFN- γ knockout mice. [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Leishmaniases are a group of tropical diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* sp. Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form and can be fatal if left untreated. VL mainly affects children, adults over 50 years old, individuals with comorbidities, or immunosuppressed individuals. The majority of VL cases occur in Brazil, East Africa, and India. Transmission is carried out by sandflies, with dogs acting as the main sources of infection for these vectors. Many infected individuals remain asymptomatic, indicating an effective immune response. This study aims to understand how this effective immune response functions in asymptomatic VL patients. This is important for developing vaccines and effective treatments. The objective of this study is to investigate the impact of multiple infections on parasite load in mice. To do this, we assessed how different quantities of *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes inocula influence experimental infection. Initially, we standardized the model using wild-type (WT) BALB/c mice. The animals were randomly assigned to three groups, respectively named Control Group, G1 Group, and G2 Group. Control Group animals remained uninfected, while G1 Group animals were subjected to a single inoculation containing 1×10^7 *L. (L) infantum* promastigotes. G2 Group animals, on the other hand, were subjected to four similar inoculations. Subsequently, for analysis and comparison between groups, the sample size was increased. Additionally, to investigate the role of interferon-gamma (IFN- γ), knockout mice for this gene (GKO) were included in the study and distributed into groups similar to the WT model. After 30 days of infection, the animals were euthanized, and biological samples (tail blood, total blood, spleen, liver) were collected. We used real-time PCR to measure parasite density (parasites/mg of proteins) in the organs. We conducted serological assays, including conventional ELISA (ELISAc) for anti-*Leishmania* IgG antibodies, and dissociative ELISA (ELISAd) for circulating immune complexes (CIC). We used flow cytometry to analyze lymphocytes. We also examined tissues through hematoxylin and eosin-stained microscopy. It was observed that a single dose of *L. (L) infantum* promastigotes is more effective in inducing liver and spleen infection compared to multiple doses. This resulted in lower production of specific antibodies and was not

influenced by IFN- γ . The study also established a measure of parasite density in the organs, allowing for the quantification of *L. (L) infantum* infection in BALB/c mice. With repeated weekly inocula, lower tissue infection was observed, along with increased antibody production and increased antibody-producing cells in the mice. The absence of IFN- γ did not affect single infection or the effects of multiple inocula in the experimental model, as compared to results obtained in wild-type animals. The study's findings can help better understand disease transmission and contribute to more effective control strategies. Additionally, these results will provide insights into the immunopathology of the disease in animal and canine models.

Keywords: Animal models. Disease resistance. Disease susceptibility. Knockout mice. *Leishmania (Leishmania) infantum*. Visceral leishmaniasis.

Sumário

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVOS	16
1.1 Objetivo geral.....	16
1.2 Objetivos específicos	16
3. ESTADO DA ARTE	17
3.1. Leishmanioses	17
3.2 .Histórico	17
3.3. Parasitos	18
3.4. Vetores.....	19
3.5. Ciclo biológico	20
3.6. Reservatórios	21
3.7. As leishmanioses não sistêmicas: Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea.....	22
3.8. LV	23
3.8.1. LV humana.....	23
3.8.2. Co-infecção LV/HIV	23
3.8.3. Epidemiologia	24
3.8.4. Diagnóstico	25
3.8.4.1. Direto	25
3.8.4.2. Indireto	26
3.8.4.3. Detecção por identificação molecular (Molecular)	27
3.8.5. Tratamento.....	28
3.8.6. Vacinas.....	28
3.8.7. Imunologia	29
3.8.7.1. Imunidade Inata.....	29
3.8.7.2. Evasão do sistema imune	30
3.8.7.3. Imunidade adaptativa	31
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Parasitos	33
4.2. Cultivo de Parasitos de <i>L. (L.) infantum in vivo</i>	33
4.3 Cultivo <i>in vitro</i> de Parasitos de <i>L. (L.) infantum</i>	34
4.4 Viabilidade celular por Brometo de Etídio (BE).....	34
4.5 Infecção experimental.....	35
4.5.1 Animais.....	35
4.5.2 Grupos Experimentais	35
4.5.3 Obtenção do eluato de sangue dos camundongos infectados para sorologia	37

4.5.4	Coleta de sangue total e tecidos	37
4.6	Hematoxilina-Eosina (HE)	38
4.7	Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos	39
4.7.1	Antígeno – Extrato total de promastigota (ETP)	39
4.7.2	ELISAc	40
4.7.3	ELISAd	40
4.8	PCR quantitativo em tempo real para análise da carga parasitária	41
4.8.1	Quantificação de proteína pelo método de Biureto	41
4.8.2	Curva Padrão	42
4.8.3	Extração de DNA	42
4.8.4	Confecção e eficiência dos <i>primers</i>	42
4.8.5	Condições do ensaio e análise dos resultados para PCR	43
4.9	Citometria de Fluxo	43
4.9.1	Separação de Linfócitos	43
4.9.2	Marcação Intracelular	44
4.9.3	Estratégia de Análise	45
4.10	Análise Estatística	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES ESPECÍFICAS	46
5.1	Padronização da infecção experimental	46
5.1.1	Determinação da densidade parasitária de animais experimentalmente infectados ...	46
5.1.2	Padronização da reação qPCR para <i>L. (L) infantum</i>	47
5.1.3	Padronização da quantificação de parasitas em amostras de tecido de camundongos infectados	49
5.1.4	Comparação da Densidade Parasitária entre Grupos Experimentais Diferentes .	54
5.1.5	Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i> e da presença de CIC	55
5.2	Análise da infecção experimental	57
5.2.1	Avaliação da densidade parasitária durante a infecção experimental em camundongos WT e GKO	57
5.2.1	Detecção de anticorpos IgG anti- <i>Leishmania</i> por ELISAc em amostras experimentais	60
5.2.2	Detecção de CIC por ELISAd em amostras de animais experimentalmente infectados	61
5.2.3	Perfil imunológico por citometria de fluxo de linfócitos esplênicos e sanguíneos .	64
5.2.4	Análises histológica de baço e fígado	67
6.	DISCUSSÃO GERAL	69
7.	CONCLUSÕES	73
7.1	Geral	73

7.2 Especifica 73

8. REFERÊNCIAS 74

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Causadas por protozoários do gênero *Leishmania sp.*, as leishmanioses são um grupo de doenças tropicais com diferentes formas clínicas, desde cutâneas, mucosas ou sistêmicas. Entre elas, destaca-se a LV (LV) por ser a forma mais severa e quase sempre fatal se não tratada (1).

Estima-se que ocorram de 50.000 a 90.000 novas infecções ou casos de LV anualmente em todo o mundo, sendo que a maioria dos casos ocorre no Brasil, leste da África e Índia(1). No período de 2001 a 2021, um total de 69.665 novos casos foram notificados na região das Américas, com média anual de 2.488 casos e taxa de letalidade de cerca de 8%, apesar do diagnóstico e terapia. No Brasil, em 2021, foram reportados 1.683 casos da doença, correspondendo a 93,5% das ocorrências em toda a América(2).

A LV no Brasil é causada pelo parasita *L. (L) infantum*, com transmissão vetorial pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. A principal fonte de infecção para o vetor no ambiente urbano são os cães (*Canis lupus familiaris*), que apresentam infecção mais prevalente do que os humanos(3).

Os sinais clínicos e sintomas são febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, frequentemente associada à anemia e trombocitopenia, podendo apresentar enzimas hepáticas elevadas e hipoalbuminemia com hipergamaglobulinemia (4). Afeta principalmente crianças menores de cinco anos e adultos com mais de 50 anos, bem como adultos com comorbidades, imunossuprimidos e indivíduos HIV/AIDS positivos (2). No Brasil, a proporção é cerca de um indivíduo que apresenta sinais e sintomas para 18 indivíduos infectados e que não apresentam os sintomas da infecção. Isso demonstra que a maioria dos indivíduos infectados pode desenvolver uma resposta imune efetiva (5).

Como já mencionado, os cães têm um papel crucial no ciclo biológico do parasito *Leishmania*, demonstrando uma frequência de infecção significativamente maior em comparação com os seres humanos. Esta suscetibilidade é amplificada pelo fato de que os cães não têm meios naturais de se defender das picadas dos flebotomíneos, tornando-os alvos vulneráveis para a transmissão da doença. Mesmo em áreas endêmicas, muitos cachorros não recebem vacinação adequada, e seus donos frequentemente não adotam medidas de prevenção, como o uso de coleiras impregnadas com inseticidas. Esta falta de precaução contribui para a manutenção do ciclo de transmissão da LV em comunidades onde a doença é endêmica (6).

Foram identificados na saliva dos flebotomíneos fatores imunossupressores que promovem a infecção (7). Essa saliva pode conter moléculas com a capacidade de suprimir a resposta imunológica do hospedeiro. As propriedades imunomoduladoras dessas moléculas salivares e seus variados impactos na leishmaniose vão desde o agravamento da doença até o favorecimento da disseminação do parasita (8).

Esses dados nos conduziram à hipótese de que a suscetibilidade à doença pode ser influenciada pela frequência de picadas dos flebotomíneos carregando *Leishmania* e seus efeitos supressores. Além disso, é possível que a inoculação repetida de promastigotas, resultante de múltiplas picadas, possa induzir uma tolerância imunológica, afetando ainda mais a resposta do hospedeiro à infecção

O modelo animal experimental para estudos da LV, como hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), são muito utilizados para estudos experimentais pois, tem a vantagem de serem suscetíveis, mimetizam as características da doença natural humana (9), como caquexia, pancitopenia, hepatoesplenomegalia, glomerulonefrite, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (10).

Por outro lado, embora o camundongo da linhagem BALB/c seja considerado suscetível à infecção, a resposta imunológica do hospedeiro desempenha um papel crucial no controle da infecção, semelhante a alguns casos de LV humana, onde a infecção pode variar de controlada a progressiva (11). O estudo da infecção nesses modelos animais apresenta desafios significativos, uma vez que o sucesso da infecção experimental é influenciado pelo tamanho e pela composição dos inóculos, pela via de infecção selecionada e pelas características específicas das cepas tanto do parasita quanto do hospedeiro (12).

O IFN- γ é uma citocina essencial para a defesa contra infecções, tanto em seres humanos quanto em camundongos. Ele desempenha um papel crucial na promoção de uma resposta imunológica eficaz, controlando a replicação do parasita. No entanto, em camundongos knockout de IFN- γ , a ausência dessa citocina resulta em maior suscetibilidade à infecção e uma resposta imunológica desequilibrada (13). Isso frequentemente leva a uma forma mais grave da doença, que pode ser comparada às manifestações mais graves observadas em seres humanos com a doença plenamente desenvolvida.

Estudos indicam que camundongos com esse gene depletado tendem a progredir com a infecção, enquanto camundongos BALB/c WT, que possuem o gene funcional, podem mimetizar a variação de infecção observada em seres humanos, com alguns indivíduos progredindo com a doença e outros não.

No contexto deste estudo, inicialmente almejamos replicar as condições em que cães são expostos à infecção por *L. (L) infantum*, sofrendo múltiplas picadas de vetores. Para isso, administramos múltiplos inóculos em modelos experimentais de camundongos, com o propósito de avaliar seu impacto na progressão da doença. Isso foi comparado com grupos de animais que não receberam nenhum inóculo e aqueles que receberam apenas um inóculo.

Em um segundo objetivo, investigamos o potencial efeito protetor da citocina IFN- γ no desenvolvimento da LV, utilizando animais *knockout* para o gene que codifica o IFN- γ . E replicando a infecção experimental de múltiplos inoculos. Esta pesquisa é de importância crucial para a compreensão do papel dessa citocina na evolução da doença.

Os resultados deste estudo têm implicações significativas no desenvolvimento de vacinas e tratamentos destinados a fortalecer a imunidade e controlar a disseminação da LV, uma doença de importância médica e de saúde pública.

Para a condução deste estudo, os animais foram divididos em três grupos distintos de infecção experimental, denominados como Controle, G1 e G2. Esta divisão foi aplicada tanto aos camundongos da linhagem BALB/c WT quanto aos camundongos GKO.

No grupo de Controle, os camundongos permaneceram livres da infecção durante todo o período do experimento. Já no grupo G1, os animais receberam um único inóculo contendo 1×10^7 de promastigotas de *L. (L) infantum*. No grupo G2, por outro lado, os camundongos receberam quatro inóculos semanais, cada um contendo 1×10^7 de promastigotas de *L. (L) infantum*.

Após um período de 30 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e foram coletadas amostras de materiais biológicos. O sangue caudal foi coletado para a realização de ensaios imunoenzimáticos, especificamente o ELISAc, a fim de detectar a presença de anticorpos IgG anti-*Leishmania*. Além disso, essa amostra foi utilizada para a detecção de CIC por ELISAd.

Adicionalmente, foi coletado sangue total para a posterior separação de linfócitos, com o propósito de realizar a imunofenotipagem e determinar a composição da população linfocitária. Através da citometria de fluxo, pudemos avaliar detalhadamente as subpopulações de linfócitos, incluindo linfócitos T e linfócitos B. Além disso, fomos capazes de investigar o crescimento e a estimulação específica dos linfócitos B.

Órgãos como baço e fígado foram coletados para determinar a densidade parasitária por meio da técnica de qPCR, que permite a quantificação precisa do número de parasitos por miligrama de proteínas. Além disso, esses órgãos foram submetidos a análises teciduais por

microscopia ótica convencional, com lâminas coradas pela técnica de hematoxilina eosina, para uma avaliação detalhada das alterações histológicas.

A determinação da correlação entre a quantidade de inóculos e a evolução da doença em sua manifestação completa é de grande importância, pois esclarece a verdadeira extensão da disseminação da doença. Além disso, esse entendimento é fundamental para a formulação de estratégias eficazes de controle da doença. E, tais resultados oferecem *insights* sobre a imunopatologia da doença, tanto em contextos caninos quanto experimentais.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Avaliar as potenciais alterações parasitológicas e imunológicas na evolução da LV em camundongos BALB/c WT e camundongos BALB/c GKO, submetidos a diferentes quantidades de inóculo de promastigotas *de L. (L.) infantum*.

1.2 Objetivos específicos

- Investigar o impacto de distintas quantidades de inóculos de promastigotas de *L. (L.) infantum* na infecção experimental de camundongos BALB/c WT, visando entender a relação entre a carga parasitária e a resposta do hospedeiro;
- Caracterizar a resposta imunológica humoral do modelo experimental, empregando a detecção de anticorpos IgG por meio de diferentes técnicas de ELISA: ELISA convencional (ELISAc), ELISA dissociativo (ELISAd);
- Determinar a densidade parasitária nos órgãos (baço e fígado) de camundongos experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, empregando tanto microscopia quanto qPCR, utilizando quantidades padronizadas dos órgãos por peso ou conteúdo protéico;
- Avaliar a resposta imune celular por meio da análise do perfil celular através da marcação específica de células por Citometria de Fluxo, buscando entender as variações nos tipos celulares envolvidos na resposta imunológica;
- Realizar uma comparação dos resultados obtidos entre os animais WT e os animais GKO, a fim de entender como a ausência dessa citocina influencia a resposta imune e a progressão da infecção;

3. ESTADO DA ARTE

3.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças parasitárias antropozoonóticas transmitidas por flebotomíneos fêmeas a hospedeiros mamíferos. São causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania sp.* Essas diversas espécies de parasitos podem provocar uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde lesões cutâneas até acometimento na mucosa e formas viscerais(14).

Essas enfermidades são consideradas doenças tropicais negligenciadas que impactam principalmente as populações mais carentes e vulneráveis socialmente. Elas estão associadas a fatores como desnutrição, deslocamento populacional, condições de moradia precárias, imunossupressão e escassez de recursos financeiros. Mais de um bilhão de pessoas residem em áreas endêmicas para leishmaniose e, portanto, estão em risco de infecção. A doença é endêmica em mais de 90 países na Ásia, África, Oriente Médio, América Central e do Sul (1).

3.2.Histórico

Em 190, Leishman e Donovan relataram pela primeira vez o encontro do agente da LV, descrevendo o parasito que mais tarde foi denominado como *Leishmania (L) donovani*. No mesmo ano, Wright descreveu o parasita do Botão do Oriente, denominado *Leishmania tropica* (15).

Charles Donovan era um médico irlandês e estudava pacientes que apresentavam sintomas de febre prolongada, aumento do baço e outros problemas de saúde. Por microscopia óptica identificou microorganismos dentro de células do baço e medula óssea; descrevendo como pequenos corpos redondos ou ovais. Já William BoogLeishman, um médico militar britânico, observou estruturas semelhantes nos tecidos de pacientes e cunhou o termo "corpos de Leishman-Donovan" para descrever essas estruturas, após desenvolver uma técnica de coloração que permitiu uma melhor visualização desses organismos microscópicos (15).

Mais tarde, os corpos de Leishman-Donovan, foram conhecidos como amastigotas, responsáveis pela LV. As observações e descrições iniciais de Donovan e Leishman foram um marco crucial para a compreensão da doença (15).

3.3.Parasitos

Os parasitos do gênero *Leishmania sp.* pertencem a classe *Kinetoplastida*, ordem *Trypanosomatidae*, família *Trypanosomatidae*(16). Os parasitos têm um ciclo de vida digenético, onde envolve tanto um hospedeiro mamífero quanto um inseto vetor. É possível observar que possuem uma variedade de diferentes morfologias capazes de se adaptarem aos hospedeiros e ao vetor. Esses parasitos podem se apresentar diversas formas durante seu desenvolvimento ao longo do ciclo biológico, com duas principais morfologias, as amastigotas e as promastigotas(17).

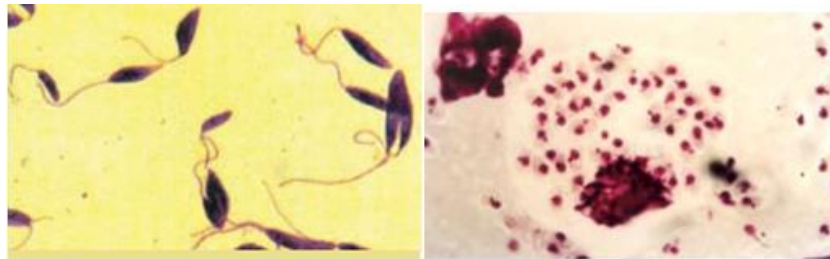


Figura 1 - Parasita *L. (L.) infantum*. Exemplo das formas amastigotas (Direita) e forma Promastigota (Esquerda)(3).

As formas amastigotas são encontradas internalizadas em células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados. São esféricas ou ovais medindo cerca de 1-2,5µm de diâmetro, com cinetoplasto localizado próximo ao núcleo. As promastigotas, que são formas alongadas e flageladas, com cerca de 5-15 µm de comprimento, com cinetoplastos localizados entre o núcleo e a extremidade anterior ao flagelo em intestino de insetos vetores ou em cultivo axênico(18).

A morfologia das diferentes espécies de *Leishmania* mostra conservação à medida que avançam em seu ciclo de vida, como pode ser visto na figura 2. As amastigotas ou promastigota mantêm o mesmo layout celular básico com o cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo se estendendo do corpo basal. A diferença mais marcante entre as formas amastigotas e promastigotas é a mudança no flagelo de um longo flagelo móvel para um flagelo curto sem mobilidade (17).

3.4. Vetores

O vetor flebotomíneo é fundamental para a transmissão das Leishmanioses. O principal vetor da LV são os flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* nas Américas. São um grupo de pequenos insetos da ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae* e do gênero *Lutzomyia*(16).

Os flebotomíneos, também conhecido como mosquito palha, são pequenos insetos, geralmente medindo entre 1 a 3 milímetros de comprimento, com várias espécies de flebotomíneos encontrados nas Américas, incluindo países como Brasil, Colômbia, Venezuela, entre outros. A *L.longipalpis* possui palpos longos e finos, o que lhes originou o nome de espécie "longipalpis" e é comumente encontrado em áreas rurais e peri-urbanas(16).

As fêmeas são transmissoras da doença, por possuir hábitos hematófagos, já que o sangue é essencial para poder a desenvolver seus ovos. Durante o repasto sanguíneo, podem adquirir parasitas *Leishmania* de um hospedeiro infectado. A cada alimentação de sangue pode aumentar a infecciosidade do flebotomíneo, facilitando a transmissão em ambientes com múltiplas fontes de alimentação de sangue (19).



Figura 2: Fêmeas de flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (20).

3.5. Ciclo biológico

Durante a alimentação sanguínea de um flebotomíneo infetado com *Leishmania*, este inocula promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva anticoagulante no local da picada, atraindo células inflamatórias, como macrófagos e neutrófilos, graças à ativação do complemento. Uma vez dentro dos macrófagos, as promastigotas são fagocitadas e sofrem transformação em amastigotas, adaptando sua forma para minimizar a relação superfície-volume, reduzindo a área exposta ao ambiente hostil do vacúolo parasitóforo. As amastigotas então iniciam um processo de multiplicação por divisão binária, ocorrendo no interior do vacúolo parasitóforo, que também aumenta de tamanho durante esse processo (21).

Posteriormente, as amastigotas podem romper esses vacúolos como parte da estratégia de evasão do parasita, permitindo sua disseminação para outras células hospedeiras e a continuação do ciclo de infecção. Após serem ingeridas pelo flebotomíneo e liberadas dos macrófagos, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas e passam por várias outras formas de promastigotas durante o ciclo do parasita, todas mantendo uma estrutura celular básica semelhante, mas com diferentes capacidades de produção de gel mucoso extracelular (21).

As *Leishmanias* possuem capacidade de se ligarem ao intestino médio dos flebotomíneos, isso permite sua propagação e diferenciação em formas infecciosas. Essa ligação ocorre através de interações com glicanos, proteoglicanos e receptores de lectina no parasita, associados a superfície externa do protozoário (22).

A infecção ocorre quando o flebotomíneo fêmea se alimenta de um hospedeiro mamífero. Durante essa alimentação, uma forma de *plug* contendo a secreção de gel promastigota (PSG) e ao ser regurgitada transmite promastigotas metacíclicas, os quais são depositados na pele do hospedeiro. O sucesso da infecção depende da susceptibilidade do hospedeiro à infecção e de sua resposta imune. Além dos parasitas, outros elementos como antígenos salivares e fatores inflamatórios são inseridos pelo flebotomíneo durante a alimentação, aumentando a probabilidade de infecção sistêmica (23).

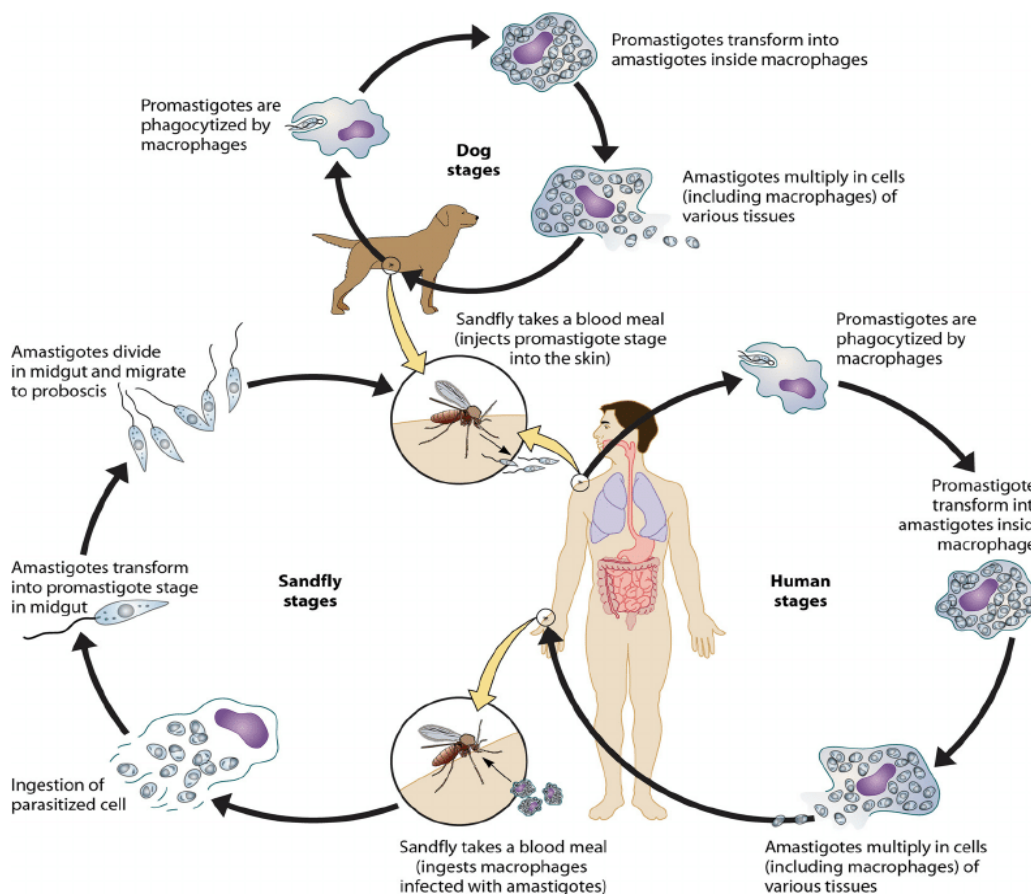


Figura 3 - Ciclo de vida de *L. (L.) infantum*, que se alterna entre hospedeiros mamíferos e os insetos flebotomíneos fêmeas (24).

3.6. Reservatórios

Exceto por algumas situações particulares, as leishmanioses são doenças transmitidas de animais para humanos, sendo que a infecção humana ocorre de maneira acidental. Mamíferos selvagens geralmente atuam como os principais hospedeiros reservatórios dessas doenças. No entanto, devido ao aumento gradual da urbanização e da domesticação dos ciclos de transmissão das leishmanioses, os animais que vivem próximos aos humanos e os animais domésticos ganharam relevância como reservatória da infecção (25).

Dentre os vertebrados que naturalmente abrigam os parasitas responsáveis por essas doenças, encontram-se mamíferos como cães, gatos, ratos, gerbos, macacos, gambás e cavalos (25). Devido à proximidade de cães e seres humanos, diversas evidências epidemiológicas identificaram que esses animais são a principal fonte de infecção humana na LV humana (25).

O abate de cães durante muitos anos foi utilizado como parte das políticas públicas para controle da LV. Essa prática foi comum nas Américas e no Brasil, mas foi necessária a substituição por métodos mais eficazes. A razão para isso se deve pela falta de evidências

científicas que comprovem sua eficácia, devido a presença de hospedeiros alternativos, o impacto socioeconômico e a necessidade de abordagens integradas (26).

Para prevenir a infecção e evitar a propagação entre cães é fundamental protegê-los contra as picadas de flebotomíneos. Medidas como vacinação, o uso de coleiras inseticidas podem ser aplicadas, a fim de reduzir assim o risco de infecção em cães não infectados e interrompendo a disseminação. É importante que práticas como abate de cães devam ser substituída por alternativas não letais que possam prevenir a infecção em cães(6).

3.7.As leishmanioses não sistêmicas: Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea

As manifestações associadas à leishmaniose cutânea acometem a pele e as mucosas. São apresentadas como lesões únicas ou múltiplas, lesões nodulares disseminadas(27).

A leishmaniose cutânea (LC) pode se apresentar como localizada, difusa, disseminada, e reincidida. Nas LC localizadas, aparecem lesões no local da picada do flebotomíneos. Geralmente em áreas expostas dos corpos, como face, braços e pernas. As lesões começam com pápulas, e ao longo de semanas a meses evoluem para lesões úlceradas com bordas amontoadas. No velho mundo é causada por *L. (L) tropical*, *L. (L) major*, *L. (L) aethiopica*, e no novo mundo *L.(L) mexicana*, *L. (L) amazonensis*, *L. (L) venezuelensis*, *L. (V) braziliensis*, *L. (V) panamensis*, *L. (V) guyanensis* (28).

A LC disseminada é definido por dez ou mais lesões de tipo misto localizadas em duas ou mais partes do corpo. É causada por *L.(V) guyanensis* e *L. (V) panamensis*, e principalmente por *L. (V.) braziliensis*. Caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco (29). A LC difusa é causada por *L. (L) amazonensis*, *L. (L) aethiopica* ou *L. (L) mexicana*. Se desenvolve como múltiplas lesões disseminadas, que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas reco-brindo grandes extensões da pele. A imunossupressão é um fator de risco para ambas as leishmanioses cutâneas difusas e disseminadas(29).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) caracteriza-se por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato. É potencialmente fatal, levando a desfiguração permanente, por isso, se faz preciso o rápido diagnóstico e tratamento. Está associada frequentemente com os parasitos do subgênero *Viannia*. Sendo que 90% dos casos ocorrem em indivíduos que já exibiram cicatrizes de leishmaniose cutânea, e em indivíduos imunocomprometidos. Os fatores de

riscos estão associados as múltiplas lesões primárias acima da linha da cintura com cicatrizações lentas (28).

Existe ainda um tipo distinto de leishmaniose conhecido como Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (PKDL), que surge como uma complicação da LV causada por *L. (L.) donovani*. A PKDL é caracterizada por uma erupção cutânea macular, maculopapular e nodular. Ela é observada em casos que aparentemente foram curados, tratados inadequadamente ou não tratados de LV (30).

3.8.LV

3.8.1. LV humana

No Brasil, a LV é causada pelo parasito *L. (L.) infantum*, transmitida pelos flebotomíneos no gênero/espécie *Lutzomyia longipalpis*. Os parasitos têm como reservatórios na área urbana os cães domésticos como principal fonte de infecção. No ambiente silvestre, outros reservatórios estão envolvidos como as raposas e os marsupiais (27).

Os sinais e sintomas que caracterizam a LV são febre irregular persistente, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia, e perda de peso. A desnutrição está relacionada com o agravamento da doença, principalmente em crianças sem tratamento pode levar ao óbito dentro de 2 anos. Geralmente o óbito está relacionado a graves infecções bacterianas secundárias ou sangramentos na doença avançada(31).

Em áreas endêmicas, a maioria das pessoas infectadas com *Leishmania* não apresenta sinais ou sintomas da doença. As proporções relatadas de indivíduos assintomáticos e casos de doença ativa variam 18:1 no Brasil; de 2,4:1 no Sudão; 5,6:1 na Etiópia;4:1em Bangladesh; 8-9:1 na Índia e Nepal; e 50:1 na Espanha (32).

3.8.2. Co-infecção LV/HIV

A coinfeção LV e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) é uma preocupação global, agravando os sintomas e aumentando a letalidade de ambas as doenças. Presente em 35 nações, a LV/HIV torna seu controle e tratamento mais desafiadores.A letalidade da LV aumenta 7,9% quando associada à infecção pelo HIV. No Brasil, o número de casos de

coinfecção LV/HIV tem aumentado, com uma taxa de letalidade três vezes superior à da LV isolada(33).

A prevalência da infecção pelo HIV em pacientes com LV é de 9%, mas cerca de 40% dos pacientes com LV não têm sorologia para o HIV. A falta de estudos abrangentes que incluam pacientes assintomáticos na avaliação da prevalência da coinfecção *Leishmania*/HIV no Brasil é uma preocupação, sugerindo que muitos casos de LV associados ao HIV podem resultar da reativação de infecções subclínicas prévias(34).

As manifestações clínicas em indivíduos com coinfeções são atípicas e incluem fraqueza, tosse, diarreia, desnutrição, perda de peso e hemorragias, sendo os sintomas gastrointestinais mais frequentes. Amastigotas podem ser encontradas em locais incomuns, como mucosa gastrointestinal, oral, pele, pleura, pericárdio, linfonodos, lesões do sarcoma de Kaposi e trato respiratório(34).

Os métodos diagnósticos para pacientes coinfectados diferem em sensibilidade e especificidade em relação a pacientes imunocompetentes. O método parasitológico direto em aspirado de medula óssea possui uma sensibilidade de 93,2% e especificidade de 100%. O teste sorológico de aglutinação (DAT) tem sensibilidade e especificidade de 81% e 90%, respectivamente, destacando-se como um dos melhores métodos sorológicos. Métodos baseados em diagnóstico molecular, como a PCR, são promissores, com sensibilidade de 87,2-98% e especificidade de 96%, mas nem sempre estão disponíveis em todas as regiões e podem ser caros (34)(35).

Na abordagem terapêutica, a principal droga utilizada no tratamento de pacientes coinfectados é a Anfotericina B lipossomal, que apresenta uma taxa de eficácia de 59,5% e é considerada a melhor opção disponível (34).

3.8.3. Epidemiologia

A epidemiologia da leishmaniose envolve uma interação dinâmica entre os parasitas *Leishmania*, os vetores flebotomíneos e os hospedeiros suscetíveis (25).

Segundo a Organização Mundial da Saúde em 2020 de 90% dos novos casos relatados ocorreram em 10 países: Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen(1). Ao todo são 59 países endêmicos para LV, sendo a Índia o país com maior número de casos, seguido do Sudão(36). Estima-se também, 50.000 a 90.000 novos casos ocorram anualmente em todo o mundo (1). Sendo de 20.000 a 40.000 mortes

anualmente devido à LV, mas devido a subnotificação esses números provavelmente são maiores(36).

No informe epidemiológico das Américas segundo a Organização Pan Americana de Saúde, entre 2001- 2021 houveram 69.665 casos novos com uma média anual de 2.488 casos nas Américas. Em 2021, dos casos em toda América, 93,5% foram registrados no Brasil. O grupo etário mais afetado são menores de 5 anos, seguido de pessoas entre 20 e 50 anos e pessoas maiores de 50 anos do sexo masculino, respectivamente. As maiores taxas de letalidade foram registradas em maiores de 50 anos seguidas de pessoas entre 20 e 50 anos, com uma pequena diferença entre os sexos (2).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil, de 2010 a 2020 foram registrados 35.128 de casos no Brasil, com um total de 2.663 óbitos nesse mesmo período (Ministério da Saúde). Os cinco municípios que registraram o maior número de casos são Fortaleza, Belo Horizonte, São Luiz, Araguaína, Parauapebas (2).

Em São Paulo de 2000 e até 2020 foram registrados 3.065 casos com 304 óbitos (MS). Os municípios mais afetados de 2019 a 2021 foram Mariápolis, Nova Guataporanga, Braúna, Presidente Epitácio e Pereira Barreto (37). Estudos indicam que a LV chegou em São Paulo vinda do Mato Grosso do Sul através das construções dos trechos paulista do gasoduto Bolívia-Brasil e a reativação da ferrovia Noroeste, sendo que os primeiros municípios paulistas (Araçatuba e Bauru) a notificar casos de LV, ficam as margens da rodovia Marechal Rondon, que faz a ligação MS/SP. As construções dos trechos ferroviários trouxeram muitos trabalhadores de outros estados e países para a região. Essas expansões das áreas urbanas acarretam nas mudanças epidemiológicas locais, causando mudanças ambientais, levando os vetores e reservatórios para outros locais (38).

3.8.4. Diagnóstico

3.8.4.1. Direto

A visualização de amastigotas através da microscopia óptica em aspirados de tecido provenientes do baço, linfonodos e medula óssea é considerada o padrão-ouro para o diagnóstico e controle da LV. Essa técnica apresenta a vantagem de detectar diretamente a carga parasitária e ser economicamente viável para execução (39). Sua especificidade é alta, embora a sensibilidade varie conforme o tecido analisado, sendo mais elevada para o baço (93-99%), medula óssea (53-86%) e linfonodos (53-65%) (40).

As vantagens desse método incluem a identificação direta do parasita, aumentando a confiabilidade do diagnóstico. A especificidade da técnica é alta gerando uma confiabilidade do resultado. Comparada com outras técnicas, a microscopia óptica é relativamente econômica, tornando-a acessível desde que haja observadores treinados. Contudo, é uma técnica invasiva e a coleta de amostras pode causar desconforto e até resultar em complicações, como hemorragias ou infecções. A sensibilidade do método depende da capacidade e habilidade especializada, devido à natureza invasiva da coleta.(40)

3.8.4.2. Indireto

Os métodos diagnósticos indiretos têm como propósito identificar anticorpos em amostras biológicas. Sua sensibilidade e especificidade variam de acordo com os métodos e antígenos empregados. A sensibilidade pode ser influenciada pelas diferenças antigênicas entre as espécies de parasitas, resultantes das variações específicas da *Leishmania*. A especificidade tende a ser reduzida devido à reatividade cruzada com outras doenças infecciosas. Além disso, os resultados são afetados por fatores hospedeiros e pelas características da região endêmica (37).

Em geral, os métodos comumente empregados incluem o Teste de Anticorpo Fluorescente Indireto (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), Teste de Aglutinação Direta (DAT), Teste de Aglutinação em Látex (KAtex), Teste Rápido rK39 (RDT) e Teste Imunocromatográfico (ICT) (37).

Alguns desses testes exibem variação em sensibilidade e especificidade. Por exemplo, o RIFI possui valores de sensibilidade entre 28,4% e 92%, e especificidade entre 83,3% e 94,4%. Outros testes, como o ELISA utilizando o antígeno rK39, apresentam excelente desempenho, com sensibilidade e especificidade em torno de 88,6% a 99% e 81% a 98,2%, respectivamente (41). O Western blot possui alta sensibilidade (98%) e especificidade (100%), podendo superar o IFAT e o ELISA em sensibilidade. O desempenho do DAT varia de acordo com a amostra biológica utilizada. Quando o soro é empregado, a sensibilidade é de 74,6% a 96,6% e a especificidade de 77,8% a 100%; quando a urina é utilizada, a sensibilidade e especificidade também são semelhantes (41).

Alguns métodos oferecem vantagens, como baixo custo, rapidez de execução e simplicidade. Resultados são disponibilizados de forma ágil. Exemplos incluem o KAtex, com sensibilidade variando de 35,8% a 100% e especificidade de 64% a 98,3%, o rK39 RDT

(especificidade e sensibilidade), e o ICT, com sensibilidade e especificidade de 97,1% e 93,44%, respectivamente (41).

3.8.4.3. Detecção por identificação molecular (Molecular)

O PCR (reação em cadeia da polimerase) convencional possui sensibilidade dependente da amostra biológica utilizada e utiliza *primers* para amplificar a sequência alvo. Esse teste fornece apenas uma análise qualitativa, indicando a presença ou ausência do parasita. De acordo com diferentes tipos de amostras biológicas, as especificidades e sensibilidades do PCR variam: no sangue total, os valores são de 70-100% e 85-99%; swab bucal apresenta 79-83% e 86-90,56%; urina apresenta 88,0-96,8% e 100%; células de revestimento leucocitário têm 80-100% e 63-100%; soro exibe 85-96% e 100%; filtro manchado de sangue varia entre 60-98% e 100%; e filtro manchado de medula óssea varia entre 99-100% e 9,0-87% (42).

O PCR em tempo real, também conhecido como PCR quantitativo, permite determinar a quantidade de moléculas de DNA de uma sequência específica em uma amostra. Com sensibilidade suficiente para detectar até uma única molécula, esse método não mede diretamente o número de parasitas viáveis, mas sim a quantidade de DNA do parasita circulante. A sensibilidade do qPCR varia conforme os *primers* e a região alvo utilizados, se são empregados reagentes SYBR Green ou TaqMan, e também em relação ao tipo de amostra biológica. As sensibilidades e especificidades para diferentes amostras são: no sangue total, os valores são de 90-100% e 83,3-100%; células de revestimento leucocitário apresentam 100% e 90%; e fluidos orais têm 95% e 90-100% (43).

Apesar das muitas vantagens, os testes moleculares apresentam algumas desvantagens como equipamentos especializados e reagentes específicos, o que pode aumentar os custos do diagnóstico. Alguns testes moleculares podem ser complexos em termos de execução e interpretação dos resultados, exigindo pessoal treinado e qualificado para realizá-los adequadamente. Isso pode limitar sua aplicação em cenários onde há falta de pessoal capacitado (43).

3.8.5. Tratamento

Ao tratar a LV, escolher o medicamento certo depende de fatores como riscos para o paciente, onde ele vive e a espécie do parasita (44). No entanto, a escolha dos medicamentos não é isenta de desafios, pois eles podem apresentar alta toxicidade, problemas de resistência, custos elevados, tratamento prolongado ou métodos de administração desafiadores(45).

Vários medicamentos são usados para tratar a LV (LV). Os Antimoniais Pentavalentes, como o Megluminaantimoniato (Glucantime) e o Sódio stibogluconato (Pentostam), são comuns como tratamento inicial, mas podem causar efeitos colaterais e são tóxicos para órgãos. A Anfotericina B (Fungizone) é utilizada em casos especiais, mas tem efeitos colaterais graves. A Anfotericina B lipossomal (Ambisome) é uma opção mais segura, porém cara. A Pentamidina é uma escolha para pacientes resistentes aos antimoniais, mas também apresenta toxicidade. A Miltefosina (Mpvavido, Milteforan) é um tratamento oral eficaz, mas pode ser tóxica e é contraindicada na gravidez. A Paromomicina é outra alternativa, mas pode causar ototoxicidade e outros efeitos colaterais. A escolha do tratamento depende das condições do paciente e da disponibilidade dos medicamentos(44).

3.8.6. Vacinas

A diversidade de espécies de *Leishmania* e as diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dificultam a criação de uma única vacina, e a necessidade de múltiplas vacinas para uma proteção completa ainda não está esclarecida. Assim, atualmente, não há vacinas disponíveis para a LV. No entanto, várias candidatas estão em processo de testes, embora nenhuma delas tenha alcançado prontidão para implementação(46).

A prática de usar promastigotas vivas de *L. (V) major* como base para vacinas foi interrompida devido a preocupações de segurança. As vacinas que usam preparações antigênicas brutas tiveram baixa eficácia em testes pré-clínicos. Já as vacinas de segunda geração, que utilizam proteínas recombinantes simples ou quiméricas, foram avaliadas em modelos experimentais. Atualmente, três poliproteínas de *Leishmania*, compostas pelos antígenos LEISHF1, LEISHF2 e LEISHF3, estão em ensaios clínicos. As vacinas de terceira geração, baseadas em vacinas de DNA, também foram desenvolvidas e avaliadas em modelos experimentais, mas seu progresso tem sido limitado (46).

Para a LV canina (LVC), as vacinas demonstraram redução nos sintomas apresentados, diminuição da carga parasitária e minimização do risco de morte em nível

individual. Além disso, em nível populacional, elas contribuíram para a redução da transmissão do parasita, resultando na diminuição da incidência da doença em cães e humanos (47).

Atualmente, existem três vacinas comerciais disponíveis para a LVC: Leish-Tec1®, CaniLeish1® e Letifend®. A Leish-Tec1® é baseada na proteína amastigota A2 recombinante e demonstrou uma eficácia protetora de cerca de 71% em áreas com baixa infecção e 35,7% em áreas com alta transmissão. No entanto, o uso dessa vacina pode ser problemático, pois interfere nos testes diagnósticos sorológicos, dificultando a diferenciação entre animais infectados e vacinados. A CaniLeish1®, composta por antígenos promastigotas secretados/excretados de *L. (L) infantum*, mostrou resultados variáveis de proteção, reduzindo principalmente a infectividade (embora infectiosidade não esteja errado, mas infectividade tem mais impacto) e o risco de cães desenvolverem sintomas. A Letifend®, uma proteína quimérica recombinante (Proteína Q), apresentou uma eficácia de 72% na prevenção da doença. Devido à variação na eficácia das vacinas existentes, ainda é necessário identificar novos antígenos, testá-los em modelos experimentais e, posteriormente, em cães (46).

3.8.7. Imunologia

Diferentes elementos da resposta imunológica do hospedeiro desempenham um papel direto no desenvolvimento da infecção. Essa resposta imune é influenciada por fatores tanto ambientais quanto genéticos, o que explica sua doença espectral, com diversas formas clínicas de diferente suscetibilidade ou resistência a infecção(48). O sucesso na eliminação da *Leishmania* depende da colaboração de componentes do sistema imunológico, do promastigota na corrente sanguínea à fase de amastigota nas células, com a capacidade do parasita de evitar a resposta imune impactando o resultado (49). E considerarmos a resposta imune contra uma infecção, é essencial levar em conta fatores como a antigenicidade dos agentes, a resposta imunológica do hospedeiro e a carga parasitária(50).

3.8.7.1. Imunidade Inata

As primeiras células a chegarem ao local da infecção após a inoculação do parasita pelo vetor são os neutrófilos. Essas células fagocitam as promastigotas e produzem fatores microbicidas contra as *Leishmania*, como o óxido nítrico, elastaseneutrofílica (NE), fator ativador de plaquetas e armadilhas extracelulares de neutrófilos(49). Eles são atraídos por

quimioatração, impulsionada por componentes pró-inflamatórios presentes na saliva do inseto vetor (50).

Outras células recrutadas são as células Natural Killer (NK), que desempenham um papel vital. Elas são as principais produtoras de IFN- γ , que é fundamental para a diferenciação das células T CD4+ para o perfil Th1, reduzindo a disseminação do parasita. Além disso, as NK podem promover a destruição direta do parasita por meio de sua atividade citotóxica, o que, por sua vez, contribui para a indução da óxido nítrico sintase (iNOS) induzível em macrófagos infectados pela *Leishmania* (49).

Dentre as células do sistema imunológico inato, os macrófagos desempenham o papel mais crucial. Isso porque os parasitas se utilizam dessas células para replicação e estabelecimento da infecção. Os macrófagos empregam mecanismos leishmanicidas, como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS). No entanto, para sobreviver nos ambientes hostis ao longo do seu ciclo de vida, as *Leishmania* spp. expressam moléculas únicas, como os glicoinositolfosfolipídeos (GIPLs), que são glicoconjugados reconhecidos como componentes principais da superfície do parasita, além do lipofosfoglicano (LPG) e da metaloprotease GP63 (50).

Durante a resposta imune, os anticorpos são capazes de neutralização, opsonização e ativação do sistema complemento. Na leishmaniose, a importância da ativação do sistema complemento pela via alternativa via C3 é comumente destacada, uma vez que é a primeira barreira enfrentada pela *Leishmania* no hospedeiro vertebrado(49). O Sistema Complemento é responsável pela eliminação de mais de 90% dos promastigotas inoculados após a infecção (51).

3.8.7.2. Evasão do sistema imune

A evasão do sistema complemento é importante para o estabelecimento da infecção. As moléculas expressas pela superfície da *Leishmania* além de ajudarem os parasitas a sobreviver após a fagocitose dos macrófagos impedem sua lise por meio de moléculas de superfície como LPG e gp63. Tanto as promastigotas metacilicas quanto amastigota, por meio da GP63 inativa C3b convertendo-o em sua forma inativa iC3b. Assim, ocorre a adsorção ou opsonização da superfície do parasito, promovendo a fagocitose por macrófagos (52).

O parasita *Leishmania* emprega várias estratégias para escapar do sistema imunológico, incluindo a inativação do complemento através do fator I do C3(52). Outras táticas incluem a ligação de lectinas à superfície das promastigotas de *L. (L.) infantum* por meio das moléculas LPG e GIPL. Essas moléculas reconhecem padrões associados a patógenos (PAMPs), ativando a via da lectina e estimulando a fagocitose e ativação dos macrófagos durante a infecção inicial(53). Além disso, altos níveis de lectina ligante de manose (MBL) estão ligados à modulação da função dos macrófagos, aumentando a suscetibilidade à leishmaniose. Estudos também indicaram que variações genéticas nos genes do complemento, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), podem influenciar a predisposição do hospedeiro a esses parasitas. Os exemplos acima citados são apenas algumas maneiras de evasão do parasito ao sistema imune(49).

3.8.7.3. Imunidade adaptativa

Apesar de os títulos elevados de anticorpos *anti-Leishmania* serem característicos das formas viscerais da doença, a ativação policlonal de células B durante a infecção pode agravar a condição. No entanto, as células B têm a capacidade de modular a resposta imune por meio de mecanismos independentes de anticorpos, como a apresentação de antígenos e a secreção de citocinas e quimiocinas(50).

Em indivíduos suscetíveis, é possível observar uma diminuição na produção de IFN- γ , que é a principal citocina responsável pela ativação de macrófagos. Além disso, há uma relação com a baixa produção de IL-1 e IL-12, que são fundamentais para a ativação de células NK e células T. No entanto, ocorre um aumento das citocinas IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β , as quais promovem a diminuição das atividades dos macrófagos, redução da expressão de MHC-II, inibição da proliferação linfocitária e supressão da produção de IFN- γ . O TNF- α é encontrado em níveis elevados no soro, o que induz a alguns sinais clássicos da LV, como febre, anorexia, perda de peso e palidez . A persistência do parasita é influenciada por citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β (5)(49).

Em indivíduos assintomáticos, há um aumento no número de células T CD4+ e as células T CD8+ produzem grandes quantidades de IFN- γ . As citocinas IL-12, TNF- α e IFN- γ estão envolvidas na ativação e diferenciação das células para a eliminação dos parasitas (Gaurav Gupta, 2014). A IL-12 induz a produção de IFN- γ , mantendo uma resposta protetora. A interação sinérgica entre IFN- γ e TNF- α desempenha um papel no controle da infecção.

Nas células mononucleares do sangue periférico de indivíduos com infecção assintomática, a estimulação com antígenos de *Leishmania* resulta na produção de IL-2, IFN- γ e IL-12(5).

No modelo murino BALB/c de leishmaniose cutânea causada por *L. (V) major*, já está bem estabelecido que uma resposta imune do tipo 1, com predominância de IFN- γ e IL-12, leva à cura das lesões e proteção contra reinfecções. Por outro lado, uma resposta do tipo 2, com predominância de IL-4, IL-5 e IL-10, entre outras, resulta em uma doença grave, visceral e geralmente fatal (54). No entanto, essa distinção não é tão clara em casos humanos e em alguns modelos de LV.

Os genes relacionados ao complexo MHC classe I e classe II (HLA) têm associação com a predisposição genética à leishmaniose. As variações desses genes impactam positiva ou negativamente o desfecho da doença. O complexo HLA, localizado na região 6p21 do cromossomo, demonstra um alto grau de polimorfismo. Cada indivíduo carrega diversos alelos HLA em um cromossomo, formando um haplótipo. Esses genes são responsáveis pela codificação de glicoproteínas MHC, divididas em classes I e II, as quais apresentam antígenos às células T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. Isso desencadeia uma reação imunológica ativada por células T, resultando na definição da imunidade anti-*leishmania* em modelos animais e em seres humanos (55).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos

Para os experimentos foram utilizados parasitos *L. (L.) infantum* da cepa MHOM/BR/1972/LD.

4.2. Cultivo de Parasitos de *L. (L.) infantum in vivo*

A manutenção de parasitas de *L. (L.) infantum* da cepa MHOM/BR/1972/LD foi realizada por meio de infecção experimental em hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) (Saini, 2020). Foi administrado um inóculo por via intraperitoneal contendo 5×10^8 formas amastigotas em Tampão Fosfato-Salino (PBS) 1X a um grupo de 5 animais. As amastigotas foram obtidas a partir de homogenatos de baços de animais previamente infectados. Após 60 dias de infecção, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de Quetamina (100 mg/Kg de peso) e Xilazina (2% 10 mg/Kg de peso) via intraperitoneal. Dos animais, os baços foram retirados, pesados e mantidos estéreis a 4° C.

As marcações do órgão em lâminas de vidro ("Imprints") foram fixadas em metanol absoluto por 5 minutos e coradas com solução de Giemsa (Merck) em tampão borato de sódio 0,1 M por 15 minutos. A partir da maceração do baço em PBS, o homogenato foi utilizado para infectar um novo grupo experimental visando a manutenção da cepa, com inóculos contendo 5×10^8 formas amastigotas. Além disso, realizou-se o isolamento de formas promastigotas *in vitro*.

A determinação da carga parasitária foi realizada por observação microscópica de imprints ou carimbos de cortes de fígado e baço dos animais, seguindo o método de Stauber (56), determinando-se o número de amastigotas e o número de células nucleadas por campo observado. Esta proporção permite estimar a carga infectante em fígado ou baço, determinando a carga infectante de cada órgão por multiplicar a razão amastigota célula pelo peso do órgão em miligramas com um fator de 2000 para correção final. Note-se de que a infecção é determinada por órgão e não pelo animal.

4.3 Cultivo *in vitro* de Parasitos de *L. (L.) infantum*

Formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram isoladas a partir do cultivo de homogenatos de baços de animais previamente infectados, conforme descrito anteriormente. Para esse processo de isolamento, o homogenato de baço foi incorporado ao meio M 199 (Sigma®), ao qual foram adicionados hemina, bicarbonato de sódio (Sigma®) e HEPES (Sigma®), juntamente com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®). O progresso da cultura foi monitorado diariamente até que as formas promastigotas se desenvolvessem, o que normalmente ocorreu em cerca de 1 semana.

Após a confirmação da presença de formas promastigotas, foram retiradas alíquotas da cultura-matriz em uma diluição de 1:10, que foram então adicionadas ao Meio M199 contendo 10% de soro fetal bovino e 5% de urina masculina humana filtrada. As culturas foram mantidas em estufa a uma temperatura média de 24 °C. As transferências subsequentes foram realizadas a cada 4 dias, seguindo a proporção de 1:10.

4.4 Viabilidade celular por Brometo de Etídio (BE)

As formas promastigotas obtidas da cultura celular foram contadas em uma câmara de Neubauer e sua concentração foi ajustada para 5×10^7 /mL de promastigotas.

Em uma placa de poliestireno com 96 poços de microtitulação preta (Costar®), foram adicionados 100 µL de parasitas a uma concentração de 5×10^7 /mL e 10 µL de solução BE 1 mg/mL em dois conjuntos de triplicatas. Em um dos conjuntos, foram adicionados 110 µL de formaldeído a 10% para fixação, enquanto no outro conjunto foram adicionados 110 µL de PBS 1X para manter os parasitas não fixados. Além disso, como controle de fundo fluorescente, foi realizado mensurações de fluorescência de 10 µL de solução BE e PBS 1X 200 µL em poços sem promastigotas.

A fluorescência da associação de brometo de etídeo com o DNA, que ocorre em células mortas, foi obtida ao realizar a leitura em um espectrofluorímetro, com um filtro de excitação de F535/25 nm e emissão de F595/35 nm. A porcentagem de parasitas mortos foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % de viabilidade = $(F595 \text{ de promastigotas sem formaldeído} - F595BE) \times 100 / (F595 \text{ de promastigotas com formaldeído} - F595BE)$. A média das triplicatas era considerada a viabilidade geral do cultivo de promastigotas.

4.5 Infecção experimental

4.5.1 Animais

Para avaliar a resistência e suscetibilidade de camundongos à *L. (L.) infantum*, utilizamos camundongos BALB/c da linhagem WT e/ou da linhagem GKO, adquiridas do Jackson Lab.JaxMice(57). Os camundongos eram mantidos em condições livres de patógenos (SPF) pela colônia central de animais da FMUSP, sendo que os animais GKO eram provenientes de embriões criopreservados de crescimento da linhagem original recebida do JaxMice.

4.5.2 Grupos Experimentais

Os camundongos BALB/c WT (n=30) e BALB/c GKO (n=15) foram distribuídos em três grupos. Esses grupos foram denominados como G1, G2, Controle. O grupo de controle não foi exposto a nenhum inóculo, enquanto o Grupo G1 recebeu uma única dose de 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) infantum* provenientes de cultura celular, e o Grupo G2 recebeu quatro doses semanais do mesmo conteúdo parasitário. Os animais foram mantidos conforme descrito na seção 4.2. Amostras de sangue foram coletadas dos animais nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 após a infecção. A coleta foi realizada por uma leve secção da extremidade final da cauda, com as amostras sendo armazenadas em papel filtro a -80°C . O Grupo 1 recebeu uma única dose de 1×10^7 promastigotas, enquanto o Grupo 2 recebeu quatro doses semanais de 1×10^7 promastigotas (conforme indicado na Tabela 1). A eutanásia foi conduzida aos 30 dias de infecção, seguindo o protocolo descrito previamente (conforme detalhado na seção 4.2).

Tabela 1 Esquema do calendário de infecção experimental, administração de inóculos, coleta de sangue e eutanásia dos animais.

Camundongos			
Dias de Infecção	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2
0	Coleta		
1	-	Inóculo	Inóculo
8	-	-	Inóculo
14	Coleta		
15	-	-	Inóculo
22	-	-	Inóculo
28	Coleta		
30	Eutanásia		

4.5.3 Obtenção do eluato de sangue dos camundongos infectados para sorologia

Os círculos de papel filtro que continham o sangue coletado (conforme ilustrado na Figura 3) foram eluídos utilizando 300 µL de um tampão de lise de eritrócitos. Esse tampão realiza a conversão da hemoglobina e estabiliza a ciano-hemoglobina. O tampão de lise de eritrócitos continha Tris/HCl 10 mM pH 7.5, Cloreto de Amônio 150 mM, Azida de sódio 1 mM e Nitrito de sódio 1 mM.

Os círculos de papel filtro e o tampão foram adicionados a uma placa de cultura celular com 24 poços. Para permitir uma eluição eficaz, as amostras foram incubadas durante a noite em temperatura ambiente, com agitação constante. Após a eluição, as absorbâncias individuais das amostras foram medidas a 540 nm em espectrofotômetro.

Esse procedimento possibilitou a normalização da quantidade de sangue na solução, correspondente a uma diluição de 1:100, utilizando PBS 1X(58).

4.5.4 Coleta de sangue total e tecidos

Após um período de 30 dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia e, em seguida, procedeu-se à coleta de sangue total diretamente do coração. O sangue foi meticulosamente coletado em tubos de coleta contendo um agente anticoagulante, especificamente o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), a fim de preservar sua integridade celular. Este sangue destinou-se à posterior separação de linfócitos sanguíneos, preparando-o para análise por citometria de fluxo.

Foram coletados baço e fígado. Esses órgãos foram divididos em fragmentos. Alguns desses fragmentos foram destinados à análise histológica para avaliação morfológica do tecido, realizada através da coloração em HE (hematoxilina e eosina). Além disso, foram separados fragmentos para detecção e quantificação parasitária através da técnica de PCR em tempo real. Outros fragmentos do baço foram reservados para o isolamento de linfócitos esplênicos, a serem utilizados na citometria de fluxo.

4.6 Hematoxilina-Eosina (HE)

Os fragmentos do baço e do fígado foram encaminhados para análise histológica, a fim de serem posteriormente examinados através de microscopia óptica. O processamento das amostras, bem como a coloração (hematoxilina e eosina), foram conduzidos na seção de histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. As lâminas foram observadas e fotografadas utilizando o microscópio Olympus® BX-50, equipado com o sistema fotográfico Optomics (Câmera C-Mos).

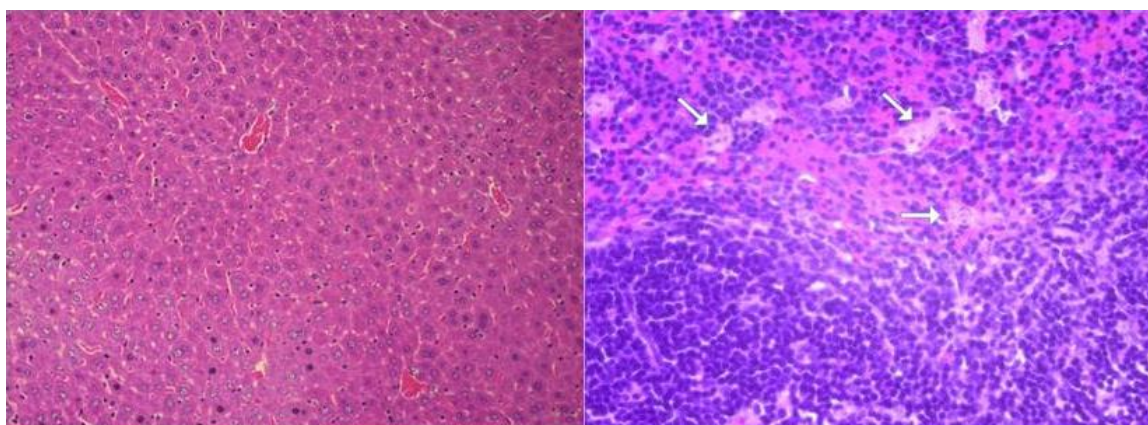


Figura 4- Histologia do fígado (esquerda) objetiva 100X e baço (direita), objetiva 40X de camundongos BALB/c infectados por *L. L. infantum*. Na figura (esquerda), podemos observar uma leve hipertrofia e hiperplasia de células de Kupffer no fígado, sem presença de infiltrados portais. Na figura (direita), é possível identificar alguns macrófagos infectados com poucas amastigotas dispersas na polpa vermelha (indicadas pelas setas).

4.7 Ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos

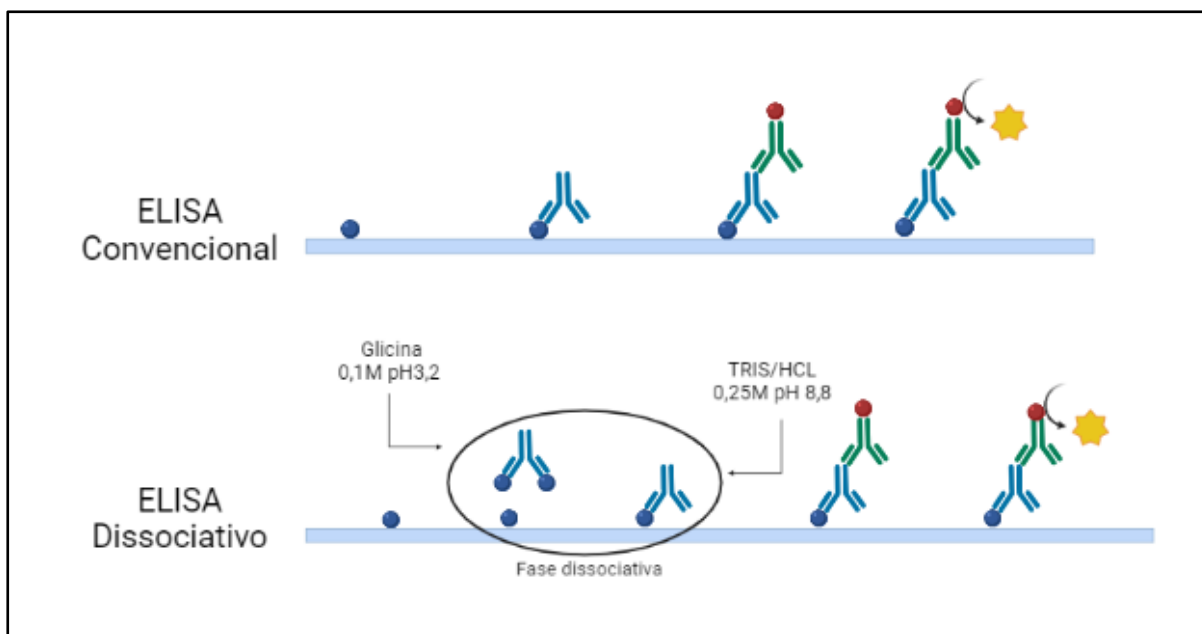


Figura 5- Representação esquemática do ELISAc (acima) e ELISAd (abaixo).

4.7.1 Antígeno – Extrato total de promastigota (ETP)

As promastigotas de *L. (L.) infantum*, provenientes de uma cultura celular em fase exponencial, foram recuperadas por centrifugação a 4.400 rpm durante 15 minutos a 4° C. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi descartado e o pellet foi ressuspensão em 15 mL de PBS 1X. Uma segunda centrifugação sob as mesmas condições foi realizada. O novo sobrenadante foi novamente descartado e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de Tampão de Lise Celular. Esse tampão consistia em: 0,05 M de TRIS, 4 M de Uréia, 5 mM de EDTA, 0,1 M de KCl, 0,5% de SDS, 5 mM de Benzamidina e 0,01% de Aprotinina.

A suspensão foi aquecida a 65°C utilizando um termo-bloco aquecedor (BioPlus IT-2002) por 15 minutos. Após o aquecimento, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante resultante teve seu conteúdo proteico quantificado pelo método descrito na seção 4.8.1 e dividido em alíquotas e armazenado a -80°C para uso posterior, conforme descrito por de Carvalho CA em 2013(59).

4.7.2 ELISAc

O ensaio foi designado como ELISAc destinava-se à detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, seguindo o protocolo descrito por Venkatesan e Wakelin em 1993 (60). Placas de poliestireno com 96 poços para microtitulação foram sensibilizadas com 1 µg de ETP por poço, suspenso em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5 (100 µL/poço). A sensibilização das placas ocorreu através de incubação por 16 horas a 4°C, dentro de uma câmara úmida.

O protocolo prosseguiu com a lavagem das placas em uma lavadora de placas automática Tecan, utilizando PBS 1X com a adição de 0,05% de Tween 20 (PSBT). Após a lavagem, as placas foram bloqueadas utilizando PBST com adição de 0,3% de Leite Mólico (PSBTL) (300 µL/poço) e incubadas por 1 hora a 37°C em uma estufa.

Depois da incubação, adicionou-se eluatos coletados de camundongos experimentalmente infectados, conforme descrito no item 4.5.3.. Esses eluatos foram diluídos 1:100. Com o objetivo de detectar os anticorpos durante o curso da infecção experimental e avaliar a progressão da doença, foram adicionados eluatos coletados nos dias 0, 14 e 28 da infecção dos camundongos.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C e, em seguida, lavadas com PBST. Após essa etapa de incubação, foram adicionados conjugados anti-mouse IgG e, marcados com peroxidase e diluídos a 1:10.000 (100 µL/poço). A incubação foi repetida por mais 1 hora a 37°C, seguida de lavagem com PBST.

A reação foi revelada pela adição de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) (100 µL/poço). As reações foram interrompidas após 30 minutos de incubação, através da adição de Ácido Clorídrico 4 N (50 µL/poço). A densidade ótica das reações foi obtida utilizando em espectrofluorímetro filtro de 450 nm.

4.7.3 ELISAd

O ELISAd descrito por Carvalho et al., 2020 (61), foi empregado para a detecção de CIC em amostras de eluato. Eluatos de animais experimentalmente infectados, foi usado placas de poliestireno com 96 poços, onde para microtitulação foram sensibilizadas com 1 µg de ETP por poço, suspensos em tampão carbonato de sódio 0,1 M pH 9,5 (100 µL/poço), incubadas durante 16 horas a 4°C, em uma câmara úmida.

Seguido de lavagem das placas em uma lavadora de placas automática, utilizando PBST, seguida de bloqueio com PBSTL (300 µL/poço) durante 1 hora em uma estufa a 37°C.

Para prosseguir com a reação, um conjunto de duas duplicatas contendo amostras de eluato camundongos em diluição de 1:100 foi adicionado (100 µL/poço).

Na fase dissociativa, uma das duplicatas recebeu uma solução de Glicina 0,1 M pH 2,5 (25 µL/poço). Após um período de incubação de 5 minutos, a reação foi neutralizada com TRIS/HCL 0,25 M pH 8,8 (25 µL/poço). A segunda duplicata foi destinada ao ELISA convencional, servindo como controle, e recebeu PBS 1X. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C e, posteriormente, lavadas com PBST.

Após a incubação, um conjugado espécie-específico (anti-mouse IgG) marcado com peroxidase, diluído 1:10.000 (100 µL/poço), foi adicionado. Uma nova incubação de 1 hora a 37°C foi realizada, seguida de uma lavagem com PBST. A revelação das reações foi feita através da adição de TMB (100 µL/poço). A reação foi interrompida após 30 minutos de incubação, através da adição de HCl 4 N (50 µL/poço). A densidade ótica das reações foi obtida utilizando por espectrofluorímetro a 450 nm

A concentração de anticorpos foi expressa em termos de densidade ótica da reação ou pelo índice de reatividade, definido como a razão entre a densidade ótica obtida na amostra e a densidade ótica do *cut-off*. O *cut-off* foi calculado como a média dos controles negativos da mesma placa, acrescida de duas vezes o desvio padrão.

4.8 PCR quantitativo em tempo real para análise da carga parasitária

4.8.1 Quantificação de proteína pelo método de Biureto

A técnica de quantificação de proteínas utilizando o método de biureto foi executada com o Kit WienerLab, projetado para medir proteínas totais em eluato ou plasma. No entanto, houve uma adaptação para a sua aplicação em placas de microtitulação, a fim de quantificar proteínas presentes em tecidos de animais infectados experimentalmente.

Na placa de microtitulação, foram adicionados 3 µL da amostra e 250 µL do reagente do kit. A placa foi então incubada em uma estufa a 37°C por 15 minutos. Após esse período, a leitura da placa foi realizada utilizando espectrofotometria a 540 nm. A quantificação das proteínas foi obtida através do cálculo fornecido pelo fabricante.

$$fator = \frac{4,7 \text{ g/dL}}{D.O. 540 \text{ nm}} \text{ ProteinasTotais (g/dL)} = Dxfator$$

4.8.2 Curva Padrão

A curva padrão utilizada para determinar a quantificação da carga parasitária nos animais infectados foi construída em duplicata, utilizando DNA extraído de concentrações conhecidas de promastigotas. A construção da curva envolveu diluições decrescentes em base 10, partindo de uma concentração inicial de 10^7 promastigotas.

4.8.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi conduzida utilizando o kit QIAamp® DNA Mini (QIAGEN) de acordo com as orientações do fabricante. Em 80 μ L da amostra (fígado ou baço dos camundongos experimentalmente infectados, assim como a curva padrão), foram adicionados 100 μ L de ATL e 20 μ L de proteinase K, seguido de incubação por 1 hora a 56°C em um banho-maria. Após esse período, as amostras foram novamente incubadas por 10 minutos a 70°C e processadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do kit. As amostras, eluídas em 100 μ L de tampão de eluição contendo DNA, foram então alíquotadas e armazenadas a -20°C.

4.8.4 Confeção e eficiência dos *primers*

Os *primers* foram projetados por meio do software Prime 3, utilizando sequências obtidas a partir do banco de dados NCBI NucleotideDatabases. A fim de serem empregados no ensaio de PCR em tempo real, todos os *primers* foram submetidos a testes e as reações foram padronizadas. A eficiência da reação foi calculada utilizando a fórmula:

$$E = \left(10^{\left(\frac{-1}{slope}\right)} - 1 \right) \times 100$$

Todos os primers utilizados apresentaram eficiência igual ou superior a 90%, como pode ser observado na tabela abaixo:

Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados para a realização do Real-Time PCR.

Target	Primers	Sequências	Referências
kDNA <i>L. (L.) infantum</i>	Leish 1	5'-AACTTTTCTGGTCCTCC-GGGTAG-3'	(62)
	Leish 2	5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3	

4.8.5 Condições do ensaio e análise dos resultados para PCR

Os ensaios de PCR em tempo real foram conduzidos no ABI Prism 7500 SequenceDetection System® (Applied Biosystems®), utilizando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®), conforme o protocolo fornecido pelo fabricante. O termociclador foi programado para uma etapa inicial de 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por uma fase de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto, seguido por um passo de desnaturação. Os resultados obtidos foram expressos em valores de CT (cyclethreshold – número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). Cada amostra foi testada em triplicata.

4.9 Citometria de Fluxo

4.9.1 Separação de Linfócitos

A separação dos linfócitos foi realizada utilizando meio de gradiente de densidade (Ficoll®-Paque PREMIUM, Cytiva). As células esplênicas coletadas de camundongos foram manuseadas de forma asséptica em fluxo laminar e dissociadas através de um filtro de células (cellstrainer BD Biosciences®, New Jersey, EUA) na presença de 3 mL de PBS 1X. O sangue coletado com anticoagulante foi diluído em 3 mL de PBS 1X e adicionado volumetricamente ao Ficoll®-Paque PREMIUM. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 400 × g por 30 minutos a 20°C. O anel formado por linfócitos foi cuidadosamente coletada por pipeta e

transferida para um novo tubo e adicionados 6 mL de PBS 1X . Em seguida, foi centrifugado a $100 \times g$ por 15 minutos a $20^\circ C$. Os linfócitos foram ressuspensos em mais 6 mL de PBS 1X. E as amostras foram centrifugadas novamente a $100 \times g$ por 10 minutos a $20^\circ C$. O pellet contendo os linfócitos foi congelado em 1 mL de PBS 1X contendo 10% de DMSO para posterior análise.

4.9.2 Marcação Intracelular

Na análise de linfócitos esplênicos e de sangue total foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais anti-mouse: anti-CD3 marcado com alofcoeritrina (APC), anti-CD19 marcado com Fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) e anti-CD8 marcado com ficoeritrina (PE)

Os linfócitos foram descongeladas à temperatura ambiente e transferidas para tubos Falcon de 15 mL. Em seguida, 5 mL de PBS 1X estéril foram adicionados; e centrifugados a 1.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 200 μL de tampão PBS 1X. As populações de linfócitos esplênicos e de sangue total foram contadas usando um contador automático (Scepter™ CellCounter). Foram transferidos 50 μL na concentração de 1×10^7 dos linfócitos para tubos de citometria para a marcação de superfície celular com anticorpos monoclonais diluídos na concentração 1:50 em PBS 1X.). As células foram incubadas por 30 minutos a $4^\circ C$, protegidas da luz. Após essa incubação, as células foram analisadas utilizando um citômetro de fluxo (LSRFortessa, BD Biosciences®). Os dados foram coletados no software FACSDIVA BD e analisados no software FlowJoX.

4.9.3 Estratégia de Análise

Para avaliar a proliferação celular T, bem como a proliferação e maturação de células B nos camundongos BALB/c WT e GKO, tanto os infectados por um único inóculo de promastigotas de *L. (L.) infantum* quanto os infectados por múltiplos inóculos, assim como os controles, foi adotada a estratégia de análise conforme esquematizada abaixo. A compensação foi realizada utilizando kit AbC™ Anti-Rat/Hamster Antibody Compensation Bead Kit (Bio-Rad).

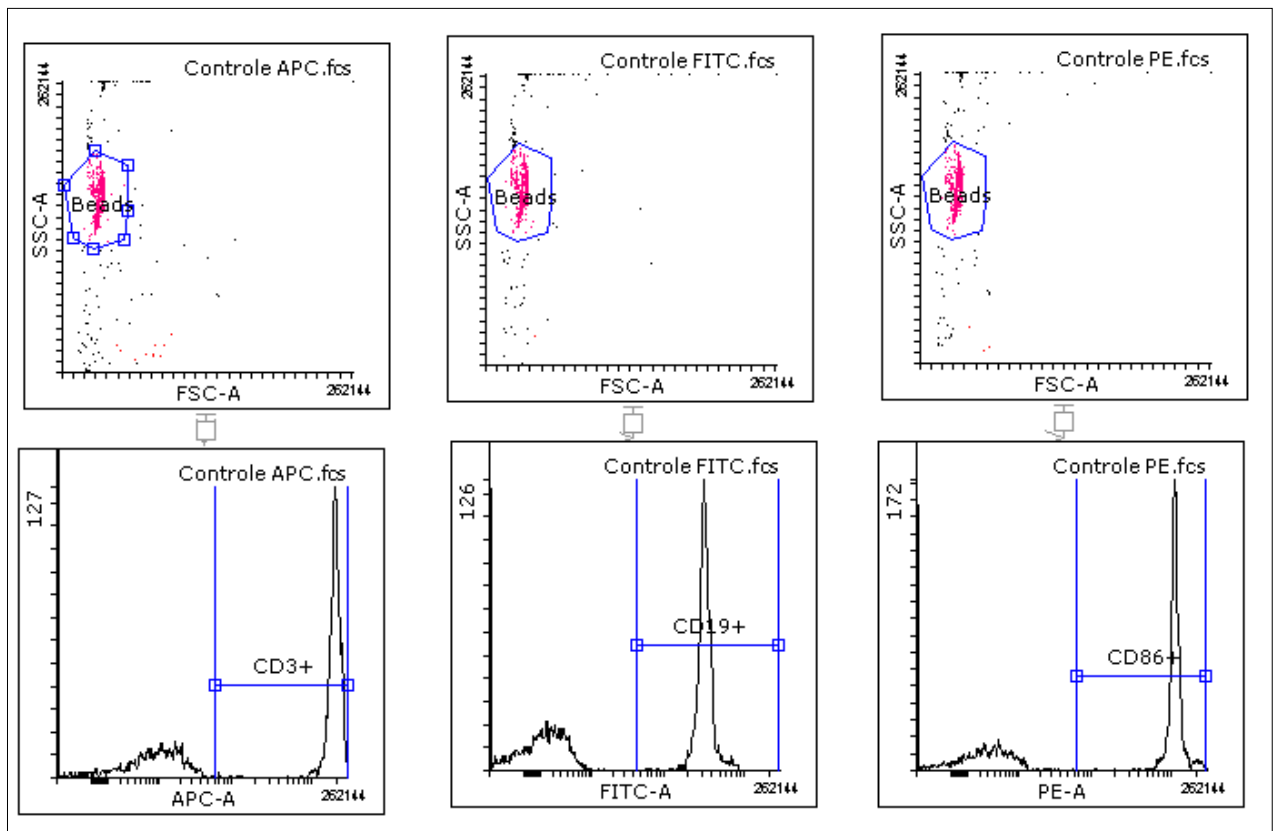


Gráfico 1 - Estratégia de análise utilizando o Beads para compensação de citometria de fluxo. As Bead foram marcadas anti-CD3 (APC), anti-CD19 (FITC) e anti-CD8 (PE).

4.10 Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo software GraphPadPrisma 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CaliforniaUSA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES ESPECÍFICAS

5.1 Padronização da infecção experimental

Como os camundongos são menos suscetíveis à infecção por *L. (L.) infantum*, inicialmente foi conduzida uma infecção experimental para verificar se esses animais apresentariam parasitismo no baço e fígado, e se seria possível detectar anticorpos ao longo da infecção. Isso permitira uma análise comparativa posterior. Para essa finalidade, um total de 15 animais foi dividido em 3 grupos: Controle, G1 e G2. O grupo Controle não recebeu inóculos, o grupo G1 recebeu uma única dose de 1×10^7 promastigotas de *L. (L.) infantum*, e o grupo G2 recebeu 4 doses semanais do mesmo inóculo. Essa padronização foi realizada utilizando apenas a linhagem WT.

5.1.1 Determinação da densidade parasitaria de animais experimentalmente infectados

Determinar a quantidade de parasitas em um modelo com baixa infecção é um desafio quando se utiliza métodos morfológicos, especialmente quando o peso do baço é inferior a 100 mg. Para enfrentar esse desafio, optamos por empregar o qPCR, uma técnica altamente sensível e quantitativa. No entanto, para garantir a consistência dos resultados entre diferentes amostras, escolhemos normalizar os dados com base nas concentrações de proteínas totais nas preparações das quais os ácidos nucleicos serão extraídos.

Nesta primeira fase, estamos compartilhando os resultados da padronização da reação de qPCR e da eficácia do método proposto. Essa padronização nos permitirá obter uma avaliação precisa da carga parasitária, mesmo em modelos com infecção leve.

5.1.2 Padronização da reação qPCR para *L. (L.) infantum*

Para padronizar a qPCR, adquirimos primers comerciais com as sequências descritas em nossos métodos e preparamos uma suspensão definida de promastigotas em cultura contendo 100.000 parasitas/ml. O DNA foi extraído dessa suspensão, e foram feitas diluições seriadas do DNA do parasita para construir a curva padrão até 1×10^{-1} , que foram então submetidas à reação de qPCR. As curvas de densidade ótica resultantes podem ser observadas no gráfico 2A. A fluorescência do produto está relacionada ao DNA de fita dupla associado ao corante fluorescente, portanto, o que visualizamos são as bases livres da reação sendo incorporadas em produtos de fita dupla. Todas as reações produzem um máximo de fluorescência, que depende apenas da quantidade de bases fornecidas na reação. Determinar o ciclo em que a reação atinge 50% desse máximo (CT) proporciona uma estimativa inversamente proporcional ao número original de cópias de DNA na reação.

Antes de utilizar esse valor quantitativo, é crucial avaliar a qualidade do produto formado. Isso é evidenciado na gráfico 2B, que ilustra a determinação da temperatura de *melting* usando o mesmo princípio da hibridização da fita dupla com sondas fluorescentes. A variação da fluorescência em função do aumento da temperatura representa o ponto em que a fita dupla de DNA se separa em fitas simples. Notavelmente, a curva de *melting* é semelhante em todos os pontos da curva padrão, sobrepondo-se quase perfeitamente com a mesma temperatura de *melting*. Isso indica um produto único da reação. Caso houvesse vários produtos de reação, a curva de *melting* mostraria múltiplos picos de variação, indicando reações oligo-específicas, ou uma ampla variação de temperaturas, sugerindo reações inespecíficas. Portanto, essa reação padronizada é específica para o alvo da qPCR, o kDNA do minicírculo do cinetoplasto de *L. (L.) infantum*.

Na etapa de quantificação, analisamos o valor Ct de cada diluição de DNA utilizada na reação e realizamos uma regressão linear comparando com o \log_{10} da concentração de DNA parasitário presente na amostra. A análise da regressão linear resultou nos seguintes parâmetros obtidos da qPCR: inclinação (slope) -3,202, eficiência percentual (EFF) de 105,96% e coeficiente de correlação (R^2) de 0,992, como ilustrado na gráfico 2C.

A análise da curva padrão, conforme apresentada na gráfico 2A, revela um valor de ciclo limiar (CT) de 0,599. O CT corresponde ao número de ciclos de PCR necessários para atingir o limiar de detecção no início da amplificação. O número de ciclos requeridos para a amplificação é inversamente proporcional à quantidade de ácidos nucleicos presentes na

amostra. Portanto, valores baixos de CT indicam uma alta quantidade de cópias de DNA parasitário.

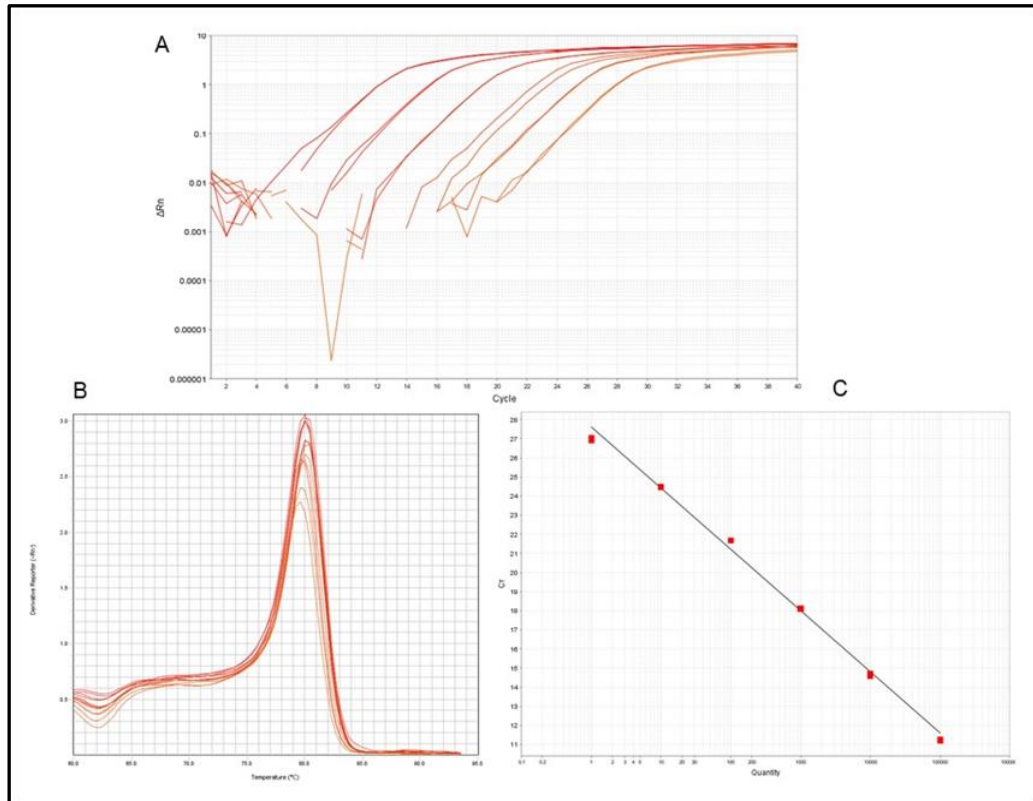


Gráfico 2 -

(A) Curva de Amplificação da Reação de PCR em Tempo Real de Promastigotas de *L. (L.) infantum*. (B) Curva de Temperatura de *melting* obtida por qPCR de Promastigotas de *L. (L.) infantum*. (C) Curva Padrão Relativa ao Gene da DNA Polimerase de *L. (L.) infantum* no Sistema SYBR®-Green. O gráfico foi gerado através de uma regressão linear estabelecida pelo software do aparelho de qPCR. No eixo X, estão os valores de Log da concentração de parasitas variando de 105 a 10-1. O eixo Y representa os valores de Ct correspondentes a cada diluição. A curva possui uma eficiência de 105,96%, um slope de -3,202 e um R² de 0,992.

5.1.3 Padronização da quantificação de parasitas em amostras de tecido de camundongos infectados

Uma vez estabelecidas as condições para a quantificação de parasitas por meio da reação de qPCR, foi necessário realizar uma padronização para os dois órgãos mais frequentemente analisados em relação à carga parasitária em infecções por esses parasitas, ou seja, o fígado e o baço.

Para esse propósito, comparamos um grupo de cinco animais controle com um grupo de dez camundongos infectados por *L. L. infantum* um mês antes do sacrifício. Foram coletados fígado e baço dos animais, inicialmente pesados de forma intacta. Em seguida, foram obtidos fragmentos menores, que foram pesados e submetidos à homogeneização em tampão de extração, conforme descrito nos Métodos. Antes da extração, a concentração de proteína no homogenato foi determinada, seguindo o procedimento descrito nos Métodos.

O gráfico 2 ilustra claramente a relação direta entre o peso do fragmento e a concentração de proteína no homogenato, com um coeficiente de determinação (r^2) de 0,48 e um valor de p inferior a 0,05 na regressão linear dos órgãos. É evidente que essa correlação é mais notável para o fígado, considerando o maior peso dos fragmentos (representados por círculos abertos).

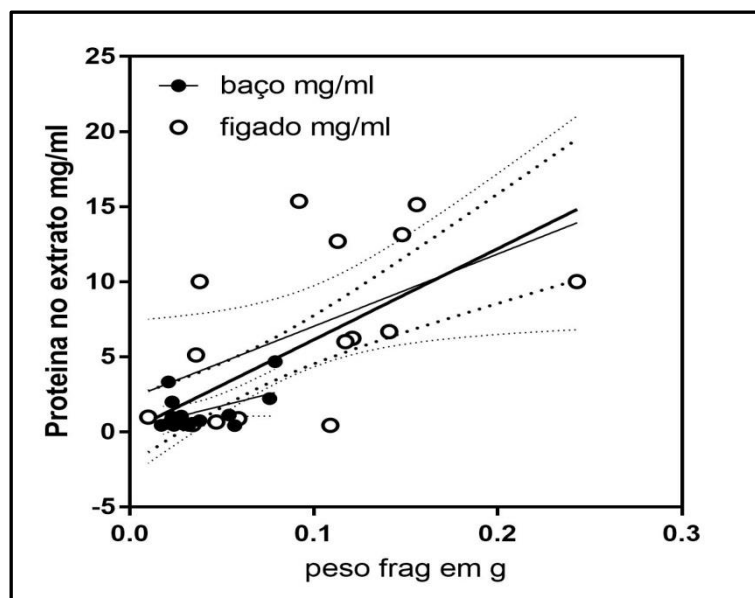


Gráfico3 - Análise Comparativa entre o Peso do Fragmento e a Concentração Proteica no Extrato. Observou-se que os fragmentos de baço apresentaram consistentemente um peso muito menor em comparação aos fragmentos de fígado. Isso se deve ao fato de que o baço de camundongos possui um peso geralmente inferior a 300 mg, mesmo durante a infecção. A análise da correlação linear entre a concentração proteica determinada nos extratos e o peso dos órgãos revelou um coeficiente de determinação (r^2) de 0,48 e um valor de $p < 0,0001$. Isso sugere uma relação estatisticamente significativa entre a concentração proteica e o peso dos órgãos analisados.

Agora podemos realizar uma avaliação comparativa entre a determinação direta da qPCR nos extratos e sua relação com a concentração protéica, e, portanto, com o peso do fragmento. Os resultados dessas análises estão apresentados no gráfico 4. Para essa análise, examinamos o número de cópias de DNA obtidas por miligrama de proteína, comparando os valores de C_T corrigidos pela concentração proteica e, conseqüentemente, pelo peso do fragmento utilizado.

É evidente inicialmente que a qPCR bruta apresenta uma resposta excelente, permitindo a distinção clara entre os camundongos controle e os infectados, independentemente do órgão analisado. Ao usar esses parâmetros, notamos que nenhum animal realmente se mostrou negativo utilizando o parâmetro bruto. No entanto, é importante destacar a possibilidade de interferências dos *primers*, resultando em produtos de amplificação maiores quando analisados isoladamente.

Ao examinar os resultados controlados pela concentração proteica e, portanto, pelo peso do fragmento, percebemos uma mudança significativa. A maioria dos animais de controle passa a apresentar resultados completamente negativos. Por outro lado, observamos uma maior dispersão dos dados nos animais infectados. Isso é particularmente notável em um

animal que poderia ter sido considerado como controlado quanto ao inóculo, não sendo identificado na análise completa.

Esses achados destacam a importância da correção pela concentração protéica na análise da qPCR, permitindo uma avaliação mais precisa da carga parasitária nos órgãos analisados.

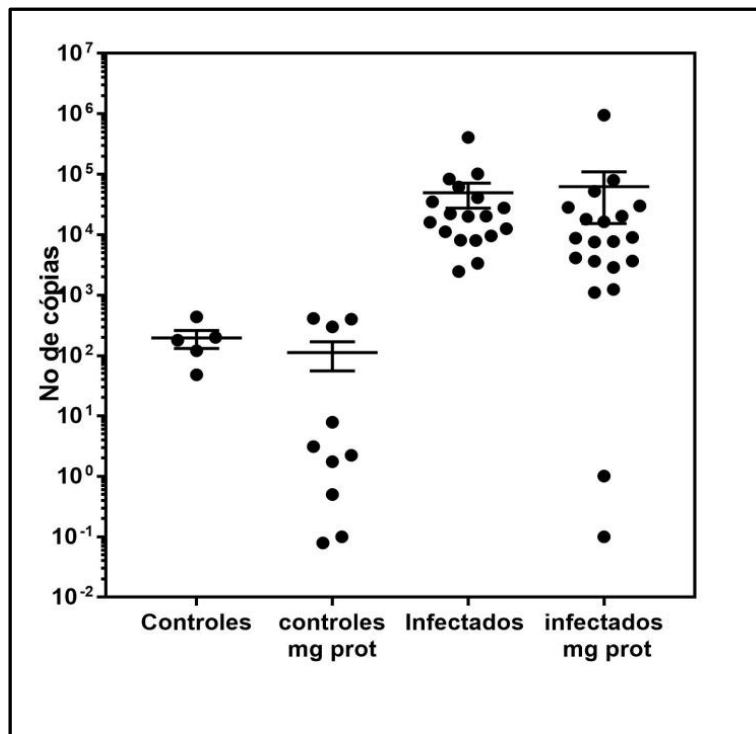


Gráfico 4 - Distribuição de resultados brutos ou controlados de número de parasitas ou número de parasitas por mg de proteína por qPCR em animais controles WT.

Esses resultados ressaltam a possibilidade de determinar o número de parasitas por miligrama de proteína do órgão como uma alternativa viável para quantificar a carga parasitária na LV.

A mensuração da carga parasitária tem sido historicamente uma medida imprecisa da infecção visceral por *Leishmania*. O método clássico desenvolvido por Stauber e colegas baseava-se em uma abordagem comparativa entre núcleos celulares e parasitários em impressões de baço ou fígado de animais infectados, fornecendo apenas uma estimativa aproximada da carga parasitária. Este método funcionava bem para hamsters dourados, que são mais suscetíveis à doença visceral e exibem um aumento progressivo da carga parasitária.

No entanto, esses animais experimentais são maiores, possuem órgãos mais pesados em comparação com os camundongos, mas não apresentam a mesma resistência à infecção, que é o foco deste trabalho

Medir o peso de um órgão após o sacrifício e dissecação de um animal é um desafio, devido à possibilidade de contaminação do órgão por sangue ou coágulos resultantes do processo de dissecação. Isso pode afetar a medição precisa do peso real do órgão, que deve ser feita com uma precisão de miligramas. Portanto, são necessários cuidados meticulosos durante a medição para garantir sua exatidão. Além disso, existem desafios relacionados à distribuição da infecção nos órgãos afetados. No fígado, por exemplo, o modelo murino apresenta uma infecção focal, distribuída por todo o órgão. Isso significa que a retirada de pequenos fragmentos pode levar a uma subestimação da carga parasitária, resultando em falsos negativos. No baço, a situação é diferente, uma vez que o parasita se distribui pela polpa vermelha do órgão, o que poderia resultar na sub-representação de parasitas em fragmentos muito pequenos.

Essas complexidades demonstram as dificuldades em estimar a carga parasitária em animais experimentais. Diversas abordagens alternativas foram exploradas inicialmente, como a quantificação da *Leishmania* por meio de técnicas como citometria de fluxo (63) ou métodos comparativos como a análise dos núcleos das células hospedeiras(56) (ou mesmo o uso de *Leishmania* geneticamente modificadas com genes de marcadores como luciferase ou proteínas fluorescentes)

No entanto, todas essas técnicas esbarram nas complexidades da imunopatologia do modelo murino, que apresenta desde alterações geneticamente dependentes, como genes transportadores de ferro, até outros fatores complexos na imunopatologia, conforme revisado de maneira abrangente por Kaye *et al.* 2004(64).

No gráfico 5, podemos observar a carga parasitária determinada nos baços e fígados de camundongos BALB/c WT infectados com promastigotas viáveis de *L. (L) infantum* (10^6) e sacrificados após 30 dias de infecção. Como demonstrado, os órgãos apresentavam cerca de 10.000 parasitas por mg de proteína do tecido após esse período. Essa carga parasitária foi significativamente maior ($p < 0,01$ no baço e $p < 0,05$ no fígado) em comparação com os animais de controle, especialmente no baço.

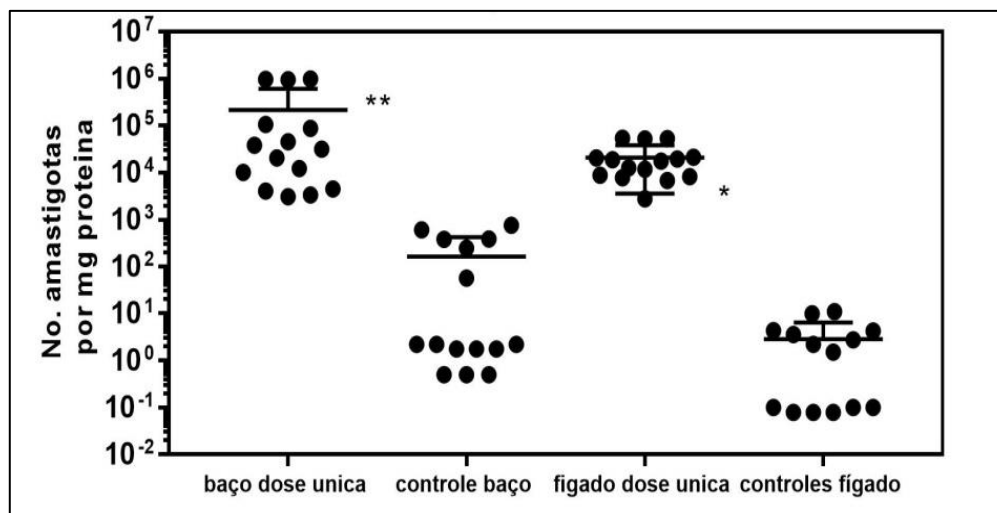


Gráfico 5 - Quantificação por qPCR do Número de Amastigotas de *L. infantum* em Baço e Fígado de Camundongos Após 30 Dias de Infecção com promastigotas de Cultivo Axênico.

É evidente que após 30 dias todos os animais exibiam infecção evidente, embora em uma escala menor. Isso ocorre porque 1 mg de proteína representa um peso 10 vezes maior do que o peso real do órgão. Portanto, encontrar 10.000 amastigotas em 1 mg de proteína significa encontrar cerca de 60.000 amastigotas no baço inteiro. Os resultados obtidos nos fígados também foram altamente consistentes, mas indicaram que neste modelo de infecção o número de amastigotas por órgão foi limitado.

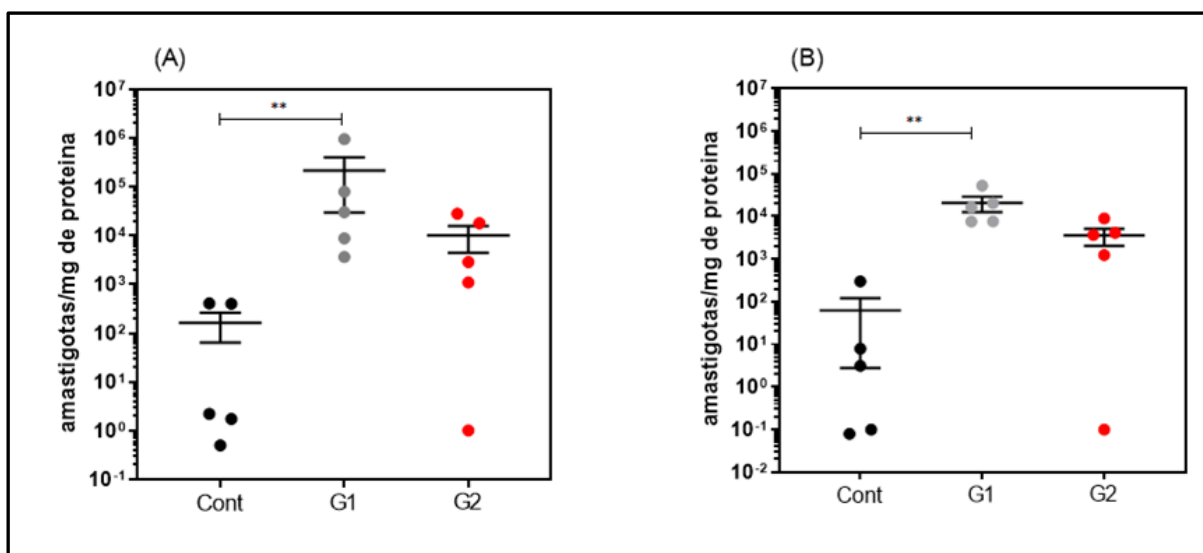
Esses resultados confirmam que o modelo de infecção utilizado é consideravelmente menos eficiente em termos de número de parasitas e desenvolvimento da doença em comparação com o modelo de hamster. Os dados também ressaltam a eficácia do método de qPCR, que conseguiu detectar a infecção em todos os animais infectados.

5.1.4 Comparação da Densidade Parasitária entre Grupos Experimentais Diferentes

A densidade parasitária foi mensurada por meio da técnica de qPCR real. No gráfico 6, é possível observar o número de amastigotas por mg de proteína nos baços e fígados dos camundongos experimentalmente infectados nos grupos G1 (único inóculo), G2 (múltiplos inóculos) e controle (negativo). Os resultados indicam que o parasitismo foi mais intenso no G1 quando comparado ao G2, tanto nos baços quanto nos fígados. No caso do (gráfico 6A), a diferença é estatisticamente significativa com $p < 0,01$, enquanto que no fígado (gráfico 6B), a diferença também é altamente significativa com $p < 0,001$.

Para análise estatística, utilizou-se o método de Kruskal-Wallis com um teste de pós-comparação de Dunn. As médias das triplicatas de cada animal foram usadas para comparação em ambos os órgãos.

Esses resultados preliminares sugerem que o grupo com único inóculo (G1) apresentou uma carga parasitária mais elevada em relação ao grupo com múltiplos inóculos (G2), indicando uma possível influência da quantidade de parasitas na infecção. As análises estatísticas realizadas reforçam a significância dessas diferenças.



Gráficos 6 - Quantificação da Carga Parasitária no Baço e Fígado de Animais Infectados da Linhagem WT por qPCR. (A) Carga parasitária no baço e (B) Carga parasitária no fígado. O gráfico ilustra a relação entre o número de amastigotas de *L. (L.) infantum* por miligrama de proteínas. Círculos fechados representam amostras do baço, enquanto círculos abertos indicam amostras do fígado. Cada ponto corresponde à média das triplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o método de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. A presença de dois asteriscos (**) indica diferença estatisticamente significativa no baço ($P < 0,01$) e no fígado ($P < 0,001$).

5.1.5 Detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* e da presença de CIC

A presença de CIC foi detectada utilizando a técnica ELISAd, conforme ilustrado na gráficos 7. Essa metodologia baseia-se no princípio do ELISAc, com a adição de uma etapa adicional. Nessa etapa, uma solução ácida (Glicina 0,1M pH 2,5) é introduzida logo após a aplicação do eluato na placa. Essa solução tem a função de dissolver os CIC, permitindo que os anticorpos se separem dos complexos formados. Posteriormente, por meio do tratamento com uma solução neutra (TRIS/HCl 0,25M pH 8,8), os anticorpos ligam-se aos antígenos previamente adsorvidos na placa. Essa abordagem, desenvolvida por Carvalho *et al.* em 2013, possibilita a identificação de amostras que poderiam ser falsos negativos, tanto em indivíduos humanos quanto em cães e animais infectados experimentalmente, contribuindo para a identificação de casos positivos de LV (LV).

A detecção de CIC nos camundongos experimentalmente infectados foi realizada ao longo do período de infecção nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, como evidenciado na figura 8. Para cada dia de infecção, foram comparados os resultados obtidos pelos métodos ELISAc e ELISAd. Essa comparação foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

Os resultados demonstraram a presença de CIC no G1 (conforme gráficos 7A), com significância estatística observada no 21º dia de infecção ($P < 0,05$) e no 28º dia ($P < 0,01$). No entanto, para o G2 (gráficos 7B), não foi identificada a presença de CIC, uma vez que não houve diferença significativa na reatividade entre os dias de infecção avaliados. A análise estatística também não revelou significância entre os dias analisados nesse grupo.

Esses resultados indicam que a detecção de CIC por meio do método ELISAd apresentou uma diferença na reatividade ao longo do tempo no G1, evidenciando a formação de CIC após a infecção. No entanto, essa diferença não foi observada no G2, sugerindo que a variação na quantidade de inóculos utilizada pode influenciar na formação dos CIC e sua detecção durante o curso da infecção.

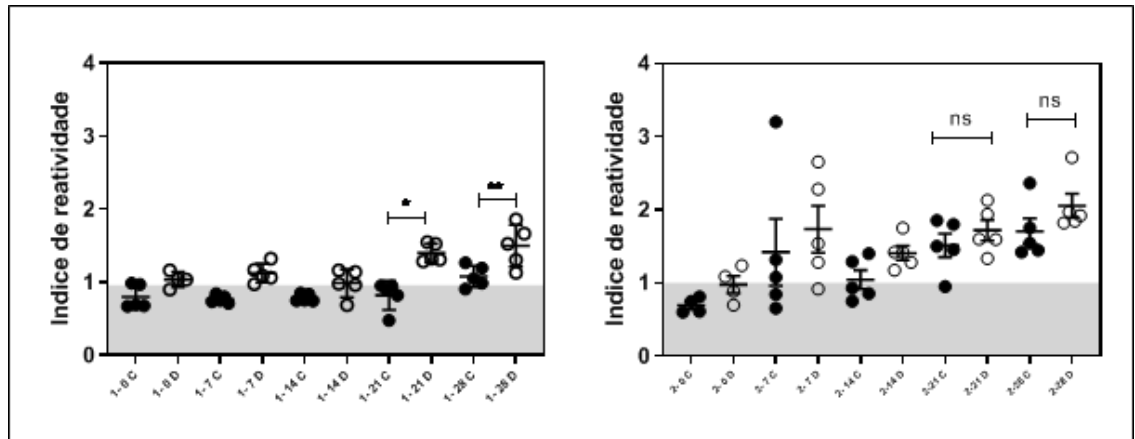


Gráfico 7 -

Detecção de Anticorpos IgG Anti-*Leishmania* e Presença de CIC. Durante a Infecção Experimental em Camundongos BALB/c. As amostras foram testadas nos dias 0, 7, 14, 21 e 28. No painel A, o Grupo 1 foi infectado com uma dose de 1×10^7 de promastigotas, enquanto no painel B, o Grupo 2 foi infectado com quatro doses de 1×10^7 de promastigotas. Os pontos abertos representam resultados do ELISAc, enquanto os pontos fechados são do ELISAd. As barras indicam o desvio padrão. Os asteriscos denotam o nível de significância estatística entre os resultados usando a análise de ANOVA. Um asterisco (*) indica $p < 0,05$ e dois asteriscos (**) indicam $p < 0,01$. A sigla "NS" representa não significante.

5.2 Análise da infecção experimental

5.2.1 Avaliação da densidade parasitária durante a infecção experimental em camundongos WT e GKO.

Após a análise preliminar e a confirmação de que os animais infectados com um inóculo de 1×10^7 foram capazes de apresentar parasitemia, o número de animais por grupo de infecção (G1 e G2) foi aumentado. A figura a seguir ilustra a análise da carga parasitária no baço dos animais experimentalmente infectados.

Observa-se que, para a linhagem WT, ambos os grupos G1 e G2 exibem uma carga parasitária significativamente maior em comparação ao grupo controle, com uma diferença estatística de $p = 0,0076$. No entanto, na linhagem GKO, o parasitismo foi maior apenas no G1, com uma diferença estatística de $P = 0,076$. Nesta linhagem, o G2 não demonstrou diferença estatisticamente significativa. Além disso, ao comparar os grupos entre as duas linhagens, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa.

Esses resultados indicam que, na linhagem WT, ambos os grupos infectados apresentaram uma carga parasitária maior em comparação ao grupo controle. Na linhagem GKO, somente o G1 mostrou um aumento significativo na carga parasitária. No entanto, entre as linhagens e entre os grupos, não foi identificada diferença estatisticamente significativa. Isso sugere que o aumento no número de animais por grupo e a variação na quantidade de inóculos podem influenciar na resposta parasitária, mas essas diferenças não se mostraram estatisticamente significativas entre as condições analisadas.

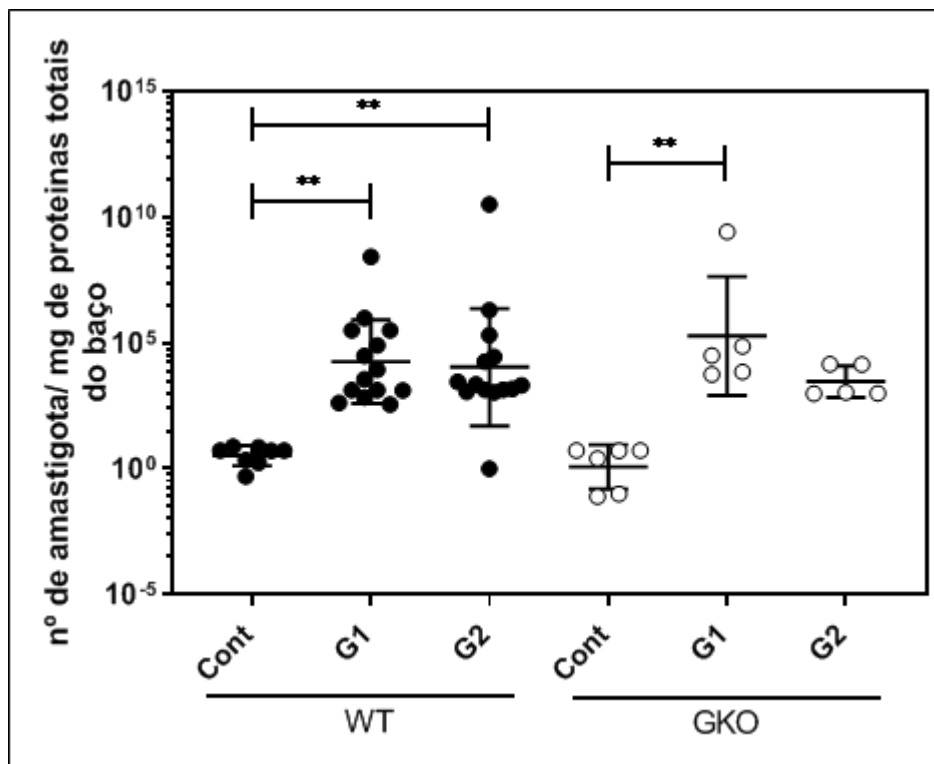


Gráfico 8 - Quantificação Parasitária por qPCR no Baço de Animais Infectados Experimentalmente. Nos gráficos, círculos fechados indicam amostras da linhagem WT, enquanto círculos abertos representam amostras da linhagem GKO. A análise estatística foi conduzida utilizando o método de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. Cada ponto corresponde à média das triplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A presença de dois asteriscos (**) indica uma diferença estatisticamente significativa com $P = 0,0076$.

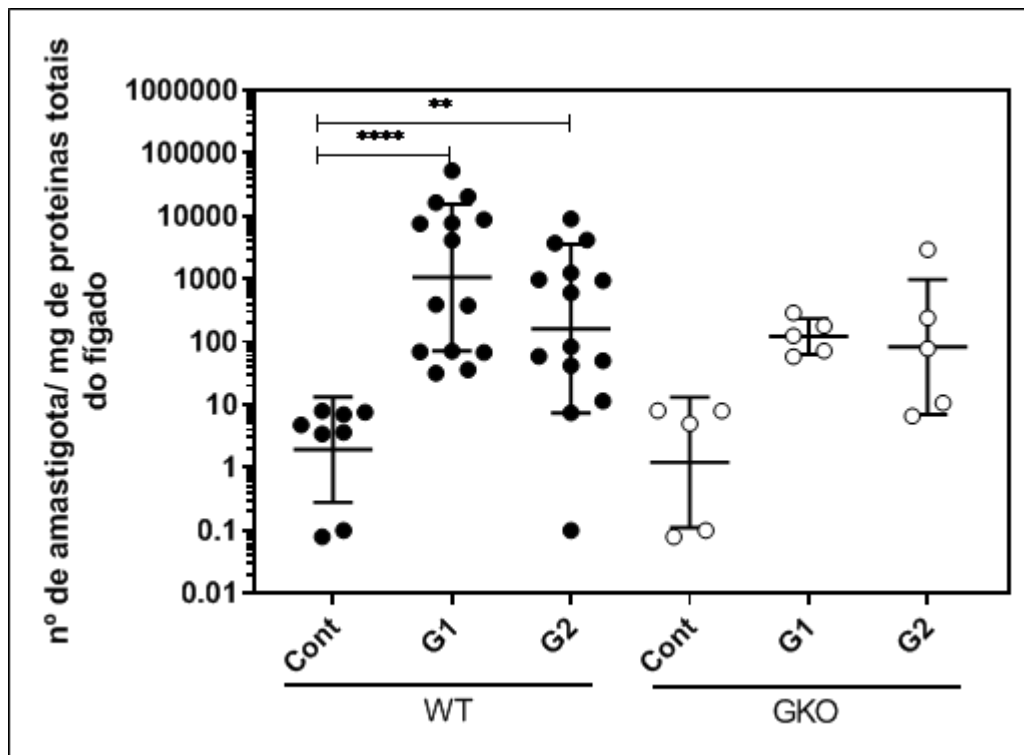
Quando examinamos o parasitismo no fígado dos animais infectados experimentalmente, observamos o seguinte:

Na linhagem WT, notamos que apenas o G1 apresentou uma diferença estatisticamente significativa no parasitismo em relação ao grupo controle, com um valor de $p = 0,0015$. No entanto, no G2 dessa mesma linhagem, que recebeu múltiplos inóculos, embora tenha apresentado parasitas no órgão, não mostrou diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle.

Quanto aos animais da linhagem GKO, nenhum dos grupos demonstrou um parasitismo estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle. No entanto, é possível observar que ambos os grupos apresentaram parasitas no fígado.

Portanto, os resultados indicam que, na linhagem WT, apenas o grupo 1 apresentou uma diferença significativa no parasitismo em relação ao controle, enquanto o grupo 2 não mostrou essa diferença, apesar da presença de parasitas. Já na linhagem GKO, nenhum dos

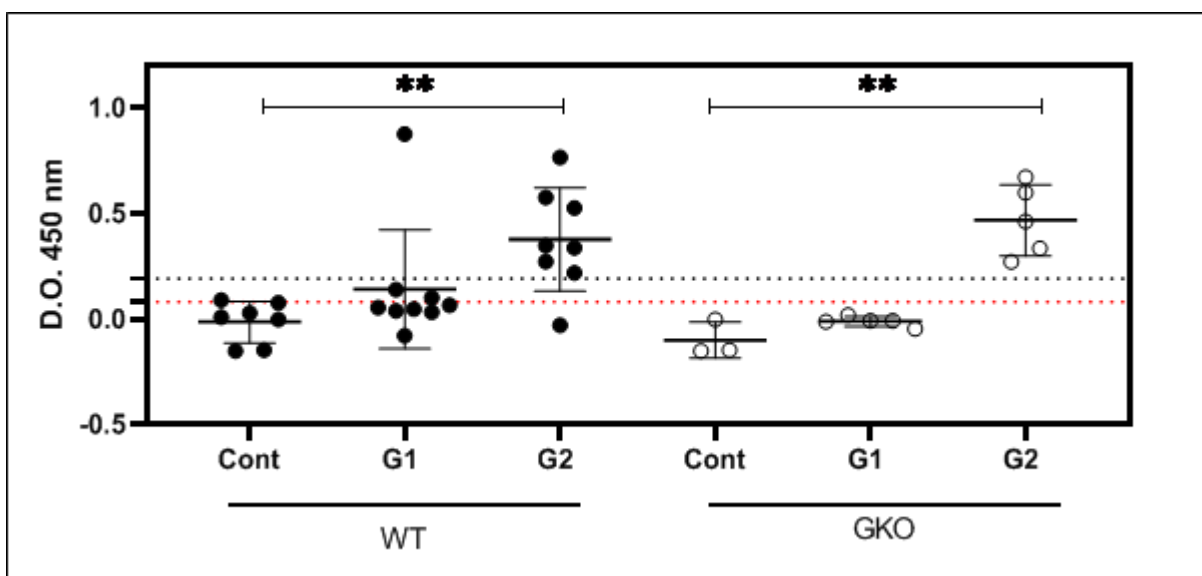
grupos mostrou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao controle, embora tenham parasitas presentes no órgão.



Gráficos 9 - Quantificação Parasitária por qPCR no Fígado de Animais Experimentalmente Infectados. Nos gráficos, círculos fechados indicam amostras da linhagem WT, enquanto círculos abertos representam amostras da linhagem GKO. A análise estatística foi realizada utilizando o método de Kruskal Wallis com pós-teste de Dunn. Cada ponto corresponde à média das triplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A presença de dois asteriscos (**) indica uma diferença estatisticamente significativa com $P = 0,0015$.

5.2.1 Detecção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* por ELISAc em amostras experimentais

Para avaliar a resposta imune humoral induzida pelos grupos com diferentes quantidades de inóculos, realizamos a análise da produção de anticorpos IgG no eluato dos animais por meio de ELISAc.



Gráficos 10 - Detecção de Anticorpos IgG Anti-*Leishmania* por Meio de ELISAc. Nos gráficos, círculos fechados referem-se à linhagem WT, enquanto círculos abertos correspondem à linhagem knockout de IFN- γ . As linhas tracejadas preta e vermelha indicam os valores de corte para as amostras da linhagem WT e GKO, respectivamente. Cada ponto representa a média das duplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por meio do método One-Way ANOVA, comparando as médias de todos os grupos infectados com seus respectivos controles. A presença de dois asteriscos (**) indica uma diferença estatisticamente significativa com $P = 0,002$.

No gráfico 10, é possível observar a produção de anticorpos IgG no eluato dos animais infectados após um período de 30 dias desde a infecção. Camundongos que receberam quatro doses dos inóculos apresentaram níveis significativamente mais elevados na produção de anticorpos em comparação com os animais do grupo controle. Essa elevação na resposta imune, constatada nos animais do G2, foi consistente em ambas as linhagens de camundongos.

Este aumento na produção de anticorpos demonstrou uma diferença estatisticamente significativa, com um valor de $P = 0,002$. Por outro lado, o G1, que recebeu somente um inóculo, não exibiu diferenças estatísticas discerníveis em relação ao controle.

O cálculo do valor de *cut off* foi realizado para ambas as linhagens de camundongos. A linha tracejada preta representa o *cut off* para os grupos da linhagem WT, indicando a positividade de 1 animal no Grupo 1 e 7 animais no Grupo 2. Quando analisamos o *cut off* nos animais GKO, percebemos que nenhum animal do Grupo G demonstrou positividade, enquanto todos os 5 animais testados do Grupo 2 apresentaram resultados positivos.

5.2.2 Detecção de CIC por ELISAd em amostras de animais experimentalmente infectados

A presença de CIC foi detectada por meio de um ensaio de ELISAd, utilizando eluato de camundongos infectados experimentalmente após 30 dias da infecção. Para essa análise, foi comparado ELISAc com o ELISAd. A fim de determinar a positividade das amostras, foram calculados valores de referência, conhecidos como *cut off*. Os resultados obtidos são delineados na figura a seguir.

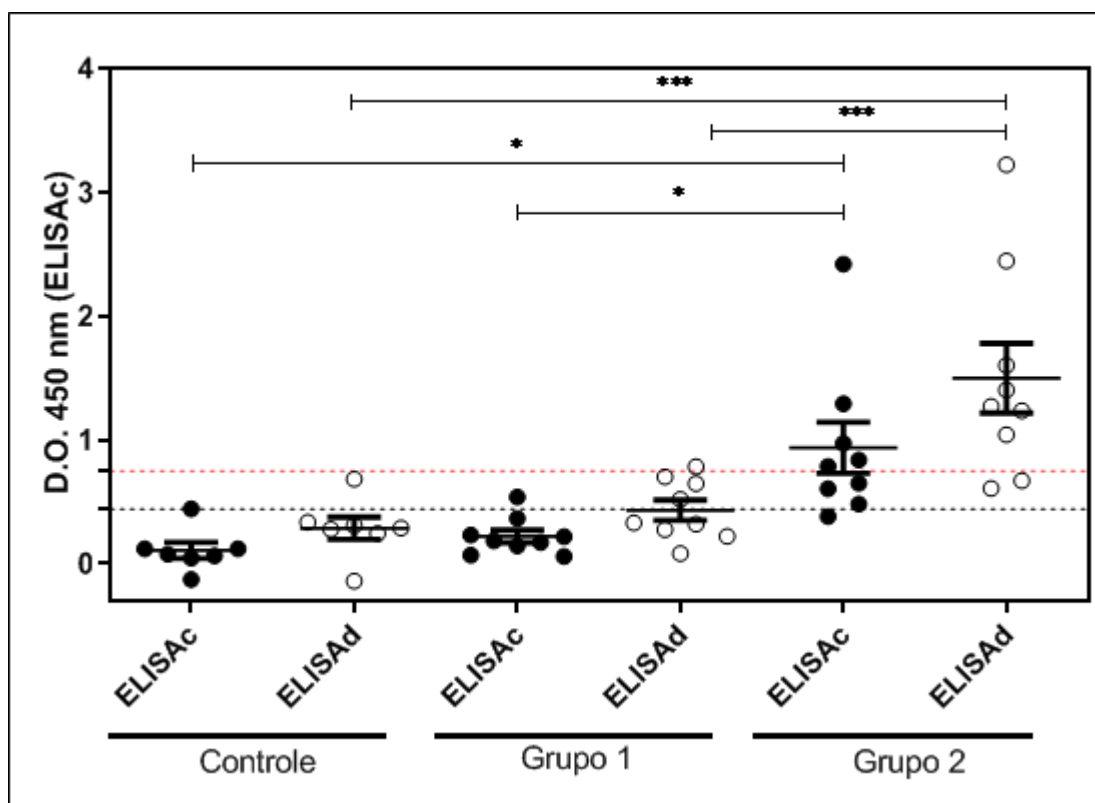
Ao analisarmos os grupos da linhagem WT, foi evidenciado um aumento na produção de anticorpos IgG no grupo 2, utilizando o método convencional de ELISA, em comparação com o grupo controle. Essa diferença apresentou relevância estatística, com um valor de p menor do que 0,01. Também foi possível constatar diferenças estatísticas entre os G1 e G2 quando aplicamos o ELISAc.

Quando focalizamos no ELISAd, observamos diferenças estatísticas tanto entre o grupo controle e o grupo 1 quanto entre o grupo 1 e o grupo 2. As análises revelaram disparidades estatísticas significativas.

Por outro lado, em relação à comparação entre os resultados do ELISAc e do ELISAd, não foi possível identificar diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos avaliados.

Em resumo, a análise dos CIC revelou importantes descobertas. No método convencional de ELISA, observou-se um aumento estatisticamente significativo na produção de anticorpos IgG no G2 em comparação com o grupo controle e entre os grupos 1 e 2. No entanto, quando utilizamos o ELISAd, as diferenças estatísticas foram evidenciadas entre o grupo controle e o grupo 1, bem como entre o grupo 1 e o grupo 2. Importante notar que, ao

comparar os dois métodos (ELISAc e ELISAd), não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes nos resultados obtidos em nenhum dos grupos analisados.

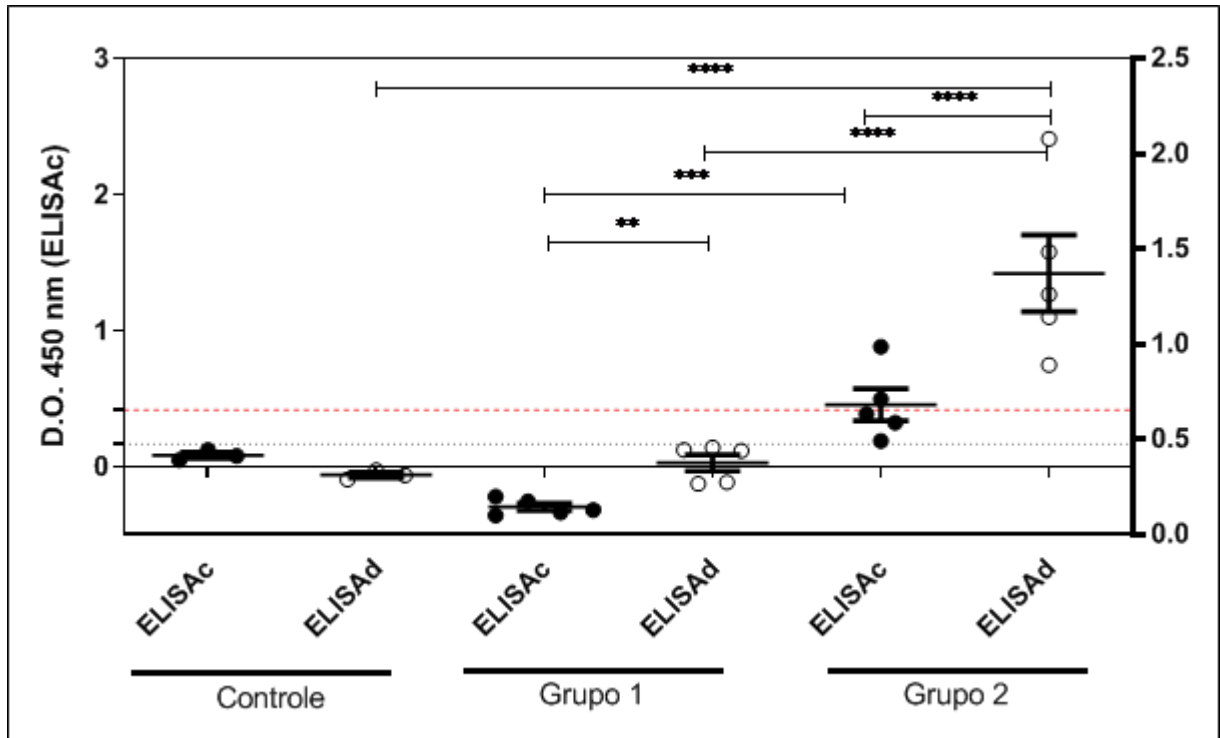


Gráficos 11 - Detecção de CIC no Eluato de Camundongos WT por ELISAc e ELISAd. Nos gráficos, círculos fechados indicam amostras no ELISAc, enquanto círculos abertos representam amostras no ELISAd. A linha tracejada preta indica o valor de corte (*cut-off*) do ELISAc, enquanto a linha vermelha indica o *cut-off* do ELISAd. Cada ponto corresponde à média das triplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi conduzida utilizando o método One-Way ANOVA. A presença de um asterisco (*) indica diferença estatisticamente significativa a um nível de $P < 0,1$, e três asteriscos (***) indicam $P < 0,001$.

Nesta mesma figura, também são visíveis os valores de *cut off*. A linha tracejada preta representa o ELISA convencional e mostra que apenas um animal do grupo 1 e oito animais do grupo 2 foram classificados como positivos. Após a execução do ELISAd, o *cut off* indicado pela linha tracejada vermelha apresenta a mesma quantidade de resultados positivos. Isso nos leva a uma conclusão: nos grupos analisados, não foi possível detectar a presença de CIC. Isso se deve ao fato de que o ELISAd identificou falsos negativos no teste convencional.

Desta forma, com base nos resultados dos dois métodos de ensaio, podemos inferir que não houve evidência de CIC nos grupos analisados. A ausência de alterações significativas nos valores de *cut off* após a aplicação do ELISAd sugere que a detecção de

falsos negativos foi consistentemente observada, reforçando a conclusão de que a presença de CIC não foi identificada nos grupos estudados.



Gráficos 12 - Detecção de CIC no Eluato de Camundongos GKO por ELISAc e ELISAd. Nos gráficos, círculos fechados indicam amostras no ELISAc, enquanto círculos abertos representam amostras no ELISAd. A linha tracejada preta indica o valor de corte (*cut-off*) do ELISAc, enquanto a linha vermelha indica o *cut-off* do ELISAd. Cada ponto corresponde à média das triplicatas testadas de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi conduzida utilizando o método One-Way ANOVA. A presença de dois asteriscos (**) indica diferença estatisticamente significativa a um nível de $P < 0,01$, três asteriscos (***) indicam $P < 0,001$ e quatro asteriscos (****) indicam $P < 0,0001$.

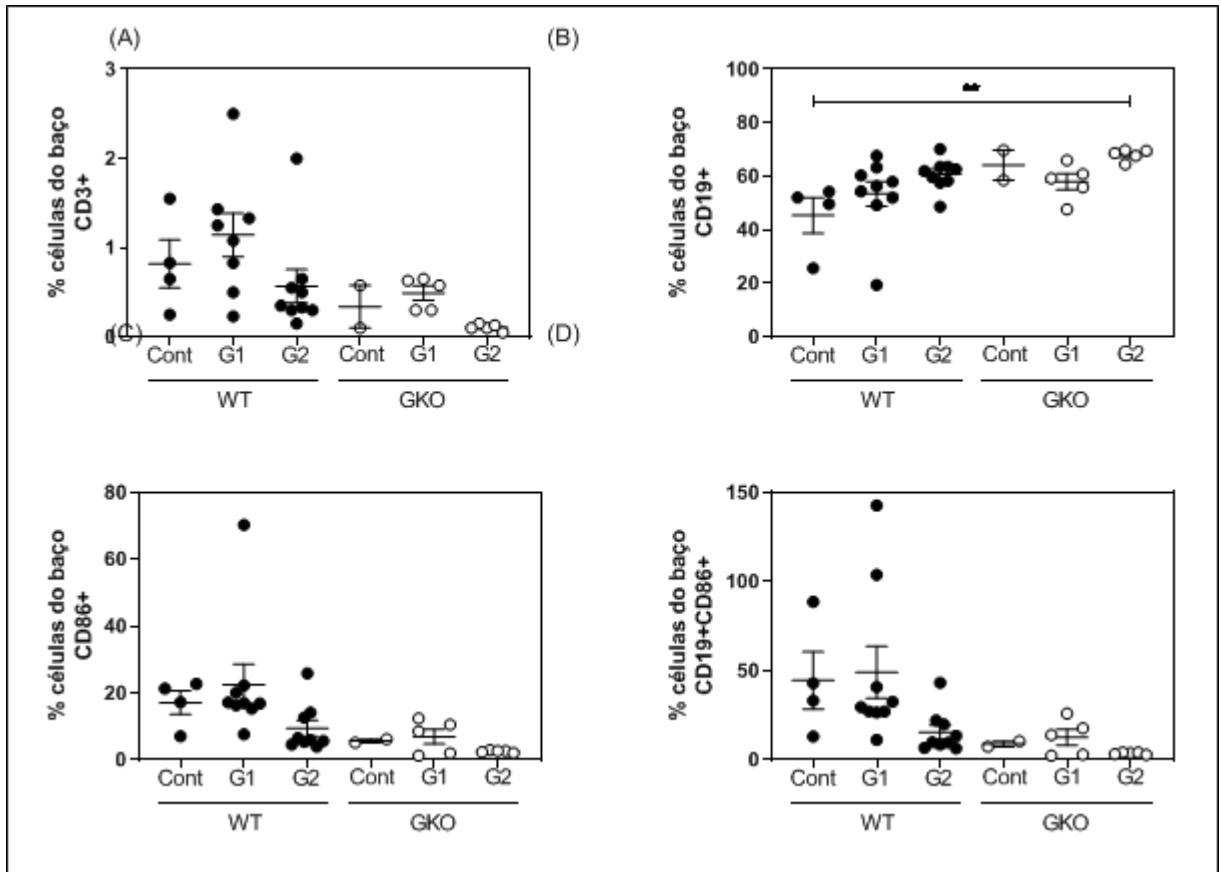
5.2.3 Perfil imunológico por citometria de fluxo de linfócitos esplênicos e sanguíneos

Com o intuito de examinar as mudanças imunológicas decorrentes da infecção experimental, realizamos uma análise por citometria de fluxo dos linfócitos T auxiliares (CD3+), linfócitos B (CD19+) e linfócitos B ativados (CD19+CD86+) presentes no baço e sangue periférico dos camundongos infectados. Optamos por apresentar os resultados como proporções das populações celulares, e os cálculos e estratégias de análise específicos para cada tipo de célula estão detalhados na metodologia.

No baço, conforme demonstrado na gráfico 13, os animais infectados apresentam uma proporção aumentada de células CD3. Quando infectados sem desafio adicional, observamos uma redução na proporção de células CD3 e um aumento na proporção de células CD19. Por sua vez, os camundongos GKO demonstram uma proporção menor de células CD3, tanto antes quanto depois do desafio, e, embora apresentem uma proporção elevada de células CD19, a ativação destas células, indicada pela presença de CD86, é menor.

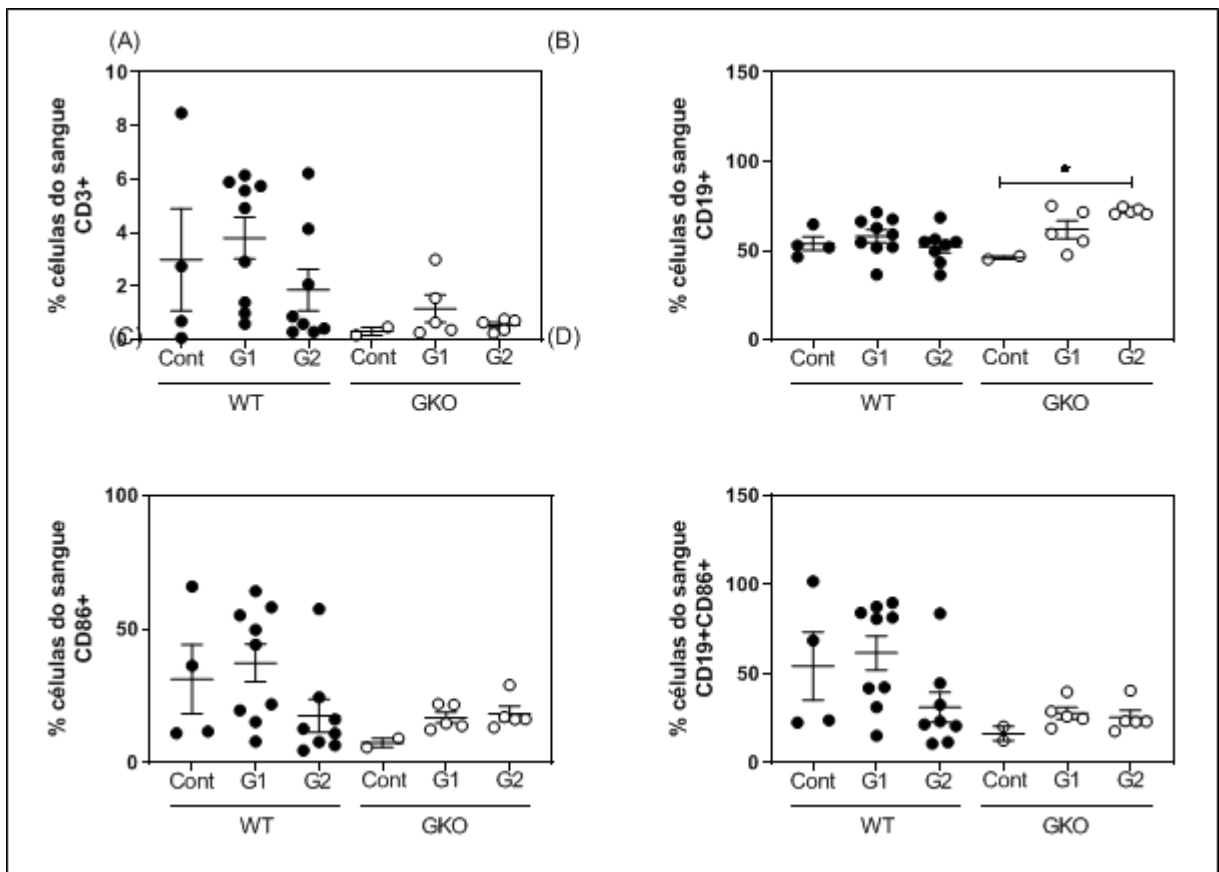
Esses achados sugerem que a infecção provoca respostas imunológicas diferenciadas nos diferentes grupos de camundongos. Nos animais infectados, há uma alteração na proporção de células CD3 e CD19 em resposta à infecção sem desafio adicional. No entanto, nos camundongos GKO, a proporção de células CD3 é consistentemente reduzida, e embora haja um aumento na proporção de células CD19, a ativação dessas células, evidenciada pela expressão de CD86, é menor.

Essas descobertas indicam que a resposta imunológica à infecção varia entre os grupos de camundongos e podem fornecer insights valiosos sobre as mudanças imunológicas que ocorrem como resultado da infecção experimental.



Gráficos 13 - Porcentagem de Linfócitos no Baço de Camundongos: (A) CD3+, (B) CD19+, (C) CD86+, (D) CD19+/CD86+. Nos gráficos, círculos fechados indicam amostras da linhagem WT, enquanto círculos abertos representam amostras da linhagem GKO. Cada ponto corresponde à média das amostras de cada animal, e as barras representam a média e o erro padrão da média. A análise estatística foi conduzida por meio do método One-Way ANOVA. A presença de dois asteriscos (**) indica uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0254$).

No sangue periférico, como demonstrado no gráfico 14, os camundongos do grupo WT não mostram variações na proporção de células CD3 ou CD19, independentemente do tipo de desafio. No entanto, nos camundongos GKO, observa-se uma proporção menor de células CD3 e uma proporção maior de células CD19, incluindo uma resposta que se amplifica com um maior número de desafios. Apesar dessa resposta, os camundongos GKO exibem uma ativação limitada das células CD19, como indicado pela presença reduzida de CD86.



Gráficos 14 - Porcentagem de Linfócitos no Sangue Periférico de Camundongos: (A) CD3+, (B) CD19+, (C) CD86+, (D) CD19+/CD86+. Nos gráficos, círculos fechados correspondem a amostras da linhagem WT, enquanto círculos abertos representam amostras da linhagem GKO. Cada ponto denota a média das amostras de cada animal, e as barras indicam a média e o erro-padrão da média. A análise estatística foi conduzida por meio do método One-Way ANOVA. A presença do asterisco (*) denota uma diferença estatisticamente significativa ($P = 0,0071$).

5.2.4 Análises histológica de baço e fígado

Realizamos uma análise histológica do fígado e do baço dos camundongos WT e GKO, infectados ou não por uma única dose (G1, WT ou GKO) ou múltiplas doses (G2, WT ou GKO) de promastigotas de *L. (L.) infantum*, com o sacrifício ocorrendo após 30 dias da infecção.

Os achados histológicos do fígado foram mínimos, consistindo principalmente de discreta hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer nos animais do Grupo 1, tanto WT quanto GKO. Não foi evidenciado parasitismo clássico ou infiltrado portal acentuado, e tampouco foram observados focos de necrose intraparenquimatosa.

As alterações no baço foram mais pronunciadas e são detalhadas no Quadro 1, onde correlacionamos os achados com os tipos de animais experimentais utilizados. Os animais não infectados do grupo controle apresentavam uma pequena proporção de polpa branca, com poucos centros germinativos, sendo que os animais GKO tinham centros germinativos menores e com uma população reduzida na zona marginal. Isso é coerente com a ausência de estimulação imune. A polpa vermelha estava inativa, com macrófagos fagocitando hemácias senescentes.

Na infecção única (G1), notamos que nos três tipos de animais experimentais há ativação da população imune esplênica, com formação de centros germinativos. No entanto, esses centros germinativos apresentam uma população marginal pequena e não possuem centros necróticos com seleção de células por apoptose. A proliferação linfóide parece ser mais intensa nos animais GKO.

Na infecção múltipla (G2), observamos uma ativação imunológica mais intensa nos centros germinativos. Esses centros passam a ter uma zona marginal mais ativa e evidente, além de esboços de ativação central, com algumas células apoptóticas centrais, tanto em hamsters quanto em animais WT.

Nos camundongos GKO com infecção múltipla, o processo de ativação da zona marginal é ainda mais intenso, com uma grande população nessa região e ausência de focos de apoptose central e seleção de células dos centros germinativos. Parece que a ausência de interferon gama dificulta os processos de seleção e eliminação de linfócitos, levando ao acúmulo dessas células imunes, tanto nos centros germinativos quanto na zona marginal. Isso está alinhado com os resultados de acúmulo de células B no baço, como observado nos

estudos fenotípicos das células por citometria de fluxo, bem como com a ausência de ativação das células imunes nesses animais.

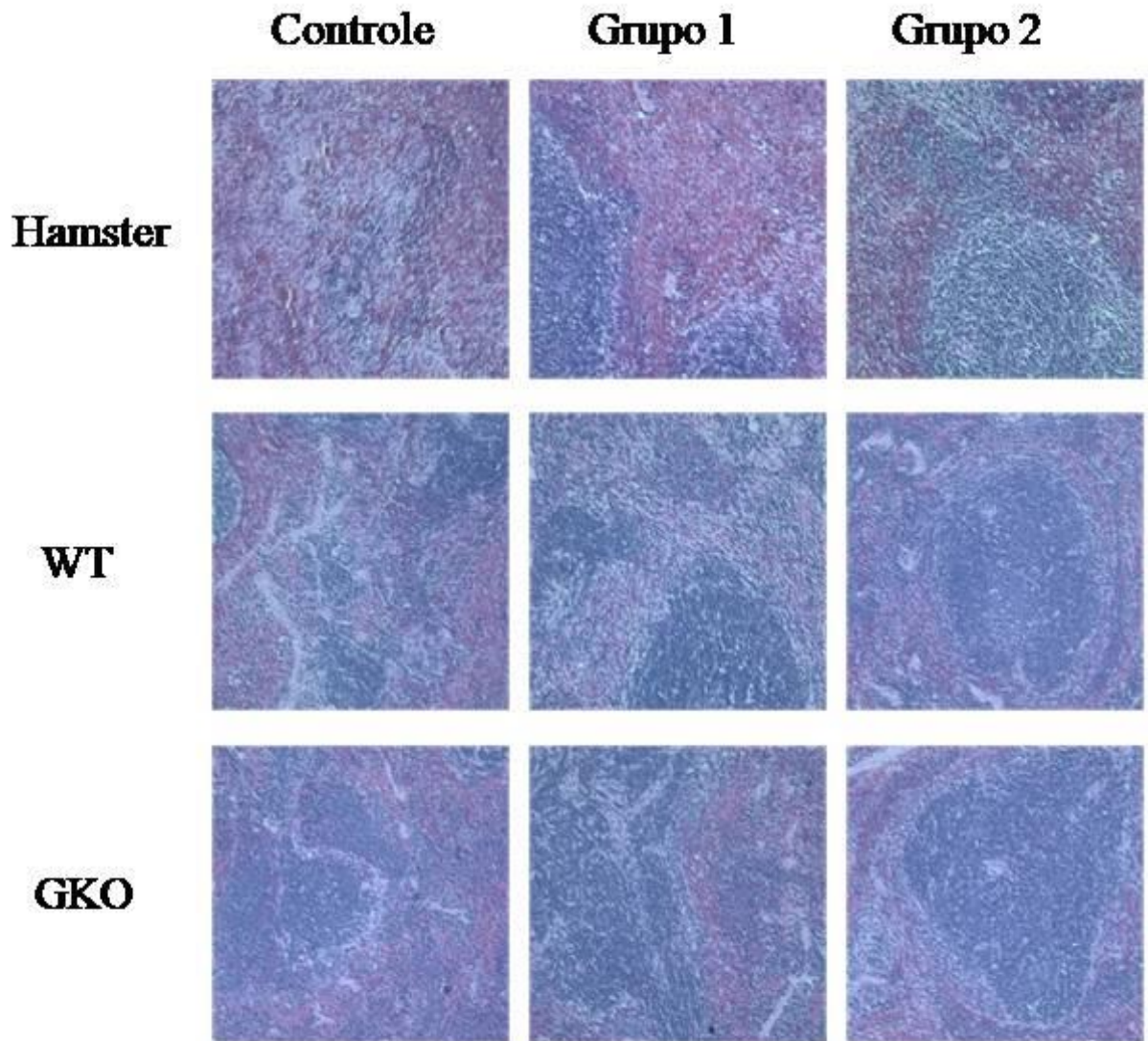


Figura 5 - Avaliação Histológica do Baço em Diferentes Modelos de Animais Experimentais. Aumento de 100x e Coloração por HE, Registradas em Fotomicroscópio Olympus BX51 com Lentes Planoapocromáticas. As linhas horizontais da tabela representam os tipos de animais: hamsters, camundongos BALB/c WT ou GKO, infectados ou não com *L. (L.) infantum*. As colunas indicam o tipo de desafio: grupos de controle não infectados, inoculação com uma dose única de promastigotas de *L.L. infantum* (G1) ou múltiplas doses de promastigotas de *L.(L.) infantum* (2).

6. DISCUSSÃO GERAL

Nossos resultados apontam que quando utilizamos múltiplas doses do parasita promastigota em um modelo de experimento com camundongos, isso leva a uma redução na quantidade de parasitas nos tecidos. Além disso, essa redução está associada ao aumento na produção de anticorpos e não parece estar ligada à presença do interferon gama. Essas descobertas vão contra a maior parte dos estudos anteriores na área, como evidenciado em várias revisões (65). Até mesmo relatos prévios que utilizaram o mesmo modelo de camundongo geneticamente modificado (57) mostraram uma doença muito mais severa em um cenário quase idêntico de infecção por *Leishmania*.

A principal distinção em nosso estudo reside na abordagem inicial de empregar um modelo menos suscetível, associando BALB/c com *L. (L.) infantum*. A escolha de uma linhagem isogênica uniforme, portadora de genes favoráveis ao crescimento intracelular da *Leishmania*, foi uma decisão tomada para simplificar a análise. Isso se deve ao conhecimento de que ocorre seleção genética em leishmanioses murinas, onde a influência de genes relacionados ao metabolismo do ferro em macrófagos é fundamental (66). Além disso, a linhagem utilizada possui os genes de suscetibilidade à leishmaniose já caracterizada (67). O modelo utilizado também simula a doença em hospedeiro humano bem nutridos e saudáveis, que é a situação mais frequente sempre em qualquer condição de exposição, imunidade e nutrição de humanos(11).

Os modelos suscetíveis são úteis para elucidar certos aspectos das doenças humanas, que também ocorrem em pacientes suscetíveis. No entanto, estudos experimentais ou envolvendo seres humanos, utilizando hamsters ou pacientes, possuem uma limitação fundamental pela falta de resistência inata. Nesses casos, a doença se comporta de maneira semelhante a uma tolerância imunológica. Várias doenças infecciosas têm este tipo de resposta em uma minoria de pacientes, como a tuberculose miliar (68), a hanseníase multibacilar (69) ou a paracoccidiodomicose juvenil(70), que se caracterizam por altos níveis de anticorpos circulantes, baixa imunidade celular e grande quantidade de patógenos, exatamente como a LV plenamente manifesta.

Nosso estudo empregou uma associação que resulta em uma doença limitada e que se resolve por si mesma (71), através de uma simples injeção de promastigotas de cultivo axênico. Isso difere de modelos que envolvem a injeção intracardíaca de amastigotas esplênicas, os quais podem resultar em modelos mais suscetíveis (72). Nossa intenção sempre

foi utilizar um modelo que se assemelhasse ao máximo à infecção natural, embora reconheçamos as limitações impostas pela ausência dos produtos salivares dos flebotomíneos.

Outro ponto crucial foi a determinação do parasitismo e seu tempo de avaliação. Optamos por uma única medida após 30 dias de infecção, pois esse período representava o pico máximo referido em infecções subcutâneas nesse modelo, com menor disseminação. Como não havia visceromegalia significativa nesses modelos, a microscopia convencional enfrentava a limitação de praticamente destruir o baço para permitir a realização de esfregaços.

Para superar esse desafio, desenvolvemos uma abordagem que consistia na quantificação proteica em um pequeno fragmento do órgão e, em seguida, realizar a pesquisa quantitativa do DNA do agente por meio da PCR em tempo real. Os resultados seriam expressos em número de cópias por miligrama de proteína, o que efetivamente representa uma medida de densidade, ou seja, quantidade em relação ao peso. Por essa razão, decidimos denominar essa medida como "densidade parasitária", em vez de outras designações como "carga" ou "parasitismo". Esse método foi minuciosamente padronizado e revelou-se eficaz para evidenciar as diferenças de densidade entre os dois tipos de inóculos.

Vale ressaltar que todas essas condições experimentais foram cuidadosamente estabelecidas durante o aprimoramento profissional e mestrado. É fundamental reconhecer que experimentos com modelos experimentais são conduzidos ao longo de um período prolongado, com limitadas possibilidades de repetição sistemática. No nosso caso, realizamos três experimentos com camundongos isogênicos e dois experimentos com animais GKO.

Os resultados relacionados à densidade parasitária revelaram que a infecção nos órgãos era menos pronunciada quando múltiplos inóculos semanais de promastigotas eram administrados. No início deste estudo, nosso foco era identificar o impacto dos glicanos de *Leishmania* na resposta imunológica dos animais. No entanto, uma vez que esses glicanos são pequenos (<5 kDa), não têm imunogenicidade quando isolados e estão frequentemente associados CIC (73), optamos por utilizar promastigotas intactas. Essa abordagem foi mais viável para a duração do projeto de mestrado e também permitiria simular uma situação ambiental de exposição múltipla a flebotomíneos infectados. Isso nos possibilitaria analisar os efeitos de várias picadas infectantes, possivelmente como uma causa de infecção generalizada (72) ou até mesmo de imunossupressão mediada por picada.

Do ponto de vista ambiental, cães urbanos com LV, que desempenham frequentemente o papel de vigias residenciais, estão constantemente expostos aos flebotomíneos, tanto para infecção quanto para repasto sanguíneo (74), em situações onde medidas como coleiras ou

inseticidas não são adotadas. Explorar os efeitos de múltiplas picadas poderia ser valioso para entender a possível tolerância imunológica, especialmente se associada aos glicanos (75)(73).

Nossos resultados abrangem várias perspectivas, indicando que a resistência em nosso experimento provavelmente foi mediada principalmente pela resposta de anticorpos. Essa conclusão foi baseada na produção aumentada de anticorpos nos casos de múltiplos inóculos e na presença ampliada de células B nos estudos de fenótipos celulares. Notavelmente, essa resposta imunológica independeu da presença de IFN- γ , que se mostrou não influente em nosso modelo. Isso pode ser atribuído ao fato de que trabalhamos com um modelo de alta resistência à infecção, no qual não observamos a manifestação plena da doença, nem em termos parasitológicos, imunológicos ou histológicos. Nossos resultados indicam uma resposta imunológica eficaz e funcional, sem a influência significativa do IFN- γ . Isso sugere que o mecanismo de resistência possivelmente está relacionado a uma fase anterior ao ambiente intracelular dos macrófagos, ou seja, pode haver uma menor infecção dos macrófagos. Nos modelos de animais suscetíveis, a infecção é extensa e ocorre de uma só vez.

No nosso modelo, uma infecção única resultou em uma infecção mais intensa do que múltiplos inóculos. Isso sugere que, de alguma forma, os anticorpos produzidos resultaram em uma menor infecção dos macrófagos. Essa diferença pode ser explicada pelo fato de que a resposta imune às promastigotas é mediada pela apresentação de antígenos e migração de células para locais de interação imune. No entanto, as promastigotas são rapidamente destruídas pelo complemento e fagocitadas por neutrófilos, que não atuam efetivamente como células apresentadoras de resposta imune. As promastigotas fagocitadas por macrófagos evadem a resposta imunológica, promovendo assim uma infecção mais intensa após um único inóculo. Importante observar que não detectamos uma presença significativa de anticorpos nas fases iniciais da evolução deste grupo de animais. No entanto, nos animais submetidos a múltiplos inóculos, a produção de anticorpos foi evidente, inclusive acompanhada pela presença de anticorpos bloqueados por antígenos. Essa presença estava relacionada aos múltiplos inóculos de promastigotas e estava ausente nos animais submetidos a inóculo único.

Isso parece decorrer de um mecanismo de evasão adotado pelas *Leishmania* no ambiente intracelular, inclusive produzindo haptenos que podem ser liberados da célula e interferir na reatividade dos anticorpos, facilitando assim a infecção de novas células. Quando anticorpos são produzidos de maneira mais eficaz pela imunização com promastigotas, esse mecanismo de evasão pode ser controlado ou evitado, resultando em uma menor infecção tecidual. A importância de nossos resultados é ressaltada pelo fato de que eles indicam que nos hospedeiros resistentes, uma resposta imune especializada não é necessária; a resposta

imune convencional pode ser suficiente e eficaz. A resposta alterada é observada nos hospedeiros suscetíveis, possivelmente devido a interferências na resposta imune habitual.

Portanto, nosso foco deve continuar a ser o estudo da infecção em modelos resistentes, buscando interferir na infecção para induzir a manifestação plena da doença, como tentamos com o uso de camundongos deficientes IFN- γ . A LV plenamente manifesta resulta da interação entre condições favoráveis no hospedeiro e no vetor, e entender como o hospedeiro competente evita o desenvolvimento pleno da doença é essencial para compreender essa associação complexa.

7. CONCLUSÕES

7.1 Geral

Uma única dose de promastigotas de *L. (L.) infantum* na infecção experimental de camundongos BALB/c é mais eficiente na indução de infecção no fígado e baço, resultando em menor produção de anticorpos específicos e sem interferência do IFN- γ .

7.2 Específica

- Foi possível padronizar e empregar uma medida de densidade parasitária no fígado e baço, permitindo a estimativa quantitativa da infecção por *L. (L.) infantum* em camundongos BALB/c.
- Foi possível desenvolver um modelo experimental de infecção em camundongos BALB/c utilizando promastigotas de cultura axênica. Esse modelo é passível de estudo sob perspectivas parasitológicas, de anticorpos específicos, fenótipos imunológicos e histologia hepática e esplênica.
- Através de inóculos semanais repetidos, foi possível demonstrar menor infecção tecidual e maior produção de anticorpos, bem como aumento de células produtoras de anticorpos em modelos experimentais de infecção em camundongos BALB/c.
- Ao comparar os resultados obtidos em animais selvagens, foi demonstrado que a ausência genética de IFN- γ nestes modelos não alterou a infecção única nem os efeitos de múltiplos inóculos no modelo experimental de infecção em camundongos BALB/c.

8. REFERÊNCIAS

1. Saude OM da. Leishmaniasis [Internet]. 2023 [cited 2023 Jan 31]. p. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/l>. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
2. OPAS. Situação epidemiológica Leishmaniose cutânea e mucosa. 2022;12.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014. 120 p.
4. Scarpini S, Dondi A, Totaro C, Biagi C, Melchionda F, Zama D, et al. Visceral Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment Regimens in Different Geographical Areas with a Focus on Pediatrics. *Microorganisms*. 2022;10(10).
5. Singh OP, Hasker E, Sacks D, Boelaert M, Sundar S. Asymptomatic leishmania infection: A new challenge for leishmania control. *Clin Infect Dis*. 2014;58(10):1424–9.
6. Dantas-Torres F, Miró G, Bowman DD, Gradoni L, Otranto D. Culling Dogs for Zoonotic Visceral Leishmaniasis Control: The Wind of Change. *Trends Parasitol* [Internet]. 2019;35(2):97–101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.005>
7. Wheat WH, Pauken KE, Morris R V., Titus RG. *Lutzomyia longipalpis* Salivary Peptide Maxadilan Alters Murine Dendritic Cell Expression of CD80/86, CCR7, and Cytokine Secretion and Reprograms Dendritic Cell-Mediated Cytokine Release from Cultures Containing Allogeneic T Cells . *J Immunol*. 2008;180(12):8286–98.
8. Lestinova T, Rohousova I, Sima M, de Oliveira CI, Volf P. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7):1–26.
9. Jiménez-Antón MD, Grau M, Corral MJ, Olías-Molero AI, Alunda JM. Efficient infection of hamster with *Leishmania donovani* by retro-orbital inoculation. *Virulence* [Internet]. 2019;10(1):711–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1649587>
10. Murillo J, Montoya A, Carrillo-Bonilla L, Rodriguez B, Vélez ID, Robledo SM. Verification and monitoring of visceral leishmaniasis in hamsters caused by *Leishmania infantum*, using non-invasive approaches involving ultrasound imaging and blood gases. *Exp Parasitol* [Internet]. 2019;201(February 2018):78–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.04.012>
11. Goto H, Lindoso JAL. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res*. 2004;37(4):615–23.
12. Loeuillet C, Bañuls AL, Hide M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: Experimental considerations. *Parasites and Vectors* [Internet]. 2016;9(1):1–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1413-9>
13. Taylor AP, Murray HW. Therapeutic effect of interferon- γ gene transfer in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 1998;178(3):908–11.
14. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet*. 2018;392(10151):951–70.
15. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2017;10(1):1–10.
16. Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus - A mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100(6):587–92.
17. Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol*. 2017;7(9).

18. Anversa L s., Tiburcio MGS, Richini-Pereira V nia B, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Rev Assoc Med Bras.* 2018;64(3):281–9.
19. Reckziegel D, Vachon-Preseu E, Petre B, Schnitzer TJ, Baliki M, Apkarian AV. Impact of different *Leishmania* reservoirs on sand fly transmission: perspectives from xenodiagnosis and other One Health observations. *Physiol Behav.* 2019;176(5):139–48.
20. Mans DR, Kent AD, VPF Hu R, Schallig HD. Epidemiological, Biological and Clinical Aspects of Leishmaniasis with Special Emphasis on Busi Yasi in Suriname. *J Clin Exp Dermatol Res.* 2017;08(02).
21. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37(10):1097–106.
22. Yasmin H, Adhikary A, Al-Ahdal MN, Roy S, Kishore U. Host–Pathogen Interaction in Leishmaniasis: Immune Response and Vaccination Strategies. *Immuno.* 2022;2(1):218–54.
23. Martin-Martin I, Chagas AC, Guimaraes-Costa AB, Amo L, Oliveira F, Moore IN, et al. Immunity to LuloHya and Lundep, the salivary spreading factors from *Lutzomyia longipalpis*, protects against *Leishmania* major infection. *PLoS Pathog.* 2018;14(5):1–26.
24. Esch KJ, Petersen CA. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(1):58–85.
25. Dantas-Torres F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol.* 2007;149(3–4):139–46.
26. Dantas-Torres F, Miró G, Baneth G, Bourdeau P, Breitschwerdt E, Capelli G, et al. Canine leishmaniasis control in the context of one health. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(12):E1–4.
27. Arenas R, Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J. Leishmaniasis: A review. *F1000Research.* 2017;6(May):1–15.
28. Mann S, Frasca K, Scherrer S, Henao-Martínez AF, Newman S, Ramanan P, et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. *Curr Trop Med Reports.* 2021;8(2):121–32.
29. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6).
30. Kordofani YM, Nour YT, El-Hassan AM, Shalayel MH. Post kala azar dermal leishmaniasis in Sudan. *East Mediterr Heal J = La Rev santé la Méditerranée Orient = al-Majallah al-ihhīyah li-sharq al-mutawassi.* 2001;7(6):1061–4.
31. Piscopo T V., Azzopardi CM. Leishmaniasis. *Postgrad Med J.* 2007;83(976):649–57.
32. Ibarra-Meneses AV, Carrillo E, Nieto J, Sánchez C, Ortega S, Estirado A, et al. Prevalence of asymptomatic leishmania infection and associated risk factors, after an outbreak in the Southwestern Madrid Region, Spain, 2015. *Eurosurveillance.* 2019;24(22).
33. Machado CAL, Sevá A da P, E Silva AAFA, Horta MC. Epidemiological profile and lethality of visceral leishmaniasis/human immunodeficiency virus co-infection in an endemic area in Northeast Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2021;54(November 2020):1–8.
34. Lindoso JAL, Moreira CHV, Cunha MA, Queiroz IT. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: Current perspectives. *HIV/AIDS - Res Palliat Care.* 2018;10:193–201.
35. Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury ANS, Romero GAS, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9).
36. Jones CM, Welburn SC. Leishmaniasis Beyond East Africa. *Front Vet Sci.*

- 2021;8(February):1–10.
37. Saude M da. No TitlSituação epidemiológica da Leishmaniose Viscerale [Internet]. 21/10/2022. 2022. p. <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a>. Available from: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>
 38. Cardim MFM, Guirado MM, Dibo MR, Chiaravalloti Neto F. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. *Rev Saude Publica*. 2016;50:1–12.
 39. Srividya G, Kulshrestha A, Singh R, Salotra P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. *Parasitol Res*. 2012;110(3):1065–78.
 40. Elmahallawy EK, Sampedro Martínez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries*. 2014;8(8):961–72.
 41. Reimão JQ, Coser EM, Lee MR, Coelho AC. Laboratory diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis: Current and future methods. *Microorganisms*. 2020;8(11):1–30.
 42. Kwilas AR, Donahue RN, Tsang KY, Hodge JW. Prevention and Treatment of Tobacco Use: JACC Health Promotion Series. *Cancer Cell*. 2015;2(1):1–17.
 43. Galluzzi L, Ceccarelli M, Diotallevi A, Menotta M, Magnani M. Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2018;11(1):1–13.
 44. Goto H. Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res Rep Trop Med*. 2012;69.
 45. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. 2012;2:11–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpddr.2012.01.003>
 46. Ludolf F, Ramos FF, Coelho EAF. Immunoproteomics and phage display in the context of leishmaniasis complexity. *Front Immunol*. 2023;14(February):1–8.
 47. Le Rutte EA, Coffeng LE, Malvoti S, Kaye PM, de Vlas SJ. The potential impact of human visceral leishmaniasis vaccines on population incidence. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2020;14(7):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008468>
 48. Ferreira-Paes T, dos Santos Charret K, da Silva Ribeiro MR, Rodrigues RF, Leon LL. Comparative analysis of biological aspects of *Leishmania infantum* strains. *PLoS One* [Internet]. 2020;15(12 December):1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0230545>
 49. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol*. 2013;82:155–84.
 50. Conde L, Maciel G, de Assis GM, Freire-de-Lima L, Nico D, Vale A, et al. Humoral response in Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(December):1–8.
 51. Elmahallawy EK, Alkhaldi AAM, Saleh AA. Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2021;139:111671. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>
 52. Filho AAP, Nascimento AA de S, Saab NAA, Fugiwara RT, D'Ávila Pessoa GC, Koerich LB, et al. Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. *Acta Trop*. 2021;224(September):1–10.
 53. Ambrosio AR, Bavia L, Hiraiwa PM, Tirado TC, Figueiredo FB, de Messias-Reason IJ. The lectin pathway of complement and the initial recognition of *Leishmania infantum* promastigotes. *Life Sci* [Internet]. 2021;282(June):119793. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119793>
54. Scott P. The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 1989;68(3):369–72.
 55. de Vrij N, Meysman P, Gielis S, Adriaensen W, Laukens K, Cuypers B. Hla-drb1 alleles associated with lower leishmaniasis susceptibility share common amino acid polymorphisms and epitope binding repertoires. *Vaccines*. 2021;9(3):1–17.
 56. Ott KJ, Hanson WL, Stauber LA. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *J Parasitol*. 1967;53(3):641–5.
 57. Taylor AP, Murray HW. Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferon- γ : Effect of interleukin-12 in experimental visceral Leishmaniasis in interferon- γ gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1997;185(7):1231–9.
 58. Mecca JN, Meireles LR, de Andrade HF. Quality control of *Toxoplasma gondii* in meat packages: Standardization of an ELISA test and its use for detection in rabbit meat cuts. *Meat Sci* [Internet]. 2011;88(3):584–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.016>
 59. de Carvalho CA, Partata AK, Hiramoto RM, Borborema SET, Meireles LR, Nascimento N do, et al. A simple immune complex dissociation ELISA for leishmaniasis: Standardization of the assay in experimental models and preliminary results in canine and human samples. *Acta Trop* [Internet]. 2013;125(2):128–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.10.010>
 60. Venkatesan P, Wakelin D. ELISAs for parasitologists: or lies, damned lies and ELISAs. *Parasitol Today*. 1993;9(6):228–32.
 61. de Carvalho CA, Ferrão TF, Cavalcante FS, de Freitas FRN, Meireles LR, de Andrade Júnior HF. Early high avidity specific IgG production in experimental hamster visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2020;119(11):3881–5.
 62. Francino O, Altet L, Sánchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2006;137(3–4):214–21.
 63. Guinet F, Louise A, Jouin H, Antoine JC, Roth CW. Accurate quantitation of *Leishmania* infection in cultured cells by flow cytometry. *Cytometry*. 2000;39(3):235–40.
 64. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201:239–53.
 65. Bhor R, Rafati S, Pai K. Cytokine saga in visceral leishmaniasis. *Cytokine* [Internet]. 2021;147(May 2020):155322. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155322>
 66. Vidal S, Gros P, Skamene E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: Molecular genetics identifies *Nramp1* as the *Bcg/Ity/Lsh* locus. *J Leukoc Biol*. 1995;58(4):382–90.
 67. Gautier A V., Lantier I, Lantier F. Mouse susceptibility to infection by the *Salmonella abortusovis* vaccine strain Rv6 is controlled by the *Ity/Nramp 1* gene and influences the antibody but not the complement responses. *Microb Pathog*. 1998;24(1):47–55.
 68. Sharma SK, Mohan A, Sharma A. Miliary tuberculosis: A new look at an old foe. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* [Internet]. 2016;3:13–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jctube.2016.03.003>
 69. Froes LAR, Sotto MN, Trindade MAB. Leprosy: clinical and immunopathological characteristics. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2022;97(3):338–47. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.08.006>
 70. Hahn RC, Hagen F, Mendes P, Burger E, Nery F, Siqueira NP, et al.

- Paracoccidioidomycosis : Current Status and Future Trends. 27.
71. Rezai HR, Farrell J, Soulsby EL. Immunological responses of *L. donovani* infection in mice and significance of T cell in resistance to experimental leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1980;40(3):508–50814.
 72. Kaur S, Kaur T, Garg N, Mukherjee S, Raina P, Athokpam V. Effect of dose and route of inoculation on the generation of CD4 + Th1/Th2 type of immune response in murine visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2008;103(6):1413–9.
 73. de Carvalho CA, Ferrão TF, de Freitas FRN, de Andrade HF. High levels of serum glycans monovalent IgG immune complexes detected by dissociative ELISA in experimental visceral leishmaniasis. *Immunology.* 2019;158(4):314–21.
 74. QUINNELL RJ, DYE C, SHAW JJ. Host preferences of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* in Amazonian Brazil. *Med Vet Entomol.* 1992;6(3):195–200.
 75. Pinho SS, Alves I, Gaifem J, Rabinovich GA. Immune regulatory networks coordinated by glycans and glycan-binding proteins in autoimmunity and infection. *Cell Mol Immunol.* 2023;(July).