

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

ARIELI BERNARDO PORTUGAL

PAPEL DA FOSFATIDILSERINA NA LATÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DA
Leishmania amazonensis

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE-DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

DEZEMBRO / 2023

Arieli Bernardo Portugal

Papel da fosfatidilserina na latência e disseminação da *Leishmania amazonensis*

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em biociências e biotecnologia.

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley

Coorientador: Renato Augusto DaMatta

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

DEZEMBRO/2023

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P853

Portugal, Arieli Bernardo.

Papel da fosfatidilserina na latência e disseminação da *Leishmania amazonensis*. / Arieli Bernardo Portugal. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

137 f. : il.
Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.

Orientador: João Luiz Mendes Wanderley.

Coorientador: Renato Augusto Damatta.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. fosfatidilserina. 3. fibroblastos. 4. neutrófilos. 5. disseminação. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

PAPEL DA FOSFATIDILSERINA NA LATÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DA
Leishmania amazonensis

Arieli Bernardo Portugal

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de doutora em biociências e biotecnologia

Examinado em: 07/12/2023

Comissão Examinadora

Prof^a Dr^a Michelle Frazão Muzitano

Prof Dr^o Sérgio Henrique Seabra

Prof^a Dr^a Suzana Passos Chaves

Prof Dr^o Renato Augusto DaMatta
(Coorientador)

Prof Dr João Luiz Mendes Wanderley
(Orientador)

EPÍGRAFE

”Os sonhos são projetos pelos quais se luta. Sua realização não se verifica facilmente, sem obstáculos. Implica, pelo contrário, avanços, recuos, marchas às vezes demoradas. Implica luta.”

Paulo Freire

“A maioria das pessoas diz que é o intelecto que faz um grande cientista. Eles estão errados: é caráter”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Ter concluído o doutorado após uma pandemia, ressaltou a importância de contar com pessoas boas ao nosso lado e reconhecimento que sem o apoio dessas pessoas, não teria conseguido chegar aqui.

Sendo assim gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me dado força e sabedoria, principalmente nos momentos de dificuldade.

Ao Prof. Doutor. João Luiz Mendes Wanderley, sou imensamente grata pela orientação ao longo destes longos 7 anos de parceria. Agradeço por cada conversa que tivemos e que contribuíram significativamente para o desenvolvimento do meu pensamento crítico. Agradeço por todo o ensinamento e técnicas compartilhadas e por ter confiado a mim esse projeto. Você sempre teve muita paciência ao me ensinar e sempre acreditou no meu potencial. Agradeço imensamente por esses anos de parceria e sei que sem sua orientação não seria possível estar aqui, muito obrigada.

Agradeço ao Carlos, que esteve ao meu lado durante praticamente todo o período do doutoramento. Agradeço por sempre me ouvir, mesmo quando os temas eram complexos e talvez difíceis de compreender. Obrigada por sempre me incentivar a continuar no meu sonho, ser um suporte constante e não permitir que eu desistisse, oferecendo apoio incondicional nos momentos mais desafiadores desse processo. Seu apoio foi muito importante, especialmente nos momentos em que minha própria confiança estava abalada.

A minha mãe, Acacia, e minha irmã, Aline, obrigada por sempre acreditarem em mim e por serem um incentivo constante, mesmo nos momentos em que talvez não compreendessem completamente as minhas escolhas e jornada, e mesmo com toda a distância que nos separou nesse período. Agradeço a todas as pessoas da família que sempre torceram por mim.

Aos amigos de SP, agradeço pelo incentivo e apoio constante, Mesmo com toda a distância, vocês sempre se fizeram presentes, torcendo por mim e me incentivando. Agradeço também por compreenderem todas as vezes em que não consegui estar presente em momentos especiais de suas vidas.

Aos amigos de Macaé, obrigada por serem também ouvidos e suporte. Agradeço pela paciência e incentivo constante, mesmo nos momentos que também me ausentei ou desabafei constantemente sobre o doutorado. Obrigada

Agradeço a todos do laboratório de Imunoparasitologia UFRJ- Macaé, em especial aos amigos que fiz durante esse período, desde a primeira geração de alunos até a geração atual. Compartilhar a bancada com vocês foi uma experiência maravilhosa, marcada pelos desafios de fazer ciência no interior, acompanhada de erros e aprendizados compartilhados em grupo. Vivenciando situações que só nós compreendemos plenamente. Em especial, agradeço à Fernanda, Franciane e Thays, por serem fundamentais no início dessa jornada, e ao Vinicius e o Elden, que me acompanharam na fase final, a amizade que desenvolvemos ultrapassou os limites do ambiente “laboratório”, tornando vocês amigos especiais para a vida.

A todos do IMCT- UFRJ/Macaé, incluindo os professores e alunos, agradeço pelos encontros casuais nos corredores ou durante os almoços, sempre acompanhados de conversas agradáveis, acolhedoras e até mesmo sobre dicas sobre novos protocolos. Um agradecimento especial à Evelynn, que sempre esteve disposta a me ajudar e me fazer companhia, até mesmo em experimentos cansativos.

Agradeço a todos do LBCT, com ênfase ao professor Renato Augusto DaMatta, pela coorientação.

Agradeço a indústria Peregrina Pharmaceuticals, pela doação dos anticorpos anti-fosfatidilserina, e ao Laboratório de Pesquisa do Timo pela doação dos anticorpos para realização da citometria.

Agradeço os órgãos de financiamento CNPQ, Faperj e CAPES pelo apoio financeiro.

Assim como também agradeço toda a rede de educação pública, as cotas e aos programas de auxílio estudantil. Foi por meio dessas iniciativas que obtive o suporte necessário para superar alguns desafios e possibilitar minha trajetória acadêmica até aqui.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste projeto e que eventualmente deixei de mencionar, meu mais sincero agradecimento. O sucesso desta jornada deve-se, em grande parte, à colaboração e apoio de cada um de vocês.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada que afeta diversos países na África, Ásia e América Latina, incluindo o Brasil, e está associada a condições como desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imunológico enfraquecido e escassez de recursos. A infecção ocorre por meio da picada de flebotomíneos, que depositam promastigotas metacíclicas no local da lesão. Estas formas são fagocitadas principalmente por macrófagos, onde diferenciam em amastigotas e estabelecem a infecção. Mas outras células como células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos também participam deste processo. Após a cura clínica inicial, a eliminação completa do parasito não ocorre, e manifestações mais graves podem surgir devido à disseminação do parasito no organismo. Um fator de virulência importante envolvido na regulação da resposta imune e na infecção de macrófagos por promastigotas e amastigotas de *Leishmania* é a fosfatidilserina (PS). Este estudo buscou avaliar o papel da PS na infecção de fibroblastos e neutrófilos, bem como seu envolvimento na disseminação da doença. *In vitro*, observamos que o bloqueio de PS diminuiu a infecção de fibroblastos o que está relacionado a um aumento da produção de óxido nítrico por essas células. Não observamos alterações na infecção de neutrófilos nesse modelo. Em experimentos de infecção intravenosa com tratamento sistêmico dos animais com anticorpos anti-PS observamos que o anticorpo anti-PS Fab reduziu a carga parasitária no baço, diminuiu o tamanho e a disseminação das lesões cutâneas, bem como suprimiu a expressão de IL-10 e TGF β em esplenócitos. Estes achados sugerem que a PS desempenha um papel relevante na infecção dos fibroblastos, células importantes no processo de latência e disseminação de *L. amazonensis*, bem como na disseminação do parasito, devido a modulação de citocinas anti-inflamatórias cruciais para a visceralização do parasito e a redução da carga parasitária no baço. O bloqueio eficaz da PS pode ser uma estratégia promissora para modular a resposta imune e proteger contra a disseminação do parasito.

Palavras-Chaves: *Leishmania amazonensis*, fosfatidilserina, fibroblastos, neutrófilos, disseminação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease that affects several countries in Africa, Asia and Latin America, including Brazil, and is associated with conditions such as malnutrition, population displacement, precarious housing, weakened immune systems and scarcity of resources. Infection occurs through the bite of sandflies, which deposit metacyclic promastigotes at the site of the lesion. These forms are phagocytosed mainly by macrophages, where they differentiate into amastigotes and establish the infection. But other cells such as dendritic cells, neutrophils and fibroblasts also participate in this process. After the initial cure, complete elimination of the parasite does not occur, and more serious manifestations may arise due to the spread of the parasite in the body. An important virulence factor involved in the regulation of the immune response and the infection of macrophages by *Leishmania* promastigotes and amastigotes is phosphatidylserine (PS). This study sought to evaluate the role of PS in the infection of fibroblasts and neutrophils, as well as its involvement in the dissemination of the disease. In vitro, we observed that blocking PS reduces the infection of fibroblasts, which is related to an increase in the production of nitric oxide by these cells. We did not observe changes in neutrophil infection in this model. In intravenous infection experiments with systemic treatment of animals with anti-PS antibodies, we observed that the anti-PS Fab antibody reduced the parasite load in the spleen, decreased the size and dissemination of skin lesions, as well as suppressed the expression of IL-10 and TGF β in splenocytes. These findings suggest that PS plays a relevant role in the infection of fibroblasts, important cells in the process of latency and dissemination of *L. amazonensis*, as well as in the dissemination of the parasite, due to the modulation of anti-inflammatory cytokines crucial for the visceralization of the parasite and reducing parasite load in the spleen. Effective PS blockade may be a promising strategy to modulate the immune response and protect against parasite dissemination.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, phosphatidylserine, fibroblasts, neutrophils, dissemination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estado de endemicidade mundial de leishmaniose visceral, 2022..	19
Figura 2 - Estado de endemicidade mundial de leishmaniose cutânea, 2022..	21
Figura 3 - Ciclo da <i>Leishmania</i>	27
Figura 4 – Receptores de superfície de neutrófilos relacionados com o reconhecimento de patógeno.....	30
Figura 5 – Mecanismo de ação dos neutrófilos em ambientes infectados ou inflamatórios.....	31
Figura 6 – Diferentes respostas possíveis dos neutrófilos durante a infecção por <i>Leishmania</i>	32
Figura 7- O modelo de infecção de <i>L. major</i> usando neutrófilos como cavalo de troia.....	34
Figura 8 – Mimetismo apoptótico clássico.....	50
Figura 9 – Mimetismo apoptótico não clássico.....	50
Figura 10 – Exposição de PS nas formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 11 - Exposição de PS em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c.	69
Figura 12 – Infecção de fibroblasto NIH/3T3 com amastigotas tratadas com anticorpos anti-PS.	70
Figura 13 – Produção de óxido nítrico por NIH/3T3.....	71
Figura 14 – Produção de óxido nítrico por NIH/3T3 após infecção com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	72
Figura 15 - Exposição de PS em promastigotas mantidas em cultura <i>in vitro</i>	74
Figura 16 - Avaliação da infecção em neutrófilos infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	75
Figura 17– Infecção de neutrófilos peritoneais infectados por promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	76

Figura 18 - Produção de EROs por neutrófilos infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	77
Figura 19 - <i>Dot plot</i> da avaliação da infecção em neutrófilos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	78
Figura 20– Infecção de neutrófilos peritoneais infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	79
Figura 21 - Produção de EROs de neutrófilos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com anticorpos anti-PS.....	80
Figura 22 - Peso do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	81
Figura 23 – Acompanhamento da infecção em órgãos internos após a infecção intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	82
Figura 24 – Lesões macroscópicas em camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	82
Figura 25 – Peso dos baços e fígados de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.....	84
Figura 26 - Carga parasitária dos órgãos internos de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.....	85
Figura 27 – Perfil de produção de citocinas intracelulares em esplenócitos de camundongos Balb/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.....	87
Figura 28 - Produção de óxido nítrico de células esplênicas após o tratamento com anticorpos anti-PS.....	88
Figura 29 – Avaliação do tamanho das lesões encontradas nos camundongos BALB/c após o tratamento com anticorpos anti-PS.....	88
Figura 30 - Escore da disseminação das lesões encontradas nos camundongos BALB/c após o tratamento com anticorpos anti-PS.....	89
Figura 31 – Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas <i>L. amazonensis</i> tratados com PBS.....	90

Figura 32 - Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas *L. amazonensis* tratados com anticorpo anti-PS 11:31..... 90

Figura 33 - Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas *L. amazonensis* tratados com anticorpo anti-PS Fab..... 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vias de disseminação do parasito <i>Leishmania</i> em relação às manifestações clínicas.	40
Tabela 2 – Curva de ativação de NIH/3T3.....	58
Tabela 3 – Anticorpos utilizados na avaliação de citocinas intracelulares...	64
Tabela 4 – Escore distribuição das lesões.....	64
Tabela 5 – Escore do tamanho das lesões	65

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

OMS- Organização Mundial da Saúde
LV- Leishmaniose visceral
LC - Leishmaniose cutânea
LMC-Leishmaniose mucosa
LCD - Leishmaniose difusa
LD- Leishmaniose disseminada
LPD -Leishmaniose pós-casalar
IL- Interleucina
IFN γ - interferon-gama
iNOS - óxido nítrico sintase induzida
PS - Fosfatidilserina
TGF β - Fator de transformação do crescimento beta
PGE₂ - Prostaglandina E2
NO - óxido nítrico
TNF - Fator de necrose tumoral
DNA - ácido desoxirribonucleico
Th2 - T helper 2
Th1 - T helper 1
PSG - *promastigote secretory gel*
LPG - Lipofosfoglicano
G-CSF - fator estimulante de colônias de granulócitos
GM-CSF - fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos
LPS - lipopolissacarídeo
EROs - espécies reativa de oxigênio
MPO - grânulos de mieloperoxidase
NET - armadilha extracelular de neutrófilos
LTB4 - leucotrieno 4
Ig - Imunoglobulina
Treg - linfócitos T reguladores
L. - Leishmania
MHC - complexo principal de histocompatibilidade
NF-KB - fator nuclear kappa B

NK - natural *killer*
CCL2 - Quimiocina (C -C motif)
MCP 1 - Proteína quimioatraente de monócitos-1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
CXCL - Ligante de quimiocina com motivo C-X-C
CDC42 - proteína Ciclo de Divisão Celular
CCR - Receptor de quimiocina
PKC- δ - proteína quinase C delta
Akt - proteína quinase B
ODC - ornitina descarboxilase
ERK - quinase regulada por sinal extracelular
LPG - lipofosfoglicanos
GPI- glicosilfosfatidilinositol
PPG - proteofosfoglicanos
GP63 - glicoproteína 63
PI - iodeto de propídio
PBS- solução salina tamponada com fosfato
CFSE - éster succinimidil de carboxifluoresceína
G - força gravidade
DMEM - meio Eagle modificado por Dulbecco
SFB - soro fetal bovino
ANX - anexina V
CO₂ - Dióxido de carbono
SNC - soro normal de camundongo
PMA - forbol 12-Miristato 13- Acetato
H2DCFDA - Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
LDA - ensaio de diluição limitante (*limiting dilution assay*)
SLA - antígeno solúvel de leishmania

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 - REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 - LEISHMANIOSE	18
2.1.1- Leishmaniose Visceral	18
2.1.2 – Leishmaniose Cutânea	20
2.1.3 – Leishmaniose Mucosa	22
2.1.4 – Leishmaniose Disseminada	23
2.1.5 – Leishmaniose Cutânea Difusa	23
2.1.6 – Leishmaniose Recidiva Cutis	24
2.1.7 – Leishmaniose Pós Calasar	25
2.2 – Aspectos gerais dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	25
2.2.1 – Ciclo de vida	26
2.3 -INTERAÇÃO <i>Leishmania</i> E HOSPEDEIRO VERTEBRADO	28
2.3.1 – O papel dos neutrófilos na infecção por <i>Leishmania</i>	29
2.3.2 – O papel dos fibroblastos na infecção por <i>Leishmania</i>	36
2.4 -O PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO DO PARASITO	38
2.5- A FASE DE LATÊNCIA DA INFECÇÃO	45
2.6 - MIMETISMO APOPTÓTICO	48
2.6.1 - <i>Leishmania</i> e o mimetismo apoptótico	51
3 – OBJETIVOS	54
3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 - METODOLOGIA	55
4.1 – ANIMAIS	55
4.2- PARASITOS	55
4.2.1 – Promastigotas	55
4.2.2 – Amastigotas	56
4.2.3 - Avaliação de exposição de PS com anexina V e iodeto de propídio	57
4.3 – ANTICORPOS	57
4.4 – INFECÇÕES IN VITRO	58
4.4.1 - Fibroblastos NIH/3t3	58
4.4.2 – Neutrófilos	60
4.3 – INFECÇÃO IN VIVO	63
4.3.1 – Padronização da infecção intravenosa com <i>Leishmania amazonensis</i> .	63
4.3.2 - Avaliação da carga parasitária em infecções intravenosa com <i>Leishmania amazonensis</i> .	63

4.3.3 – Infecção intravenosa e tratamento com anticorpo anti-PS	64
4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5 - RESULTADOS	68
5.1.2 – Avaliação da infecção em fibroblastos NIH/3T3 com amastigota de <i>L. amazonensis</i> previamente tratadas com anticorpos anti-PS.	69
5.1.3 – Avaliação da produção de óxido nítrico por fibroblastos NIH/3T3 após infecção por amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> previamente tratadas com anticorpos anti-PS.	71
5.1.4 – Avaliação da produção de óxido nítrico por fibroblastos NIH/3T3 após infecção por amastigota de <i>L. amazonensis</i> PS-bloqueada	71
5.2 – INFECÇÃO EM NEUTRÓFILOS COM AMASTIGOTAS E PROMASTIGOTAS PREVIAMENTE TRATADAS COM ANTICORPO ANTI-PS	73
5.2.1 - Exposição de fosfatidilserina de promastigotas mantidas em cultura <i>in vitro</i> .	73
5.2.2 – Infecção de neutrófilos peritoneais com promastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.	74
5.2.3 – Produção de espécies reativas de oxigênio em infecções de neutrófilos peritoneais com promastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS	76
5.2.4 – Infecção de neutrófilos peritoneais com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.	78
5.2.5 – Produção de espécies reativas de oxigênio em infecções de neutrófilos peritoneais com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.	80
5.3– PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DISSEMINADA COM <i>L. amazonensis</i>	81
5.4 – ALTERAÇÃO NA DISSEMINAÇÃO SISTÊMICA DE <i>L. amazonensis</i> APÓS TRATAMENTO COM ANTICORPOS ANTI-PS	83
5.4.1 – Peso dos baços e fígados de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.	83
5.4.2 – Avaliação da carga parasitária de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.	84
5.4.3 – Análise do perfil imunológico das células esplênicas de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.	86
5.4.5 – Modulação da produção de óxido nítrico de células esplênicas de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.	87
5.4.6 – Distribuição de lesões macroscópicas em camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com anticorpos anti-PS.	88
5- DISCUSSÃO	92
6 - CONCLUSÃO	103
ANEXO 1	104
Participação em artigos publicados	104

Participação de trabalhos premiados	104
ANEXO 2	105
REFERÊNCIAS	116

1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose, uma doença endêmica e negligenciada, é uma preocupação global identificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 99 países, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, incluindo o Brasil. Estima-se que 1 bilhão de pessoas vivam em área de risco e que anualmente são diagnosticados aproximadamente 30 mil novos casos de leishmaniose visceral (LV) e mais de 1 milhão de novos casos de leishmaniose cutânea (LC) (RUIZ-POSTIGO et al., 2022, (WHO, 2023). Essa doença apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas, variando em níveis de complicação de severidade. A OMS classifica as formas clínicas em humanos em leishmaniose visceral (LV) também denominada calazar, cutânea (LC), mucosa (LM), difusa (LCD), disseminada (LD) e pós-calazar (LPC) (WHO, 2010)

A infecção geralmente começa com uma lesão ulcerativa no local da picada do vetor. Em muitos casos, essa lesão pode cicatrizar espontaneamente ou através de tratamento quimioterápico, porém não envolve a cura parasitológica do hospedeiro. A presença contínua de parasitos após a cicatrização está associada ao reaparecimento das feridas e ao desenvolvimento de manifestações clínicas mais graves, exigindo tratamentos difíceis e dispendiosos, como no caso de Leishmaniose recidiva cútis (LRC), LCD e LM. Fatores que comprometem o sistema imunológico, como transplantes de órgãos e infecção pelo vírus da imunodeficiência, aumentam o risco de infecção e suas formas mais graves. Durante a fase crônica da leishmaniose, alguns elementos do sistema imunológico, como as células T CD4⁺, e agentes como interleucina (IL) - 12, interferon-gama (IFN γ) e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), conseguem controlar o crescimento dos parasitos e a infecção. No entanto, qualquer falha nessa resposta durante a fase latente leva ao crescimento dos parasitos e ao reaparecimento das lesões (Corrêa Soares *et al.*, 2020; Leon *et al.*, 1992; Silveira, 2019).

Durante a fase latente, o parasito tende a se proliferar pouco, e os fibroblastos são as principais células onde a infecção persiste, devido à sua baixa capacidade microbicida. A persistência dos parasitos após a cura clínica representa desafios significativos para a evolução clínica, epidemiológica e controle da leishmaniose. Isso é especialmente problemático em relação aos pacientes imunocomprometidos e

áreas de transmissão ativa, pois a relação entre eles ainda não é completamente compreendida (HALDAR et al., 2020).

A função protetora ou patogênica dos neutrófilos na infecção ainda não está claramente definida e está relacionada com a espécie do parasito (Scorza; Carvalho; Wilson, 2017). Quando infectados com *L. major*, neutrófilos são considerados o "cavalo de Troia" da infecção, facilitando de forma indireta e silenciosa a entrada dos parasitos nos macrófagos. Na infecção de *L. amazonensis*, os neutrófilos não são capazes de eliminar o parasito, que por sua vez, induz a morte celular dessas células (van Zandbergen et al., 2004; Xin et al., 2010).

A fosfatidilserina (PS) é um fosfolípido presente em membranas celulares de eucariotos e procariotos, desempenhando um papel fundamental na sinalização celular, estrutura, manutenção, fluidez e permeabilidade seletiva da bicamada. Além das funções estruturais, a PS desempenha um papel crucial em vários processos celulares, incluindo a manutenção do potencial elétrico das membranas, o recrutamento e ativação de enzimas e componentes estruturais, bem como a sinalização de corpos apoptóticos para a fagocitose (Vance; Steenbergen, 2005). Quando células apoptóticas com PS expostas são fagocitadas, provocam uma mudança nos macrófagos incluindo a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, fator de transformação do crescimento beta (TGF β) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Freire-de-Lima et al., 2006; Vance; Steenbergen, 2005).

Protozoários como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e *L. amazonensis* possuem a capacidade de expor PS em suas membranas externas, um mecanismo conhecido como mimetismo apoptótico. Esse fenômeno suprime a resposta inflamatória local, permitindo o estabelecimento e disseminação da infecção (Balanco et al., 2001; Damatta et al., 2007; Seabra; de Souza; Damatta, 2004).

A exposição da PS na superfície de *L. amazonensis* ocorre de maneiras distintas nas formas evolutivas do parasito. As promastigotas que expõem PS são aquelas em morte apoptótica, resultado de condições adversas como falta de nutrientes e alterações de temperatura. Por outro lado, as promastigotas viáveis, responsáveis pelo estabelecimento da infecção, não exibem PS na superfície. Entretanto, a presença de promastigotas apoptóticas PS-positivas é crucial para o estabelecimento da infecção (Wanderley et al., 2009). As formas amastigotas, que são as formas intracelulares do parasito, apresentam PS na membrana de forma

constitutiva, sendo viáveis e capazes de iniciar a infecção, sem exibir sinais de apoptose (Wanderley *et al.*, 2006). O mecanismo exato de como o PS é exposta nas amastigotas ainda não é completamente compreendido, mas há suspeitas de que envolve o sequestro da membrana da célula hospedeira, sinalização apoptótica residual ou um processo desconhecido de resgate da morte por apoptose (Wanderley *et al.*, 2006, 2009).

A exposição de PS nas duas formas de *Leishmania* modula a resposta imune do hospedeiro, facilitando a infecção e a progressão da doença. As promastigotas PS-positivas regulam negativamente a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos que fagocitam promastigotas PS-negativas, permitindo a entrada, sobrevivência e diferenciação das promastigotas nos macrófagos. Nas amastigotas, o PS na superfície não apenas controla a produção de NO nos macrófagos infectados, mas também induz a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, TGF β e PGE $_2$, suprimindo assim a resposta inflamatória local (Balanco *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a quantidade de PS exposta na superfície das amastigotas pode influenciar a manifestação clínica da doença, sendo maior em casos de LCD em comparação com a LC em pacientes. Isso sugere que o PS desempenha um papel na modulação da resposta inflamatória e na determinação da gravidade da infecção no hospedeiro (França-Costa *et al.*, 2012). Em modelos de infecção em camundongos é clara a relação entre a exposição de PS e a gravidade da doença. Camundongos suscetíveis à infecção modulam positivamente a exposição de PS em amastigotas e esta exposição é diretamente proporcional a capacidade infectiva do parasito. Isto ocorre devido a uma modulação imunológica, associada à capacidade de macrófagos infectados expressarem concomitantemente iNOS e arginase I, criando um ambiente onde os parasitos sofrem o estresse necessário para induzir a exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2019).

A infecção por *L. amazonensis* está associada, primariamente, com casos de LC. No entanto, esta espécie é uma das únicas capazes de estabelecer infecções cutâneas mais graves (LCD, LD e LMC), assim como promover visceralização (Aleixo *et al.*, 2006; Barral *et al.*, 1991; Guerra *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2018). Em muitos destes casos, os pacientes têm resposta imunológica insuficiente, mesmo sem indicações claras de imunodeficiência. Acredita-se que características

intrínsecas desta espécie do parasito estejam associadas a esse fenômeno. Deste modo, avaliamos alguns aspectos da disseminação e latência da infecção na presença de anticorpos que bloqueiam a sinalização via PS.

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - LEISHMANIOSE

A leishmaniose se caracteriza como um conjunto de manifestações clínicas ocasionadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Mundialmente é uma das dez principais doenças tropicais negligenciadas. Os casos são amplamente distribuídos geograficamente, com distribuição principalmente na zona tropical e subtropical do globo. Endêmica em 99 países, sendo que 89 países são endêmicos por LC, 80 países endêmicos por LV, e 71 países endêmicos para ambas as formas clínicas (PAHO,2023).

Atualmente estima-se que mais de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas ou áreas de risco de infecção e que ocorra 30.000 novos casos de LV e mais de 1 milhão de novos casos de LC anualmente (WHO, 2023).

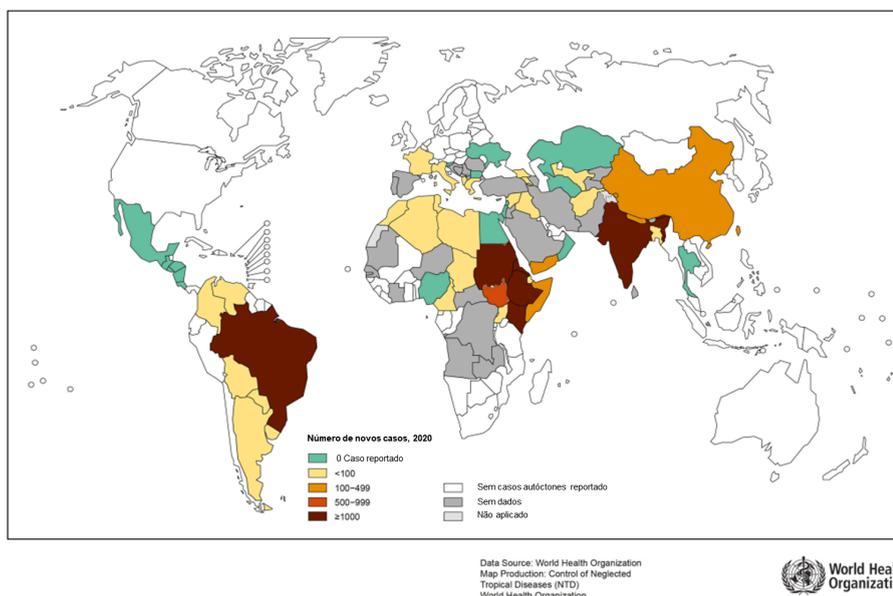
É uma zoonose e a transmissão ocorre através da picada de flebotomíneos. As manifestações são bastantes diversas em níveis de complicações e severidades. Os principais fatores determinantes das manifestações clínicas são o estado imunológico do hospedeiro e espécie do parasito envolvido.

2.1.1- Leishmaniose Visceral

A LV é também conhecida como calazar, é a manifestação mais grave, responsável por altas taxas de mortalidades na ausência de diagnósticos e tratamentos adequados. Anualmente ocorrem cerca de 50 mil a 90 mil novos casos, porém apenas cerca de 25% – 40% de casos são notificados. Os casos são distribuídos por todo o globo e a infecção está presente em 4 continentes, a maioria dos casos ocorrem no Brasil, leste da África e Índia (Figura 1) (WHO, 2023).

Figura 1– Estado de endemicidade mundial de leishmaniose visceral, 2021

Estados de endemicidade de leishmaniose visceral mundial, 2020



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2023)

Os casos majoritariamente ocorrem em comunidades pobres e regiões rurais, com registro de peri-urbanização no Brasil. Os surtos de casos estão associados com migração maciça, reassentamento de hospedeiros e desmatamento/destruição do habitat de flebotomíneos (Chappuis *et al.*, 2007).

As infecções de LV podem ser assintomáticas ou sintomáticas. Nos casos sintomáticos, os sintomas tendem a aparecer após 2 a 6 meses do início da infecção e consistem, principalmente de episódios irregulares de febre, perda de peso, anemia, aumento do baço e do fígado e caso não receba o diagnóstico e tratamento adequado, a taxa de mortalidade pode atingir 100% em 2 anos (WHO, 2023).

As principais espécies relacionadas são *L. donovani* e *L. infantum* (*L. chagasi*), porém algumas espécies relacionadas com casos de LC também podem visceralizar, como *L. amazonensis* (Barral *et al.*, 1991).

L. infantum está associada com casos na China, Oriente Médio e América do Sul, e infecta principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, o cão é o principal reservatório. *L. donovani* é considerada a forma antroponótica, transmitida de

humano para humano, e está relacionada com casos no leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal e afeta todos os grupos (Chappuis *et al.*, 2007).

A patologia da LV está associada com o aumento da produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, IFN γ e fator de necrose tumoral (TNF) sugerindo que o resultado clínico desfavorável não está relacionado com o direcionamento para uma resposta Th2, mas que outros mecanismos contribuem para a patogênese. A resposta imune celular tem papel importante no controle da infecção, visto que em casos de desnutrição ou imunossupressão os casos aumentam (Faleiro *et al.*, 2014).

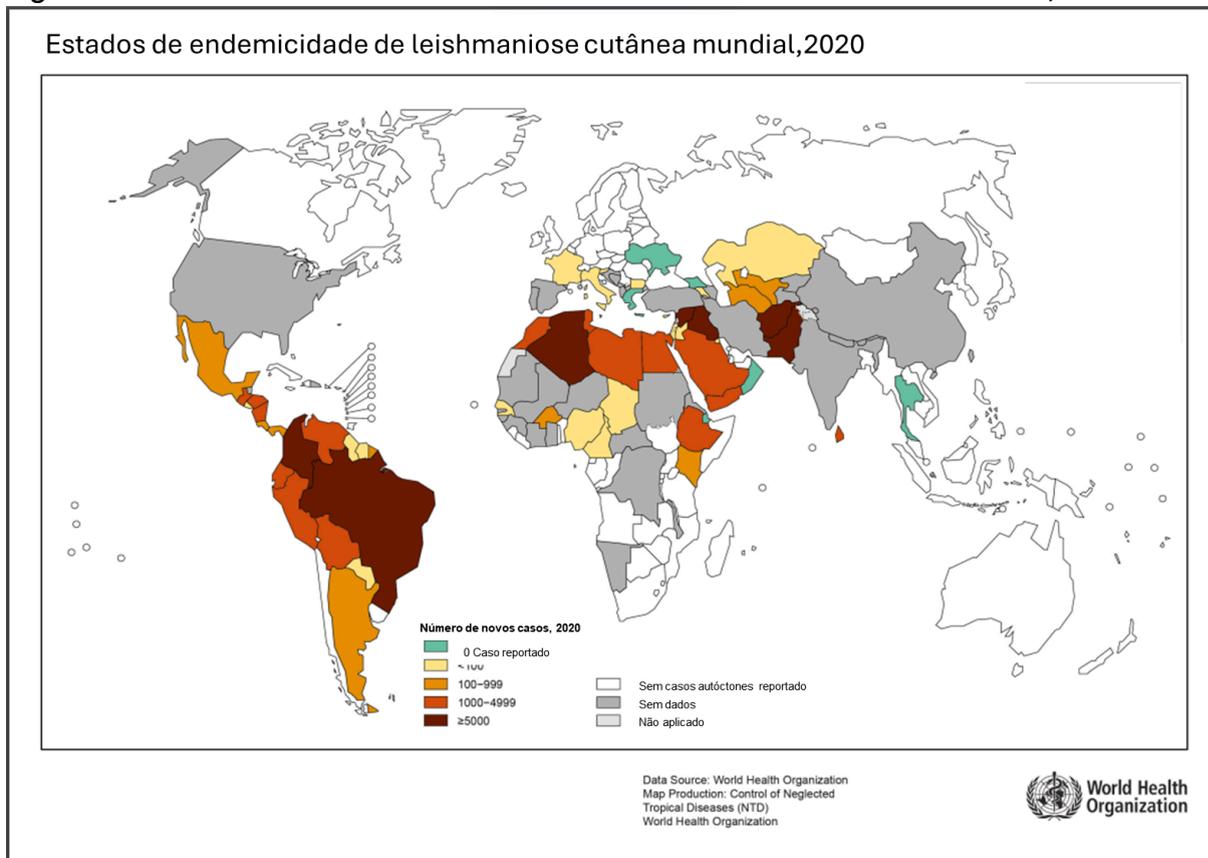
Após o tratamento farmacológico e aparentemente seu sucesso, o parasito permanece latente no organismo. A reativação da infecção pode ser espontânea ou devido a imunossupressão das células T CD4+, como novos casos de HIV, tratamento anti-rejeição de transplantes ou desnutrição (Murray *et al.*, 2005). Após a realização do tratamento é possível a migração do parasito para o tecido conjuntivo do paciente e que desenvolva LDPC.

2.1.2 – Leishmaniose Cutânea

A LC é a forma mais comum das leishmanioses, causando lesões ulcerativas na pele. A taxa de mortalidade é baixa, no entanto, a infecção gera impacto econômico e causa feridas socialmente estigmatizantes (Bennis *et al.*, 2017).

Cerca de 95% dos casos ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (Figura 2). Estima-se que ocorra 1 milhão de novos casos anualmente em todo o mundo, mas apenas cerca de 200 mil são relatados à OMS (OMS, 2023). Os casos em sua maioria ocorrem em países em desenvolvimento e estão relacionados com a pobreza, condições insalubres e inadequadas de habitações e desnutrição (Karimkhani *et al.*, 2016). O aumento da incidência dos casos está relacionado principalmente com as mudanças ambientais, como desmatamento, conflitos regionais, migrações em massa e urbanização (Bahrami; Harandi; Rafati, 2018).

Figura 2 - Estado de endemicidade mundial de leishmaniose cutânea, 2022



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2023)

Os sintomas de LC se desenvolvem após 2 a 8 semanas de inóculo do parasito. Na maioria das infecções na LC, os parasitos permanecem localizados na pele e as lesões ocorrem onde o flebotomíneo inocula os parasitos. As lesões típicas caracterizam-se inicialmente como uma pápula eritematosa e aumenta de tamanho até tornar-se úlcera. As lesões geralmente são redondas com bordas elevadas. Podem ser abertas e úmidas, sujeitas a infecções bacterianas secundárias, cobertas com exsudatos, ou podem ser secas, com crosta central. Em alguns casos as lesões podem ser auto-limitantes sem intervenção farmacológica, porém a cicatrização é lenta e pode demorar meses ou anos, podendo ocasionar cicatrizes desfigurantes (Pearson; Sousa, 1996). A cura da lesão não resulta na cura parasitológica, podendo encontrar parasitos e DNA dos parasitos após anos da cura clínica (Schubach *et al.*, 1998).

As principais espécies relacionadas com casos de LC são divididas pela distribuição geográfica em dois grupos: Espécies do Velho Mundo encontradas na

bacia do mediterrâneo, Oriente Médio, África e Índia, e espécies do Novo Mundo, encontradas nas Américas. As espécies do Velho do Mundo são *L. major*, *L. aethiopica* e *L. tropica*. E as do Novo Mundo são *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. laisoni*, *L. brasiliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Pearson; Sousa, 1996).

A cura das lesões de LC está associada com a ativação de células T CD4+ responsivas ao parasito e um perfil misto de produção de citocinas inflamatória e anti-inflamatória (Da-Cruz *et al.*, 2002).

2.1.3 – Leishmaniose Mucosa

A LM é a complicação mais grave da LC, caracterizada pela destruição parcial ou total das mucosas infectadas. Essa manifestação pode levar ao comprometimento significativo da via respiratória e da estética facial.

A frequência da manifestação é depende do tamanho e número de lesão, espécie, virulência do parasito, reposta imune do hospedeiro, sexo, idade e estado nutricional, podendo ser 5% do casos de LC, porém em áreas endêmicas podem chegar a 20% (David *et al.*, 1993; Machado-Coelho *et al.*, 2005; Volpedo *et al.*, 2021).

A principal espécie relacionada com as manifestações é *L. brasiliensis*, porém as espécies *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* (Goto; Lauletta Lindoso, 2012) *L. major*, *L. tropica* e *L. infantum* (Alborzi *et al.*, 2013; Cobo *et al.*, 2007; Marsden, [s. d.]; Shirian *et al.*, 2013) também podem ocasionar LMC. Aproximadamente 1-10% dos casos de LC progridem para LMC (Scorza; Carvalho; Wilson, 2017). A LCM pode ocorrer até 30 anos da lesão inicial de LC.

Essa manifestação é caracterizada por lesões ulcerativas nasais com perfuração do septo, que podem atingir lábios, bochechas, palato mole, faringe, laringe e em casos mais raros a traqueia e genitália (PEARSON; SOUSA, 1996). Os principais sintomas estão relacionados com os danos ocasionados nas mucosas, como obstrução nasal, tosse seca e crônica, rouquidão ou odinofagia (Carotenuto *et al.*, 2022). Mais de 90% dos casos ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2023).

A patologia da LMC está relacionada a uma resposta inflamatória exacerbada, representando uma reação de hipersensibilidade à leishmania e seus antígenos. Quando as lesões de LMC são comparadas com lesões de LC é encontrado maior

infiltrado inflamatório, maior quantidade de células T CD4+ e CD8+, maior produção de IFN γ , iNOS e granzima A e menor expressão de IL-10 e do receptor de IL-10, sugerindo assim que hiperativação *in situ* nas lesões de LM, ocorre na ausência da atividade de IL-10 (Bacellar *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005).

Quando comparada às outras manifestações, a produção de citocinas, tanto inflamatórias quanto anti-inflamatória estão em maiores quantidades nas lesões de LMC do que nas lesões de LC. Sugerindo que a desregulação da resposta inflamatória encontrada nas lesões não é só devido ao aumento de células T, mas também da rede de citocinas que contribuem para a destruição tecidual. Essa resposta exacerbada pode estar associada ao fato que não ocorre cura estéril nas infecções de *Leishmania*, podemos assim considerar que a superprodução de citocinas inflamatórias não leva a eliminação do parasito e sim ao dano do tecido (Bacellar *et al.*, 2002; Da-Cruz *et al.*, 2002).

2.1.4 – Leishmaniose Disseminada

A LD é uma manifestação rara, caracterizada com o aparecimento de dezenas, podendo chegar à milhares de lesões cutâneas polimórficas do tipo erupções acneiformes, pápulas inflamatórias (erosivas ou crostosas), nódulos e úlceras, em várias regiões do corpo, podendo ocorrer também em mucosas nasais. As lesões apresentam baixa carga parasitária e uma resposta inflamatória alta contra os antígenos do parasito. Algumas vezes concomitante com o surgimento das lesões ocorrem sintomas sistêmicos, como febre e enjojo. O aparecimento das lesões ocorre em até 6 semanas após o aparecimento da lesão LC inicial (Turetz *et al.*, 2002).

A maioria dos casos das Américas estão relacionados com a espécie *L. braziliensis*, porém pode ser causada por *L. guyanenses*, *L. panamensis* e *L. amazonensis* (MS., 2017). Os principais fatores relacionados com o desenvolvimento de DL é a ocupação agrícola (Machado; Prates; Machado, 2019).

A DL não está associada a imunossupressão dos pacientes, pois é descrita em pacientes jovens e imunocompetentes que vivem em áreas endêmicas (Turetz *et al.*, 2002).

2.1.5 – Leishmaniose Cutânea Difusa

A LCD é uma rara manifestação caracterizada disseminação linfo-hematogênica periférica de parasitos, com grave comprometimento da pele, com surgimento de infiltração difusas e lesões indolores e desfigurantes, com aspecto eritematoso nodular e tumoral e espalham sobre todo o corpo do paciente (Christensen *et al.*, 2019).

Os pacientes apresentam baixa resposta às tentativas de tratamentos e resistência quimioterápica. Além disso, a negatividade no teste intradérmico de Montenegro (teste cutâneo utilizado para avaliar a resposta tardia de hipersensibilidade celular no diagnóstico da leishmaniose tegumentar) é bastante comum, o que dificulta o diagnóstico e indica ausência de resposta imune celular (Silveira; Lainson; Corbett, 2004).

Grande parte dos casos são oriundos de infecções contraídas na infância, sugerindo que a imaturidade do sistema imune no momento da infecção inicial possibilita a ocorrência da manifestação. Na maioria dos casos o tratamento quimioterápico não é eficiente, o que oportuniza a reincidência da doença (Goto; Lauletta Lindoso, 2012; Turetz *et al.*, 2002).

A grande maioria dos casos ocorrem nas Américas e Etiópia e as principais espécies relacionadas com as infecções são *L. mexicana*, *L. aethiopica* e *L. amazonensis* (Goto; Lindoso, 2010).

2.1.6 – Leishmaniose Recidiva Cutis

A LRC é uma manifestação rara entre as leishmanioses, caracterizada pelo aparecimento de lesões em forma de pápulas/nódulos que não ulceram ao redor ou dentro da cicatriz da lesão de LC inicial, cerca de 2 anos após a cura. Grande parte dos casos descritos foram considerados crônicos, sem cura e os tratamentos tradicionais de leishmanioses não funcionam (Bittencourt *et al.*, 1993; Momeni; Aminjavaheri, 1995).

Está relacionada com um defeito na ativação de linfócitos T, sendo assim macrófagos infectados não conseguem eliminar o parasito e as lesões reaparecem. (Momeni; Aminjavaheri, 1995).

Considerada como uma forma hiperérgica das leishmanioses, os pacientes apresentam uma forte resposta de hipersensibilidade ao antígeno, resultando em pacientes com forte resposta ao teste de Montenegro (Bittencourt *et al.*, 1993).

Histologicamente é caracterizada pela infiltração difusa de linfócitos, plasmócitos e macrófagos, ausência de necrose e os parasitos estão em baixa quantidade e às vezes não são encontrados (Bittencourt *et al.*, 1993).

As principais espécies relacionadas são *L. tropica*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Bittencourt *et al.*, 1993). A manutenção do parasito nas lesões pode estar associado ao tratamento primário incorreto (Gomes *et al.*, 2015) e o aparecimento das novas lesões pode estar relacionado com possíveis traumas locais ou o tratamento com o corticoides (Gangneux *et al.*, 2007; Marovich *et al.*, 2001).

2.1.7 – Leishmaniose Pós Calasar

A LPC é uma complicação dermatológica que ocorre após a cura da LV e apresenta manifestações distintas nas regiões geográficas. Na Ásia, cerca de 5% dos pacientes curados de LV desenvolvem LPC, que é caracterizada por lesões papulares não auto reparáveis, tendência à cronificação e infiltração de células T CD8+. Por outro lado, na África Ocidental, aproximadamente 60% dos casos de LV progridem para LPC, com lesões maculares que surgem precocemente após a cura da LV, sendo caracterizadas pela reativação da resposta imunológica e auto reparáveis.

A patogênese dessas manifestações está relacionada ao tratamento bem-sucedido da LV, que reativa a resposta imune celular, porém sua manifestação difere muito dependendo da genética do parasito e sua localização (Dey; Singh, 2007; Volpedo *et al.*, 2021).

Além das diferenças genéticas da espécie *L. donovani*, a ocorrência dessas manifestações está relacionada às características genéticas do hospedeiro. Embora a LPC não seja uma condição letal, ela acarreta estigma social e os pacientes são reservatórios do parasito, contribuindo assim para a disseminação da LV. Portanto, compreender em detalhes os mecanismos moleculares e celulares envolvidos nessas manifestações é fundamental para uma investigação aprofundada nesta área (Burza; Croft; Boelaert, 2018; Volpedo *et al.*, 2021).

2.2 – ASPECTOS GERAIS DOS PARASITOS DO GÊNERO *Leishmania*

Os parasitos do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertencentes à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae (Garnham, 1971), são os agentes etiológicos responsáveis pela leishmaniose. Atualmente, existem aproximadamente 53 espécies descritas, das quais 31 são parasitos de humanos, sendo 20 patogênicas (Akhoundi *et al.*, 2016). Características biológicas, bioquímicas e imunológicas são determinantes para a divisão do gênero em dois grupos: Euleishmania e Paraleishmania (Cupolillo *et al.*, 2000). O grupo Euleishmania, composto pelos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, abrange as espécies patogênicas para os seres humanos. O grupo Paraleishmania não possui uma classificação definida e a maioria de suas espécies não são patogênicas para os seres humanos.

Parasitos do gênero *Leishmania* são microrganismos unicelulares flagelados que apresentam predominantemente reprodução assexuada por divisão binária. No entanto, há registros de espécies capazes de realizar reprodução sexuada no interior do intestino do vetor inseto (Akopyants *et al.*, 2009). Esses parasitos possuem uma organela denominada cinetoplasto, que é uma estrutura de DNA mitocondrial sendo uma característica distintiva da ordem Kinetoplastidae. O cinetoplasto está contido a única mitocôndria do parasito e se localiza onde a bolsa flagelar se associa ao flagelo (Laurent; Steinert, 1970; Webster; Russell, 1993).

2.2.1 – Ciclo de vida

No ciclo de vida da *Leishmania* são observadas duas formas evolutivas distintas: amastigotas e promastigotas. Essas formas apresentam diferenças bioquímicas e morfológicas, além de ocuparem diferentes ambientes celulares e infectar hospedeiros específicos (Brun; Berens; Krassner, 1976). A forma amastigota é caracterizada por um corpo celular arredondado, um flagelo curto e interno e ausência de mobilidade. Essa forma é obrigatoriamente intracelular e se reproduz no interior de células fagocíticas dos hospedeiros vertebrados, com preferência pelos macrófagos como células hospedeiras. Por outro lado, a forma promastigota possui um corpo alongado, com um flagelo visível na região anterior e com mobilidade.

Essa forma do parasito reside principalmente no ambiente extracelular, parasitando o intestino do hospedeiro invertebrado.

Os principais hospedeiros vertebrados da *Leishmania* são mamíferos, incluindo roedores, edentados, primatas e cães. É importante ressaltar que os seres humanos não fazem parte do ciclo silvestre do parasito, sendo infectados de forma acidental devido à destruição do habitat dos principais hospedeiros (LAINSON et al., 1994). Os hospedeiros invertebrados são insetos pertencentes à ordem Diptera, da família Psychodidae, nos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomia* (Novo Mundo) (Akhoundi et al., 2016).

Ao se alimentar de um hospedeiro infectado, a fêmea do mosquito flebotomíneo ingere macrófagos parasitados ou amastigotas livres, as formas amastigotas são liberadas no intestino do mosquito após a destruição dos macrófagos. Após um período de 6 a 8 horas, ocorre a diferenciação das amastigotas em promastigotas (Garnham, 1971). Durante a permanência das promastigotas no intestino do mosquito, ocorre um processo chamado metaciclogênese, desencadeado pela escassez de nutrientes disponíveis. Esse processo resulta em alterações celulares e bioquímicas nos parasitos, como a redução do corpo celular, o alongamento do flagelo e o aumento da motilidade. Essas mudanças levam às formas promastigotas metacíclicas, que são capazes de infectar células do hospedeiro vertebrado (Sacks; Perkins, 1984). As promastigotas metacíclicas diferenciadas migram para a região anterior do mosquito, onde são aprisionadas em um gel de glicoconjugados denominado PSG (*promastigote secretory gel*), produzido pelo próprio parasito (Rogers; Chance; Bates, 2002). O PSG atua bloqueando a válvula cardia do mosquito, impedindo a deglutição das formas parasitárias. Dessa forma, durante uma nova alimentação sanguínea, as formas metacíclicas são regurgitadas no local da picada do mosquito, transmitindo-se para o hospedeiro vertebrado (Figura 3) (Sacks; Noben-Trauth, 2002; Stierhof et al., 1999).

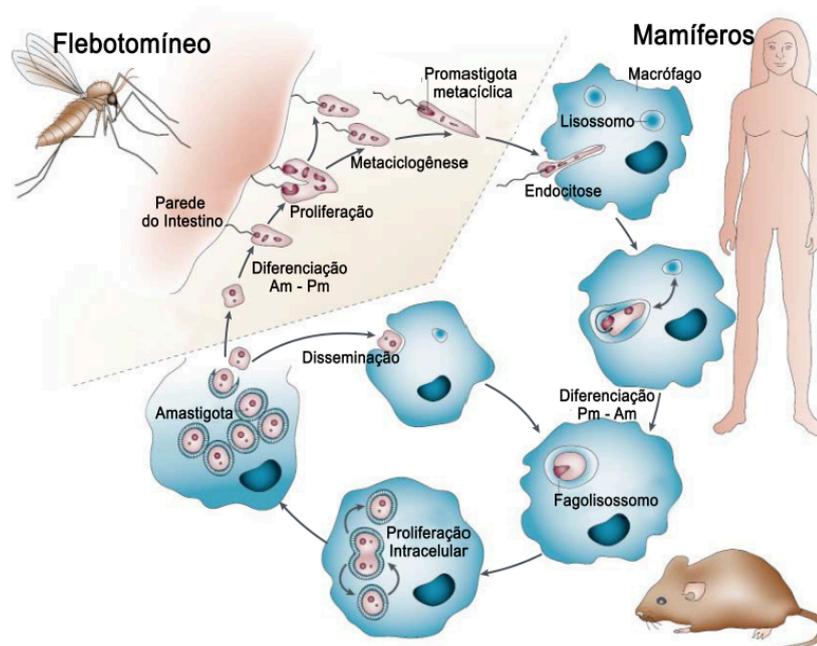


Figura 3- Ciclo da leishmania: Os insetos flebotomíneos são infectados ao se alimentarem de sangue contendo formas amastigotas do parasito. No intestino do vetor, essas formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas, passando por um processo de proliferação e diferenciação conhecido como metaciclogênese. Durante uma nova alimentação sanguínea, o flebotomíneo infectado regurgita no hospedeiro vertebrado com as formas promastigotas metacíclicas, que são rapidamente fagocitadas. Essas promastigotas, preferencialmente dentro dos fagolisossomos de macrófagos, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam até causar a lise do macrófago. As formas amastigotas podem infectar novos macrófagos, disseminando a infecção, ou serem capturadas em outra alimentação sanguínea, dando continuidade ao ciclo (Adaptada de Sacks; Noben-Trauth, 2002).

A proporção de promastigotas metacíclicas inoculadas na pele é responsável pelo sucesso da infecção (Giraud *et al.*, 2019). A presença de componentes salivares dos flebotomíneos e moléculas expostas pelos parasitos desempenha um papel crucial na sobrevivência das promastigotas no microambiente inflamatório e tóxico encontrado no hospedeiro vertebrado. As endonucleases presentes na saliva dos flebotomíneos são capazes de digerir as armadilhas extracelulares formadas pelos neutrófilos, além de inibir a coagulação sanguínea (Chagas *et al.*, 2014). Por sua vez, o lipofosfoglicano (LPG) exposto na superfície das promastigotas interfere na ativação do sistema complemento e na inserção do sistema de ataque à membrana. A enzima gp63 também desempenha um papel importante, interferindo na ativação do sistema complemento e auxiliando na fagocitose do parasito (McGwire *et al.*, 2002).

Após a infecção do hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas são rapidamente fagocitadas por células fagocíticas residentes e/ou por células que migram rapidamente da derme ou sangue para o local inflamatório. No interior dos fagolisossomas, os parasitos se diferenciam em amastigotas, um processo que pode levar de 1 a 5 dias, dependendo da espécie (Courret *et al.*, 2001). Após a conclusão da diferenciação, as amastigotas se multiplicam até que ocorra a ruptura da célula hospedeira. As amastigotas liberadas são então fagocitadas por novos macrófagos adjacentes, estabelecendo e disseminando a infecção (Figura 3) (Sacks; Noben-Trauth, 2002).

2.3 -INTERAÇÃO *Leishmania* E HOSPEDEIRO VERTEBRADO

As principais células parasitadas são fagócitos profissionais do sistema imunológico, sendo os macrófagos considerados como as células principais, porém existem relatos de infecção em neutrófilos, monócitos, células dendríticas e fibroblastos (Bogdan *et al.*, 2000; Hurrell; Regli; Tacchini-Cottier, 2016; Valigurová; Kolářová, 2023). Essas células desempenham papel importante na homeostase e na inflamação, possibilitando a eliminação de patógenos e a cicatrização do tecido hospedeiro. As células possuem receptores fagocíticos, como receptores semelhantes a Toll, receptores de complemento, receptores de Fc-gama, receptores de scavenger entre outros. Após a fagocitose, o parasito fica no fagossoma, que se funde aos lisossomos para a degradação hidrolítica e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (Podinovskaia; Descoteaux, 2015).

Após a inoculação do parasito as primeiras células a serem infectadas são os neutrófilos e os macrófagos residentes, fornecendo abrigo temporário para as formas de *Leishmania* durante as primeiras horas de infecção. Após alguns dias, os parasitos infectam monócitos inflamatórios, células dendríticas e eosinófilos. As células dendríticas e os eosinófilos são importantes para a ativação e direcionamento da resposta imunológica adaptativa contra a *Leishmania* (da Silva Marques *et al.*, 2021; Soong, 2008).

Os mecanismos utilizados para o parasito invadir os fagócitos são diversos. A entrada nos macrófagos acontece de forma passiva e é baseada nas interações mediadas por ligante-receptor entre promastigotas e moléculas de superfície do macrófago (Ueno; Wilson, 2012; Walker *et al.*, 2014). Porém em fibroblasto a

Leishmania entra de forma ativa, através da motilidade flagelar das promastigotas, que causa um dano na membrana e leva a formação de pseudópodes (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019; Valigurová; Kolářová, 2023).

2.3.1 – O papel dos neutrófilos na infecção por *Leishmania*

Os neutrófilos são os leucócitos predominantes na corrente sanguínea, constituindo cerca de 50% a 70% do total de leucócitos circulantes em humanos (Kobayashi; Malachowa; DeLeo, 2017). Diariamente, bilhões dessas células migram da medula óssea para a corrente sanguínea e migram em direção aos órgãos como baço, fígado e medula óssea, nos quais permanecem por um período até sofrerem morte por apoptose. O período de sobrevivência das células pode ser de 24 horas, enquanto em ambientes inflamatórios e infeccionados a apoptose espontânea dos neutrófilos é adiada e o tempo de vida é prolongado, podendo ser de 7 dias. A eliminação dos neutrófilos apoptóticos é efetuada por fagócitos mononucleares, processo importante para a manutenção da homeostase do organismo (Greenlee-Wacker, 2016; Kobayashi; Malachowa; DeLeo, 2017).

O microambiente do hospedeiro é fundamental para a sobrevivência e função dos neutrófilos. A produção de citocinas, quimiocinas, o contato célula-célula e fatores quimiotáticos dos microrganismos são responsáveis pelo recrutamento e ativação dos monócitos, células dendríticas e linfócitos (Kobayashi; Malachowa; DeLeo, 2017).

O adiamento da apoptose está relacionada com a presença de moléculas como citocinas pró-inflamatórias e moléculas bacterianas, incluindo C5a recombinante humano, fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-1 β , IL-6, IFN γ , lipopolissacarídeo (LPS), ou TNF α . O aumento da proliferação dos neutrófilos está relacionado com o aumento da produção de IL-17, G-CSF e GM-CSF, produzidos por macrófagos após endocitose dos neutrófilos apoptóticos (Colotta *et al.*, 1992; Nauseef; Borregaard, 2014). Outro fator que influencia a modulação dos neutrófilos é a morfologia e vitalidade do microrganismo fagocitado.

Os principais receptores presentes na superfície externa dos neutrófilos capazes de reconhecer patógenos são os receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), que reconhecem estruturas dos microrganismos, e os receptores opsônicos,

que reconhecem proteínas do hospedeiro depositadas na superfície do parasito (Figura 4).

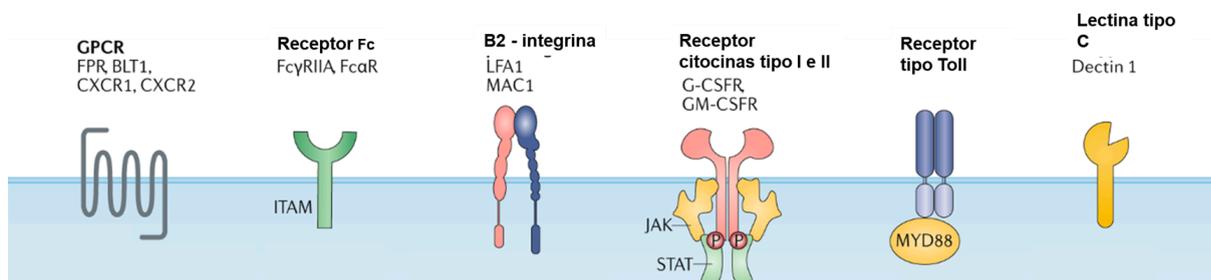


Figura 4 – Receptores de superfície de neutrófilos associados ao reconhecimento de patógenos (Németh; Sperandio; Mócsai, 2020). Representação dos receptores importantes na superfície dos neutrófilos essenciais para o reconhecimento de patógenos: receptores acoplados à proteína G (FPR, BLT1, CXCR1 e CXCR2), receptores de Fc (FcγRIIA e FcαR), integrinas β2 (LFA1 MAC1), receptores de citocinas tipo I e tipo II (G-CSFR e GM-CSFR), receptores Toll-like e lectinas do tipo C (dectina 1).

Os neutrófilos utilizam uma variedade de mecanismos nos processos inflamatórios para combater as infecções. Estes mecanismos compreendem atividades como a fagocitose e atividades enzimáticas como a geração de EROs, a liberação de grânulos de mieloperoxidase (MPO), enzimas hidrolítica elastase, lisozima e metaloproteinases de matriz, além da liberação de proteínas e peptídeos antibacterianos, como exemplo as defensinas e lactoferrina (Mantovani *et al.*, 2011). Adicionalmente, ocorre a liberação do DNA e a formação de estruturas conhecidas como armadilha extracelular de neutrófilos (NET), liberadas durante o processo de NETosis (Figura 5) (Németh; Sperandio; Mócsai, 2020). Além disso, considerável liberação de quimiocinas e citocinas que interagem com a resposta imunológica adaptativa, influenciando assim o direcionamento e a eficácia da resposta imunológica. Moléculas como leucotrieno 4 (LBT 4) também são secretadas em vesículas extracelulares pelos neutrófilos e possuem papel antimicrobianos e contribuem para a inflamação e o câncer (Németh; Mócsai, 2016).

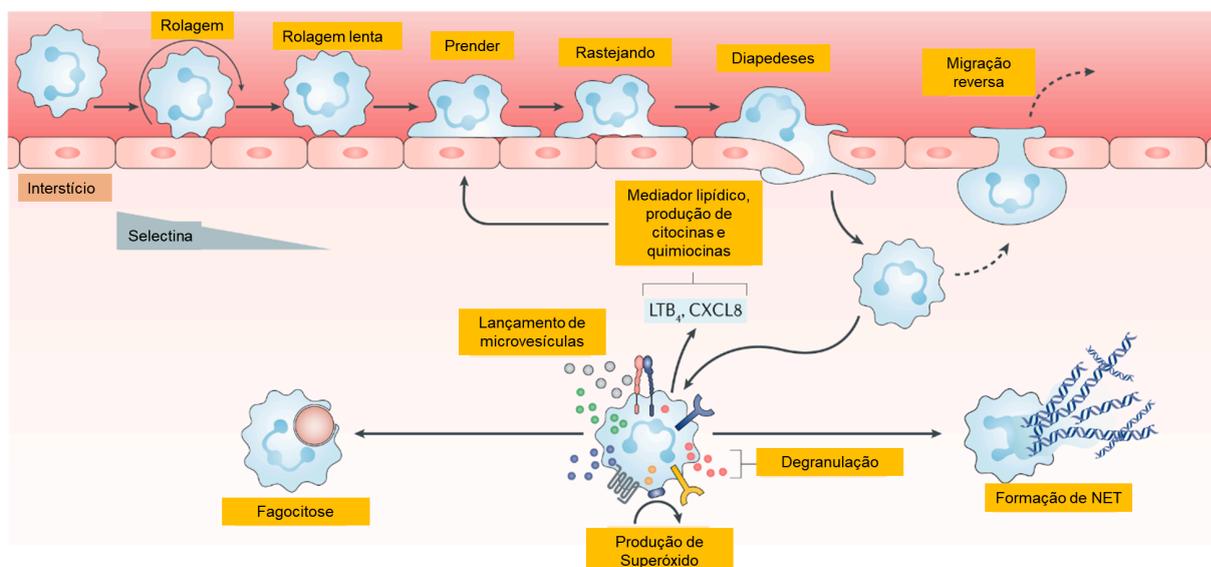


Figura 5 – Mecanismo de ação dos neutrófilos em ambientes infectados ou inflamatórios (Adaptado de Németh; Sperandio; Mócsai, 2020). Em microambientes inflamatórios e ao detectar estímulos microbianos, os neutrófilos passam por uma cascata de recrutamento, migrando para os tecidos. No local da inflamação, os neutrófilos exercem suas diferentes funções efetoras, como fagocitose, produção de superóxido, liberação de microvesículas com moléculas microbicidas, liberação de quimiocinas, degranulação e formação de NETs, levando à eliminação dos microrganismos invasores ou promovendo a resposta inflamatória.

Nas infecções causadas por *Leishmania*, as respostas dos neutrófilos manifestam-se de maneira heterogênea, variando de acordo com a espécie do parasito relacionado, às condições do hospedeiro e o estágio da infecção (Xin *et al.*, 2010) (Figura 6).

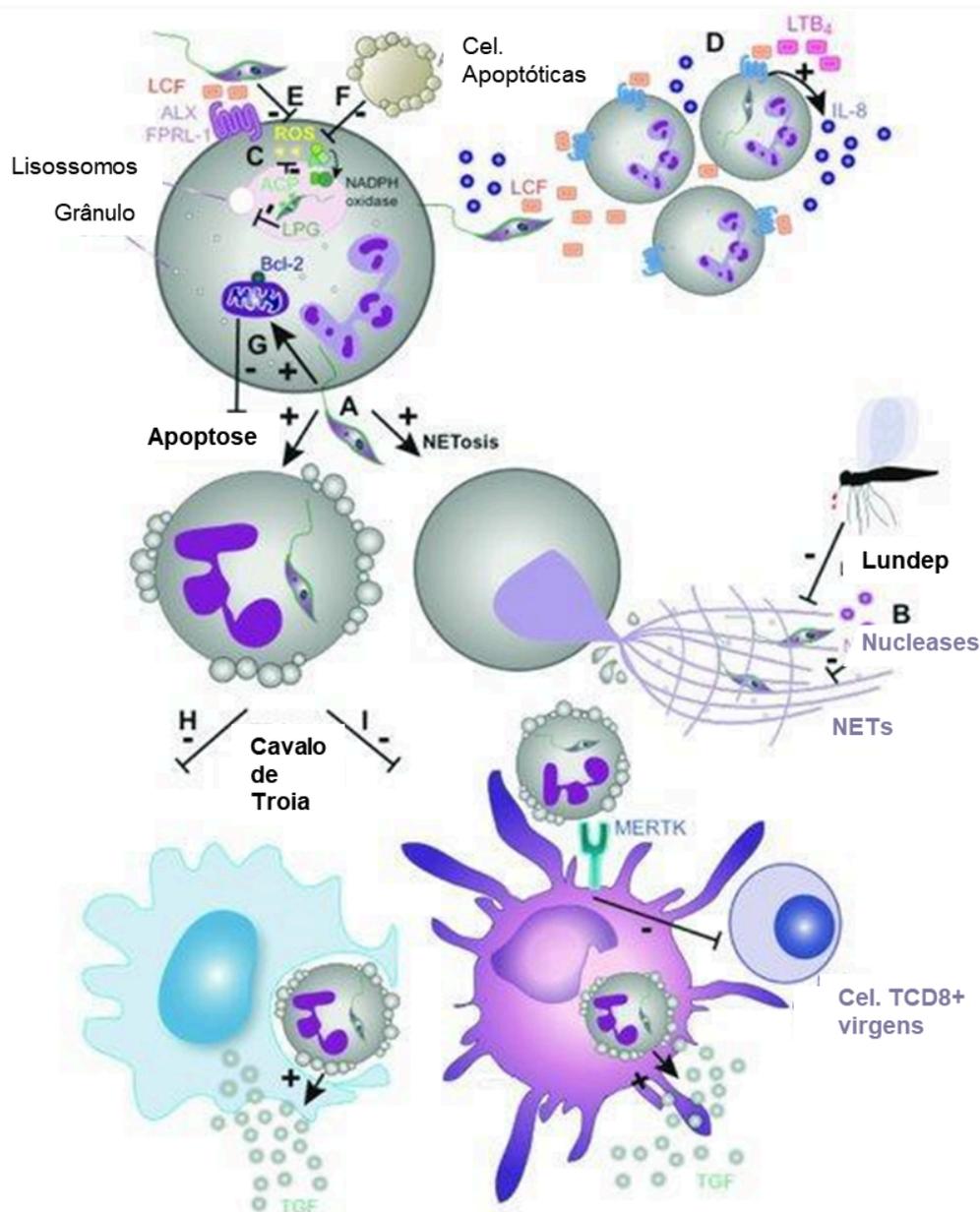


Figura 6 – Diferentes respostas possíveis dos neutrófilos durante a infecção por *Leishmania*. (A) Indução de apoptose. (B) Inibição da morte mediada por NET por nucleases (C) Fatores de virulência como LPG, ACP e LCF evitam a maturação do fagossom e inibem a explosão respiratória. (D) Recrutamento de neutrófilos para o local da infecção mediado por LTB₄ (E) Fatores quimiotáticos de leishmania inibe a explosão oxidativa (F) Indução da apoptose para inibição da produção de ROS (G) Prolongamento da vida útil dos neutrófilos por indução da proteína Bcl-2, (H, I) Transmissão silenciosa de *Leishmania* ou a hipótese do "Cavalo de Troia". (H) Fagocitose de neutrófilos apoptóticos contendo parasitos intactos promove uma resposta anti-inflamatória pelos macrófagos. (I) O envolvimento do MERTK em células dendríticas por neutrófilos apoptóticos infectados, após infecção inibe a ligação de células T CD8+ (Martínez-López *et al.*, 2018)

No contexto da infecção por *L. major*, ao avaliarmos camundongos resistentes à infecção, observamos que os neutrófilos têm a capacidade de eliminar os parasitos. Por outro lado, nos camundongos suscetíveis, os neutrófilos são permissivos à infecção, o que permite a sobrevivência dos parasitos, tanto em infecções agudas quanto crônicas (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2004; Romano *et al.*, 2017).

Nos hospedeiros suscetíveis à infecção, ocorre um rápido recrutamento dos neutrófilos após a inoculação do parasito e ocorre uma retenção significativa de células parasitadas no sítio da infecção, mesmo após algum tempo de infecção, concomitante, ocorre elevada atividade de MPO, indicando o papel essencial que os neutrófilos possuem na retenção do parasitos e no desenvolvimento das lesões (Aga *et al.*, 2002; Charmoy *et al.*, 2010; Tacchini-Cottier *et al.*, 2000). Complementarmente, ocorre o adiamento da apoptose dos neutrófilos infectados, em aproximadamente em 2-3 dias. Esse atraso na apoptose dos neutrófilos infectados é importantíssimo para o modelo proposto de interação dos neutrófilos e a espécie *L. major*, denominado como “cavalo de troia” (Laskay; van Zandbergen; Solbach, 2003). Devido esse adiamento da apoptose, possibilita que mais macrófagos migrem para o local da infecção, sendo que os macrófagos são as células alvo da *Leishmania*. Como a fagocitose de células apoptóticas autólogas é um processo inerente a homeostase tecidual, e nesses casos os macrófagos não são ativados, conseqüentemente, os parasitos internalizados pelos neutrófilos não são reconhecidos pelos macrófagos, visto que não tem interação física dos parasitos com os receptores de superfície dos macrófagos, resultando na incapacidade de desencadear uma resposta imunológica eficaz. Como resultado, os parasitos conseguem sobreviver, proliferar e infectar novas células hospedeiras (Figura 7) (Laskay; van Zandbergen; Solbach, 2003; van Zandbergen *et al.*, 2004).

De maneira semelhante, infecções ocasionadas por promastigotas de *L. mexicana* utilizam neutrófilos como abrigo temporário para inibir uma resposta imunológica contra os parasitos, ao mesmo tempo que utilizam essas células como mecanismos de disseminação do parasito e progressão das lesões e, ainda são capazes de sobreviverem ao aprisionamento das NETs. Porém, em contraste com *L. major*, as promastigotas de *L. mexicana* retardam o recrutamento das células fagocíticas e não atrasam a apoptose dos neutrófilos (Hurrell *et al.*, 2015).

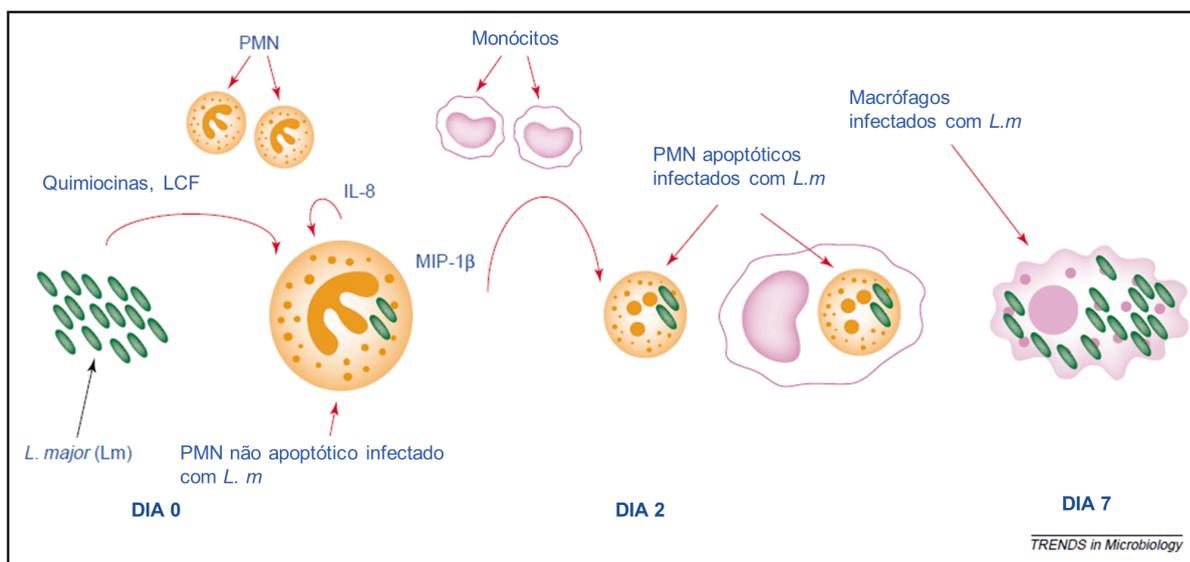


Figura 7- O modelo de infecção de *L. major* usando neutrófilos como cavalo de troia. Infecção por promastigotas de *L. major* (Lm) resulta no rápido recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) por quimiocinas do tecido e pela liberação de quimiotáticos de *Leishmania* (LCF). Os PMNs fagocitam os parasitas, e a liberação de IL-8 pelos PMN infectados amplifica a migração para o local da infecção. Após a ingestão, Lm sobrevive intracelularmente em PMNs e atrasa a apoptose espontânea e permitindo sua sobrevivência por 2–3 dias. Durante esse período, os PMNs liberam a quimiocina MIP-1b, atraindo monócitos. Após dois dias, os PMNs infectados também se tornam apoptóticos. Os monócitos são recrutados, ingerindo os "cavalos de Tróia" (PMNs apoptóticos com parasitas viáveis), silenciando as funções antimicrobianas dos macrófagos. Os parasitas sobrevivem e se multiplicam nos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (Laskay; van Zandbergen; Solbach, 2003).

De forma contrária, a interação dos neutrófilos com promastigotas das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. infantum* (Falcão *et al.*, 2016) é benéfica para o hospedeiro, pois os neutrófilos possuem um papel importante no controle da proliferação do parasito. Os neutrófilos eliminam os parasitos e tem a morte por apoptose adiantada, o que conseqüentemente resulta na proteção durante os estágios iniciais da infecção. No entanto, durante as fases iniciais da infecção, os neutrófilos também podem contribuir para a disseminação da infecção. (McFarlane *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2001; SOUSA *et al.*, 2014).

Com destaque para a interação neutrófilos e *L. amazonensis*, os neutrófilos desempenham um papel importante no controle da carga parasitária e no desenvolvimento de lesões nos estágios iniciais da infecção (Xin *et al.*, 2010).

Quando estudadas as infecções em camundongos C57BL/6, considerados parcialmente resistentes, e os camundongos BALB/c, considerados suscetíveis a infecção, encontramos diferenças nas quantidades de neutrófilos e suas atividades (SOUSA *et al.*, 2014). Em camundongos suscetíveis encontramos uma predominância de neutrófilos, compondo cerca de 90% de todas as células presentes na área infectada. Em contraste, nos camundongos parcialmente resistentes, encontramos que apenas 50% das células totais na infecção são neutrófilos. Além disso, é importante destacar que nos camundongos suscetíveis, os neutrófilos desempenham um papel importante na regulação negativa da produção de imunoglobulina (Ig) G e nas citocinas IL-10 e IL-17, e são responsáveis pela manutenção de células Treg no local da infecção, demonstrando assim o papel importante dos neutrófilos para o controle da proliferação do parasito e o desenvolvimento de lesões (SOUSA *et al.*, 2014).

Tanto as formas promastigotas quanto as amastigotas, de *L. amazonensis*, são passíveis de serem fagocitadas pelos neutrófilos. Entretanto, as interações variam significativamente, como a produção de diferentes citocinas e na eficácia variável da eliminação dos parasitos. Quando a infecção ocorre por promastigotas, os neutrófilos são estimulados a produzir TNF α , e a resposta microbicida é capaz de eliminar os parasitos. Porém, as amastigotas são mais resistentes aos mecanismos microbicidas dos neutrófilos e são capazes de induzir a produção de IL-10, o que contribui para a sobrevivência do parasito (Carlsen *et al.*, 2013). Entretanto, a infecção por amastigota resulta na indução da ativação dos neutrófilos, levando a um aumento da fagocitose, degranulação, produção de EROs e morte por apoptose dos neutrófilos. Estes fenômenos não são observados nas infecções com promastigotas, uma vez que o principal mecanismo de morte dos neutrófilos nessas condições é a NETose. É importante destacar que as promastigotas são bastantes sensíveis às NETs, sendo eliminadas na presença destas estruturas. Um dos principais fatores indutores das NETs é o LPG das promastigotas. Por outro lado, as amastigotas também são capazes de induzir a produção de NET, porém em menor quantidade, e são resistentes a esse processo quando comparadas às promastigotas (Carlsen *et al.*, 2013; Guimarães-Costa *et al.*, 2009).

Os neutrófilos podem estar relacionados com a restrição da disseminação dos parasitos, pois tendem a se concentrar nos locais de dano tecidual, local onde os parasitos ficam localizados (Carneiro; Peters, 2021).

Quando observamos os neutrófilos em diferentes manifestações clínicas e diferentes espécies, encontramos uma variedade de respostas. Em pacientes infectados com *L. aethiopica*, os neutrófilos sanguíneos periféricos mostram um estado inflamatório caracterizado por uma hiper-responsividade específica a *Leishmania*. Esta hiper-responsividade leva a uma produção elevada de EROs, o que, por sua vez, contribui para a progressão da doença mais acentuada, ocasionando maior dano tecidual e um desenvolvimento acentuado das lesões cutâneas (Chanyalew *et al.*, 2021). Semelhante com pacientes de LMC, que apresentam neutrofilia severa, o que contribui para o agravamento do processo inflamatório e destruição das mucosas (Jaimes, 2022).

Entretanto, pacientes com LV infectados com *L. chagasi*, submetidos ao tratamento com granulócitos induzido por GM-CSF, apresentaram uma menor taxa de reincidência da doença (Badaró *et al.*, 1994). Em casos de infecção por *L. braziliensis*, a produção de NET foi associada à cura espontânea da infecção e a uma resposta eficaz ao tratamento (Leite-Silva *et al.*, 2023).

Nas lesões derivadas de pacientes infectados com *L. amazonensis*, observa-se uma elevada presença de neutrófilos, mesmo em processos inflamatórios crônicos com lesões já estabelecidas. A presença de NETs também foi bastante significativa, manifestando-se em redes pequenas e homogêneas, distribuídas em toda a extensão das lesões, além de estruturas grandes facilmente identificáveis. A presença de NETs foi correlacionada com a presença de amastigotas, sendo que após a morte do parasito, as NETs se degradam (Morgado *et al.*, 2015).

2.3.2 – O papel dos fibroblastos na infecção por *Leishmania*

Os fibroblastos são as células mais prevalentes no tecido conjuntivo, sendo células mesenquimais que constitui o estroma dos tecidos. Estas células são altamente heterogêneas e variam conforme a origem do desenvolvimento, a localização anatômica e a função específica no organismo (Talbot *et al.*, 2022; Wei; Nguyen; Brenner, 2021).

No contexto fisiológico e patológico da pele, que é o primeiro órgão de defesa do corpo contra o ambiente externo, os fibroblastos desempenham um papel crucial (Talbot *et al.*, 2022). As células da pele devem ser capazes de reparar não apenas os danos diários causados pela constante exposição a fatores ambientais estressantes, como os efeitos do sol, mas também feridas mais significativas resultantes de queimaduras, lacerações ou outras lesões traumáticas. O processo de cicatrização das feridas é extremamente complexo, com muitos estágios e altamente regulado, no qual os fibroblastos desempenham funções cruciais. Isso inclui a comunicação com outras células-chave envolvidas na cicatrização e contribuição direta para o fechamento e preenchimento do local da lesão (Talbot *et al.*, 2022).

Essas células, conhecidas como células não clássicas do sistema imune inato, desempenham um papel importante na imunidade tecidual local, interagindo com o sistema imunológico em diferentes locais anatômicos e condições patológicas. As propriedades imunológicas dessas células variam dependendo da localização e patologia envolvida e estão relacionadas com o recrutamento e ativação de células imunes, indução de imunossupressão e remoção de infiltrados inflamatórios (Davidson *et al.*, 2021).

Os fibroblastos desempenham papel importante na infecção por *Leishmania*, devido à sua abundância nos locais de inoculação das promastigotas nos hospedeiros vertebrados. Diversos estudos destacam a relevância dos fibroblastos durante o curso da infecção. Rodríguez e cols. (1996) demonstraram a presença de amastigotas em fibroblastos de cães, e esfregaços de pacientes com LC revelaram a presença de fibroblastos infectados (Dabiri *et al.*, 1998; Hervás Rodríguez *et al.*, 1996).

Em diferentes manifestações da doença, como LPC e LV, bem como indivíduos saudáveis, observa-se variação nos padrões de expressão gênica e níveis de citocinas nos fibroblastos. Essas variações incluem diferenças na expressão de proteína e síntese das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8. Fibroblastos derivados de pacientes LPC apresentam padrões indicativos de apresentação antigênica através via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I, favorecendo o direcionamento da resposta imune para células T CD8+. De maneira contrária, fibroblastos derivados de pacientes com VL expressam quimiocinas mediadas por fator nuclear kappa B

(NF-KB), IL-1 β , IL-6 e IL-8, o que induz o recrutamento e migração de células natural killer (NK) e monócitos para o local da infecção, alterando a resposta imune para células T CD4+, auxiliando na visceralização da doença (Singh *et al.*, 2023).

Estudos *in vitro* utilizando fibroblastos humanos demonstraram a susceptibilidade dessas células as espécies *L. amazonensis*, *L. major* e *L. donovani* (Bogdan *et al.*, 2000; Dedet *et al.*, 1983; Haldar *et al.*, 2020). Nas infecções por *L. donovani*, os parasitos não conseguem multiplicar eficazmente após a entrada nas células hospedeiras (Haldar *et al.*, 2020).

Já nas infecções por *L. major*, os fibroblastos são as principais células hospedeiras durante a fase latente, servindo como locais seguros para a sobrevivência dos parasitos, devido à sua menor produção de NO quando comparado com os macrófagos. Entretanto, os fibroblastos são sensíveis ao NO produzido por macrófagos adjacentes, o que pode equilibrar a quantidade de parasitos presentes nas lesões crônicas (Bogdan *et al.*, 2000). Em linhagem de fibroblastos embrionário de camundongos, à infecção resulta na redução da ativação de apoptose nas células infectadas, um dos mecanismos que contribui para a sobrevivência prolongada das células infectadas e evita ativação do sistema imunológico (Hallé *et al.*, 2009).

Além disso, os fibroblastos podem eliminar os parasitos durante a infecção por *L. amazonensis* (Dedet *et al.*, 1983). A infecção por promastigotas de *L. amazonensis* está relacionada com receptores de manoses nos fibroblastos de pele, uma vez que a infecção leva ao aumento dessa expressão, dependente da viabilidade do parasito (Hespanhol *et al.*, 2005). Em estudos com fibroblastos murinos *in vitro* revelaram a entrada ativa de *L. amazonensis*, mecanismo que envolve a permeabilização temporária da membrana plasmática, sinalização de cálcio, recrutamento/exocitose de lisossomos, de maneira independente de fagocitose e não envolvendo o citoesqueleto de actina (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019).

Essas interações entre leishmania e fibroblastos, mostram que os fibroblastos são uma população de células importantes para o decorrer da infecção, porém, há muitas coisas ainda a serem descobertas.

2.4 -O PROCESSO DE DISSEMINAÇÃO DO PARASITO

Os parasitos quando inoculados no hospedeiro vertebrado, são rapidamente fagocitados, principalmente por macrófagos residentes, monócitos e neutrófilos (Mosser; Brittingham, 1997). A lesão cutânea pode se desenvolver no local, no entanto, a cura pode ocorrer de forma espontânea ou por meio de tratamento quimioterápico. O desenvolvimento das formas clínicas subsequentes está intrinsecamente ligado ao processo de disseminação do parasito, podendo ocorrer enquanto a lesão inicial ainda está ativa quanto após a cura clínica (tabela 1) (Silveira, 2019). As manifestações clínicas secundárias podem surgir após meses ou até anos da lesão inicial. A compreensão total da patogênese destas formas clínicas ainda é um grande desafio e a cura terapêutica é difícil de ser alcançada (Costa *et al.*, 2009; Silveira *et al.*, 2009).

A disseminação do parasito está intrinsecamente relacionada ao seu movimento do local da inoculação nos hospedeiros para os órgãos internos e outros locais da pele. A principal via de disseminação conhecida atualmente é por via linfo-hematogênica ou migração dérmica (Chappuis *et al.*, 2007). Importante ressaltar que a maneira pela qual ocorre a disseminação e a resposta imunológica associada à disseminação são distintas de cada manifestação clínica e parasito envolvido.

Na LV, a disseminação ocorre após a internalização das formas promastigotas pelas células fagocíticas, seguidas pela sua diferenciação em amastigotas. As células infectadas migram através do sistema linfático e vascular, infectando, assim, monócitos e macrófagos pertencentes do sistema retículo-endotelial, resultando na infecção em vários tecidos e órgãos, como baço, medula óssea, linfonodos e fígado (Chappuis *et al.*, 2007). Durante a fase aguda da infecção com *L. donovani*, o sistema imunológico é incapaz de conter a proliferação do parasito, devido uma deficiência nas respostas de células T aos antígenos parasitários, o que resulta em sua disseminação. Isto é acompanhado por uma elevada produção de IL-10 e redução na produção de IFN γ e TNF α (Ghalib *et al.*, 1993).

Nos casos de LMC, a infecção pode se disseminar por via hematogênica ou linfática (Barral *et al.*, 1995; de Oliveira Camera *et al.*, 2006). O fato de as manifestações clínicas geralmente ocorrerem após a cura da cicatrização da lesão

inicial, sugere que o organismo é capaz de controlar a proliferação inicial dos parasitos. Porém, em alguns indivíduos, sem o total entendimento dos detalhes, ocorre o aparecimento de lesões metastáticas, indicando que as amastigotas migram do local inicial da infecção para as mucosas (Gomes *et al.*, 2016). Atualmente os principais fatores relacionados à suscetibilidade da progressão da LM são polimorfismo dos genes TNF α , IL-6 e CCL2/MCP1, porém esses fatores genéticos sozinhos não conseguem explicar a disseminação do parasito (Cabrera *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 2006; Ramasawmy *et al.*, 2010).

Nos casos de DL, a disseminação do parasito ocorre cerca de 2 a 6 semanas após o aparecimento da lesão inicial. Diversos pacientes relatam sintomas sistêmicos nesse estágio, indicando que o processo de disseminação ocorre preferencialmente por via hematogênica. As lesões podem se manifestar em todo o corpo, incluindo regiões corporais não contínuas, sendo também comuns as lesões nas mucosas (Machado; Prates; Machado, 2019).

Nas lesões de LD é notável a expressão de IFN γ , TNF α , CCL2, CCL3, CCL11 e CXCL10, semelhantes às lesões de LC. Antígenos de *L. braziliensis* isolados de pacientes com LD estimulam maior produção de IFN γ e TNF α em comparação aos antígenos derivados de pacientes com LC. Entretanto, as células do sangue periféricos de pacientes com LD apresentam uma menor produção de IFN γ , TNF α e CXCL9 em relação aos pacientes com LC. Isso sugere que a diminuição da resposta Th1 no sangue possibilite a disseminação do parasito. A diminuição de resposta Th1 no sangue pode estar relacionado com a atração das células T para as múltiplas lesões cutâneas, o que, por sua vez, preserva a resposta imune tecidual, responsável pela baixa carga parasitária e o desenvolvimento de úlceras semelhantes a LC (Machado; Prates; Machado, 2019; Machado *et al.*, 2011; Turetz *et al.*, 2002).

Nos casos de LCD a disseminação é lenta e pode persistir por muitos anos, e ocorre por via linfo hematogênica periférica, onde as lesões crescem e se desenvolvem como nódulos e placas que se espalham de forma lenta e contínua para cobrir todo o corpo, com exceção do couro cabeludo, axilas, prega inguinal, palmas das mãos e solas dos pés (Hashiguchi *et al.*, 2016; Silveira, 2019).

As lesões de LCD são caracterizadas ausência de resposta celular específica contra os antígenos dos patógenos, com baixa produção de citocinas inflamatórias

como IL-1 β , IFN γ e TNF α e alta produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10, a resposta imune presente é a resposta T helper 2 (Th2). Devido à ausência da resposta imunológica, os macrófagos presentes estão massivamente parasitados e o teste de Montenegro é negativado (Bryceson, 1969; Fernández-Figueroa *et al.*, 2016; Salaiza-Suazo *et al.*, 1999).

Quanto à disseminação do parasito nos casos de LPC, ainda não se sabe muito. No entanto, é de conhecimento que a fim de evitar a morte, os parasitos migram dos órgãos internos para a pele, muitas vezes fugindo dos tratamentos e da ativação da resposta imunológica. Outro ponto importante é a influência da determinação genética dos parasitos no tropismo tecidual (Ganguly *et al.*, 2010). Os parasitos presentes na pele são detectados pelas células imunes reativas, que infiltram o tecido cutâneo, desencadeando uma resposta inflamatória dérmica e a migração de células T do sangue periférico para a pele. Esse processo leva à produção exacerbada de IFN γ , amplificando a resposta inflamatória e culminando no desenvolvimento das lesões de LPC (Volpedo *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Vias de disseminação do parasito *Leishmania* em relação às manifestações clínicas.

Manifestação Clínica	Via de disseminação	Fonte
Visceral	Sistema linfático e vascular	Chappuis (2007)
Disseminada	Hematogênica	Turetz (2002)
Difusa	Linfático e hematogênica periférica	Silveira (2019)
Mucocutânea	Sistema linfático e hematogênica	Barral (1995); Almeida (1996)
Disseminada cutânea limítrofe	Sistema linfático	Mondolfi (2012)
LPC	Desconhecido	

A imunidade celular específica é crucial para controlar a infecção, os pacientes com LCD e LD apresentam uma falha nesta resposta imunológica. Essa deficiência pode ser congênita, adquirida através de infecções ou decorrer de eventos desconhecidos (Costa *et al.*, 2009). Este fenótipo tem papel central na permissibilidade gerada pelo sistema imunológico, permitindo que o parasito replique de maneira incontrolável e se dissemine pelo organismo, permitindo a cronificação e acarretando a gravidade da infecção.

Para que o processo de disseminação aconteça é necessário que ocorra a migração das células parasitadas do local da inoculação para tecidos adjacentes (Carvalho *et al.*, 2004). A migração celular é um processo complexo que envolve a participação de quimiocinas e moléculas de adesão, como selectinas e integrinas. A capacidade das células de migrar ou permanecer no local é crucial para determinar as características e distribuição das lesões (Hermida *et al.*, 2014). Figueira *et al.* (2015) demonstrou que a infecção por *L. amazonensis* resulta na perda de função de integrinas e na redução da capacidade de adesão de leucócitos aos tecidos conectivos. Após a infecção, os macrófagos apresentaram redução na função das integrinas, levando à redução da adesão dos macrófagos (Figueira *et al.*, 2015). Mecanismo semelhante foi observado em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* em um ambiente de cultura 3D, onde a infecção resultou na redução da migração de macrófagos em comparação com os não infectados. Essa redução foi associada à diminuição da expressão de Rac1 e CDC42 (Luz *et al.*, 2023).

Porém, na infecção por *L. infantum* em células dendríticas houve um efeito oposto, aumentando a migração dessas células. Esse aumento de migração está associado ao transporte de antígenos para os gânglios linfáticos e pode estar relacionada com o aumento da expressão de Rac1 e CDC42, encontrada nessas células após a infecção. Em contraste, a infecção com *L. braziliensis* reduziu a migração, enquanto a *L. amazonensis* não teve alteração significativa nas taxas de migração das células dendríticas (Luz *et al.*, 2023).

Espécies relacionadas com a visceralização, como a *L. infantum*, estão associadas com maior migração das células dendríticas. De maneira semelhante, cepas de *L. amazonensis* isoladas de pacientes com LCD e LMC, também induz aumento na migração das células dendríticas, quando comparado com as cepas

isoladas de pacientes com LC (Rebouças *et al.*, 2021). Porém, Hermida *et al.* (2014) e De Menezes (2017) mostraram que a migração de células dendríticas e macrófagos parasitados com *L. amazonensis* eram inibidas. A permanência dessas células no local da lesão pode auxiliar o processo de latência da infecção e favorecer o aparecimento tardio de úlceras, característico na LCD. Sendo assim a indução da migração celular após a infecção por *Leishmania* podem ser um importante mecanismo para a disseminação e latência do parasito e para a modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Esta modulação ocorre de maneira distinta entre uma mesma espécie, sendo necessário analisar as características das cepas (de Menezes *et al.*, 2017; Hermida *et al.*, 2014).

Os receptores de quimiocinas também estão relacionados com o processo de migração celular, devido às proteínas transmembranas associadas à proteína G, que desencadeia o processo de recrutamento celular (Hughes; Nibbs, 2018). Dois receptores estudados na infecção, são o receptor de quimiocina (CCR) 7 e o CCR4. O CCR4 é um receptor expresso principalmente em macrófagos, células dendríticas, células NK e células T, com predominância no fenótipo Th2, e está relacionado com o direcionamento de linfócitos específicos para o local de inflamação. Em um estudo de Pinheiro (2006), foi demonstrado que a infecção de *L. amazonensis* induziu uma regulação negativa de CCR4 e perda de adesão dos fagócitos (Pinheiro *et al.*, 2006). No entanto, no trabalho de Coêlho *et al.* (2010) foi demonstrado que a expressão de CCR4 está relacionada com a produção de IFN γ , pois células que produzem altos níveis desta citocina expressam menos CCR4, enquanto as células que produzem pouco IFN γ expressam mais CCR4 (Coêlho *et al.*, 2010). A infecção de *L. infantum* e *L. amazonensis* em LCD aumenta a expressão de CCR7, molécula relacionada com a migração de células para o linfonodo de drenagem, ocorre também o aumento de expressão de CCR7 nas espécies que aumentam a migração (Rebouças *et al.*, 2021). Desse modo, a dinâmica de regulação da expressão de receptores de quimiocinas pela infecção pode ser fator relevante para definir a suscetibilidade e disseminação.

Os parasitos da espécie *L. aethiops* utilizam como principal mecanismo para a disseminação do parasito a via célula-célula com a indução da apoptose na célula infectada e sua posterior fagocitose. As células infectadas apresentam exposição de PS e ativação de caspase-3, liberação de citocromo c, regulação negativa de

proteína quinase B (Akt), fosforilação de BAD e ativação de NF-kB de forma independente da expressão de proteína quinase C delta (PKC- δ) (Ranatunga *et al.*, 2020).

Embora a vigilância imunológica seja fundamental, existem evidências de que fatores intrínsecos à espécie de *Leishmania* podem ter papel tão ou mais importante no desenvolvimento de formas mais graves de LC. Nos casos de coinfeção *Leishmania*-HIV, principalmente documentados no continente africano e asiático, a principal intercorrência nos pacientes infectados com espécies que causam infecção tegumentar, como *L. major*, é a disseminação do parasito para órgãos internos como o fígado e o baço. Ou seja, não há uma correlação clínica clara entre a imunodeficiência adquirida e o desenvolvimento de infecções tegumentares graves (Lindoso *et al.*, 2016). Além disso, mesmo em indivíduos imunologicamente comprometidos, as manifestações clínicas são variáveis na infecção por espécies dermatrópicas (van Griensven *et al.*, 2014). Dessa forma, características intrínsecas às espécies de leishmania devem ser levadas em consideração no que diz respeito à patogênese de formas graves de LC.

Os fatores citados acima são possíveis mecanismos modulados pela infecção para possibilitar a disseminação do parasito para outros tecidos. Ao comparar pacientes com LCD e com outras manifestações, podemos encontrar diferenças em alguns processos do sistema imunológico. Arginase 1, ornitina descarboxilase (ODC), PGE₂ e TGF β estão elevados em pacientes com LCD, de maneira sistêmica e no local da infecção o que contribui para a proliferação do parasito, cronicização da doença e na formação das lesões características. A presença de PGE₂ sistêmica em LC, em conjunto com TNF α e IL-12 induzem a ativação do sistema imune capaz de controlar a infecção, enquanto pacientes com LCD apresentem alta PGE₂ e TGF β suprimindo o sistema imune, possibilitando a proliferação e disseminação do parasito (França-Costa *et al.*, 2015).

As lesões derivadas de pacientes com LCD apresentam níveis mais baixos de moléculas efetoras citotóxicas, como a granulicina, perforina e granzima A e B, quando comparadas com outras formas de LC, o que pode ser um fator que contribui para a incapacidade do sistema imune em controlar a infecção (Silveira; Lainson; Corbett, 2004). Além disso, as células T CD4⁺ e T CD8⁺ são encontradas em menores quantidades nas lesões derivadas de LCD quando comparadas com outras

manifestações, sendo que as células T CD8+ são as células T predominantes do sítio inflamatório (Campos *et al.*, 2018). Entretanto, elas não são consideradas essenciais para disseminação (Vanloubbeeck; Ackermann; Jones, 2005), pois não são células diretamente associadas com o controle citotóxico de macrófagos infectados.

Em lesões de LCD as células B são mais frequentes do que em pacientes com LC e em indivíduos saudáveis. Pacientes com LCD apresentam níveis mais altos de todos os isotipos de IgG, sendo que a IgG4 é responsável por 40% de todas as imunoglobulinas. O isotipo IgG4 não oferece proteção ao hospedeiro, pois não se liga ao complemento e não ativa os receptores da porção constante (FcγRs) e além disso, contribui para a condição anti-inflamatória e refrataria da doença (Christensen *et al.*, 2019).

Nos casos de leishmaniose disseminada cutânea limítrofe/intermediária (LCBD), relacionados com a espécie *L. amazonensis*, a disseminação e desfecho da doença são diferentes quando comparados com outras espécies. Nessa variação de manifestação clínica a doença se manifesta de forma crônica, com aparecimento de uma ou múltiplas lesões e nem sempre com comprometimento de mucosas, o que a difere da LCD (Paniz Mondolfi *et al.*, 2013). As primeiras lesões aparecem após 6 meses da cura das lesões iniciais de LC, com no máximo 6 lesões metastáticas e com duração de 1 a 2 anos. Na derme, encontra-se grande quantidade de macrófagos vacuolizados e bastantes parasitados, cercados por linfócitos e plasmócitos. A disseminação do parasito ocorre por via linfática devido a presença do parasito nos linfonodos. Essa disseminação dos parasitos não ocorre nas formas LC e LCD, e o motivo ainda é incerto. No entanto, uma possível explicação é a mudança do perfil das células T CD4+ Th2 para o perfil Th1. A presença significativa dos linfócitos nas lesões LCBD é uma característica distinta à LCD e tem importância crucial para o sucesso do tratamento farmacológico, pois após seis meses de tratamentos, os pacientes são considerados curados (Silveira; Lainson; Corbett, 2004).

Em uma mesma manifestação clínica, porém causada por espécies diferentes, observamos variações na celularidade. Quando analisadas histopatologicamente, as lesões de LC causada por *L. amazonensis*, encontramos infiltrado inflamatório granulomatoso composto principalmente por macrófagos densamente vascularizado,

ao contrário nas lesões de LC, causadas por *L. braziliensis* encontramos poucos macrófagos e com baixa carga parasitária, maior presença de linfócitos e plasmócitos, caracterizado um granuloma epitelióide. Porém, nas lesões de LCD de *L. amazonensis*, de maneira similar as lesões de LC, as principais características histopatológicas são a intensa infiltração de macrófagos, muitas amastigotas, porém com baixa frequência de linfócitos e plasmócitos, dando ao infiltrado o aspecto de granuloma macrofágico (Silveira; Lainson; Corbett, 2004)

2.5- A FASE DE LATÊNCIA DA INFECÇÃO

A fase latente da infecção é caracterizada pelo período que o parasito permanece viável no organismo após a cura clínica, porém, com uma quantidade muito baixa. Durante esse período, os sintomas podem estar ausentes, e a doença pode reincidir meses após o tratamento inicial. Esse fenômeno é bastante comum em diversas infecções causadas por vírus, bactérias e parasitos (Mandell; Beverley, 2017; Ramírez; Guevara, 1997).

A reincidência da doença é um fenômeno complexo influenciado por diversos fatores, incluindo características do hospedeiro, agente etiológico e até mesmo via de administração dos medicamentos. Em muitos casos, não possui espécie específica relacionada à reincidência (Santos *et al.*, 2023).

Em áreas endêmicas de leishmaniose, há desafios significativos no diagnóstico diferencial entre reincidência ou nova infecção. Isso resulta em dificuldades para interpretar adequadamente o real cenário dos casos da infecção e reinfecção, identificar infecções latentes e entender a distribuição do parasito (Ramírez; Guevara, 1997). A latência tem sua importância devido os hospedeiros serem possíveis reservatórios dos parasitos em regiões onde a transmissão é ativa (Mendonça *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2014; Svobodová *et al.*, 2003).

A cura espontânea da lesão está associada ao desenvolvimento da resposta imune celular contra o patógeno, porém, essa resposta nem sempre é sustentada e, ao longo do tempo (de Rossell *et al.*, 1992; Sanguenza *et al.*, 1993). Quando o período de latência é interrompido, lesões podem reaparecer de forma grave em humanos, incluindo manifestações como a LMC, LV, LD, LCD, coinfecção com HIV e pós-calazar dermal (Aebischer, 1994; Carvalho *et al.*, 1994; Corrêa Soares *et al.*,

2020; de Oliveira *et al.*, 2007; Leon *et al.*, 1992; Pampiglione; La Placa; Schlick, 1974).

A razão pela qual o parasito continua a persistir no organismo após a cura espontânea e/ou o sucesso da terapia ainda não é completamente compreendida. Porém, parasitos viáveis persistem no sistema linfático e sistema retículo endotelial, principalmente em células dendríticas e fibroblastos, podendo também infectar adipócitos (Mendes *et al.*, 2022). Um local frequentemente identificado como nicho privilegiado para a persistência do parasito após o tratamento medicamentoso, são as mucosas, isso pode ser atribuído às diferenças farmacocinéticas na distribuição e acumulação de medicamentos ou a divergência imunológica entre os tecidos da mucosa e da pele (Martínez-Valencia *et al.*, 2017). Nestes ambientes, os parasitos sobrevivem em quantidades mínimas, aproveitando-se da falha na ativação de mecanismo microbicidas dessas células (Belkaid *et al.*, 2000, 2001).

Tem-se a especulação que a persistência do parasito seria benéfica para pacientes que vivem em áreas endêmicas de leishmaniose, através da manutenção de uma memória de células T. Se esta suposição for correta, a eliminação completa do parasito poderia tornar o paciente mais vulnerável às reinfecções (Mendonça *et al.*, 2004; Uzonna *et al.*, 2001; Zaph *et al.*, 2004).

Os principais fatores relacionados com a capacidade de latência do parasito estão relacionados com características genótípicas e fenótípicas do parasito, bem como a resposta imune do hospedeiro. A seleção clonal e alterações moleculares são os mecanismos utilizados pelos parasitos para conseguir escapar da resposta imunológica leishmanicida (Mendonça *et al.*, 2004).

A produção de IFN γ e IL-10 é fundamental para modular a latência do parasito, visto que camundongos deficientes em IL-10 são capazes de ter cura estéril, enquanto a presença excessiva de IL-10 resulta em lesões progressivas, não cicatrizantes e com alta carga parasitária. O IFN γ também está presente no período de latência do parasito, porém devido a presença da IL-10, as células tornam-se menos responsivas ao IFN γ . Durante a fase de latência dos parasitos, as células T CD4 $^{+}$ desempenham um papel importante, devido a capacidade de produção de IFN γ e IL-10. A proliferação do parasito e o reaparecimento das lesões está relacionada com o desequilíbrio e o comprometimento das células T CD4 $^{+}$ e alteração da produção destas citocinas (Belkaid *et al.*, 2001; Bomfim *et al.*, 1996).

Pacientes infectados com *L. infantum* frequentemente atravessam um período prolongado de infecção assintomática, com aparecimento dos sintomas após um intervalo significativo (Burza; Croft; Boelaert, 2018). Em casos com *L. braziliensis*, a persistência do parasito após a cura clínica é uma ocorrência quase universal, caracterizada pela cronificação da infecção, latência e a tendência à metástase. A doença pode ressurgir em hospedeiros imunocomprometidos, nas formas mucocutâneas ou viscerais, especialmente em pacientes com infecção por HIV (Mendonça *et al.*, 2004). *L. viannia* também exibe persistência do parasito nas lesões mesmo após a cura clínica (Martínez-Valencia *et al.*, 2017).

A espécie *L. major* aparentemente se comporta de maneira distinta em comparação com as outras espécies. Em infecções por *L. major*, após a cura, não são encontrados parasitos nas lesões de LC. Isso reforça a ideia de que as infecções causadas por essa espécie não apresentam reativação e não há relatos de casos LRC, embora não seja possível afirmar que os parasitos não estejam em outros órgãos. Esse acontecimento pode ser atribuído à incapacidade dos parasitos em resistir às atividades leishmanicidas do hospedeiro. No entanto, como falado anteriormente, a eliminação completa dos parasitos pode aumentar a probabilidade de reinfecção, uma vez que a manutenção de células T reguladoras seria comprometida, e a proteção contra novas infecções dependeria exclusivamente das células T CD4⁺ CD25⁺ efectoras (Sghaier *et al.*, 2022). Porém, o controle da infecção e proteção contra novas infecções são mediadas por duas populações de células T CD4⁺, células efectoras dependentes de patógenos de vida curta e células de memória central independentes de patógenos de vida longa (Zaph *et al.*, 2004).

Outro fator que pode estar associado com a manutenção da latência é a expressão de iNOS constante nos macrófagos residentes nas lesões em linfonodos e nas células dendríticas (Stenger *et al.*, 1996).

Uma das maneiras que o parasito consegue subverter a resposta imune do hospedeiro e sobreviver de forma crônica nas células imunes é através da modulação da quinase regulada por sinal extracelular MAPK (ERK1/2) nas células dendríticas e macrófagos infectados. O parasito é capaz de modular a ativação de ERK1/2 através da fosforilação. A ativação de ERK1/2 inibe a expressão de moléculas de superfície CD40 e a produção de IL-12p40, alterando a maturação das células dendríticas que contribui para o fenótipo de células T não polarizada,

característico da lesão não cicatrizante da infecção por *L. amazonensis*. Outra contribuição da ativação de ERK1/2 é aumentar a sobrevivência da célula parasitada. O bloqueio de ERK1/2 leva ao aumento da produção de EROs e NO demonstrando papel importante para a cronificação da infecção (Boggiatto *et al.*, 2009; Martinez; Petersen, 2014).

A forma ativa de LC está relacionada com as citocinas IL-4 e IL-5, uma vez que, após o tratamento e conseqüentemente a cura clínica, os níveis de IL-4 e IL-5 diminuem, enquanto os níveis de IFN γ aumentam significativamente. Uma resposta de cicatrização foi relacionada com a diminuição das células T CD4+ e aumento das células T CD8+, levando a proporções semelhantes entre as células. Pode-se especular que as diminuições observadas nas proporções de células T CD4+, manutenção da proporção CD4+/CD8+, juntamente com a ausência de produção de IL-4, poderiam representar um passo importante para evitar a reativação da doença (Da-Cruz *et al.*, 2002).

2.6 - MIMETISMO APOPTÓTICO

Para que a leishmania consiga estabelecer, manter e disseminar a infecção é necessário que superem as atividades leishmanicidas do sistema imunológico do hospedeiro. Diversas moléculas são descritas como facilitadores desse processo de estabelecimento da infecção, tais como os lipofosfoglicanos (LPG), glicosilfosfatidilinositol (GPI), proteofosfoglicanos (PPG) e a glicoproteína 63 (GP63) (Turco; Späth; Beverley, 2001). Dentre essas moléculas, a fosfatidilserina tem sido bastante estudada devido à sua importância no estabelecimento e disseminação da infecção de leishmania (Balanco *et al.*, 2001; França-Costa *et al.*, 2012; Wanderley *et al.*, 2006).

A exposição de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática está relacionada com o mecanismo de morte programada do tipo apoptose (Emoto; Umeda, 2002; van Engeland *et al.*, 1998). A apoptose é um processo de morte celular que envolve a eliminação de células geneticamente determinadas e desempenha papéis cruciais durante o desenvolvimento, envelhecimento e homeostase dos tecidos, sem ativar uma resposta imunológica (Elmore, 2007; Taylor; Cullen; Martin, 2008). As células apoptóticas exibem características

morfológicas específicas, como arredondamento da célula, retração dos pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de bolhas na membrana plasmática (Häcker, 2000). A eliminação eficiente dessas células apoptóticas é realizada principalmente por células fagocíticas. Durante esse processo, a imunossupressão da resposta imunológica desempenha um papel bastante importante e é mediada pela produção de citocinas como IL-10 e TGF β , sendo essencial para o controle da reação inflamatória, garantindo que o tecido não seja danificado (Fadok *et al.*, 1998).

De maneira semelhante às células apoptóticas, algumas células tumorais, vírus, bactérias e parasitos intracelulares expõem a PS na membrana externa, esse fenômeno é conhecido como mimetismo apoptótico (Amara; Mercer, 2015; Birge *et al.*, 2016; DaMatta *et al.*, 2007; Seabra; de Souza; DaMatta, 2004; Wanderley; DaMatta; Barcinski, 2020).

A exposição de PS é capaz de alterar microambientes celulares, afetando a viabilidade celular, progressão tumoral e metástase em ambientes tumorais (Iida *et al.*, 2015; Park; Kang, 2019). Em relação aos patógenos, induz a tolerância imunológica, onde células fagocíticas não conseguem desempenhar a atividade microbicida, o que possibilita o estabelecimento e disseminação dos parasitos (Birge *et al.*, 2016).

Esta exposição de PS por células tumorais e patógenos, induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, com IL-10 e TGF β , de maneira semelhante ao que ocorre com as células apoptóticas (Birge *et al.*, 2016; Voll *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2022).

O mimetismo apoptótico pode ser classificado em dois tipos: o mimetismo clássico e não clássico. O mimetismo clássico ocorre quando a fonte de PS é membrana plasmática do próprio organismo ou células, está associado com infecções de vírus envelopados, desenvolvimento tumoral e infecções parasitárias (Figura 8). Por outro lado, o mimetismo não clássico está relacionado com patógenos ou células tumorais que se beneficiam da exposição de PS das células hospedeiras, seja durante a sua morte natural ou após a fagocitose, sendo observado em alguns vírus envelopados e parasitos (Figura 9) (Amara; Mercer, 2015; Wanderley; DaMatta; Barcinski, 2020).

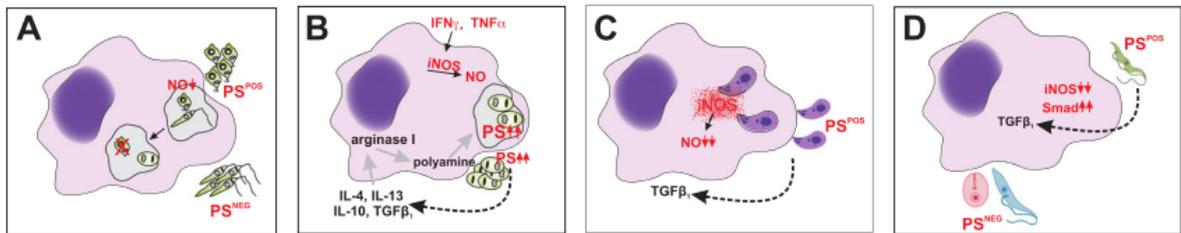


Figura 8 – Mimetismo apoptótico clássico – A PS exposta é oriunda da própria membrana da célula ou parasito. (A) promastigotas de *Leishmania spp.* (B) amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (C) Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (D) Tripomastigotas de *T. cruzi* (Wanderley; DaMatta; Barcinski, 2020)

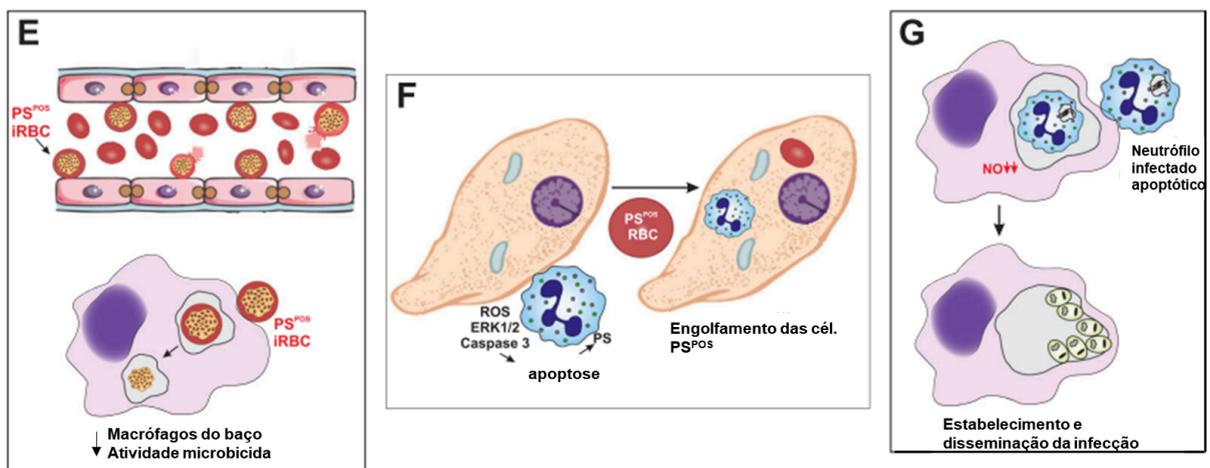


Figura 9 – Mimetismo apoptótico não clássico – A PS exposta é oriunda de outra célula, células tumorais de beneficiam de outras células e patógenos utilizam a PS expostas em células do hospedeiro ou após a morte natural da célula infectada. (A) Glóbulos vermelhos infectados com *Plasmodium spp.* (B) Trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (C) Neutrófilos infectados com *Leishmania* (Wanderley; DaMatta; Barcinski, 2020).

2.6.1 - *Leishmania* e o mimetismo apoptótico

Leishmania utiliza o mimetismo apoptótico como um mecanismo de patogenicidade. A exposição de PS na leishmania ocorre em ambas as formas morfológicas do parasito, tanto em amastigota quanto promastigotas (Figura 10). Esse processo tem como principais objetivos induzir a fagocitose e modular a produção de citocinas, polarização celular e quimiocinas, resultando em um perfil anti-inflamatório no local da infecção. Até o momento, o mimetismo apoptótico foi

descrito nas espécies *L. major* (van Zandbergen *et al.*, 2006), *L. braziliensis* (Farias *et al.*, 2013) e *L. amazonensis* (Wanderley *et al.*, 2006, 2009).

Nas formas amastigotas, a exposição de PS ocorre de forma constitutiva enquanto estão vivas e não está relacionada a outros aspectos de morte celular. Esse fato de virulência é explorado pelas amastigotas para possibilitar o estabelecimento da infecção e a proliferação dos parasitos. A capacidade infectiva das amastigotas está, de fato, relacionada com a exposição de PS (Wanderley *et al.*, 2006).

Por outro lado, as formas promastigotas expõem a PS quando morrem por apoptose, sendo, fundamentais para o estabelecimento da infecção. Uma pequena quantidade de promastigotas morre por apoptose devido a alterações de nutrientes e temperaturas (MOREIRA *et al.*, 1996). A fagocitose desses parasitos, que estão expondo PS, é capaz de inibir a ativação dos macrófagos, permitindo que as promastigotas vivas entrem e estabeleçam a infecção com sucesso (van Zandbergen *et al.*, 2006; Wanderley *et al.*, 2009).

Os mecanismos implícitos à exposição de PS nas formas amastigotas, ainda não foram completamente elucidados. No entanto, algumas hipóteses incluem o sequestro da membrana da célula hospedeira, resíduo da sinalização apoptótica ou a possibilidade de resgate por meios de mecanismos ainda desconhecidos da morte por apoptose (Wanderley; Barcinski, 2010).

O reconhecimento da PS exposta por *Leishmania* induz a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF β e inibem a produção de TNF α (Balanco *et al.*, 2001; van Zandbergen *et al.*, 2006). A produção de IL-10 está relacionada com a produção de citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias na fase inicial da lesão, sendo importante para o estabelecimento da infecção e sua presença é fundamental para o estabelecimento da latência da infecção, podemos sugerir assim que possivelmente a exposição de PS influencia no estabelecimento e latência da infecção.

Conforme as promastigotas são mantidas por consecutivas passagens *in vitro*, a exposição de PS é reduzida (Crepaldi *et al.*, 2019), e isso pode estar relacionado com a perda de patogenicidade, já observada após a passagens seguidas *in vivo*. Além disso, promastigotas mantidas em culturas por longos períodos, apresentam uma maior produção de IFN γ e menor produção de IL-10 em macrófagos, o que se reflete em lesões menores nos camundongos infectados (Moreira *et al.*, 2012).

O reconhecimento de PS na superfície de amastigotas é fundamental para a infecção de macrófagos (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006)). Porém, a PS não participa do processo de internalização das amastigotas por células dendríticas, mas está relacionada com o processo de apresentação de antígeno, visto que após o bloqueio de PS durante a interação com o parasito, células dendríticas apresentam mais antígenos e são mais competentes em ativar linfócitos T CD4+ específicos contra o parasito (Wanderley *et al.*, 2013). Sendo assim, a PS na superfície de amastigotas é um forte candidato que contribui para supressão do sistema imune e a disseminação parasitária, visto a importância das células dendríticas na infecção e disseminação do parasito. Pouco se sabe sobre a participação do reconhecimento de PS na infecção de outras células envolvidas na infecção latente e na disseminação parasitária, como fibroblastos e neutrófilos.

O TGF β é a principal citocina estimulada pelo reconhecimento de PS na superfície de amastigotas e é capaz de modular o microambiente inflamatório proporcionando um local propício para proliferação do parasito. Esta citocina é encontrada em maiores níveis em pacientes com LCD (Balanco *et al.*, 2001).

A exposição de PS ocorre de forma diferenciada nas diversas manifestações clínicas, mesmo quando se trata da mesma espécie. Isolados de *L. amazonensis* obtidos de pacientes com LCD apresentam maior exposição de PS em comparação com pacientes com LC. Nos pacientes com LCD a exposição de PS nos parasitos têm uma correlação direta com a quantidade de lesões apresentadas e com o tempo de duração da doença, o que pode estar associado ao carácter de imunossupressão encontrados nas infecções de LCD (França-Costa *et al.*, 2012).

De maneira análoga, cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LC apresentam uma maior exposição de PS em suas membranas externas quando comparadas com as cepas isoladas de pacientes com LMC. Essa diferença, pode estar relacionada com o fato que as lesões LC se apresentam com lesões cutâneas menos agressivas para o tecido, devido a uma resposta inflamatória mais controlada, ao contrário das lesões de LMC, que ocorre uma intensa resposta inflamatória, com grande potencial para a destruição dos tecidos (Farias *et al.*, 2013).

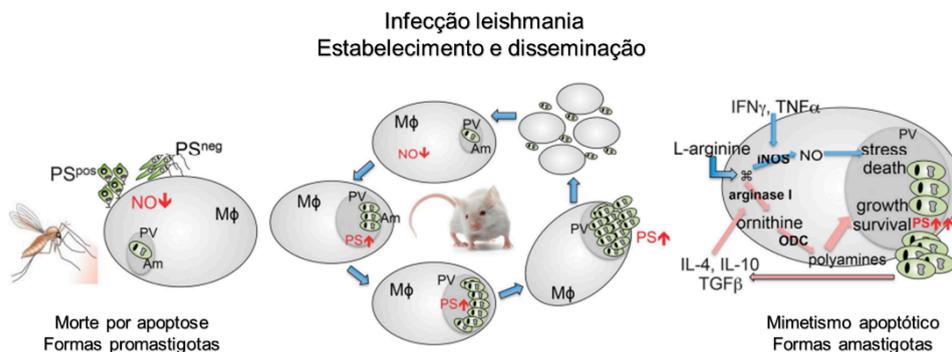


Figura 10 – Exposição de PS nas formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. As promastigotas morrem por apoptose, assim expõe PS, facilitando a infecção de macrófagos por promastigotas vivas. As formas amastigotas expressam PS constitutivamente, sem sinais de apoptose. O reconhecimento de PS pelos macrófagos induz a fagocitose do parasito e induz uma resposta anti-inflamatória, com produção de IL-10 e TGF β , facilitado a multiplicação dos parasitos, o estabelecimento e disseminação da infecção (Birge *et al.*, 2016)

3 – OBJETIVOS

Avaliar o papel da fosfatidilserina na disseminação e latência da infecção por *Leishmania amazonensis*.

3.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o índice de infecção e a modulação da resposta inflamatória em fibroblastos da linhagem NIH-3T3 infectados com as amastigotas tratadas com anticorpos anti-PS.
- Avaliar o índice de infecção e a modulação da resposta inflamatória em neutrófilos infectados com amastigotas e promastigotas tratadas com anticorpos anti-PS.
- Avaliar a carga parasitária de linfonodos, baço fígado e medula óssea de camundongos infectados tratados com anticorpos anti-PS, em modelo de infecção intravenosa.
- Identificar alterações na resposta inflamatória de camundongos tratados com anticorpos anti-PS, em modelo de infecção intravenosa.

4 - METODOLOGIA

4.1 – ANIMAIS

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas com 6 a 8 semanas de idade foram utilizados. Os animais foram obtidos dos biotérios da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Biotério Central - UENF) e da Fundação Oswaldo Cruz (ICTB). Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Polo IMCT com temperatura controlada (22 à 25°C), água e comida *ad libitum*.

O uso dos animais foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais de experimentação da UFRJ, Campus Macaé, sob o número MAC047.

4.2- PARASITOS

Foram utilizados parasitos da espécie *Leishmania amazonensis* da linhagem LV78 (MPRO/BR/72/M1845).

4.2.1 – Promastigotas

As formas promastigotas foram cultivadas em frasco para cultivo celular (12,5 cm² - KASVI) com meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB - GIBCO), 1% de L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1% antibióticos (1000 unidades / mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 1000 unidades/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich)), em incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D) a uma temperatura constante de 23°C. Os parasitos foram mantidos em cultura por até oito passagens *in vitro*, sendo que as passagens foram realizadas sempre ao atingir o final da fase logarítmica de crescimento. Para os experimentos, foram utilizadas promastigotas em fase estacionária, cultivadas por sete dias. Previamente aos experimentos, os parasitos foram avaliados quanto à viabilidade e à expressão de fosfatidilserina por meio da marcação com anexina V e iodeto de propídio (PI), semelhante ao item 4.2.3.

4.2.1.1 – Marcação de promastigotas com CFSE

As promastigotas foram contadas por câmara de Neubauer, separadas e submetidas a três lavagens consecutivas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, as células foram suspensas em solução com 5 µM de éster succinimidil de carboxifluoresceína (CFSE - Invitrogen), previamente diluída em PBS. As promastigotas foram incubadas à temperatura de 23°C, no escuro, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram submetidas à centrifugação a 1.600 xg por 10 minutos e, em seguida, ressuspensas em PBS. Adaptada (Smirlis *et al.*, 2006).

4.2.2 – Amastigotas

As formas amastigotas foram isoladas a partir das lesões em patas de camundongos BALB/c infectados pela linhagem de *L. amazonensis* citada previamente. Os animais foram infectados na pata com 1×10^6 de promastigotas ou amastigotas, aguardando-se a formação das lesões por no máximo 12 semanas. A purificação de amastigotas foi realizada mediante a homogeneização do tecido extraído das patas lesionadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), utilizando o homogeneizador de tecido de vidro tipo Potter. A solução resultante foi centrifugada a 50 g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado e submetido a centrifugação subsequente a 1750 g por 17 minutos à 4°C. O precipitado obtido foi ressuspendido em 10 mL de DMEM contendo 1% de antibiótico e submetido a três ciclos de centrifugação a 1750 g por 17 minutos a 4°C. Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuspendido em 10 mL de DMEM contendo 4% de SFB e 1% de antibiótico. Essa suspensão foi incubada por 2 horas a 34°C em tubos de centrifugação de fundo cônico, com agitação a 100 rpm. Após a incubação, as amastigotas foram centrifugadas a 1750 g por 17 minutos a 4°C, em dois ciclos consecutivos, e então incubadas em tubos de centrifugação de fundo cônico, durante a noite em DMEM contendo 4% de SFB e 1% antibióticos, a 34°C. Após esta etapa, as amastigotas foram submetidas a três ciclos de centrifugação a 1750 g por 17 minutos a 4°C. O precipitado final foi ressuspendido em 10 mL DMEM contendo 4% de SFB e 1% antibióticos e ao término a suspensão contendo as amastigotas estavam prontas para os usos subsequentes.

4.2.2.1 – Marcação de amastigotas com CFSE

As amastigotas previamente isoladas foram contadas e separadas conforme as demandas experimentais. Os parasitos foram submetidos à centrifugação e lavagem com PBS por três vezes. Em seguida, foram suspensos em uma solução com 5 μ M CFSE diluída em PBS. As amastigotas foram incubadas em microtubos de centrifugação à temperatura de 34°C, no escuro, por um período de 30 minutos. Após a incubação, as amastigotas foram centrifugadas a 1.600 xg por 10 minutos e ressuspensas em PBS. Após uma centrifugação adicional, as amastigotas foram ressuspensas em DMEM considerado completo. Adaptada (Smirlis *et al.*, 2006).

O DMEM completo é constituído de 10% SFB, 1% de piruvato de sódio (Sigma), 1% de L-glutamina (Sigma), 1% de antibiótico (1000 unidades/mL de penicilina - Sigma), 1000 unidades/mL de estreptomicina (Sigma) e 50 μ M de B-mercaptoetanol.

4.2.3 - Avaliação de exposição de PS com anexina V e iodeto de propídio

Os parasitos foram lavados com tampão de ligação de anexina (ABB) e incubados em microtubos de centrifugação com anexina V conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 34 Oregon, EUA) em 20 μ L de tampão ABB, por um período de 15 minutos, à temperatura ambiente e no escuro. Posteriormente, foi adicionado 0,7 μ g/ml de iodeto de propídio (PI - Sigma-Aldrich), um indicador de viabilidade. Os parasitos foram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur/ Cytex, N/S E3591). A análise foi feita utilizando software FlowJo CE (Cytex). O tampão ABB é preparado com 10 mM de sal de sódio de HEPES, 150 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 2,5 mM cloreto de cálcio bi-hidratado (CaCl₂ 2H₂O), em água ultra pura (Wanderley *et al.*, 2006).

4.3 – ANTICORPOS

Foram utilizados os anticorpos monoclonais IgG2 PNG632 anti-PS completo, denominado 11:31, ou a fração de ligação ao antígeno purificada, denominada Fab. Ambos os anticorpos são independentes da presença de β 2-glicoproteína para interagir com PS. Esses anticorpos foram doados pela empresa Peregrine Pharmaceuticals (MTA 27829). Como controle do bloqueio de PS *in vitro* foi utilizado

anexina V (BD) 1:10 diluída em tampão de ligação de ANX-V (ABB) e como controle não reagente, foi utilizado PBS.

Nos experimentos realizados *in vitro*, os anticorpos foram utilizados em concentrações de 5 µg/mL e incubados em microtubos de centrifugação por 30 minutos em temperatura de 4 - 8°C. Nos experimentos *in vivo*, a concentração dos anticorpos utilizados foi de 100 µg/ mL por camundongo.

4.4 – INFECÇÕES IN VITRO

4.4.1 - Fibroblastos NIH/3T3

Foram utilizados fibroblastos NIH/3T3, doados pelo professor André Cruz (UFRJ-Macaé). Os fibroblastos foram cultivados em frascos para cultivo celular (75 cm² - KASVI) com DMEM completo. As células eram mantidas em garrafas de culturas até alcançarem uma confluência de 80%, sendo cultivadas em estufas incubadoras de CO₂ a 37°C. Os repiques foram realizados a cada três dias, assegurando a renovação e multiplicação celular para atingir a quantidade desejada de células para os experimentos.

4.4.1.1 – Infecção em fibroblastos NIH 3T3 de amastigotas de Leishmania amazonensis previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

Foram semeadas 5x10⁴ células NIH/3T3 sobre lamínulas de 13 mm² em placas de 24 poços, contendo DMEM completo. As placas foram mantidas em incubadoras de CO₂ à 37° C por 12 horas para permitir a adesão das células. Após isto, o meio foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Os parasitos, obtidos conforme o item 3.2.2, foram incubados com os anticorpos conforme o item 3.3. Posteriormente, os parasitos foram centrifugados, ressuspensos em DMEM com 2% SFB, 1% de piruvato de sódio, 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico e 50 µM B-mercaptoetanol, e adicionados nos poços contendo as células. Após um período de 4 horas de infecções, todos os poços foram lavados com PBS.

Para as análises das infecções/adesão de 4 horas, os poços foram lavados com PBS e fixados com metanol. Nos casos das análises das infecções de 24 horas, após 4 horas de infecção, os parasitos foram removidos dos poços por meio de

sucessivas lavagens com PBS, em seguida, foi adicionado DMEM suplementado com 2% de SFB. Após 24 horas de infecção, os poços foram novamente lavados com PBS e fixados com metanol.

As células foram coradas utilizando o kit panóptico e montadas lâminas utilizando Entellan (MERCK). O índice de infecção foi calculado após a contagem de 300 células. Foi analisado a porcentagem de macrófagos infectados, número médio de amastigotas por fibroblastos infectados e a multiplicação desses 2 índices, conforme equação abaixo.

$$\left(\text{Índice de infectividade} = \left[\frac{\text{fibroblastos totais}}{\text{fibroblastos infectados}} \right] * \left[\frac{\text{amastigotas}}{\text{fibroblastos infectados}} \right] \right)$$

4.4.1.2 – Padronização da produção de óxido nítrico de fibroblastos NIH/3T3

Para avaliação da produção de NO, foram plaqueadas 1×10^4 células NIH/3T3 em placas de 96 poços fundo chato (Kasvi) contendo DMEM completo por 12 horas. Após a aderência foi realizada uma curva de ativação com LPS e IFN γ :

Tabela 2: Curva de ativação de NIH/3T3

LPS (ng/mL)	1	10	10	100	100	1000	1000	0	1	10	100	0	0	1000
IFN γ (ng/mL)	5	0,5	5	0,5	5	0,5	5	0	0	0	0	0,5	5	0

Adaptado (Español *et al.*, 2010)

Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após a ativação. A produção de óxido nítrico foi mensurada através do método de Griess. .

4.4.1.3 – Avaliação da produção de NO em NIH/3T3 após a infecção com amastigotas de *Leishmania amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

As células NIH/3T3 foram plaqueadas na densidade de 1×10^4 células/ poço, em placas de 96 poços e incubadas por 12 horas para adesão. Após a aderência, as células foram lavadas cuidadosamente com PBS e em seguida, foram incubadas com amastigotas previamente tratadas com PBS, anticorpo 11:31 e anticorpo Fab, como descrito no item 3.3. Após 4 horas de infecção, os poços foram lavados com

PBS para a remoção dos parasitos não internalizados, e as células foram estimuladas com LPS na concentração 1000 ng/mL e IFN γ na concentração de 5 ng/mL. Os sobrenadantes foram coletados 24 e 48 horas após o início da infecção. A produção de NO foi quantificada utilizando o método de Griess.

Na realização deste experimento, procedemos à análise de diferentes grupos de fibroblastos: (1) fibroblastos sem ativação e sem infecção; (2) fibroblastos ativados mas, não infectados; (3) fibroblastos ativados e infectados; (4) fibroblastos ativados e infectados com amastigotas previamente tratadas com 11:31; (5) fibroblastos ativados e infectados com amastigotas tratadas previamente com Fab e (6) fibroblastos ativados e infectados com amastigotas tratadas previamente com anexina.

4.4.2 – Neutrófilos

Foram utilizados neutrófilos derivados de cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Estes neutrófilos foram obtidos através da inoculação de 1 mL de tioglicolato 10% estéril no peritônio de camundongos e, após 18 horas, foi realizada lavagem abdominal utilizando PBS gelado (Abi Abdallah *et al.*, 2011). As células obtidas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e substituído por DMEM completo. A pureza das células foi analisada através da marcação com anticorpos anti - Ly6C/Ly6G, e analisada por citometria de fluxo (FACSCalibur/ Cytex, N/S E3591). A análise foi feita utilizando software FlowJo CE (Cytex). As células foram armazenadas em gelo até o momento de uso. Cada experimento foi realizado utilizando neutrófilos provenientes de dois camundongos.

4.4.2.1 – Infecção em neutrófilos com promastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS

Foram adicionados 2×10^6 de neutrófilos em placa de 96 poços com de fundo U (Kasvi). Previamente, para a infecção dos neutrófilos, as promastigotas foram marcadas com CFSE como descrito no item 3.2.1.1 e incubadas com os anticorpos PS e os respectivos controles conforme o item 3.3. Após o término da incubação, as promastigotas foram cuidadosamente lavadas e ressuspensas em DMEM completo e adicionadas em poços com neutrófilos. A incubação foi realizada em

estufa com 5% de CO₂ a 34°C, e a proporção utilizada na infecção foi de 10 promastigota para 1 neutrófilo.

Após 3 e 6 horas do início da infecção, as células foram lavadas com PBS contendo soro normal de camundongo (SNC), para o bloqueio da interação indesejadas. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos Ly6c/ly6g, sendo incubadas por 15 minutos entre 2 à 8°C (gelo). Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS contendo SNC e preparadas para a análise no citômetro de fluxo (FACSCalibur/ Cytex, N/S E3591) e os dados foram analisados pelo software FlowJo CE (Cytex).

4.4.2.2 – Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em neutrófilos infectados com promastigotas tratadas com anticorpos ANTI-PS

Foram adicionados 1×10^5 dos neutrófilos em placa de 96 poços com fundo formato de U (Kasvi). As promastigotas foram previamente tratadas com anticorpos anti-PS e os respectivos controles como descrito no item 3.3. Após o término da incubação, as promastigotas foram cuidadosamente lavadas e ressuspensas em DMEM completo e adicionadas em poços com neutrófilos. A incubação foi realizada em estufa com 5% de CO₂ a 34°C, e a proporção utilizada na infecção foi de 10 promastigota para 1 neutrófilo.

Após 2 e 5 horas da infecção, os neutrófilos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi ativado com 200 ng/mL de forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA), enquanto o outro permaneceu sem ativação. Uma hora após ativação, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi medida utilizando a sonda H2DCFDA (Sigma-Aldrich). Para esta medição, as células infectadas, tanto ativadas quanto as não ativadas, foram cuidadosamente lavadas três vezes com PBS e, em seguida, foram incubadas com 20 uM de H2DCFDA diluído em HBSS sem EDTA por 40 minutos a 37° C em estufa de CO₂. Após a incubação, as células foram analisadas no espectrofluorímetro (spectraMax 190) nos comprimentos de onda de excitação de 493 nm e emissão de 524 nm.

4.4.2.3 – Infecção em neutrófilos com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS

Foram adicionados 2×10^6 de neutrófilos em poços de placa de 96 poços com em formato de fundo U (Kasvi). Previamente para a infecção dos neutrófilos, as amastigotas foram marcadas com CFSE como descrito no item 3.2.2.1 e incubadas com os anticorpos PS e os respectivos controles conforme o item 3.3. Após o término da incubação, as amastigotas foram cuidadosamente lavadas e ressuspensas em DMEM completo e adicionadas nos poços com neutrófilos. A incubação foi realizada em estufa com 5% de CO₂ a 34°C, e a proporção utilizada na infecção foi de 5 amastigotas para 1 neutrófilo.

Após 3 e 6 horas do início da infecção, as células foram lavadas com PBS com SNC. Em seguida, as células foram marcadas com os anticorpos Ly6c/Ly6g, sendo incubadas por 15 minutos entre 2 à 8°C (gelo). Após o período de incubação, as células foram lavadas com PBS contendo SNC e preparadas para a análise no citômetro de fluxo (FACSCalibur/ Cytex, N/S E3591) e os dados foram analisados pelo software FlowJo CE (Cytex).

4.4.2.4 – Avaliação de produção de espécies oxidativas em neutrófilos infectados com amastigotas tratadas com anticorpos anti-PS

Foram plaqueados 1×10^5 de neutrófilos, obtidos previamente como no item 3.4, em placa de 96 fundo U (Kasvi). As amastigotas foram previamente tratadas com citado no item 3.3, após a incubação foram lavadas, ressuspensas em DMEM completo e incubadas com os neutrófilos em estufa de CO₂ a 34°C. A proporção utilizada para infecção foi de 5 amastigotas para 1 neutrófilo.

Após 2 e 5 horas da infecção, os neutrófilos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles foi ativado com 200 ng/mL de forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA), enquanto o outro permaneceu sem ativação. Uma hora após ativação, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi medida utilizando a sonda H₂DCFDA (Sigma-Aldrich). Para esta medição, as células infectadas, tanto ativadas quanto as não ativadas, foram cuidadosamente lavadas três vezes com PBS e, em seguida, foram incubadas com 20 µM de H₂DCFDA diluído em HBSS sem EDTA por 40 minutos a 37° C em estufa de CO₂. Após a incubação, as células foram

analisadas no espectrofluorímetro (spectraMax 190) nos comprimentos de onda de excitação de 493 nm e emissão de 524 nm.

4.3 – INFECÇÃO IN VIVO

4.3.1 – Padronização da infecção intravenosa com *Leishmania amazonensis*.

Camundongos BALB/c foram infectados via intravenosa com 1×10^6 amastigotas. Os animais foram eutanasiados 3 animais semanalmente durante 12 semanas, período no qual o peso dos baços e fígados foi avaliado em balança analítica. Além disso, foram avaliadas a carga parasitária por meio do ensaio de diluição limitante (*limiting dilution assay* - LDA) nos órgãos baço, fígado, medula óssea e linfonodos mesentéricos e inguinais. Foram utilizados 36 animais no total.

4.3.2 - Avaliação da carga parasitária em infecções intravenosa com *Leishmania amazonensis*.

Para determinar a carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos inguinais e mesentéricos, realizamos o ensaio de LDA. Inicialmente, os órgãos foram macerados em filtro (70 μ m), e as suspensões celulares foram ajustadas para o volume de 5 mL para o baço, 10 mL para o fígado e 2 mL para os linfonodos. A medula óssea foi obtida através da lavagem dos ossos fêmur e tíbia com meio Schneider, sendo as amostras ajustadas para o volume de 10 mL de meio Schneider.

No ensaio LDA, as amostras foram diluídas na proporção de 1:10. Deste modo, as amostras de todos os órgãos foram distribuídas em duplicatas em placas de 96 poços estéreis (Kasvi), com 330 μ L de suspensão celular em cada poço. Em seguida, adicionamos 270 μ L de meio Schneider nos poços adjacentes e transferimos 30 μ L de suspensão celular inicial para o próximo poço, e de maneira contínua para os demais, em uma sequência de 8 poços consecutivos. Todas as placas foram analisadas durante 15 dias de cultura. Ao final desse período, a avaliação foi realizada por meio de microscópio invertido, identificando o último poço com leishmania viva. Os resultados foram expressos por média do logaritmo do título de parasitos. Adaptado de (GHOTLOO *et al.*, 2015)

4.3.3 – Infecção intravenosa e tratamento com anticorpo anti-PS

Camundongos BALB/c foram intravenosamente infectados com 1×10^6 de amastigotas, que foram previamente tratadas com anticorpos anti-PS e controle, conforme citado no 3.6. Na quarta semana após a infecção, os camundongos foram submetidos aos tratamentos correspondentes aos que as amastigotas receberam: PBS (controle), anticorpo 11:31 e anticorpo Fab. A administração do tratamento foi feita via peritoneal, ao longo de três semanas. Na 12^a semana pós-infecção, os camundongos foram eutanasiados. Para analisarmos a infecção, avaliamos a carga parasitária dos órgãos baço, fígado, medula óssea e linfonodos mesentéricos e inguinais. Além disso, investigamos a produção intracelular de citocinas e a produção de óxido nítrico de células esplênicas. Também analisamos a distribuição e tamanho de lesões nos camundongos. A amostra experimental final de cada grupo de tratamento consistiu em 10 animais.

4.3.3.1 – Cultura de esplenócitos

Os baços derivados dos camundongos infectados intravenosamente, foram fragmentados e incubados em solução de colagenase (1 mg/mL), DNase (100 ug/mL) e dispase (0,6 U/ mL) por 30 minutos a 37°C. Em seguida, as soluções celulares foram passadas por seringas 21 g para desagregar as células. As células foram então centrifugadas a 600g por 10 minutos, ressuspensas em PBS e novamente centrifugadas. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 2 mL de tampão de lise de cloreto de amônio e potássio (ACK) e foram homogeneizadas, foi adicionado 2 mL de DMEM completo antes de serem centrifugadas novamente. As células foram contadas e separadas para uso posterior. Adaptado de (Hoffmann *et al.*, 2009)

4.3.3.2 – Avaliação da expressão de citocinas intracelulares de esplenócitos

Para a quantificação de citocinas intracelulares, as células esplênicas previamente preparadas foram cultivadas na presença ou ausência de 50 µg/mL de antígeno solúvel de leishmania (SLA) obtido pelo método de congelamento e descongelamento repetidamente (REF). As células foram colocadas em placas de

96 poços de fundo em forma de U (Kasvi), com uma concentração de $4,37 \times 10^6$ células por poço e incubadas por 72 horas em 37°C , sob atmosfera com 5% de CO_2 . Faltando 4 horas para o fim da incubação, o coquetel de ativação de leucócitos com BD GolgiPlug™ (BD biosciences) foi adicionado aos poços, que foram mantidos em incubação por mais 4 horas.

Após o término da incubação, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 700 g, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em PBS. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente, e o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspense em tampão fix-perm (Saponina 0,1% p/v) e incubado por 15 minutos. Depois disso, as células foram centrifugadas novamente e o pellet foi ressuspense em tampão perm-wash (PBS + saponina 0,1% + 2% de SNC), mantendo as células em incubação por 15 minutos. Em seguida, as células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em soluções com anticorpos conforme os painéis da tabela 2, mantendo-as em incubação por 30 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com perm-wash, ressuspendidas em PBS e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur/ Cytex, N/S E3591). A análise foi feita utilizando software FlowJo CE (Cytex). Adaptado de (Bottrel *et al.*, 2001)

Tabela 3 – Anticorpos utilizados na avaliação de citocinas intracelulares

Painel	Anticorpos
1	CD3 FITC; CD4 PerCP; IL-4 PEcy7; IL-10 PE
2	CD3 FITC; CD4 PE; TGF β PerCP-Cy5.5; TNF α APC
3	CD11b PE; TNF α FITC

4.3.3.4 – Avaliação da produção de óxido nítrico de esplenócitos

Para a dosagem de óxido nítrico, as células esplênicas foram adicionadas na concentração de 1×10^6 células por poço, em placas de 96 poços de fundo em forma de U (Kasvi) e incubadas por 72 horas a 37°C , sob atmosfera com 5% de CO_2 . Após a incubação, as células foram centrifugadas a 700 xg por 5 minutos, e o

sobrenadante foi coletado. A produção de óxido nítrico foi analisada através do método de Griess.

4.3.3.5 – Análise das distribuições e tamanhos das lesões

Após a eutanásia dos animais, realizou-se uma avaliação macroscópica da distribuição das lesões e seus respectivos tamanhos. A distribuição das lesões foi classificada de acordo com a localização das lesões aparentes, conforme descrito na tabela 3, enquanto os tamanhos das lesões foram classificados conforme indicado na tabela 4.

Tabela 4 – Escore de distribuição das lesões

Distribuição	Score
Sem úlcera aparente	0
Uma úlcera aparente	1
Duas úlceras aparentes	2
Úlceras na polpa da cauda	2

Tabela 5 – Escore dos tamanho das lesões

Tamanho da úlcera	Score
Sem úlcera aparente	0
Úlcera pequena	1
Úlcera média	2
Úlcera grande	3

4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão representados como média e desvio padrão (SD). A normalidade dos dados foi avaliada utilizando o teste de Shapiro – Wilk. Quando os dados seguiam uma distribuição normal, foram realizadas análises de variância two-way Anova, seguida pelo teste de Tukey para comparação múltipla. Nos casos em que os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste teste de Kruskal-wallis. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

Todas as análises foram feitas no software GraphPad-Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

5 - RESULTADOS

5.1 – AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EM FIBROBLASTOS NIH/3T3 COM AMASTIGOTAS PS- BLOQUEADAS.

Os fibroblastos desempenham um papel importante na latência e disseminação de *L. amazonensis*. Neste trabalho, investigamos a influência da PS na infecção de fibroblastos NIH/373. Para isso, inicialmente, avaliamos a expressão de PS nas formas amastigotas. Em seguida, infectamos as células NIH/3T3 aderentes em lamínulas e as incubamos por um período de 24 horas. Após o tempo de incubação, as células foram fixadas e coradas e, posteriormente, o índice de infecção foi avaliado.

5.1.1- Exposição de fosfatidilserina em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c

Um dos fatores de patogenicidade das amastigotas de *L. amazonensis* é a exposição de PS em sua superfície (Balanco *et al.*, 2001). Para confirmar a exposição de PS nas formas amastigotas de *L. amazonensis*, utilizamos amastigotas de lesões de camundongos BALB/c. A exposição de PS foi avaliada por marcação com anexina V (ANX) e iodeto de propídio (PI) utilizando citometria de fluxo. A ANX apresenta alta afinidade por fosfatidilserina na presença de cálcio, enquanto que PI se liga às moléculas de DNA, desde que haja permeabilidade na membrana celular. Os parâmetros de dispersão de luz para frente (FSC) e dispersão lateral (SSC) foram utilizados para selecionar a população de amastigotas viáveis (Figura 11A). Eventos localizados fora da área de seleção (gate) foram excluídos e correspondiam a outros componentes presentes nas lesões, como hemácias, células mortas e debris celulares. Dentro do gate de amastigotas, os parâmetros de fluorescência FL1 e FL2 foram analisados (Figura 11B). Observamos que em média 80% das células apresentaram marcação positiva para ANX e negativa para PI, confirmando que as formas amastigotas predominantemente expõem PS em sua superfície.

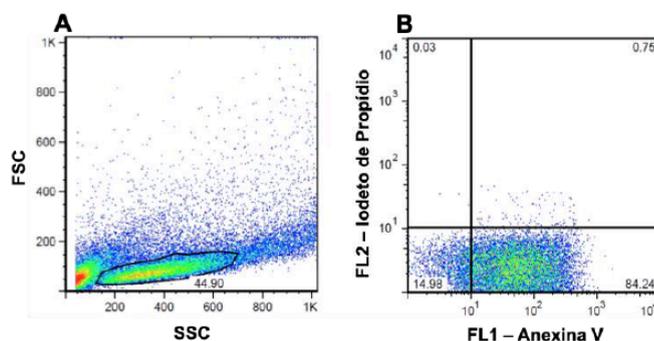


Figura 11 - Exposição de fosfatidilserina em amastigotas extraídas de lesões de camundongos BALB/c. Amastigotas, extraídas de lesões de camundongos BALB/c infectados, foram purificadas e analisadas por citometria de fluxo. (A) As células extraídas foram analisadas quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), com uma população característica de amastigotas viáveis identificada pelo *gate*. (B) A exposição de PS foi avaliada usando ANX conjugada com Alexa Flúor 488 (FL1) e a permeabilidade celular com o iodeto de propídio (FL2), na população do *gate* (amostra representativa). FSC - (*Forward Scatter*) tamanho. SSC - (*Side Scatter*) granulosidade FL1 – canal de fluorescência 1. FL2 – canal de fluorescência 2.

5.1.2 – Avaliação da infecção em fibroblastos NIH/3T3 com amastigota de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

A PS é importante para as infecções de macrófagos (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006), porém pouco se sabe sobre a sua relação com a infecção de fibroblastos. Para isso, bloqueamos a exposição da PS nas formas amastigotas de *L. amazonensis*, isoladas de camundongos BALB/c, e procedemos a infecção de fibroblastos NIH/3T3.

Os fibroblastos foram infectados com amastigotas previamente tratadas com anticorpo 11:31, 11:31 Fab e anexina. Posteriormente, analisamos o índice de infecção após 24 horas. Observamos uma redução significativa no índice de infectividade após 24 horas de infecção em todos os tratamentos, 11:31, 11:31 Fab e ANX, em comparação com as amastigotas sem bloqueio de PS. Não encontramos diferenças estatísticas entre os tratamentos (Figura 12).

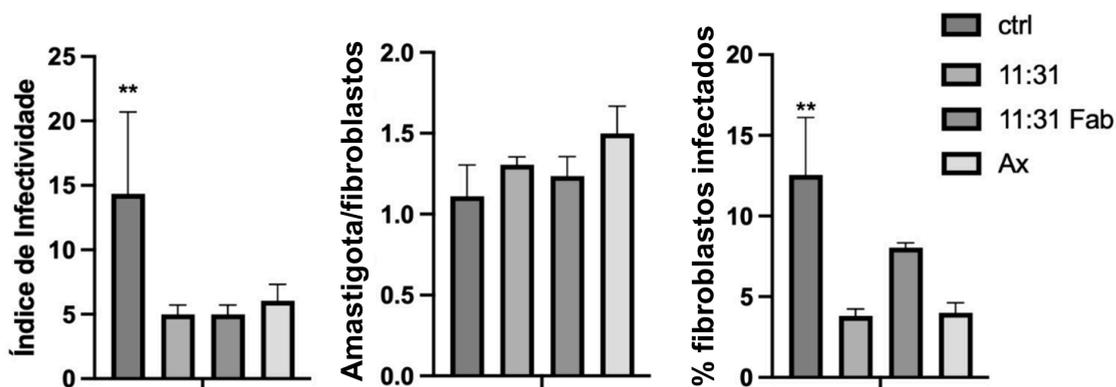


Figura 12 – Infecção de fibroblasto NIH/3T3 com amastigotas tratadas com anticorpos anti-PS. Os fibroblastos NIH/3T3 foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* isoladas de camundongos na proporção de 1:30 e previamente tratadas com anticorpos 11:31 ou Fab na concentração de 5 µg/mL. O índice de infectividade foi observado em culturas com 24 horas após a infecção. Foram utilizados como controle negativo PBS e como controle positivo do bloqueio de fosfatidilserina anexina V (ANX). A porcentagem de fibroblastos infectados e o número de amastigotas intracelulares foram determinadas por microscopia ótica contando 300 células. O índice de infectividade foi obtido através do produto entre o percentual de fibroblasto infectados pelo número médio de amastigotas por fibroblasto. * $p= 0,05$: comparação com o índice de infectividade de macrófagos infectados com amastigotas tratadas com PBS em culturas de 24h após a infecção.

O índice de infectividade, calculado como o produto da porcentagem de fibroblastos infectados pela média do número de amastigotas por fibroblasto, foi o ponto de partida para nossa análise. No entanto, reconhecemos que tanto a porcentagem de fibroblastos infectados quanto o número médio de amastigotas por fibroblasto poderiam influenciar essa avaliação. Para uma compreensão mais detalhada dos fatores associados à redução do índice, examinamos esses componentes separadamente.

Nossos resultados demonstraram que não houve alteração na média de amastigotas por fibroblastos em todos os tratamentos avaliados (Figura 12). Entretanto, observamos uma redução significativa na porcentagem de fibroblastos infectados nos tratamentos 11:31, 11:31 fab e ANX, quando comparados com o tratamento com PBS.

5.1.3 – Avaliação da produção de óxido nítrico por fibroblastos NIH/3T3 após infecção por amastigota de *Leishmania amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

A produção de óxido nítrico é o principal mecanismo leishmanicida dos macrófagos (MAUËL, 1996). Os fibroblastos são uma das células mais abundantes na derme e são capazes de expressar NOS2 e NOS3. Considerando a importância do NO na eliminação da leishmania e a capacidade dos fibroblastos de produzi-los, examinamos a modulação da produção de NO pelos fibroblastos NIH/3T3 após a infecção com amastigotas de *L. amazonensis*. Para isso, realizamos um teste de ativação das células com LPS e IFN γ , no qual estabelecemos uma curva de ativação. Observamos que a concentração ideal para induzir uma maior produção de NO foi de 1000 ng/mL de LPS e 5 ng/ml de IFN γ (Figura 13).

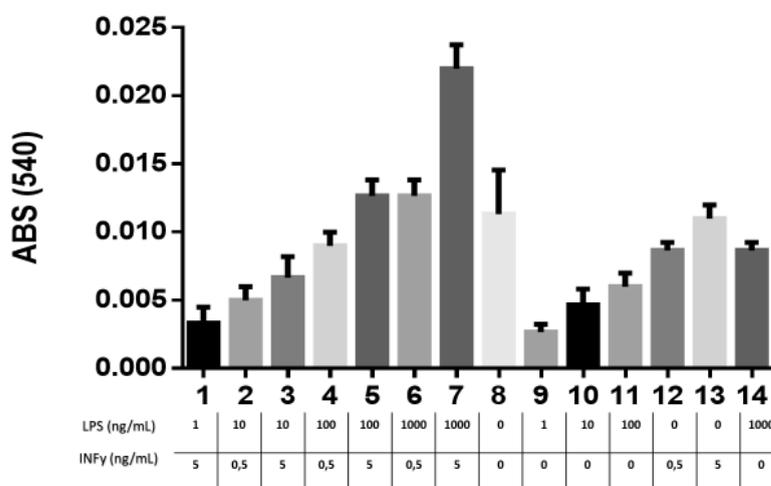


Figura 13 – Produção de óxido nítrico por NIH/3T3. Os fibroblastos NIH/3T3 foram ativados com diferentes concentrações de LPS e IFN γ e deixados em incubação por 48 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi analisada pelo método de Griess.

5.1.4 – Avaliação da produção de óxido nítrico por fibroblastos NIH/3T3 após infecção por amastigota de *L. amazonensis* PS-bloqueada

Após estabelecermos a concentração ideal dos ativadores, infectamos fibroblastos com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS e os

respectivos controles. Após 4 horas de infecção, realizamos lavagem dos poços para remover os parasitos não internalizados e adicionamos a solução de ativação. Deixamos as células incubadas por 24 e 48 horas. Após esse período, coletamos os sobrenadantes e analisamos a produção de NO pelo método de Griess.

Nos experimentos de infecção de 24 horas, não encontramos alterações significativas na produção de NO. No entanto, notamos uma tendência de aumento da produção de NO nos fibroblastos ativados, em comparação com os não ativados. Houve uma tendência de redução da produção de NO nos fibroblastos ativados e infectados. Observamos uma tendência de aumento na produção de NO por fibroblastos infectados com parasitos tratados com o anticorpo 11:31 em comparação com os outros tratamentos (Figura 14A).

Já nas infecções de 48 horas, observamos que a anexina induziu uma produção significativamente maior de NO em comparação com os fibroblastos não ativados e os fibroblastos ativados e infectados. Além disso, notamos que o tratamento com o Fab resultou em uma produção reduzida de NO, semelhante ao grupo controle não ativado e ao grupo ativados e infectados. Essa produção inferior levou a uma diferença estatisticamente significativa em relação à produção de NO induzida pela anexina. No grupo tratado com 11:31, observamos uma tendência de aumento na produção de NO, em comparação com os fibroblastos não ativados e os ativados e infectados (Figura 14B).

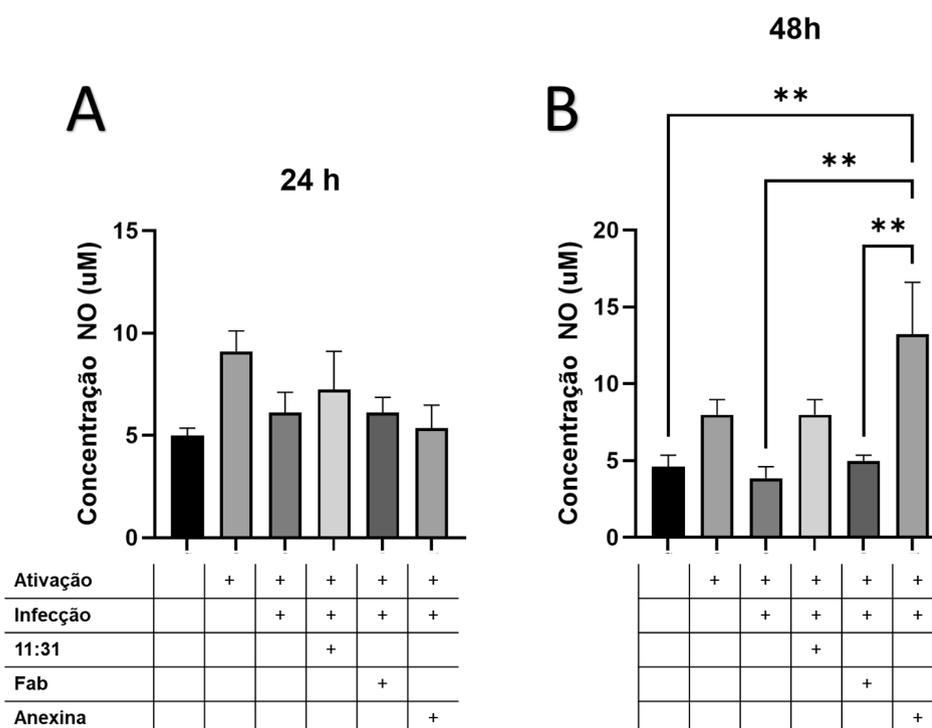


Figura 14 – Produção de óxido nítrico por NIH/3T3 após infecção com amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. Os fibroblastos NIH/3T3 foram infectados com amastigotas previamente tratadas com anticorpos 11:31 e Fab na concentração de 5 µg/mL ou ANX. Após 4 horas as células foram ativadas com 1000 ng/mL de LPS e 5 ng/ml de IFN γ e deixados em incubação por 24 (A) e 48 horas (B). O sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi analisada pelo método de Griess.

5.2 – INFECÇÃO EM NEUTRÓFILOS COM AMASTIGOTAS E PROMASTIGOTAS PREVIAMENTE TRATADAS COM ANTICORPO ANTI-PS

Os neutrófilos são as primeiras células a interagirem com as promastigotas e desempenham um papel importante na resposta imunológica contra o parasito. Para avaliarmos a participação de PS na infecção de neutrófilos, realizamos a infecção de neutrófilos peritoneais com promastigotas e amastigotas que foram previamente tratadas com anticorpos anti-PS e, em seguida avaliamos a modulação da expressão de espécies reativas de oxigênio.

5.2.1 - Exposição de fosfatidilserina de promastigotas mantidas em cultura *in vitro*.

A exposição de fosfatidilserina é um fenômeno importante associado à patogenicidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*, conforme relatado por Wanderley e col. (2009). Para confirmar a presença dessa exposição, as promastigotas foram cultivadas *in vitro* por um período de 7 dias. Em seguida, foi realizada a marcação das células com anexina V (ANX) e iodeto de propídio (PI), seguida de análise por citometria de fluxo. No gate específico de promastigotas, os parâmetros de fluorescência FL1 e FL2 foram avaliados. A média das células com sinal positivo para ANX (FL2) e negativo para PI (FL1) confirmou a presença de fosfatidilserina exposta nas promastigotas (Figura 15B).

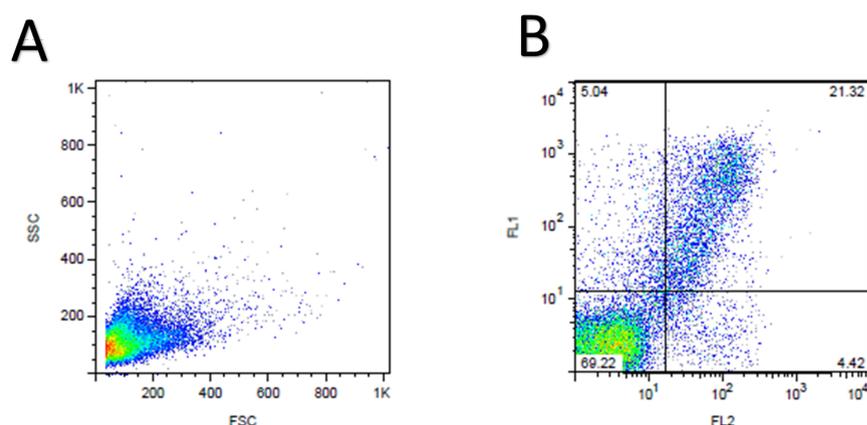


Figura 15 - Exposição de PS em promastigotas mantidas em cultura *in vitro*.

Promastigotas mantidas em cultura *in vitro* por 7 dias foram analisadas por citometria de fluxo. (A) As células extraídas foram analisadas quanto ao tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (B) A exposição de PS foi avaliada com usando ANX conjugada com Alexa Fluor 488 (FL1) e a permeabilidade celular com o iodeto de propídio (FL2), na população do gate (amostra representativa). FSC - (Forward Scatter) tamanho. SSC - (Side Scatter) granulosidade FL1 – canal de fluorescência 1. FL2 – canal de fluorescência 2.

5.2.2 – Infecção de neutrófilos peritoneais com promastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

Neutrófilos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis*. As promastigotas foram previamente marcadas com CFSE e tratadas com anticorpo 11:31, Fab ou ANX. Em seguida, as promastigotas foram incubadas com os neutrófilos por períodos de 3 e 6 horas. Os neutrófilos foram identificados através da marcação com o anticorpo Ly6c/Ly6g. Para determinar as células infectadas, foram

consideradas as células que apresentavam fluorescência positiva nos canais FL4 (Ly6c/Ly6g) e FL1 (CFSE) (Figura 16).

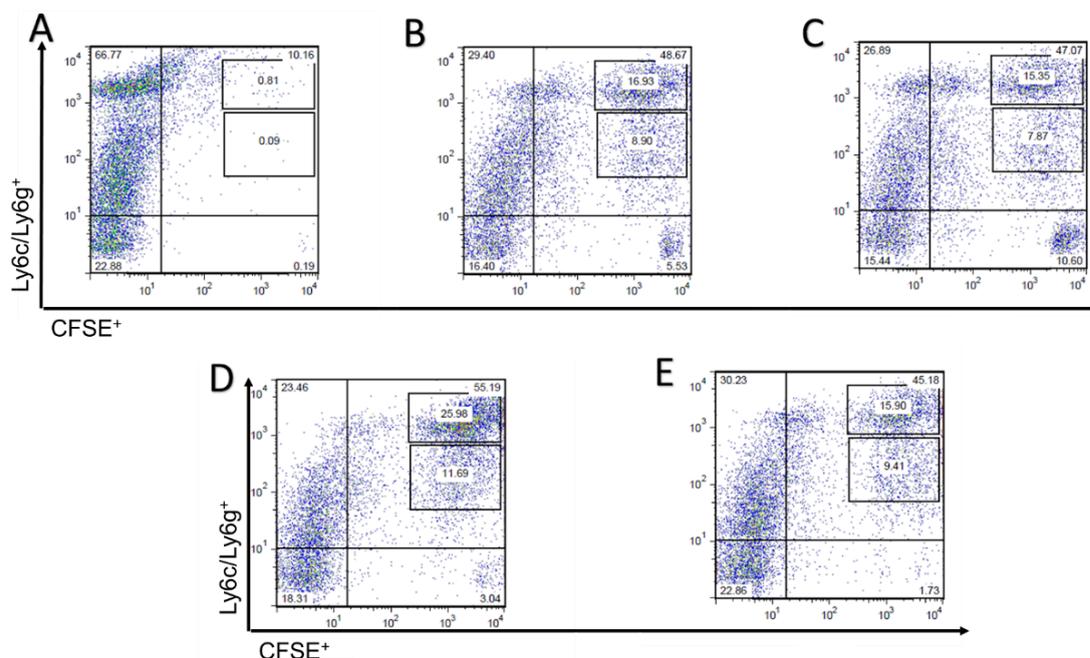


Figura 16 - Avaliação da infecção em neutrófilos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. O percentual de neutrófilos infectados está demonstrado no quadrante superior direito, referente às células CFSE e Ly6C/Ly6g duplo positivas. (A) neutrófilos não infectados; (B) neutrófilos infectados; (C) neutrófilos infectados com promastigotas previamente tratadas com anticorpo 11:31; (D) neutrófilos infectados com promastigotas previamente tratadas com anticorpo Fab; (E) neutrófilos infectados com promastigotas previamente tratadas com ANX.

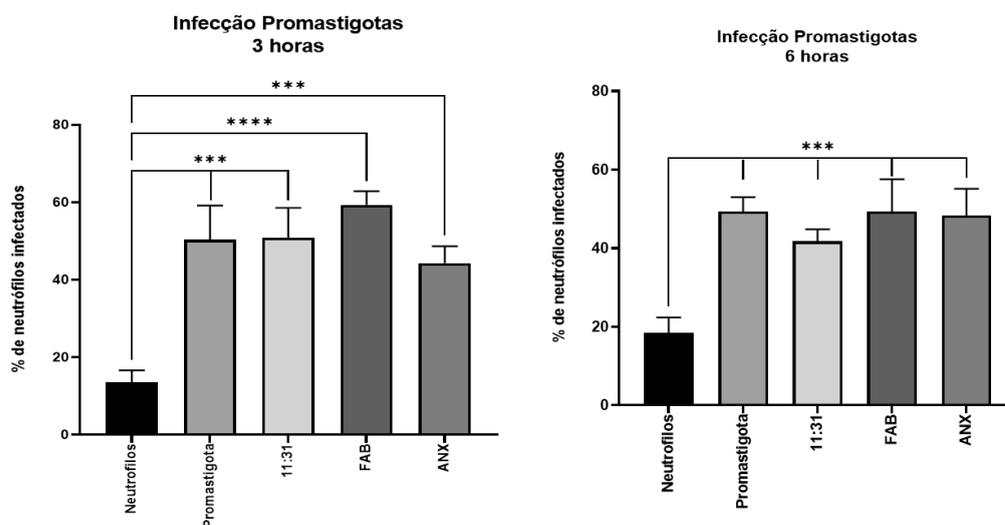


Figura 17– Infecção de neutrófilos peritoneais infectados por promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. Os neutrófilos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-fosfatidilserina (11:31) e a porção Fab purificada (Fab) na concentração de 5 µg/mL e, com anexina V (ANX). A análise das infecções nos neutrófilos foi realizada após 3 e 6, utilizando citometria de fluxo. Os valores são apresentados como média das porcentagens de células FL1+/FL4+. Foram realizados três experimentos, cada um contendo três triplicatas.***p<0,001; ****p<0,0001 pela comparação entre os grupos não infectados e infectados.

Durante os dois períodos de infecção analisados, os neutrófilos mostraram-se suscetíveis à infecção. No entanto, é importante observar que os tratamentos com anticorpos anti-PS e anexina V não demonstraram capacidade de alterar o índice de infecção em nenhum dos tempos avaliados. Este resultado indica que, apesar da suscetibilidade dos neutrófilos à infecção por promastigotas de *L. amazonensis*, a exposição a esses tratamentos específicos não teve impacto na capacidade de infecção das células (Figura 17).

5.2.3 – Produção de espécies reativas de oxigênio em infecções de neutrófilos peritoneais com promastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) desempenha um papel significativo no controle da infecção por *Leishmania*. As EROs têm a capacidade de afetar a sobrevivência e replicação dos parasitos, pois estão relacionadas com a atividade microbicida dos neutrófilos. Avaliamos a produção de EROs em neutrófilos peritoneais derivados de camundongos BALB/c, infectados com promastigotas de *L.*

amazonensis que foram previamente tratadas com anticorpos 11:31 e a porção Fab, utilizando promastigotas tratadas com PBS como controle negativo e promastigotas tratadas com ANX como controle positivo. Após 3 e 6 horas de infecção, os neutrófilos foram ativados com PMA e a produção de EROs foi quantificada usando a sonda H2DCFDA na avaliação por fluorimetria.

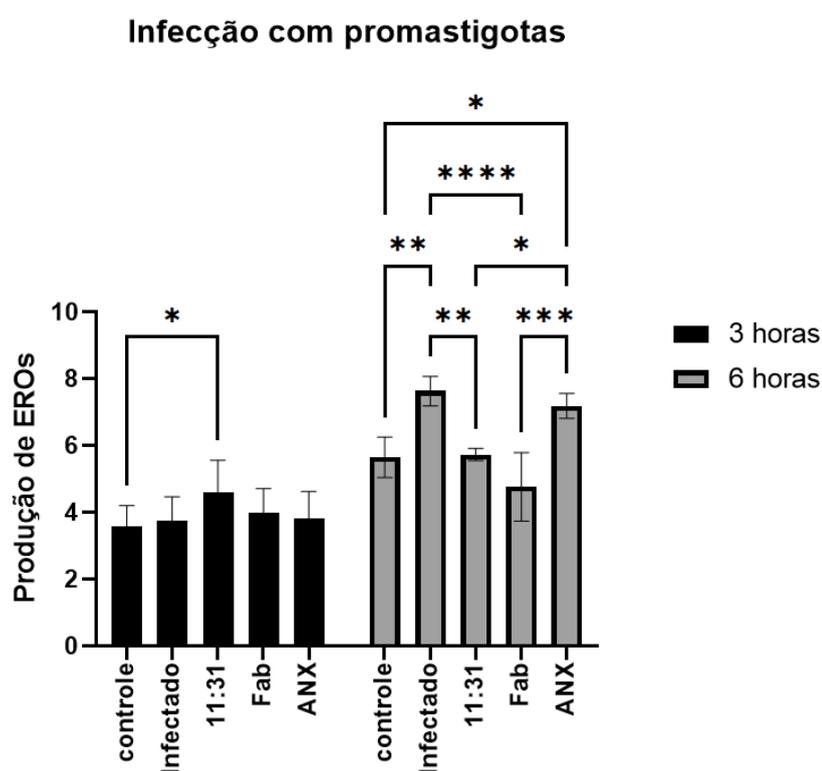


Figura 18 - Produção de EROs por neutrófilos infectados com promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. Neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS 11:31 ou Fab na concentração de 5 µg/mL e, com anexina V (ANX). A produção de EROs neutrófilos foi observada após 3 e 6 h, através da sonda H2DCFDA. Foram realizados três experimentos, cada um contendo três triplicatas. * $p < 0.05$.

Observamos padrões distintos na produção de EROs em neutrófilos infectados após diferentes períodos de incubação e tratamentos específicos. Nas infecções por 3 horas, notamos um aumento significativo na produção de EROs em neutrófilos infectados tratados com o anticorpo 11:31, em comparação com neutrófilos ativados mas não infectados. Essa diferença não foi encontrada nos outros tratamentos. No entanto, após 6 horas de infecção, observamos um aumento da produção de EROs

em neutrófilos infectados e em neutrófilos infectados com amastigotas tratadas com anexina. Os neutrófilos infectados com amastigotas tratadas com anticorpos 11:31 e Fab apresentaram uma redução da produção de EROs quando comparado com os neutrófilos infectados e os infectados com amastigotas tratadas com anexina (Figura 18).

5.2.4 – Infecção de neutrófilos peritoneais com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

Neutrófilos peritoneais foram infectados por amastigotas de *L. amazonensis*, extraídas de lesões de BALB/c. As amastigotas foram previamente marcadas com CFSE e tratadas com anticorpo 11:31, Fab ou anexina V. Em seguida, as amastigotas foram incubadas com os neutrófilos por períodos de 3 e 6 horas. Os neutrófilos foram identificados através da marcação com o anticorpo Ly6c/Ly6g. Para determinar as células infectadas, foram consideradas as células que apresentavam fluorescência Ly6C/Ly6g positiva e CFSE positiva (Figura 19).

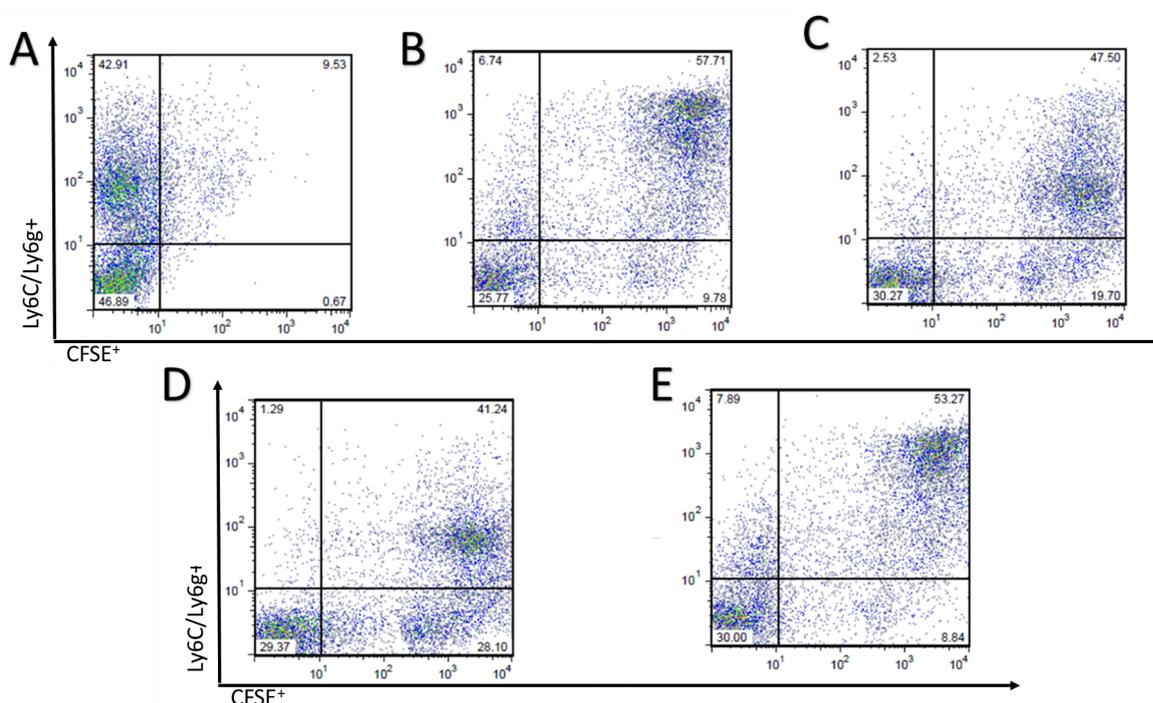


Figura 19 - Dot plot da avaliação da infecção em neutrófilos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. O percentual de neutrófilos infectados está demonstrado no quadrante superior direito, referente às células CFSE e Ly6C/Ly6g duplo positivas. (A) neutrófilos não infectados; (B) neutrófilos infectados; (C) neutrófilos infectados com amastigotas previamente tratadas com anticorpo 11:31; (D)

neutrófilos infectados com amastigotas previamente tratadas anticorpo Fab; (E) neutrófilos infectados com amastigotas previamente tratadas com ANX.

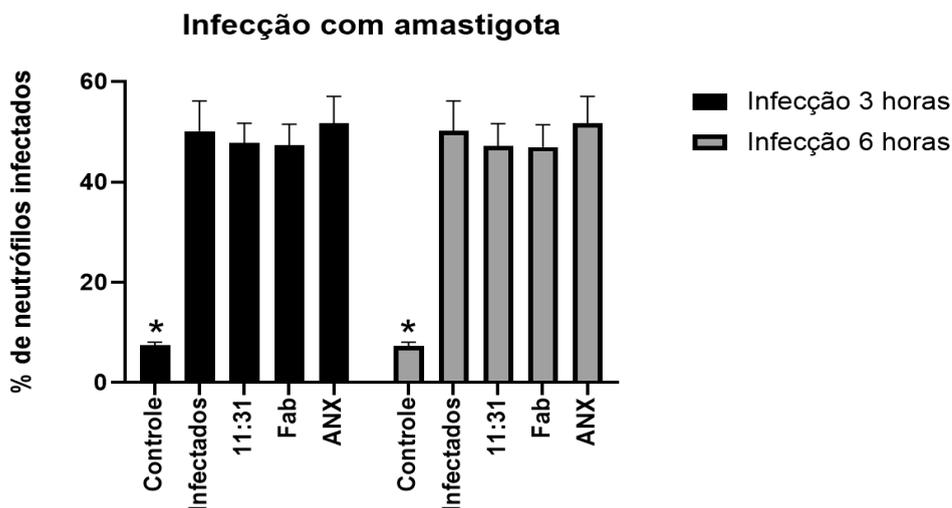


Figura 20– Infecção de neutrófilos peritoneais infectados por amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. Neutrófilos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS, 11:31 ou Fab na concentração de 5 µg/mL ou, com anexina V (ANX). A avaliação das infecções nos neutrófilos foi realizada após 3 e 6 h, utilizando citometria de fluxo. Os valores são apresentados como média das porcentagens de células FL1+/FL4+. Foram realizados três experimentos, cada um contendo três triplicatas. * $p < 0,05$ pela comparação entre os grupo não infectado e infectados.

Os neutrófilos peritoneais de camundongos BALB/c demonstraram serem suscetíveis à infecção por amastigotas de *L. amazonensis* em 3 e 6 horas. No entanto, os tratamentos com anticorpos anti-PS e anexina V não foram capazes de modificar o índice de infectividade em nenhum dos tempos avaliados (Figura 20).

3.2.5 – Produção de espécies reativas de oxigênio em infecções de neutrófilos peritoneais com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS.

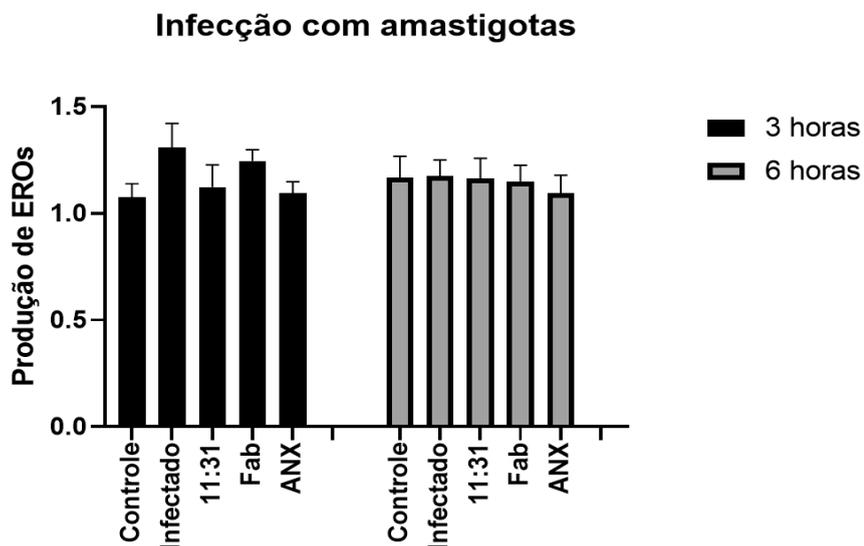


Figura 21 - Produção de EROs de neutrófilos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* tratadas com anticorpos anti-PS. Neutrófilos peritoneais extraídos de camundongos BALB/c foram infectados com amastigotas de *L. amazonensis* previamente tratadas com anticorpos anti-PS, 11:31 ou Fab na concentração de 5 µg/mL ou, com anexina V (ANX). A produção de EROs neutrófilos foi realizada após 3 e 6 h, através da sonda H2DCFDA. Foram realizados três experimentos, cada um contendo três triplicatas.

Ao investigar a produção de EROs durante a infecção por amastigotas, observamos que, após 3 horas de infecção, houve uma tendência de indução na produção de EROs nos neutrófilos infectados e uma tendência de redução com anticorpos anti-PS e ANX, embora essa redução também não tenha sido estatisticamente significativa (Figura 21).

Em relação à infecção de 6 horas, não identificamos diferenças significativas na produção de EROs entre os neutrófilos não infectados e os infectados com amastigotas sem tratamento ou com as amastigotas previamente tratadas com os anticorpos anti-PS e ANX. Isso indica que, nesse ponto de tempo, os tratamentos aplicados às amastigotas não influenciaram de forma marcante a produção de EROs pelos neutrófilos (Figura 21).

5.3– PADRONIZAÇÃO DA INFECÇÃO DISSEMINADA COM *L. amazonensis*

A grande maioria dos trabalhos realizados com *L. amazonensis* utilizam modelos experimentais com infecções intradérmicas, direcionados para avaliação com LC, porém sabe-se que existem outras manifestações relacionadas com a espécie que são dependentes da disseminação do parasito. Para avaliarmos a disseminação da *L. amazonensis* e validar o modelo experimental, infectamos camundongos BALB/c via intravenosa (IV) com amastigotas. Após a infecção, os animais foram eutanasiados semanalmente e avaliados o peso dos baços e fígado e carga parasitária da medula óssea, baço, fígado e linfonodos inguinais e mesentéricos (LIM).

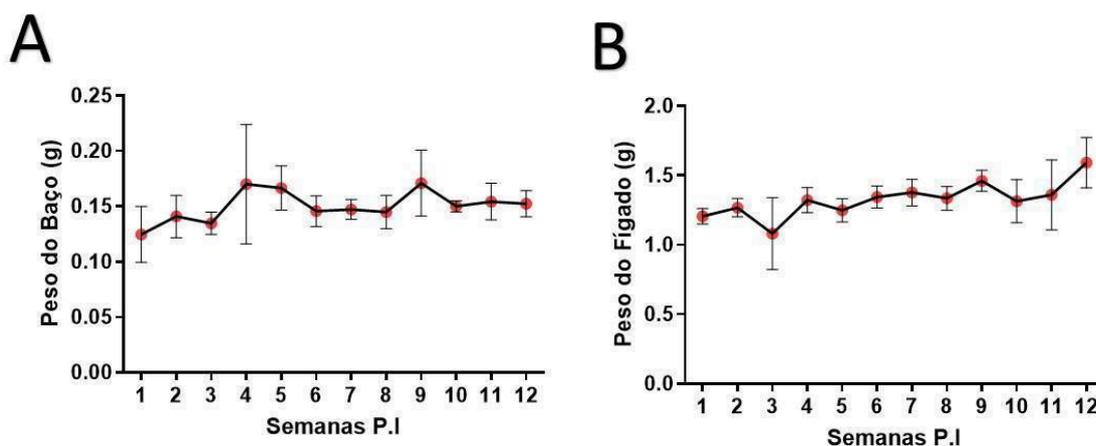


Figura 22 - Peso do baço e fígado de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas em 100 μ L de PBS. Semanalmente foram eutanasiados dois camundongos por semana e avaliados o peso do baço (a) e fígado (B).

Durante o decorrer das semanas de infecção, o peso dos baços e fígados não apresentaram alterações significativas (Figura 22).

Para uma melhor compreensão da infecção nos órgãos internos, realizamos o ensaio de LDA para avaliar a carga parasitária no baço, fígado, medula óssea e linfonodos inguinais e mesentéricos. Observamos que a medula óssea foi o primeiro órgão a ser infectado, pois na primeira semana pós infecção (SPI) encontramos a presença dos parasitos. O baço foi o segundo órgão a ser infectado, com a presença

de parasitos a partir da sétima SPI. Os linfonodos inguinais e mesentéricos foram infectados a partir da oitava SPI, enquanto o fígado foi o último órgão a ser parasitado, apenas a partir da nona semana (Figura 23).

Na décima segunda SPI, os camundongos apresentaram lesões macroscópicas na cauda, patas e nariz, levando à interrupção dos experimentos para evitar qualquer forma de sofrimento aos animais (Figura 24).

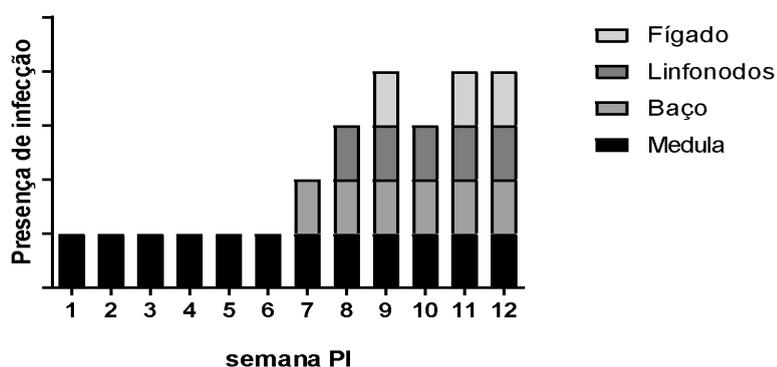


Figura 23 – Acompanhamento da infecção em órgãos internos após a infecção intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis*. Avaliação da infecção em órgãos internos: baço, fígado, medula óssea e linfonodos mesentéricos e peritoneais, após a infecção intravenosa com 10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Após a infecção, dois camundongos por semana foram eutanasiados e coletadas as amostras dos órgãos para realizarmos o teste de LDA e identificarmos a presença de parasitos.

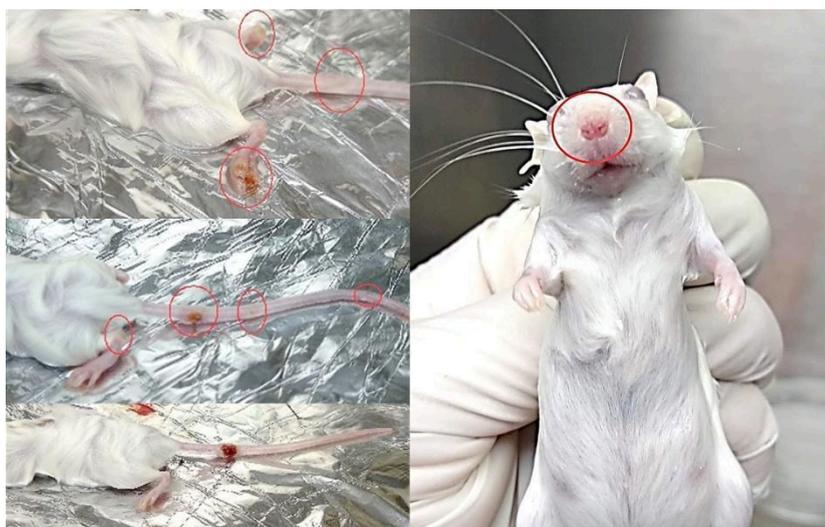


Figura 24 – Lesões macroscópicas em camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos Balb/c foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis* e após 12

semanas pós infecção foram encontradas lesões macroscópicas na cauda, pata e nariz dos camundongos.

5.4 – ALTERAÇÃO NA DISSEMINAÇÃO SISTÊMICA DE *L. amazonensis* APÓS TRATAMENTO COM ANTICORPOS ANTI-PS

Com o objetivo de investigar o papel da PS na disseminação da *L. amazonensis*, realizamos uma infecção intravenosa em camundongos BALB/c com amastigotas previamente tratadas com anticorpos anti-PS (11:31) e a porção Fab purificada (Fab). Após um período de 4 semanas, os camundongos foram submetidos a um tratamento intraperitoneal 3x na semana, com os anticorpos anti-PS e PBS por um total de 3 semanas. Após 12 SPI foram realizadas diversas avaliações, incluindo a medição do peso dos baços e fígados, a determinação da carga parasitária na medula óssea, fígado, baço e linfonodos mesentéricos e peritoneais, a quantificação de citocinas e óxido nítrico produzidos por células esplênicas, a análise da proliferação celular nas células esplênicas, bem como a avaliação da disseminação e tamanho das lesões.

5.4.1 – Peso dos baços e fígados de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS.

O peso dos órgãos é considerado um parâmetro relevante na análise de infecções, uma vez que alterações nesse aspecto podem estar associadas a processos inflamatórios, infiltrados celulares, proliferação celular e aumento da carga parasitária. No entanto, em nosso estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos pesos dos baços e fígados entre os animais dos grupos tratados com anticorpos anti-PS e os animais do grupo controle (Figura 25).

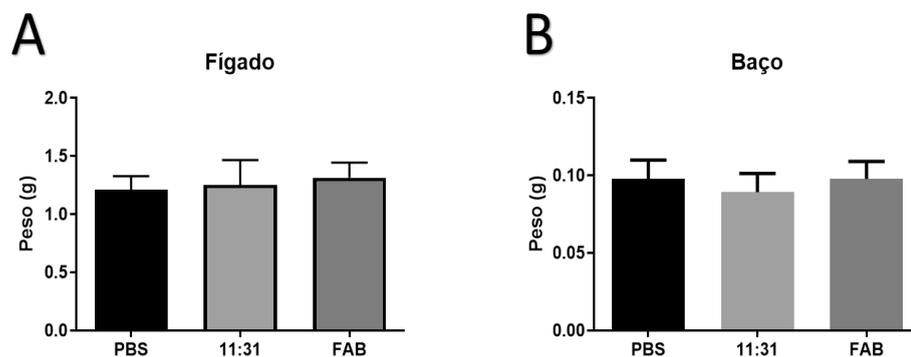


Figura 25 – Peso dos baços e fígados de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS. Camundongos Balb/c foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Após 4 SPI foram tratados via i.p. por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI os camundongos foram eutanasiados e o peso dos fígados (A) e baços (B) foram mensurados.

5.4.2 – Avaliação da carga parasitária de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS.

Após 12 semanas de infecção, a carga parasitária foi avaliada nos camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados i.p com anticorpos anti-PS. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio de PS foi eficaz na redução da infecção em órgãos alvo da infecção pelo parasito. Ao analisarmos os linfonodos, observamos que, embora não tenham sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com anticorpos anti-PS, constatamos uma menor presença de parasitos nos grupos tratados. No grupo controle, cinco animais apresentaram positividade para a infecção nos linfonodos, enquanto no grupo tratado com 11:31 apenas três animais tiveram os linfonodos infectados. No grupo tratado com Fab, apenas dois animais apresentaram infecção nos linfonodos. Sugere-se que esses achados apontam para um potencial efeito protetor do bloqueio de PS na disseminação da infecção por leishmania nos linfonodos (Figura 26A).

Ao analisarmos a infecção no fígado (Figura 26B), também observamos que, embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa, o grupo tratado com o anticorpo Fab apresentou menor quantidade de camundongos

infectados, com apenas 2 animais apresentando parasitos no fígado. Não foram encontradas diferenças entre o grupo controle e o grupo tratado com 11:31, ambos com 5 animais positivos para a infecção.

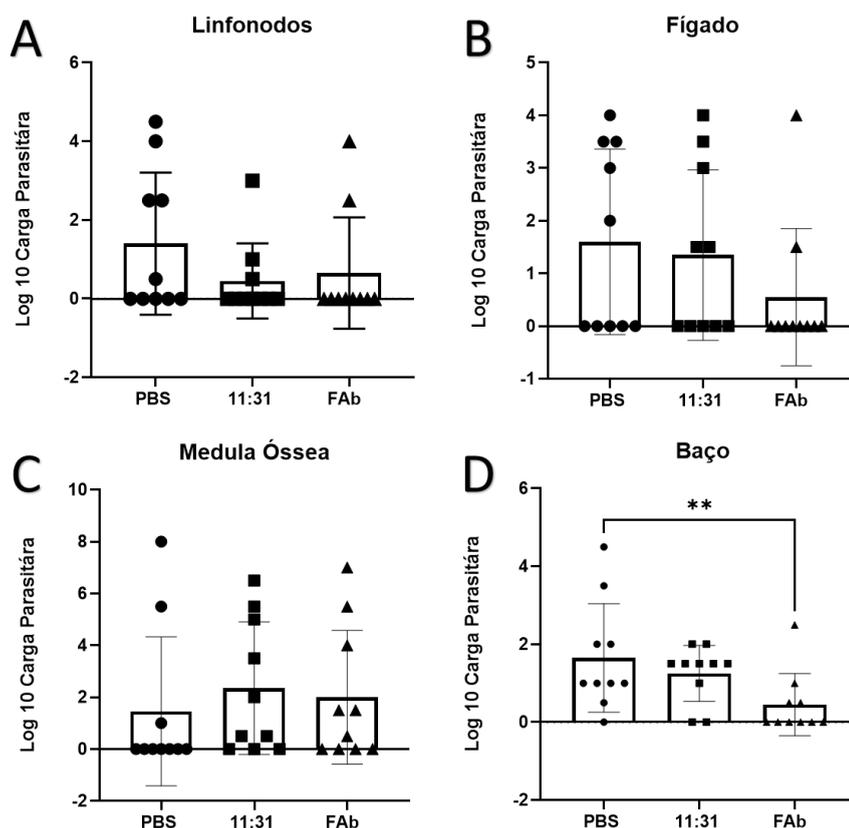


Figura 26 - Carga parasitária dos órgãos internos de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS. Camundongos Balb/c foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Após 4 SPI foram tratados via i.p. por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI os camundongos foram eutanasiados e a carga parasitária foi avaliada por LDA na medula óssea, baço, fígado e linfonodos mesentéricos e peritoneais. ** p < 0,01.

Ao analisarmos a carga parasitária da medula óssea (Figura 26C), não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas. No entanto, contrariamente aos resultados observados nos outros órgãos avaliados, os grupos tratados com anticorpos anti-PS apresentaram um maior número de camundongos com medula óssea parasitada em comparação ao grupo controle. Foram infectados 10 animais em cada grupo. No grupo tratado com 11:31, observou-se a presença de parasitos em 7 animais, enquanto no grupo tratado com Fab esse número foi de 6 animais e

no grupo tratado com PBS apenas 3 camundongos apresentaram parasitos na medula óssea.

Durante a análise das cargas parasitárias do baço (Figura 26D), observou-se uma redução estatisticamente significativa na carga parasitária no grupo tratado com Fab em comparação com o grupo controle. Embora no grupo tratado com 11:31 não tenha sido observada diferença estatística, verificou-se que menos camundongos apresentaram infecção no baço, com um total de 8 animais positivos, enquanto no grupo controle esse número foi de 9 animais.

5.4.3 – Análise do perfil imunológico das células esplênicas de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS.

Realizamos a avaliação das citocinas intracelulares em células derivadas do baço, visando investigar o potencial do bloqueio de PS em modular a resposta inflamatória. Para isso, as células do baço foram isoladas e mantidas em cultura por um período de três dias, na presença de SLA, em triplicatas. As células foram ativadas utilizando um coquetel de ativação de leucócitos contendo BD GolgiPlug™. Posteriormente, as células foram fixadas com fixperme, submetidas a lavagens com perm-wash e, em seguida, incubadas com anticorpos específicos (CD3, CD4, IL-4, IL-10, TGFβ, TNFα e CD11b), conforme descrito na Tabela 2.

Como principal achado, observamos uma diminuição significativa nas concentrações de IL-10 e TGFβ no grupo tratado com Fab. Embora a IL-4 não tenha apresentado diferença estatisticamente significativa, observou-se uma tendência de diminuição nos grupos tratados 11:31 e Fab, quando comparados com o grupo controle (Figura 28).

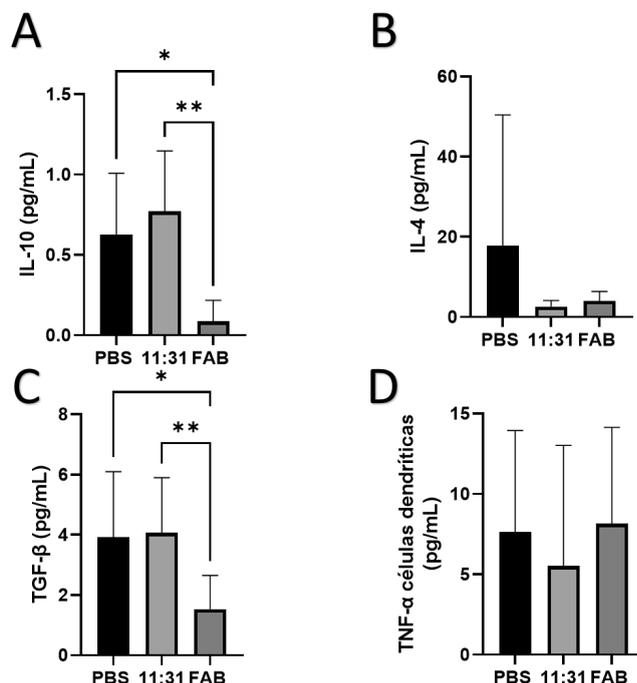


Figura 27 – Perfil de produção de citocinas intracelulares em esplenócitos de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), receberam tratamento intraperitoneal por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e as células dos baços foram coletadas e mantidas em cultura com SLA por 3 dias. A expressão das citocinas IL-10, TGF β , IL-4 e TNF α em células dendríticas foram avaliadas por citometria de fluxo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.4.5 – Modulação da produção de óxido nítrico de células esplênicas de camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *Leishmania amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS.

Avaliamos a produção de NO a fim de investigar a modulação da resposta inflamatória das células esplênicas. Para isso, as células do baço foram isoladas e mantidas em cultura com SLA por um período de três dias. Após esse período, o sobrenadante foi coletado e a produção de NO foi avaliada utilizando o método de Griess.

Embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas, observamos que o grupo tratado com 11:31 apresentou uma tendência de menor produção de NO em comparação com os demais grupos (Figura 29).

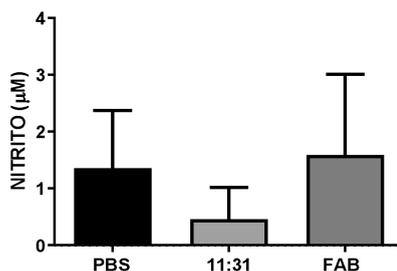


Figura 28 - Produção de óxido nítrico de células esplênicas após o tratamento com anticorpos anti-PS. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), receberam tratamento intraperitoneal por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e os esplenócitos foram coletados e mantidos em cultura com antígeno solúvel de leishmania (SLA) por 3 dias. A produção de NO foi mensurada pelo método de Griess.

5.4.6 – Distribuição de lesões macroscópicas em camundongos infectados via intravenosa com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com anticorpos anti-PS.

Ao final de 12 semanas pós-infecção, os camundongos apresentaram lesões macroscópicas nas caudas, narizes e patas, indicativas de disseminação do parasito. Com base nos escores determinados, observou-se que ambos os grupos tratados com anticorpos anti-PS apresentaram uma tendência de redução no tamanho das lesões. No entanto, somente nos grupos tratados com Fab foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em comparação com o grupo controle (Figura 30).

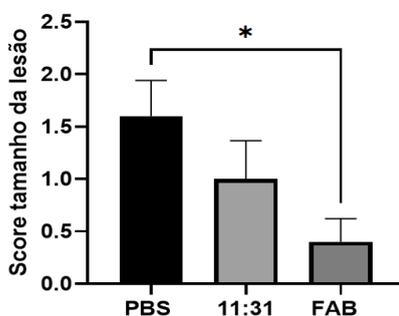


Figura 29 – Avaliação do tamanho das lesões encontradas nos camundongos BALB/c após o tratamento com anticorpos anti-PS. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), receberam tratamento intraperitoneal por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e o tamanho das lesões foram analisadas. * $p < 0,05$.

Além da análise do tamanho das lesões, também avaliamos a distribuição das mesmas. Nos casos em que as lesões estavam presentes em apenas uma pata, atribuímos a pontuação 1 (score 1), nos casos em que as lesões ocorreram nas duas patas ou na ponta da cauda, atribuímos a pontuação 2 (escore 2). Observamos uma tendência de diminuição na distribuição das lesões nos grupos tratados com anticorpos anti-PS, sendo que apenas no grupo tratado com Fab encontramos diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle.

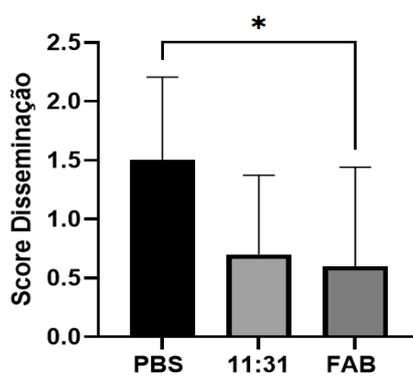


Figura 30 - Escore da disseminação das lesões encontradas nos camundongos BALB/c após o tratamento com anticorpos anti-PS. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), receberam tratamento intraperitoneal por 3 semanas com PBS, anticorpos anti-PS (11:31) e porção Fab purificada (Fab). Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e a distribuição das lesões foi analisada. * $p < 0,05$.

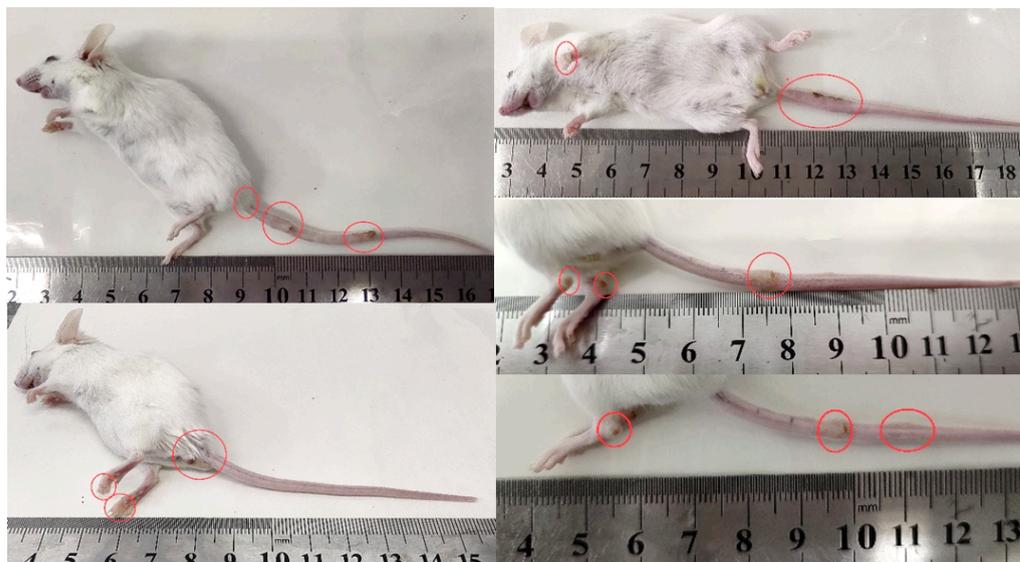


Figura 31 – Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas *L. amazonensis* tratados com PBS. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), foram tratados intraperitoneal por 3 semanas com PBS. Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram analisadas.

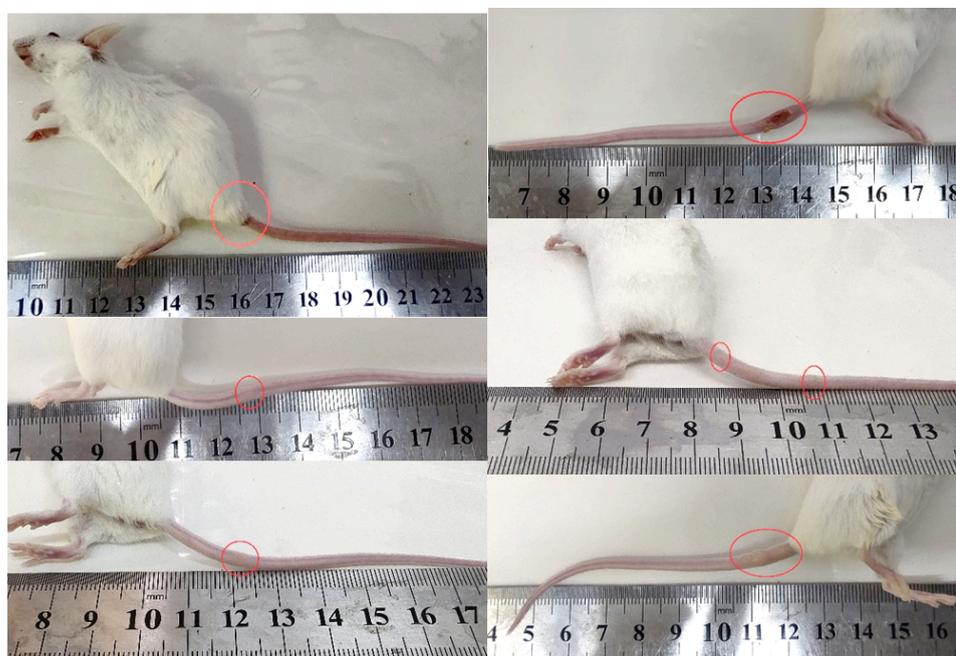


Figura 32 - Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas *L. amazonensis* tratados com anticorpo anti-PS 11:31. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), foram tratados intraperitoneal por 3 semanas com

anticorpo anti-PS 11:31. Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram analisadas.

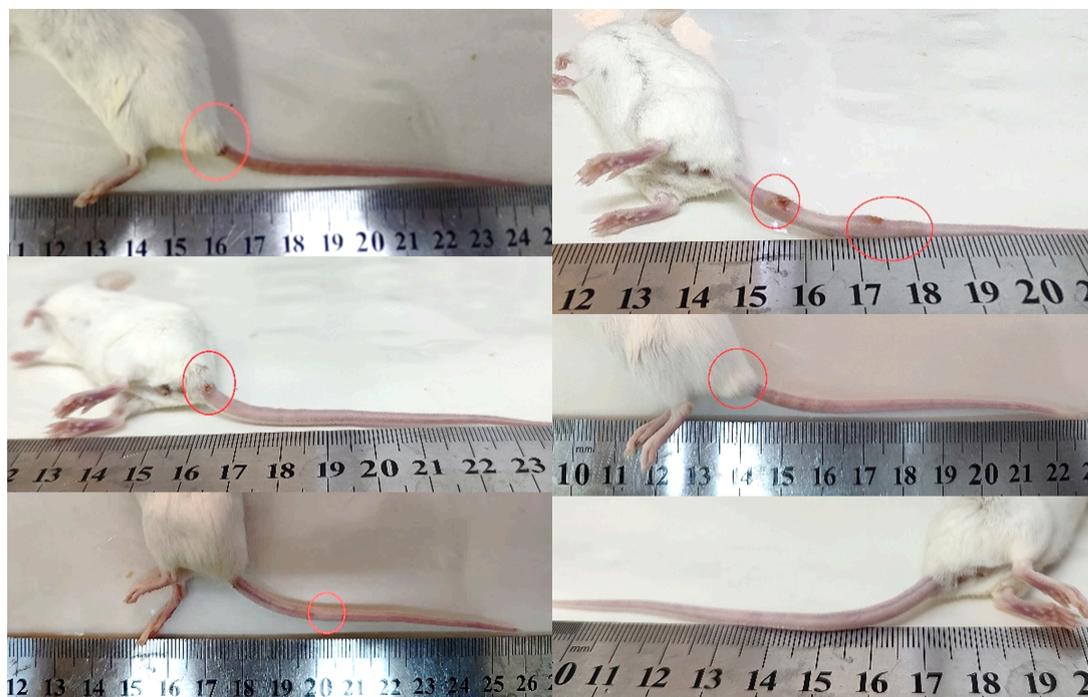


Figura 33 - Lesões de camundongos BALB/c infectados via intravenosa com amastigotas *L. amazonensis* tratados com anticorpo anti-PS Fab. Os camundongos foram infectados via intravenosa com 10^6 amastigotas de *L. amazonensis* e, após 4 semanas pós-infecção (SPI), foram tratados intraperitoneal por 3 semanas com anticorpos anti-PS Fab. Após 12 SPI, os camundongos foram eutanasiados e as lesões foram analisadas.

5- DISCUSSÃO

A exposição de PS na monocamada externa da membrana plasmática é um fator de virulência bastante importante, descritos em várias infecções parasitárias intracelulares como *T. gondii*, *T. cruzi*, *Plasmodium spp* e *Leishmania spp*, bem como em células tumorais e vírus (Amara; Mercer, 2015; Birge *et al.*, 2016; Damatta *et al.*, 2007; França-Costa *et al.*, 2015; Seabra; de Souza; Damatta, 2004; Sherman; Prudhomme; Tait, 1997; van Zandbergen *et al.*, 2006).

A exposição de PS nas monocamada externas da membrana plasmática celular é similar ao observado nas células que morrem de morte programada do tipo apoptose, portanto esse mecanismo é denominado de mimetismo apoptótico, devido aos parasitos ou células estarem viáveis e não possuem qualquer outro sinal de morte celular ao expor a PS (Balanco *et al.*, 2001; Birge *et al.*, 2016; Wanderley; Barcinski, 2010).

Na apoptose, a exposição de PS está relacionada com a indução de fagocitose e supressão do sistema imune durante a endocitose e digestão intracelular dos corpos apoptóticos. De maneira semelhante, amastigotas de *L. amazonensis* ao exporem PS induzem uma maior taxa de endocitose, a produção de citocinas anti-inflamatórias e promovem uma resposta imunossupressora, importante para que o parasito consiga invadir os macrófagos, se multiplicar, estabelecer e disseminar a infecção (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006).

A exposição de PS está relacionada com a manifestação clínica de LCD, uma manifestação grave e de difícil tratamento. Concomitante a quantidades de lesões no paciente também possui relação positiva em relação à exposição de PS. De maneira contrária, na LMC, que também é uma manifestação secundária e grave, de difícil tratamento e porém relacionada com uma resposta inflamatória exacerbada e com bastante destruição tecidual, apresenta baixa expressão de PS (Farias *et al.*, 2013; França-Costa *et al.*, 2012).

Os macrófagos têm sido extensivamente estudados na relação entre o parasito e a célula hospedeira, *in vitro*, devido a ser a célula preferencial pelo parasito. Porém, os fibroblastos são as células abundantes no local de inóculo das promastigotas e são descritos como um ambiente propício para a sobrevivência do parasito nas fases aguda, crônica e de latência, devido a sua baixa atividade microbicida (Bogdan *et al.*, 2000; Valigurová; Kolářová, 2023).

O estudo com fibroblastos nesta infecção ainda é uma área em desenvolvimento, com muitas descobertas a serem feitas. A maioria dos estudos foca em demonstrar a capacidade de infecção desse tipo celular, especialmente em lesões observadas nos modelos animais ou em infecções em humanos. No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas células no ciclo completo da infecção e os fatores associados.

Mesmo assim, sabemos que a capacidade dos fibroblastos de serem infectados e sua resposta à infecção depende tanto da espécie do parasito quanto a origem dos fibroblastos estudados. Por exemplo, fibroblastos de origem humana podem eliminar os parasitos da espécie *L. amazonensis* (Dedet *et al.*, 1983), enquanto na infecção com *L. major* permite a permanência prolongada do parasito (Bogdan *et al.*, 2000).

Quanto ao mecanismo de entrada dos parasitos, estudos indicam que os receptores de manose estão envolvidos na infecção dos fibroblastos por *Leishmania* (Hespanhol *et al.*, 2005), assim como a implicação de CDC42 na internalização do parasito. Recentemente, Cavalcante-Costa (2019) descreveu uma nova via de internalização do parasito. Em seu trabalho, promastigotas de *L. amazonensis* penetram nos fibroblastos de maneira não relacionada à fagocitose, envolvendo o recrutamento de íons de Ca^{++} e reparo da membrana devido a excitose dos lisossomos (Cavalcante-Costa *et al.*, 2019).

No presente estudo, investigamos o impacto da inibição da PS na infecção por *L. amazonensis* em células hospedeiras, focando especificamente nos fibroblastos e neutrófilos.

Os fibroblastos usados no nosso trabalho foram da linhagem celular NIH-3T3, uma linhagem embrionária de fibroblastos de camundongos, com inúmeras aplicações na pesquisa e que possui sistema adequado para estudar o papel dessas células na inflamação (Espanhol *et al.*, 2010; Rahimi; Cai; Hoyer-Fender, 2022). Esta linhagem tem sido amplamente empregada em estudos relacionados às infecções por *T. gondii*, *T. cruzi*, e alguns vírus, como o MuLV (Guimarães-Pinto *et al.*, 2018; Risco *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 2010; Tzen *et al.*, 2007). No entanto, até o momento, não havia sido documentada nenhuma relação entre essa linhagem e a infecção por leishmania. Assim, os resultados obtidos neste trabalho são uma inovação significativa, pois demonstram que a linhagem celular NIH/3T3 é suscetível à infecção por *L. amazonensis* (Figura 12) podendo ser um novo modelo de estudo. O estabelecimento bem-sucedido de uma cultura celular de fibroblasto para a

infecção é um achado notável, devido às vantagens proporcionadas, como o controle ambiental, homogeneidade da amostra e custos reduzidos em comparação com experimentos animais (Alves; Guimarães, 2010).

Estudos anteriores indicaram que a inibição de PS, seja através do uso de anexina V ou anticorpos anti-PS, tem o potencial de alterar a taxa de infecção em macrófagos e reprogramar a resposta imunológica do hospedeiro (Balanco *et al.*, 2001; Wanderley *et al.*, 2006; Wanderley; Barcinski, 2010). No entanto, ao analisar o bloqueio de PS na infecção de células dendríticas, observou-se que não houve interferência na taxa de infecção, mas sim na capacidade de modular funções das células dendríticas (Wanderley *et al.*, 2013). No presente trabalho, foi demonstrado que a inibição de PS, tanto por meio de anticorpos anti-PS quanto por anexina V, resultou em uma redução significativa da infecção em fibroblastos NIH-3T3 em um período de 24 horas (Figura 12). A fim de compreender melhor quais fatores poderiam estar relacionados com a redução no índice de infectividade, avaliamos separadamente a porcentagem de fibroblastos infectados e a quantidade de amastigotas por fibroblasto. Intrigantemente, a relação da quantidade de amastigotas por macrófago permaneceu inalterada independente do pré-tratamento dos parasitos. No entanto, a porcentagem de macrófagos infectados foi significativamente reduzida com o tratamento com anticorpos anti-PS. Este achado sugere que o bloqueio de PS afeta a entrada do parasito na célula, sem necessariamente influenciar a resposta imunológica da célula hospedeira. A falta de controle sobre a proliferação do parasito pode estar relacionada à limitada capacidade dos fibroblastos para modular a proliferação do parasito, possivelmente devido à baixa produção de NO pelos fibroblastos, em comparação com os macrófagos (Bogdan *et al.*, 2000).

A produção de NO representa um dos mecanismos cruciais para o controle da infecção por *Leishmania* (Olekhnovitch; Bousso, 2015). Em concordância com os resultados obtidos e semelhantes aos achados de Bodgan (2000), seguindo uma ativação de 24 horas, observou-se que os fibroblastos ativados produzem mais NO em comparação com as células não ativadas, mas não houve variação significativa na produção de NO entre os diferentes tratamentos de bloqueio de PS com os anticorpos. (Figura 14).

Entretanto, ao analisar o mesmo contexto 48 horas após a infecção, notamos uma tendência de redução na produção de NO pelas células infectadas com amastigotas PS-livre. Porém, após o tratamento com anexina V, foi observado um aumento significativo na produção de NO e no tratamento com o anticorpo completo 11:31 resultou em tendência de aumento na produção de NO, quando comparado com as células infectadas com amastigotas PS-livre (Figura 14). Este padrão de produção de NO é congruente com as observações feitas em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, onde a produção de NO é reduzida após a infecção por amastigotas PS-livre e é aumentada após o bloqueio de PS (Wanderley *et al.*, 2006). É importante atentar que as células NIH/3T3 possuem a isoforma neuronal da NOS (NOS 1) e, quando estimuladas com LPS e IFN γ , são capazes de expressar a proteína NOS1 e produzir NO (Español *et al.*, 2010). Portanto, é relevante verificar a expressão de NOS1 nessas células após a infecção com *L. amazonenses*.

O trabalho de Español (2010) indica que o ápice da produção de NO ocorre após 18 horas de indução da inflamação, mas a cinética após 24 horas ainda é desconhecida. Considerando que as alterações encontradas neste estudo foram relacionadas às ativações de 44 horas, são necessários mais estudos para compreender detalhadamente a cinética da produção de NO pelas células NIH-3T3 e seu possível controle na infecção por *Leishmania*.

As células NIH-3T3 são amplamente utilizadas em estudos de infecções virais e quando a infecção viral ocorre com suplementação de PS, ocorre o aumento do nível da infecção (Coil; Miller, 2005). Sabe-se que NIH-3T3 expressa um alto nível de Axl, um dos receptores de PS da família TAM (Yanagihashi *et al.*, 2017), e que fibroblastos também são capazes de realizar a eferocitose, ou seja, endocitose de células apoptóticas (Arandjelovic; Ravichandran, 2015). Possivelmente a PS influencia na infecção de amastigotas em fibroblastos, facilitando a entrada do parasito e subvertendo a capacidade imunológica da célula via receptores desta família. No entanto, são necessários mais estudos para compreender de forma mais abrangente os mecanismos envolvidos na entrada e na permanência do parasito, bem como para investigar como essa interação se desenrola ao longo do tempo.

Os neutrófilos desempenham um papel crucial na resposta imunológica contra a infecção por *Leishmania*, sendo as primeiras células a se infiltrar no local da infecção (Peters *et al.*, 2008). No entanto, a interação entre neutrófilos e *Leishmania* é

complexa e altamente diversificada, dependendo da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro (Hurrell; Regli; Tacchini-Cottier, 2016). Embora haja um conhecimento mais avançado sobre a relação entre *Leishmania* e neutrófilo, quando comparado com os estudos em relação a infecção nos fibroblastos.

No presente estudo, foi confirmado que os neutrófilos peritoneais são suscetíveis à infecção por ambas as formas de *L. amazonensis*, tanto promastigotas (Figura 17) quanto amastigotas (Figura 20), o que está em conformidade com os resultados encontrados em estudos anteriores, como os de Carlsen (2003) e Da Fonseca-Martins (2021). No entanto, em Da Fonseca-Martins (2021) observou-se uma diferenciação significativa na resposta dos neutrófilos dependendo da fonte de sua origem. Enquanto os neutrófilos derivados da medula óssea mostraram uma maior propensão a serem infectados por amastigotas em comparação com promastigotas, os neutrófilos humanos, por outro lado, demonstraram uma preferência por promastigotas em relação às amastigotas durante o processo de internalização (da Fonseca-Martins *et al.*, 2021). A diversidade nos padrões de fagocitose entre diferentes subpopulações de neutrófilos ressalta a complexidade das interações entre *Leishmania* e o sistema imunológico do hospedeiro. Essa complexidade demonstra que vários fatores, como o estado do ambiente inflamatório e o estágio de maturação dos neutrófilos, podem influenciar significativamente a fagocitose do parasito e a preferência por sua forma infectiva.

Apesar de termos confirmado que os neutrófilos são capazes de fagocitar ambas as formas de *L. amazonensis*, nossos resultados sugerem que a PS pode não estar diretamente relacionada a essas interações. Não observamos alterações estatisticamente significativas nas células infectadas ao bloquear a PS, seja com anticorpos anti-PS ou com anexina V, em diferentes períodos de tempo e em ambas as formas morfológicas (Figura 17 e Figura 20). Porém, em infecções com duração de 6 horas, notamos uma tendência à redução na porcentagem de neutrófilos infectados com amastigotas após o bloqueio de PS com o anticorpo 11:31.

Um aspecto importante a ser considerado é o papel das EROs nesse contexto. As EROs são metabólitos parcialmente reduzidos de oxigênio com fortes propriedades oxidantes, sendo prejudiciais aos organismos devido à sua capacidade de oxidar constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e danificar o DNA (Mittal *et al.*, 2014). Tanto macrófagos quanto neutrófilos produzem EROs em resposta à

fagocitose e ligantes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Horta *et al.*, 2012). Em infecções por *L. major*, as EROs desempenham um papel importante na eliminação do parasito no baço, embora o NO também seja relevante em outros tecidos (Blos *et al.*, 2003). Entretanto, a importância das EROs varia de acordo com a espécie de *Leishmania*. Em estudos *in vitro* com macrófagos, as EROs não foram capazes de eliminar *L. major* e *L. guyanensis*, mas em infecções com *L. donovani*, estão relacionadas ao controle do parasito em curto prazo.

Nos casos de infecção por *L. amazonensis*, as EROs produzidas por macrófagos derivadas de diferentes camundongos não são capazes de eliminar o parasito (Almeida *et al.*, 2012; Carneiro *et al.*, 2018). Em neutrófilos, embora as EROs estejam associadas à modulação da inflamação, especialmente no que diz respeito ao controle do infiltrado inflamatório e mediação da apoptose dos neutrófilos, não possuem atividade direta na morte de *L. amazonensis*, porém os mecanismos pelos quais o parasito resiste às EROs ainda não foram completamente elucidados (Carneiro *et al.*, 2018; Roma *et al.*, 2016). Esse contexto sugere que a relação entre EROs e a infecção por *Leishmania* é complexa e varia dependendo do tipo de célula e da espécie de parasito.

Essas observações justificam os resultados encontrados neste estudo, nos quais, nas infecções com promastigotas, mesmo após as alterações na produção de EROs identificadas nas infecções de 3 e 6 horas, os índices de infecção não foram alterados. Um ponto de destaque é que a produção significativamente maior de EROs após a infecção ocorreu somente nas infecções de 6 horas, indicando que a modulação das EROs pelos neutrófilos, após a infecção com promastigota, pode ocorrer de forma mais lenta quando comparada aos macrófagos. Sugerindo assim, que as alterações encontradas na produção aumentada de EROs após o tratamento com o anticorpo 11:31 nas infecções de 3 horas podem estar relacionadas ao reconhecimento da porção Fc do anticorpo pelos receptores Fc presentes nos neutrófilos, induzindo uma resposta mais robusta, e uma maior produção de EROs (Futosi; Fodor; Mócsai, 2013; Nguyen; Green; Mecsas, 2017). As reduções na produção de EROs nas infecções de 6 horas, após o bloqueio de PS com anticorpos anti-PS, precisam ser melhor investigadas, pois a relação bloqueio de PS e produção de EROs relatado na literatura é o contrário do que encontramos aqui, pois o

reconhecido de PS é capaz de reduzir a produção de EROs (Brelstaff *et al.*, 2018; Hosain *et al.*, 2016).

De maneira contrária aos resultados obtidos por Carlsen e col. (2013) não foi observado indução na produção de EROs durante as infecções com as formas amastigotas (Carlsen *et al.*, 2013). Vale destacar que os estudos de Carlsen foram realizados em camundongos C57BL/6, enquanto o presente trabalho foi conduzido em camundongos BALB/c. Essa discrepância ressalta a influência significativa do hospedeiro nas respostas imunológicas, demonstrando mais uma vez que o perfil imunológico do hospedeiro pode ser um fator determinante nas alterações observadas. Além disso, não encontramos diferenças significativas na taxa de infecção em nenhum dos tempos avaliados ou em nenhum dos tratamentos realizados com as formas amastigotas. Isso ressalta a necessidade de conduzir estudos mais aprofundados para identificar e compreender os fatores específicos que estão associados à indução de EROs pelas formas promastigotas, mas não pelas formas amastigotas. A investigação detalhada desses fatores é essencial para elucidar os mecanismos relacionados a essa disparidade nas respostas do sistema imunológico às diferentes fases do ciclo de vida do parasito *L. amazonensis*.

Nas infecções *in vivo* por *Leishmania*, um modelo amplamente utilizado que se assemelha à infecção natural, especialmente no contexto de lesões cutâneas, é a infecção intradérmica na orelha (Mortatti; Henriques, 1990). Em camundongos BALB/c, que são suscetíveis à infecção por *L. amazonensis*, as lesões na orelha tendem a se desenvolver, e os parasitos migram para os linfonodos drenantes após aproximadamente cinco semanas de infecção. No entanto, a migração dos parasitos ocorre de forma discreta e com uma carga parasitária relativamente baixa (Courret *et al.*, 2003).

A resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania* em camundongos está intrinsecamente ligada ao tipo de resposta inflamatória desencadeada durante a infecção e à orientação da resposta dos linfócitos T. O IFN γ está associado à resposta Th1 e à resistência à infecção, enquanto as interleucinas IL-4 e IL-10 estão relacionadas à resposta Th2 e à suscetibilidade à infecção. Camundongos resistentes se caracterizam pela produção elevada de IFN γ e pela baixa quantidade de IL-4, ao passo que os camundongos suscetíveis apresentam o padrão oposto. Esse paradigma é especialmente válido em modelos experimentais de infecção por

L. major. No entanto, em modelos de infecção por *L. amazonensis*, os camundongos desenvolvem uma resposta inflamatória heterogênea e não polarizada (Afonso; Scott, 1993; Ji; Sun; Soong, 2003; Souza *et al.*, 2000).

A maioria dos trabalhos envolvendo a espécie *L. amazonensis* concentra-se na investigação de mecanismos celulares e imunológicos relacionados à manifestação da LC (Loría-Cervera; Andrade-Narváez, 2014). Entretanto, mesmo em modelos de infecção intradérmica, é possível observar a disseminação dos parasitos para os linfonodos após cinco semanas de infecção, como documentado por Courret *et al.* (2003). Porém, mesmo em modelos de infecção intradérmica, é possível observar a disseminação dos parasitos para os linfonodos após cinco semanas de infecção, como documentado por Courret *et al.* (2003) e neste estudo, após quatro semanas. Uma outra via de inoculação comum em pesquisas relacionadas visceralização é a intraperitoneal, porém, essa via resulta em uma infecção com cargas parasitárias mais baixas e um tempo de pré-latência maior (Ott; Hanson; Stauber, 1967; Rolão; Melo; Campino, 2004). Sendo assim, a via intravenosa é a mais interessante para o estudo do estabelecimento de um modelo de visceralização da espécie *L. amazonensis* com curto prazo de infecção.

Este estudo é promissor, pois a maioria dos modelos experimentais relacionados com *L. amazonensis* se concentra em mecanismos relacionados às lesões cutâneas, utilizando vias de inoculação subcutânea ou intradérmica, como na planta plantar, na base da cauda ou na orelha (Araujo *et al.*, 2015; Mortatti; Henriques, 1990).

Durante o curso da infecção, observamos que a medula óssea foi o primeiro órgão a ser parasitado, seguido pelo baço, linfonodos mesentéricos e inguinais, e por último, o fígado (Figura 23). Este padrão de parasitismo inicial da medula óssea é consistente com estudos anteriores sobre a visceralização da espécie dermatrópica, cuja a medula óssea e o baço são os locais onde os parasitos persistem por mais tempo durante infecções crônicas (Abreu-Silva *et al.*, 2004). Em infecções causadas por *L. braziliensis*, principal espécie relacionada com as LMC, é possível encontrar parasitos no baço, medula óssea e nos linfonodos após seis semanas de infecção. Em contraste, para espécies viscerotrópicas, observou-se um padrão diferente, onde o fígado foi o primeiro órgão a ser infectado, seguido pelo baço e medula, onde a infecção torna-se crônica (Faleiro *et al.*, 2014; Rousseau *et*

al., 1997). Essas observações ressaltam a importância de adotar um modelo de estudo de infecção específico para investigar a visceralização das espécies dermatrópicas.

O mecanismo exato pelo qual o parasito consegue penetrar na medula óssea ainda é desconhecido. A medula óssea não possui vasos linfáticos, mas é rica em vasos sanguíneos sinusóides. Estes vasos têm uma estrutura única, onde os glóbulos vermelhos podem aderir às suas paredes capilares e migrar para o compartimento da medula óssea. Acredita-se que este sistema vascular especializado possa ser um possível caminho que as células infectadas utilizam para entrar na medula óssea (Bixel *et al.*, 2017; Floro e Silva *et al.*, 2022).

Curiosamente, observamos que os parasitos nos linfonodos só foram detectados após a medula óssea e o baço serem parasitados, indicando que, neste modelo de infecção, o parasito se disseminou inicialmente pelo sistema hematogênico. Considerando que a via de inoculação foi intravenosa, era esperado que os parasitos migrassem inicialmente através do sistema circulatório. E a infecção posterior dos linfonodos confirma a disseminação via sistema linfático. Isso sugere um tropismo as células da medula óssea ou uma facilidade de passar pelos sinusóides desse órgão.

No nosso modelo experimental, não observamos alterações nos pesos dos órgãos após 12 semanas de infecção (Figura 22), o que está de acordo com os achados na literatura. Em infecções causadas pela espécie visceratrópicas, a diferença de peso nos órgãos só é relatada após 24 semanas (Maeda *et al.*, 2021), nas infecções pelas espécies dermatrópicas, essa alteração requer um período de tempo ainda mais prolongado, além das 12 semanas, para se manifestar.

Portanto, este modelo experimental proporcionou uma compreensão mais abrangente das manifestações relacionadas com a espécie do parasito, permitindo a investigação detalhada da disseminação no organismo. Além disso, ofereceu uma visão mais detalhada sobre a disseminação da *L. amazonensis* nos órgãos-alvo e nos linfonodos, o que nos possibilitou entender melhor as dinâmicas de infecção em diferentes locais do hospedeiro.

Quando tratamos amastigotas previamente com anticorpos anti-PS e, em seguida, infectamos os camundongos via intravenosa, seguidos de tratamento intraperitoneal com anticorpos anti-PS por quatro semana, observamos uma redução significativa

na carga parasitária do baço do grupo tratado com o anticorpo Fab, quando comparado com os camundongos tratados com PBS. E quando avaliamos a porcentagem de camundongos infectados que positivaram com infecção após as 12 semanas de tratamento encontramos uma redução na porcentagem de redução após o tratamento com os anticorpos anti-PS tanto o anticorpo 11:31 e Fab, na quantidade de parasito nos linfonodos e baço e um aumento significativo na medula.

A avaliação da interferência de PS na infecção por *L. amazonensis* foi documentada por Wanderley (2013) em lesões dérmicas de camundongos C57BL/6, onde o anticorpo mch1N11 reduziu a carga parasitária nas orelhas, embora não tenha eliminado completamente a infecção (Wanderley *et al.*, 2013). Sendo assim, a redução na carga parasitária observada nos baços tratados com a porção Fab (Figura 26) do anticorpo PGN632 abre caminho para investigações mais detalhadas sobre a importância do PS na infecção dos esplenócitos.

A redução da carga parasitária após o bloqueio do uso de anticorpos anti-PS PGN632 foi também descrito em infecções virais, onde os principais mecanismos relacionados à ação do anticorpo envolvem a opsonização do vírus e a citotoxicidade celular dependente de anticorpos nas células infectadas (Soares; King; Thorpe, 2008). No entanto, na infecção por *L. amazonensis*, ainda são necessários mais estudos para identificar os mecanismos relacionados à ação dos anticorpos, especialmente porque os principais achados estão associados à porção Fab' purificado do anticorpo.

A exposição ao PS em células apoptóticas ou durante infecções por *L. amazonensis* geralmente resulta na indução de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF β , pelas células fagocíticas (Balanco *et al.*, 2001; Freire-de-Lima *et al.*, 2006). Ao analisarmos o perfil de produção de citocinas produzidos pelos esplenócitos após a infecção com *L. amazonensis* e o tratamento com anticorpos anti-PS, identificamos uma redução na produção de IL-10 e TGF β nos esplenócitos derivados de camundongos tratados com o anticorpo Fab (Figura 28). Em infecções com *L. donovani*, a IL-10 favorece a suscetibilidade à infecção no baço, e na ausência de IL-10, a resposta das células T é rapidamente modulada para uma resposta Th1, capaz de eliminar o parasito (Ml *et al.*, 2001). Dessa forma, podemos relacionar a diminuição da carga parasitária encontrada nos baços com a redução da resposta anti-inflamatória induzida pelo PS. Isso sugere que ao bloquear o PS, a

resposta inflamatória dos esplenócitos é alterada de tal forma que consegue controlar a proliferação do parasito de maneira mais eficaz.

A produção de TNF α não foi alterada com os tratamentos, sugerindo a necessidade de avaliar outros marcadores inflamatórios no baço. Um marcador que seria particularmente importante investigar é o IFN γ , pois a sua produção está inversamente relacionada com a produção de IL-10 (Belkaid *et al.*, 2001).

Entretanto, a produção de NO não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos esplenócitos derivados de camundongos entre os diferentes tratamentos (Figura 29). Isso indica que o controle do parasito não foi mediado pela indução da produção de NO e sugere que outras vias podem estar envolvidas nesse processo.

O aparecimento de lesões distantes do local de inoculação tem sido associado com a capacidade de disseminação do parasito (Quiñonez-Díaz *et al.*, 2012). A presença de lesões está relacionada com uma resposta inflamatória ativa (Travi; Osorio; Saravia, 1996), e em infecções intravenosas, o desenvolvimento de lesões metastáticas é comum (Roberts; Alexander; Blackwell, 1989). Ao avaliarmos a distribuição de lesões macroscópicas pelo corpo dos camundongos, podemos concluir que o parasito está se disseminando por todo o organismo. Comparando o tamanho e a distribuição das lesões, observamos que o anticorpo Fab foi capaz de reduzir tanto o tamanho quanto a disseminação das lesões. Esses achados indicam um papel significativo do anticorpo Fab na inibição da disseminação do parasito e na redução da gravidade das lesões metastáticas (Figura 30 e 31).

6 - CONCLUSÃO

A PS pode estar relacionada com a infecção de amastigota de *L. amazonensis* em fibroblastos e, portanto, impactar no estabelecimento da fase latente da infecção. Porém são necessários mais estudos para uma compreensão mais aprofundada dessa relação.

A PS não está diretamente envolvida na infecção de promastigotas ou amastigotas de *L. amazonensis* em neutrófilos. No entanto, há alguma associação com a produção de EROs por estas células na infecção por formas promastigotas, que precisa ser melhor estudada.

O modelo de infecção intravenosa com amastigota é um modelo confiável para estudar a infecção sistêmica pela espécie *L. amazonensis* em modelos animais, tanto para visceralização quanto para o aparecimento de lesões cutâneas disseminadas.

A porção Fab purificada do anticorpo anti-PS PGN 632 interferiu de maneira significativa na disseminação de *L. amazonensis* no modelo de infecção intravenosa, com redução da carga parasitária no baço, inibição da produção IL-10 e TGF β por esplenócitos, além de inibir a disseminação e gravidade de lesões metastáticas.

ANEXO 1

PARTICIPAÇÃO EM ARTIGOS PUBLICADOS

CD4⁺ T Cell-Dependent Macrophage Activation Modulates Sustained PS Exposure on Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis* (WANDERLEY et al., 2019).

Design and Synthesis of New Anthranyl Phenylhydrazides: Antileishmanial Activity and Structure-Activity Relationship (DO CARMO MAQUIAVELI et al., 2023)

PARTICIPAÇÃO DE TRABALHOS PREMIADOS

11a Semana de Integração Acadêmica da UFRJ (2022) pelo trabalho Métricas do LIP na live: avaliando o alcance da (boa) informação através da internet, UFRJ.

VI JFPN - Jornada Fluminense de Produtos Naturais (2022) - PRÊMIO KAPLAN Pôsteres – Mestrado - 2º lugar, pelo trabalho “Análise *in vitro* da citotoxicidade e efeitos carcinogênicos produzido por chalconas sintéticas em células de fibroblastos humanos”

12ª Semana de Integração acadêmica da UFRJ (2023) pelos trabalhos:

- Investigando a atividade anti-leishmania pela microbiota em flebotomíneo;
- Avaliação do potencial citotóxico do herbicida roundup e seu ingrediente ativo glifosato em células de fibroblasto murino;
- Produção de extrato do fungo endofítico *Stemphyllium lycopersici* utilizando eliciação biológica de lisado de *Leishmania amazonensis*.

ANEXO 2

Artigo em processo de submissão para a revista Internatiol Journal for Parasitology

Succintus

Phosphatidylserine blockade decreases parasite dissemination in a model of systemic *Leishmania amazonensis* infection.

Arieli Bernardo Portugal^{1,2}, Renato Augusto daMatta², João Luiz Mendes Wanderley^{1*}

1-Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Macaé, RJ, Brazil

2-Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil.

*corresponding author at: Laboratório de Imunoparasitologia, 159th Alcides da Conceição street, Macaé, Rio de Janeiro, Brazil, 27933378. E-mail address: lmwjoao@macae.ufrj.br

Declarations of interest: none

Abstract

Leishmania amazonensis is associated with cutaneous, disseminated, diffuse, mucosal and visceral leishmaniasis. The mechanisms underlying its ability to persist and spread after the initial clinical cure are unclear. Phosphatidylserine recognition on amastigotes by macrophages triggers the endocytosis of the parasite and the production of regulatory cytokines. In systemically infected mice, we observed that anti-phosphatidylserine antibodies diminish splenic infection, due to a marked decrease in the production of IL-10 and TGF β by splenocytes and reduce the size of disseminated skin lesions. Therefore, phosphatidylserine mediates dissemination and visceralization contributing to the establishment of severe forms of the infection.

Keywords: leishmaniasis, phosphatidylserine, dissemination, visceralization, *L. amazonensis*, lesions

Leishmaniasis is a neglected disease endemic in most tropical and subtropical regions. It is estimated that around 1 billion people live in risk areas, with approximately 30,000 new cases of visceral leishmaniasis (VL) and more than 1 million new cases of cutaneous leishmaniasis (CL) diagnosed annually (Ruiz-Postigo et al., 2022). The disease presents a wide variety of clinical manifestations and severity classified as visceral (VL), cutaneous (CL), mucosal (MCL), diffuse (CDL), disseminated (DL), and post-kala-azar leishmaniasis (WHO, 2010). Parasite persistence after healing is associated with the recurrence of lesions, dissemination and the worsening of clinical manifestations. The advent of the most serious forms of the disease is associated with intrinsic parasite features and the conditions of the immune system of the host.

Leishmania amazonensis is associated with CL, CDL, DL and some cases of VL (Barral et al., 1991; Souza et al., 2018). Amastigote forms of this species rely on the exposure of phosphatidylserine (PS) to be recognized and internalized by host cells, in a mechanism called apoptotic mimicry, which is the use, by viable pathogens, of apoptotic cell signals that mediate efferocytosis (Wanderley et al., 2006). PS recognition by macrophages mediates endocytosis and the suppression of the cellular inflammatory response through the stimulation of anti-inflammatory cytokines and lipid mediators (Vance and Steenbergen, 2005). PS exposure at the surface of *L. amazonensis* amastigotes correlates with disease severity in mouse models and in CDL patients (França-Costa et al., 2012; Wanderley et al., 2006), but the role of this phospholipid in parasite dissemination is poorly understood.

Intradermal infection of the ear is, a widely used model of *in vivo* *Leishmania* infection that mimics natural infection. (Mortatti and Henriques, 1990). In BALB/c mice, which are susceptible to *L. amazonensis* infection, ear lesions tend to develop, and the parasites migrate to the draining lymph nodes after approximately five weeks of infection. However, parasite migration occurs discreetly and with a relatively low parasite load (Courret et al., 2003). Models that aim the dissemination of *Leishmania* species that are primarily involved in CL cases are scarce and could provide insights of cutaneous clinical manifestations related to disease complications.

Thus, we established a model of systemic *L. amazonensis* infection and evaluated the visceralization, immune response and the appearance of distal skin lesions in mice treated with antagonist anti-PS antibodies. For that, we inoculated BALB/c mice intravenously with 1×10^6 amastigotes and the parasite load in several organs was determined weekly. Parasites were detected in the bone marrow in the first week post infection and during the course of the next 12 weeks. Then parasite disseminated to the spleen (7 weeks post infection - PI), inguinal and mesenteric lymph nodes (8 weeks PI) and lastly to the liver (9 weeks PI). All organs sustained infection until 12 weeks PI (Fig. 1A), when the experiment was interrupted. This data indicates that the intravenous inoculation of viable amastigotes can be used as a tool to investigate the factors that allow these parasites to establish in internal organs. This pattern of initial bone marrow

parasitism is consistent with previous studies on the visceralization of dermatropic species, where the bone marrow and spleen are the sites where parasites persist for the longest time during chronic infections (Abreu-Silva et al., 2004). In infections caused by *L. braziliensis*, the main species related to CML, it is possible to find parasites in the spleen, bone marrow and lymph nodes after 6 weeks of infection. In contrast, for viscerotropic species, a different pattern was observed, where the liver was the first organ to be infected, followed by the spleen and bone marrow, where the infection becomes chronic (Faleiro et al., 2014). The exact mechanism by which the parasite manages to penetrate the bone marrow is still unknown. Bone marrow does not have lymphatic vessels, but is rich in sinusoidal blood vessels. These vessels have a unique structure where blood cells can adhere to their capillary walls and migrate to the bone marrow compartment. It is believed that this specialized vascular system may be a possible pathway that infected cells use to enter the bone marrow, carrying the parasite (Floro e Silva et al., 2022). This is especially important because we found that lymph node parasitism occurs only 6 weeks after the bone marrow (Fig. 1A), indicating that amastigote spreading could be related to this route.

To investigate the role of PS in the dissemination of *L. amazonensis* amastigotes, we used anti-PS full antibody, therefore named 11:31, or their Fab purified portions. These antibodies are being evaluated regarding their role in etiological agents that make use of PS to modulate host immunity (Thomas and Thorpe, 2017). We performed an intravenous infection in BALB/c mice using amastigotes previously treated with anti-PS 11:31 or Fab antibodies. After a period of 4 weeks, we started treating the mice with anti-PS antibodies three times a week, in a course of 3 weeks. At 12 weeks post infection we observed a significant reduction on the splenic parasite loads in the Fab-treated group compared to the PBS-treated group (Fig. 1C). Although not statistically significant, there was an noticeable decrease in the parasite load in the liver of anti-PS Fab-treated mice (Fig. 1E) and in the lymph nodes of mice treated with both forms of anti-PS antibodies (Fig 1D). The evaluation of PS interference in *L. amazonensis* infection was firstly documented by Wanderley et al. (2013) in dermal lesions of C57BL/6 mice, where the mch1N11 anti-PS antibody reduced the parasite load in the ears, although it did not completely eliminate the infection (Wanderley et al., 2013). In the present study, we evaluated the interference of PGN632 antibodies (clone 11:31), a second generation of anti-PS antibodies that binds to PS independently of β 2-GPI (Moody et al., 2010). Therefore, the reduction in parasite load observed in spleens treated with the Fab portion antibody paves the way for a more detailed investigation into the importance of PS in this context, given the importance of the spleen for the establishment and chronification of the infection. PS exposure on intracellular parasites is a mechanism that was denominated as apoptotic mimicry (Balanco et al., 2001) and plays a role in diverse infections such as by *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium* spp. (Wanderley et al., 2020). It is clear that

L. amazonensis parasites make use of this molecule to be endocytosed by macrophages, although this is not the case for dendritic cells (Wanderley et al., 2013, 2006). Recognition of PS in apoptotic cells or during *L. amazonensis* infections generally results in the induction of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β , by phagocytic cells, leading to a marked decrease in nitric oxide production (Balanco et al., 2001; Freire-de-Lima et al., 2006; Wanderley et al., 2006). Since we observed a decrease in spleen infection on mice treated with anti-PS antibody (Fig. 1C), we analyzed the production of cytokines by splenocytes. For that, total splenocytes were stimulated *in vitro* with soluble leishmanial antigens and production of intracellular cytokines was evaluated by flow cytometry after addition of phorbol-myristate-acetate and monensin. We observed a significant decrease in the production of IL-10 and TGF β by CD4+ T cells (Fig. 2 A and B) in mice treated with Fab anti-PS antibody and there were no significant differences in the production of IL-4 by CD4+ T cells (Fig. 2C) or TNF α by myeloid cells (Fig. 2D). We did not observe significant production of IL-10, TGF β and nitric oxide by myeloid cells (data not shown). Previous data indicate that PS recognition leads to the activation of an anti-inflammatory phenotype in macrophages and dendritic cells (Balanco et al., 2001; Wanderley et al., 2013). It is possible that we could not observe this effect *in vivo*, due to the method used to quantify those cytokines. However, this is the first evidence regarding the effect of PS recognition on amastigotes in the differentiation of CD4+ T cells during the infection. Mice treatment with mch1N11 anti-PS antibody induced the increase of IL-1 β , IL-2 and CXCL1 in restimulated lymph node cells, but with no observable alterations in TGF β or IL-10 production (Wanderley et al., 2013). Although the increase in overall inflammatory response is clear when using mch1N11 anti-PS antibody, it is possible that the independence of β 2-GPI for PGN632 antibodies to bind the PS molecule lead to a more potent effect. In infections with *L. donovani*, IL-10 favors susceptibility to infection in the spleen, and in the absence of IL-10, the T cell response is quickly modulated to a Th1 response, capable of eliminating the parasite (MI et al., 2001). Therefore, we can relate the decreased parasite loads found in the spleen with the reduction in the anti-inflammatory response induced by PS. CD4+ T cells that produce IL-10 and TGF β possess a characteristic regulatory phenotype. In *L. infantum* infections regulatory T cells producing IL-10 and TGF β promote parasite persistence and chronification (Rodrigues et al., 2009). Despite the fact that these cells restrain *L. amazonensis* cutaneous infections in mouse models (Ji et al., 2005), it is possible that they play a different role for the establishment of the disseminated disease. In any case, the determination of the populations and the role of regulatory T cells involved in *L. amazonensis* dissemination requires further studies.

At 12 weeks post-infection, we evaluated the appearance of macroscopic lesions in mice, which indicates parasite dissemination. For that we devised a scoring system based on the presence of lesions in the tail or paws and whether these lesions were of small, medium or large size (Fig. 3C). It was observed that anti-PS Fab antibody

treatment induced a decrease in size and dissemination scores (Fig. 3A and B). Although anti-PS full antibody induced some extent of protection from dissemination, it was not statistically significant (Fig. 3A and B). The appearance of lesions distant from the inoculation site has been associated with the parasite's ability to disseminate (Quiñonez-Díaz et al., 2012). The presence of lesions is related to an active inflammatory response (Travi et al., 1996), and in intravenous infections, the development of metastatic lesions is common (Roberts et al., 1989). When we evaluate the distribution of macroscopic lesions, we observe that the parasite is spreading throughout the organism, and is promoting cutaneous infections due to its natural tropism. It is still elusive whether the effect of anti-PS Fab antibody is related to the decrease in the establishment of splenic parasitism or due to the blockade of macrophage infections in the skin.

Our data indicate that the 11:31 anti-PS antibody is able to restrain systemic infections, mainly the Fab portion. It is possible that the full anti-PS antibody is not so effective due to a cross reactivity with Fc receptors, as this is one of the main routes for amastigote entry in host cells (Kima et al., 2000). The effect of anti-PS antibodies in this setting is related to a decrease in regulatory cytokines produced in the spleen that reflects a diminished parasitism in this organ and in distal skin sites. We suggest that PS exposure, which is a marked feature of *L. amazonensis* amastigotes, is relevant to understand the ability of this parasite species to cause a wide range of clinical and severe manifestations of leishmaniasis.

Funding: This work was supported by the CAPES/Brazil [grant number 88882.449607/2019-01]; and Fundação de Apoio à Pesquisa do Rio de Janeiro [grant number E-26/210.118/2022].

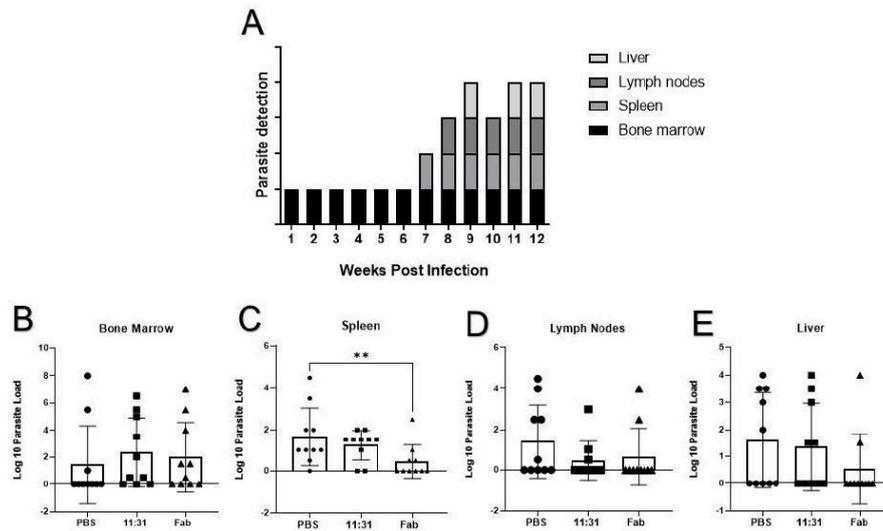


Figure 1- Anti-PS antibodies reduce liver parasitism in systemic infection with *L. amazonensis* amastigotes. BALB/c mice were intravenously infected with 1×10^6 amastigotes in 100 μ l of PBS. (A) Infection in the spleen, liver, bone marrow, mesenteric and peritoneal lymph nodes after the infection was monitored in the course of 12 weeks by limiting dilution assay, after 15 days of axenic culture. Infected mice treated with anti-PS full antibody (11:31) or their Fab portions. Additionally, mice were treated with 100 μ g of full anti-PS antibody (11:31) or their Fab portions. Treatment was administered intraperitoneally, 3 times per week from week 4 to week 7 post infection. At 12 weeks post infection, parasite loads were determined by a limiting dilution assay in the (B) bone marrow, (C) spleen, (D) mesenteric and inguinal lymph nodes and (E) liver. Data is shown as mean and SD of each group, containing 10 mice. Variance analysis was made by a two-way anova test with Kruskal-Wallis post test. ** $p < 0.01$.

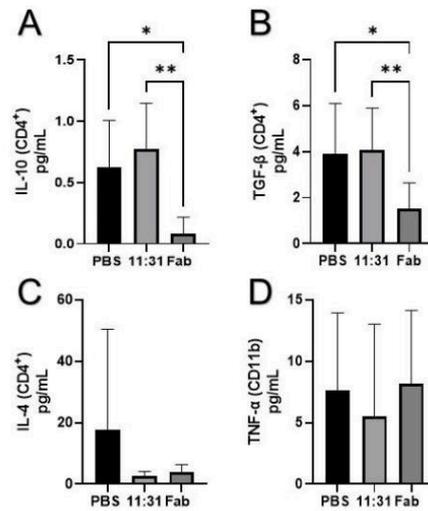


Figure 2 – Anti-PS antibody treatment decreased the production of regulatory cytokines by CD4⁺ T cells in systemically infected mice. BALB/c mice were infected intravenously with 1×10^6 amastigotes treated with anti-PS full antibody (11:31) or their Fab portions. Additionally, mice were treated with 100 μ g of full anti-PS antibody (11:31) or their Fab portions. Treatment was administered intraperitoneally, 3 times per week from week 4 to week 7 post infection. At 12 weeks post infection, spleen cells were collected and maintained in culture with soluble leishmanial antigens for 3 days. In the last 6 hours phorbol-myristate-acetate (PMA) and monensin was added to the cultures to evaluate the production of intracellular cytokines by flow cytometry. The expression of cytokines (A) IL-10, (B) TGF β , (C) IL-4 was assessed in CD4⁺ T cells and (D) TNF- α in myeloid CD11b⁺ cells. Variance analysis was made by a two-way anova test with Kruskal-Wallis post test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

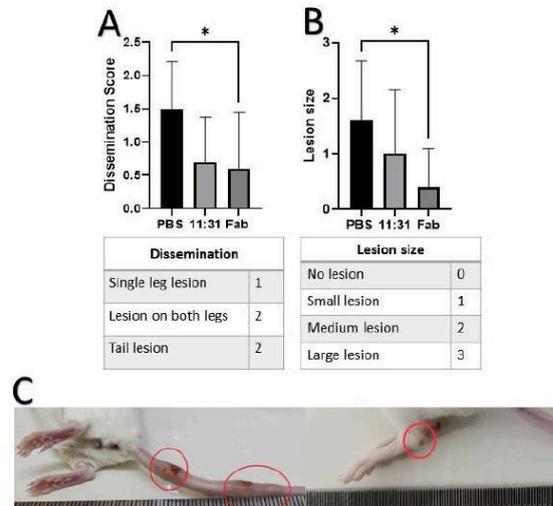
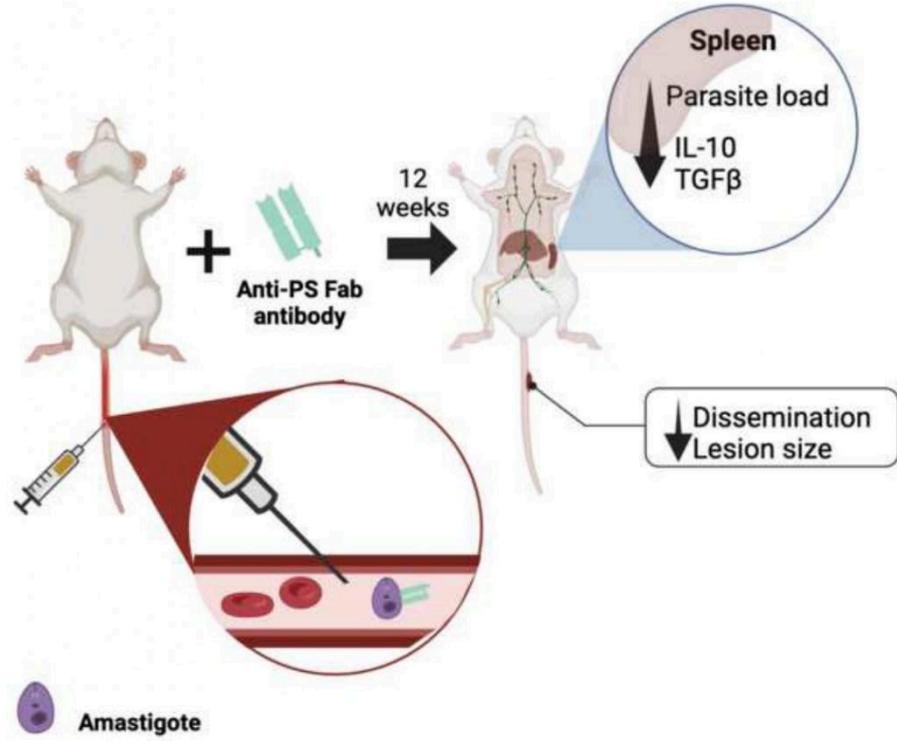


Figure 3 – Anti-PS antibody treatment protected systemically infected mice from the development of skin disseminated lesions. BALB/c mice were infected intravenously with 1×10^6 amastigotes treated with anti-PS full antibody (11:31) or their Fab portions. Additionally, mice were treated with $100 \mu\text{g}$ of full anti-PS antibody (11:31) or their Fab portions. Treatment was administered intraperitoneally, 3 times per week from week 4 to week 7 post infection. At 12 weeks post infection the development of skin lesions (C) was assessed macroscopically. The severity of the disseminated infection was quantified based on a scoring system of (A) lesion sites and (B) size of the lesions. Variance analysis was made by a two-way anova test with Kruskal-Wallis post test. * $p < 0.05$.



References

- Abreu-Silva, A.L., Calabrese, K.S., Cupolillo, S.M.N., Cardoso, F.O., Souza, C.S.F., Gonçalves da Costa, S.C., 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania amazonensis*) in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.002>
- Balanco, J.M. de F., Moreira, M.E.C., Bonomo, A., Bozza, P.T., Amarante-Mendes, G., Pirmez, C., Barcinski, M.A., 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Current Biology* 11, 1870–1873. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00563-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00563-2)
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi Júnior, G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., Ribeiro de Jesus, A., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44, 536–546. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>
- Courret, N., Lang, T., Milon, G., Antoine, J.C., 2003. Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J Parasitol* 33, 1373–1383. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(03\)00179-6](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(03)00179-6)
- Faleiro, R.J., Kumar, R., Hafner, L.M., Engwerda, C.R., 2014. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8, e2914. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914>
- Floro e Silva, M., Roque, G.A.S., Machado, D. de A., Rocha, F.J.S., Giorgio, S., 2022. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* replicates in mouse bone marrow. *Acta Tropica* 230, 106407. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106407>
- França-Costa, J., Wanderley, J.L.M., Deolindo, P., Zarattini, J.B., Costa, J., Soong, L., Barcinski, M.A., Barral, A., Borges, V.M., 2012. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. *PLOS ONE* 7, e36595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036595>
- Freire-de-Lima, C.G., Xiao, Y.Q., Gardai, S.J., Bratton, D.L., Schiemann, W.P., Henson, P.M., 2006. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem* 281, 38376–38384. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605146200>
- Ji, J., Masterson, J., Sun, J., Soong, L., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol* 174, 7147–7153. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7147>
- Kima, P.E., Constant, S.L., Hannum, L., Colmenares, M., Lee, K.S., Haberman, A.M., Shlomchik, M.J., McMahon-Pratt, D., 2000. Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 191, 1063–1068. <https://doi.org/10.1084/jem.191.6.1063>
- Mi, M., U, W., En, V., Ca, H., Jp, F., 2001. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. *European journal of immunology* 31. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(2001010\)31:10%60;2848::aid-immu2848%62;3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1521-4141(2001010)31:10%60;2848::aid-immu2848%62;3.0.co;2-t)
- Moody, M.A., Liao, H.-X., Alam, S.M., Scarce, R.M., Plonk, M.K., Kozink, D.M., Drinker, M.S., Zhang, R., Xia, S.-M., Sutherland, L.L., Tomaras, G.D., Giles, I.P., Kappes, J.C., Ochsenbauer-Jambor, C., Edmonds, T.G., Soares, M., Barbero, G., Forthal, D.N., Landucci, G., Chang, C., King, S.W., Kavlie, A., Denny, T.N., Hwang, K.-K., Chen, P.P., Thorpe, P.E., Montefiori, D.C., Haynes, B.F., 2010. Anti-phospholipid human monoclonal

- antibodies inhibit CCR5-tropic HIV-1 and induce β -chemokines. *J Exp Med* 207, 763–776. <https://doi.org/10.1084/jem.20091281>
- Mortatti, R.C., Henriques, A., 1990. Experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania amazonensis*: course of fast-growth infection in the mouse ear. *Parasitol Res* 76, 729–730. <https://doi.org/10.1007/BF00931097>
- Quiñonez-Díaz, L., Mancilla-Ramírez, J., Avila-García, M., Ortiz-Avalos, J., Berron, A., González, S., Paredes, Y., Galindo-Sevilla, N., 2012. Effect of Ambient Temperature on the Clinical Manifestations of Experimental Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in a Rodent Model. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12, 851–860. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0844>
- Roberts, M., Alexander, J., Blackwell, J.M., 1989. Influence of Lsh, H-2, and an H-11-linked gene on visceralization and metastasis associated with *Leishmania mexicana* infection in mice. *Infect Immun* 57, 875–881.
- Rodrigues, O.R., Marques, C., Soares-Clemente, M., Ferronha, M.H., Santos-Gomes, G.M., 2009. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.07.001>
- Ruiz-Postigo, J.A., Jain, S., Maia-Elkhoury, A.N., Warusavithana, S., Osman, M., Lin, Z., Beshah, A., Kim, S., 2022. Global leishmaniasis surveillance: 2021, assessing the impact of the COVID-19 pandemic. *WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD*.
- Souza, C. da S.F. de, Calabrese, K. da S., Silva, A.L.A., Carvalho, L.O.P., Cardoso, F. de O., Dorval, M.E.M.C., Oshiro, E.T., Quaresma, P.F., Gontijo, C.M.F., Pacheco, R. da S., Rossi, M.I.D., Costa, S.C.G. da, Valle, T.Z. do, 2018. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. <https://doi.org/10.14670/HH-11-965>
- Thomas, J.M., Thorpe, P.E., 2017. Protective Effect of Anti-Phosphatidylserine Antibody in a Guinea Pig Model of Advanced Hemorrhagic Arenavirus Infection. *Open Microbiol J* 11, 303–315. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010303>
- Travi, B.L., Osorio, Y., Saravia, N.G., 1996. The inflammatory response promotes cutaneous metastasis in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. *J Parasitol* 82, 454–457.
- Vance, J.E., Steenbergen, R., 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Progress in Lipid Research* 44, 207–234. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2005.05.001>
- Wanderley, J.L.M., DaMatta, R.A., Barcinski, M.A., 2020. Apoptotic mimicry as a strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. *Cell Commun Signal* 18, 10. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0482-8>
- Wanderley, J.L.M., Moreira, M.E.C., Benjamin, A., Bonomo, A.C., Barcinski, M.A., 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* 176, 1834–1839. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1834>
- Wanderley, J.L.M., Thorpe, P.E., Barcinski, M.A., Soong, L., 2013. Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates *in vivo* infection and dendritic cell function. *Parasite Immunol* 35, 109–119. <https://doi.org/10.1111/pim.12019>
- WHO Expert Committee on the Control of the Leishmaniasis, World Health Organization, 2010. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010, WHO technical report series ; 949.

REFERÊNCIAS

- ABI ABDALLAH, Delbert S. *et al.* Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. **International Immunology**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 317–326, 2011.
- ABREU-SILVA, A. L. *et al.* Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 121, n. 3–4, p. 179–187, 2004.
- AEBISCHER, T. Recurrent cutaneous leishmaniasis: a role for persistent parasites?. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 25–28, 1994.
- AFONSO, L C; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 61, n. 7, p. 2952–2959, 1993.
- AGA, Eresso *et al.* Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 169, n. 2, p. 898–905, 2002.
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AKOPYANTS, Natalia S. *et al.* Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 324, n. 5924, p. 265–268, 2009.
- ALBORZI, Abdolvahab *et al.* First molecular-based detection of mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in Iran. **Journal of Infection in Developing Countries**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 413–416, 2013.
- ALEIXO, J. A. *et al.* Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 79–82, 2006.
- ALMEIDA, T. F. *et al.* *Leishmania amazonensis* fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 34, n. 10, p. 492–498, 2012.
- ALVES, Emanuele Amorim; GUIMARÃES, Anna Christina Rosa. Cultivo celular. In: [S. l.]: EPSJV, 2010. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13410>. Acesso em: 21 out. 2023.
- AMARA, Ali; MERCER, Jason. Viral apoptotic mimicry. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 461–469, 2015.
- ARANDJELOVIC, Sanja; RAVICHANDRAN, Kodi S. Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 16, n. 9, p. 907–917, 2015.
- ARAUJO, Vanessa Carneiro Pereira *et al.* Hairless mice as an experimental model of infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 157, p. 138–144, 2015.
- BACELLAR, Olívia *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
- BADARÓ, R. *et al.* Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reverses neutropenia and reduces secondary infections in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 170, n. 2, p. 413–418, 1994.
- BAHRAMI, Fariborz; HARANDI, Ali M.; RAFATI, Sima. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, 2018.
- BALANCO, José Mario de Freitas *et al.* Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, [s. l.], v. 11, n. 23, p. 1870–1873, 2001.

BARRAL, A. *et al.* Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.

BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 256–259, 1995.

BELKAID, Y. *et al.* A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged “silent” phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 165, n. 2, p. 969–977, 2000.

BELKAID, Y. *et al.* The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 2001.

BENNIS, Issam *et al.* “The mosquitoes that destroy your face”. Social impact of Cutaneous Leishmaniasis in South-eastern Morocco, A qualitative study. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. e0189906, 2017.

BIRGE, R. B. *et al.* Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. **Cell Death and Differentiation**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 962–978, 2016.

BITTENCOURT, A. L. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 32, n. 11, p. 802–805, 1993.

BIXEL, M. Gabriele *et al.* Flow Dynamics and HSPC Homing in Bone Marrow Microvessels. **Cell Reports**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 1804–1816, 2017.

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

BOGDAN, Christian *et al.* Fibroblasts as Host Cells in Latent Leishmaniosis. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BOGGIATTO, Paola Mercedes *et al.* Altered dendritic cell phenotype in response to *Leishmania amazonensis* amastigote infection is mediated by MAP kinase, ERK. **The American Journal of Pathology**, [s. l.], v. 174, n. 5, p. 1818–1826, 2009.

BOMFIM, Glória *et al.* Variation of Cytokine Patterns Related to Therapeutic Response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 188–194, 1996.

BOTTREL, R. L. A. *et al.* Flow Cytometric Determination of Cellular Sources and Frequencies of Key Cytokine-Producing Lymphocytes Directed against Recombinant LACK and Soluble *Leishmania* Antigen in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 3232–3239, 2001.

BRELSTAFF, Jack *et al.* Living Neurons with Tau Filaments Aberrantly Expose Phosphatidylserine and Are Phagocytosed by Microglia. **Cell reports**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1939-1948.e4, 2018.

BRUN, R.; BERENS, R. L.; KRASSNER, S. M. Inhibition of *Leishmania donovani* transformation by hamster spleen homogenates and active human lymphocytes. **Nature**, [s. l.], v. 262, n. 5570, p. 689–691, 1976.

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

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

CABRERA, M. *et al.* Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 182, n. 5, p. 1259–1264, 1995.

CAMPOS, Marliane Batista *et al.* Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania(V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PLoS One**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e0194383, 2018.

CARLSEN, Eric D. *et al.* *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 81, n. 11, p. 3966–3974, 2013.

CARNEIRO, Matheus B. H. *et al.* NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 200, n. 1, p. 196–208, 2018.

CARNEIRO, Matheus B.; PETERS, Nathan C. The Paradox of a Phagosomal Lifestyle: How Innate Host Cell-*Leishmania amazonensis* Interactions Lead to a Progressive Chronic Disease. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.728848>. Acesso em: 27 set. 2023.

CAROTENUTO, Alessandro *et al.* Clinical Diagnosis and Management of Mucosal Leishmaniasis in the Context of a Global Pandemic: A Case Report. **Cureus**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. e30586, 2022.

CARVALHAL, Djalma G. F. *et al.* The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 107, n. 3–4, p. 189–199, 2004.

CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CASTELLUCCI, Lea *et al.* IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 194, n. 4, p. 519–527, 2006.

CAVALCANTE-COSTA, Victor Soares *et al.* *Leishmania amazonensis* hijacks host cell lysosomes involved in plasma membrane repair to induce invasion in fibroblasts. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 132, n. 6, p. jcs226183, 2019.

CHAGAS, Andrezza C. *et al.* Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases *Leishmania* Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits X11a Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. e1003923, 2014.

CHANYALEW, Menberework *et al.* Enhanced activation of blood neutrophils and monocytes in patients with Ethiopian localized cutaneous leishmaniasis in response to *Leishmania aethiops* Neutrophil activation in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 220, p. 105967, 2021.

CHAPPUIS, François *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews. Microbiology**, [s. l.], v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

CHARMOY, Mélanie *et al.* The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**, [s. l.], v. 2010, p. 719361, 2010.

CHRISTENSEN, Stephen M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. e0007152, 2019.

COBO, F. *et al.* The histological spectrum of non-granulomatous localized mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, [s. l.], v. 101, n. 8, p. 689–694, 2007.

COELHO, Zirlane Castelo B. *et al.* In vitro initial immune response against *Leishmania amazonensis* infection is characterized by an increased production of IL-10 and IL-13. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 14, p. 476–482, 2010.

COIL, David A; MILLER, A Dusty. Phosphatidylserine treatment relieves the block to retrovirus infection of cells expressing glycosylated virus receptors. **Retrovirology**, [s. l.], v. 2, p. 49, 2005.

COLOTTA, F. *et al.* Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. **Blood**, [s. l.], v. 80, n. 8, p. 2012–2020, 1992.

CORRÊA SOARES, Gustavo Henrique *et al.* Case Report: Coinfection by *Leishmania amazonensis* and HIV in a Brazilian Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Patient. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 1076–1080, 2020.

COSTA, Jackson Mauricio Lopes *et al.* Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. [s. l.], 2009.

COURRET, N. *et al.* Kinetics of the intracellular differentiation of *Leishmania amazonensis* and internalization of host MHC molecules by the intermediate parasite stages. **Parasitology**, [s. l.], v. 122, n. Pt 3, p. 263–279, 2001.

COURRET, Nathalie *et al.* Intradermal inoculations of low doses of *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 33, n. 12, p. 1373–1383, 2003.

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

CUPOLILLO, E. *et al.* A revised classification for *Leishmania* and Endotrypanum. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 142–144, 2000.

DA FONSECA-MARTINS, Alessandra M. *et al.* Leishmania Parasites Drive PD-L1 Expression in Mice and Human Neutrophils With Suppressor Capacity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, p. 598943, 2021.

DA SILVA MARQUES, Patrícia *et al.* Eosinophils increase macrophage ability to control intracellular *Leishmania amazonensis* infection via PGD2 paracrine activity in vitro. **Cellular Immunology**, [s. l.], v. 363, p. 104316, 2021.

DABIRI, S. *et al.* Cytologic features of “dry-type” cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Cytopathology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 182–185, 1998.

DA-CRUZ, Alda Maria *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 251–256, 2002.

DAMATTA, Renato A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* exposes phosphatidylserine as an evasion mechanism. **FEMS microbiology letters**, [s. l.], v. 266, n. 1, p. 29–33, 2007.

DAVID, C. *et al.* Fifteen years of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia: a retrospective study. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 7–9, 1993.

DAVIDSON, Sarah *et al.* Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 704–717, 2021.

DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra *et al.* *Leishmania* infection inhibits macrophage motility by altering F-actin dynamics and the expression of adhesion complex proteins. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 19, n. 3, 2017.

DE OLIVEIRA CAMERA, Patricia *et al.* Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 100, n. 12, p. 1112–1117, 2006.

DE OLIVEIRA, João Paulo C. *et al.* Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. **Kinetoplastid Biology and Disease**, [s. l.], v. 6, p. 5, 2007.

DE ROSSELL, R. A. *et al.* Is leishmaniasis ever cured?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 86, n. 3, p. 251–253, 1992.

DEDET, J. P. *et al.* Uptake and killing of *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes by human skin fibroblasts. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 35–44, 1983.

DEY, Ayan; SINGH, Sarman. Genetic heterogeneity among visceral and post-Kala-Azar dermal leishmaniasis strains from eastern India. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 219–222, 2007.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EMOTO, Kazuo; UMEDA, Masato. Apoptosis by phosphatidylserine in mammalian cells. **Sub-Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 36, p. 61–77, 2002.

ESPAÑOL, A. J. *et al.* Nitric oxide synthase 1 and cyclooxygenase-2 enzymes are targets of muscarinic activation in normal and inflamed NIH3T3 cells. **Inflammation Research**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 227–238, 2010.

FADOK, V A *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.

FALCÃO, Sarah De Athayde Couto *et al.* *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and Similarities to Evade the Innate Immune System. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 7, 2016.

FALEIRO, Rebecca J. *et al.* Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FARIA, Daniela R. *et al.* Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.

FARIAS, Luis Henrique S. *et al.* Phosphatidylserine Exposure and Surface Sugars in Two *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strains Involved in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 207, n. 3, p. 537–543, 2013.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, Edith A. *et al.* Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with *Leishmania mexicana*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. e0004570, 2016.

FIGUEIRA, Cláudio Pereira *et al.* *Leishmania* infection modulates beta-1 integrin activation and alters the kinetics of monocyte spreading over fibronectin. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 12862, 2015.

FLORO E SILVA, Marina *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* replicates in mouse bone marrow. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 230, p. 106407, 2022.

FRANÇA-COSTA, Jaqueline *et al.* Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 211, n. 3, p. 426–435, 2015.

FRANÇA-COSTA, Jaqueline *et al.* Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. e36595, 2012.

FREIRE-DE-LIMA, Celio G. *et al.* Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 281, n. 50, p. 38376–38384, 2006.

FUTOSI, Krisztina; FODOR, Szabina; MÓCSAI, Attila. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **International Immunopharmacology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 638–650, 2013.

GANGNEUX, Jean-Pierre *et al.* Recurrent American Cutaneous Leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1436–1438, 2007.

GANGULY, Sudipto *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis--an overview. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 49, n. 8, p. 921–931, 2010.

GARNHAM, P. C. C. The genus *Leishmania*. **Bulletin of the World Health**

Organization, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 477–489, 1971.

GHALIB, H. W. *et al.* Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 92, n. 1, p. 324–329, 1993.

GHOTLOO, Somayeh *et al.* Comparison of Parasite Burden Using Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay and Limiting Dilution Assay in *Leishmania major* Infected Mouse. **Iranian Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 571–576, 2015.

GIRAUD, E. *et al.* Promastigote secretory gel from natural and unnatural sand fly vectors exacerbate *Leishmania major* and *Leishmania tropica* cutaneous leishmaniasis in mice. **Parasitology**, [s. l.], v. 146, n. 14, p. 1796–1802, 2019.

GOMES, C. M. *et al.* The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 109–114, 2015.

GOMES, Clayson M. *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes from patients with mucosal leishmaniasis have increased ability to disseminate and are controlled by nitric oxide at the early stage of murine infection. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 74, n. 4, p. ftw023, 2016.

GOTO, Hiro; LAULETTA LINDOSO, José Angelo. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José Angelo Lauletta. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GREENLEE-WACKER, Mallary C. Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 273, n. 1, p. 357–370, 2016.

GUERRA, Jorge Augusto de Oliveira *et al.* Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. e980, 2011.

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

GUIMARÃES-PINTO, Kamila *et al.* *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Cellular Stress Response and Senescence-Like Phenotype in Murine Fibroblasts. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 9, p. 1569, 2018.

HÄCKER, G. The morphology of apoptosis. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 301, n. 1, p. 5–17, 2000.

HALDAR, Arun Kumar *et al.* Guanylate Binding Proteins Restrict *Leishmania donovani* Growth in Nonphagocytic Cells Independent of Parasitophorous Vacuolar Targeting. **mBio**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. e01464-20, 2020.

HALLÉ, Maxime *et al.* The *Leishmania* Surface Protease GP63 Cleaves Multiple Intracellular Proteins and Actively Participates in p38 Mitogen-activated Protein Kinase Inactivation. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 284, n. 11, p. 6893–6908, 2009.

HASHIGUCHI, Yoshihisa *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 2, 2016.

HERMIDA, Micely D. R. *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs dendritic cell migration from the inflammatory site to the draining lymph node. **BMC infectious diseases**, [s. l.], v. 14, p. 450, 2014.

HERVÁS RODRÍGUEZ, J. *et al.* *Leishmania* infection of canine skin fibroblasts in vivo. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 469–473, 1996.

HESPANHOL, Renata C. *et al.* The expression of mannose receptors in skin fibroblast and their involvement in *Leishmania (L.) amazonensis* invasion. **The Journal of**

Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 35–44, 2005.

HOFFMANN, J. L. *et al.* Experimental infection with *Leishmania chagasi* in immunosuppressed Balb/c mice: cytokines and parasite burdens. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 15, p. 391–410, 2009.

HORTA, Maria Fátima *et al.* Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, [s. l.], v. 2012, p. 203818, 2012.

HOSAIN, Md Zahangir *et al.* Synergy between phenotypic modulation and ROS neutralization in reduction of inflammatory response of hypoxic microglia by using phosphatidylserine and antioxidant containing liposomes. **Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 290–302, 2016.

HUGHES, Catherine E.; NIBBS, Robert J. B. A guide to chemokines and their receptors. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 285, n. 16, p. 2944–2971, 2018.

HURRELL, Benjamin P. *et al.* Rapid Sequestration of *Leishmania mexicana* by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. e1004929, 2015.

HURRELL, Benjamin P.; REGLI, Ivo B.; TACCHINI-COTTIER, Fabienne. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016.

IIDA, Yuuki *et al.* Phosphatidylserine-specific phospholipase A1 (PS-PLA1) expression in colorectal cancer correlates with tumor invasion and hematogenous metastasis. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 1459–1464, 2015.

JAIMES, Jesús Rojas. Severe mucosal leishmaniasis with torpid and fatal evolution. **Clinical Case Reports**, [s. l.], v. 10, n. 8, p. e6220, 2022.

Jl, Jiexiang; SUN, Jiaren; SOONG, Lynn. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 4278–4288, 2003.

KARIMKHANI, Chante *et al.* Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 584–591, 2016.

KOBAYASHI, Scott D.; MALACHOWA, Natalia; DELEO, Frank R. Influence of Microbes on Neutrophil Life and Death. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, 2017.

LASKAY, Tamás; VAN ZANDBERGEN, Ger; SOLBACH, Werner. Neutrophil granulocytes--Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LAURENT, M.; STEINERT, M. Electron microscopy of kinetoplastic DNA from *Trypanosoma mega*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 419–424, 1970.

LEITE-SILVA, Jéssica *et al.* Is There Any Difference in the In Situ Immune Response in Active Localized Cutaneous Leishmaniasis That Respond Well or Poorly to Meglumine Antimoniate Treatment or Spontaneously Heal?. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. 1631, 2023.

LEON, Leonor Laura Pinto *et al.* Antigenic differences among *Leishmania amazonensis* isolates and their relationship with distinct clinical forms of the disease. [s. l.], 1992.

LINDOSO, José Angelo Lauletta *et al.* Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS (Auckland, N.Z.)**, [s. l.], v. 8, p. 147–156, 2016.

LORÍA-CERVERA, Elsy Nalleli; ANDRADE-NARVÁEZ, Fernando José. ANIMAL MODELS FOR THE STUDY OF LEISHMANIASIS IMMUNOLOGY. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 56, p. 1–11, 2014.

LUZ, Yasmin *et al.* *Leishmania* infection alters macrophage and dendritic cell migration in a three-dimensional environment. **Frontiers in Cell and Developmental**

Biology, [s. l.], v. 11, p. 1206049, 2023.

MACHADO, Gustavo Uzêda; PRATES, Fernanda Ventin; MACHADO, Paulo Roberto Lima. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 94, p. 09–16, 2019.

MACHADO, Paulo R. *et al.* Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MACHADO-COELHO, George L. L. *et al.* Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 55–61, 2005.

MAEDA, Kota *et al.* Hepatomegaly Associated with Non-Obstructive Sinusoidal Dilatation in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1356, 2021.

MANDELL, Michael A.; BEVERLEY, Stephen M. Continual renewal and replication of persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 114, n. 5, p. E801–E810, 2017.

MANTOVANI, Alberto *et al.* Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 519–531, 2011.

MAROVICH, M. A. *et al.* Leishmaniasis recidivans recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1076–1079, 2001.

MARSDEN, Philip Davis. MUCOSAL LEISHMANIASIS DUE TO LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS L(V)b IN TRÊS BRAÇOS, BAHIA-BRAZIL. [s. l.],

MARTINEZ, Pedro A.; PETERSEN, Christine A. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. **Immunologic Research**, [s. l.], v. 59, n. 1–3, p. 153–165, 2014.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, María *et al.* *Leishmania* Hijacks Myeloid Cells for Immune Escape. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 883, 2018.

MARTÍNEZ-VALENCIA, Alvaro J. *et al.* Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e0005713, 2017.

MCFARLANE, Emma *et al.* Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 532–541, 2008.

MCGWIRE, Bradford S. *et al.* Extracellular release of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-linked *Leishmania* surface metalloprotease, gp63, is independent of GPI phospholipolysis: implications for parasite virulence. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 11, p. 8802–8809, 2002.

MENDES, Bruno *et al.* Causative Agents of American Tegumentary Leishmaniasis Are Able to Infect 3T3-L1 Adipocytes In Vitro. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 824494, 2022.

MENDONÇA, Mitzi G. *et al.* Persistence of *Leishmania* Parasites in Scars after Clinical Cure of American Cutaneous Leishmaniasis: Is There a Sterile Cure?. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 2004.

MITTAL, Manish *et al.* Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury. **Antioxidants & Redox Signaling**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 1126–1167, 2014.

ML, Murphy *et al.* IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European journal of immunology**, [s. l.], v. 31, n. 10, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11592059/>. Acesso em: 24 out. 2023.

MOMENI, A. Z.; AMINJAVAHARI, M. Treatment of recurrent cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 129–133, 1995.

MOREIRA, Diana *et al.* Impact of continuous axenic cultivation in *Leishmania infantum* virulence. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. e1469, 2012.

MORGADO, Fernanda Nazaré *et al.* Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions?. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. e0133063, 2015.

MORTATTI, R. C.; HENRIQUES, A. Experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania amazonensis*: course of fast-growth infection in the mouse ear. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 76, n. 8, p. 729–730, 1990.

MOSSER, D. M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, [s. l.], v. 115 Suppl, p. S9-23, 1997.

MURRAY, Henry W. *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

NAUSEEF, William M.; BORREGAARD, Niels. Neutrophils at work. **Nature Immunology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 602–611, 2014.

NÉMETH, Tamás; MÓCSAI, Attila. Feedback Amplification of Neutrophil Function. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 412–424, 2016.

NÉMETH, Tamás; SPERANDIO, Markus; MÓCSAI, Attila. Neutrophils as emerging therapeutic targets. **Nature Reviews. Drug Discovery**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 253–275, 2020.

NGUYEN, Giang T.; GREEN, Erin R.; MECSAS, Joan. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 7, p. 373, 2017.

OLEKHNOVITCH, Romain; BOUSSO, Philippe. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 653–664, 2015.

OTT, K. J.; HANSON, W. L.; STAUBER, L. A. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 641–645, 1967.

PAMPIGLIONE, S.; LA PLACA, M.; SCHLICK, G. Studies on mediterranean Leishmaniasis. I. An outbreak of visceral leishmaniasis in Northern Italy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 68, n. 5, p. 349–359, 1974.

PANIZ MONDOLFI, Alberto E. *et al.* Intermediate/borderline disseminated cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 446–455, 2013.

PARK, Miso; KANG, Keon Wook. Phosphatidylserine receptor-targeting therapies for the treatment of cancer. **Archives of Pharmacal Research**, [s. l.], v. 42, n. 7, p. 617–628, 2019.

PEARSON, Richard D.; SOUSA, Anastacio de Queiroz. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–11, 1996.

PETERS, Nathan C. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2008.

PINHEIRO, Nathanael F. *et al.* *Leishmania* infection impairs beta 1-integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 3912–3921, 2006.

PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.

QUIÑONEZ-DÍAZ, Laura *et al.* Effect of Ambient Temperature on the Clinical Manifestations of Experimental Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in a Rodent Model. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 851–860, 2012.

RAHIMI, Amir Mohammad; CAI, Mingfang; HOYER-FENDER, Sigrid. Heterogeneity of the NIH3T3 Fibroblast Cell Line. **Cells**, [s. l.], v. 11, n. 17, p. 2677, 2022.

RAMASAWMY, Rajendranath *et al.* The -2518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and**

evolutionary genetics in infectious diseases, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 607–613, 2010.

RAMÍREZ, J. L.; GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 333–338, 1997.

RANATUNGA, Medhavi *et al.* Leishmania aethiopica cell-to-cell spreading involves caspase-3, Akt, and NF- κ B but not PKC- δ activation and involves uptake of LAMP-1-positive bodies containing parasites. **The FEBS journal**, [s. l.], v. 287, n. 9, p. 1777–1797, 2020.

REBOUÇAS, Amanda *et al.* Leishmania-Induced Dendritic Cell Migration and Its Potential Contribution to Parasite Dissemination. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 1268, 2021.

RIBEIRO-GOMES, Flávia L. *et al.* Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 172, n. 7, p. 4454–4462, 2004.

RISCO, Cristina *et al.* Intracellular transport of the murine leukemia virus during acute infection of NIH 3T3 cells: Nuclear import of nucleocapsid protein and integrase. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 108, n. 9, p. 3039–3050, 1995.

ROBERTS, M; ALEXANDER, J; BLACKWELL, J M. Influence of Lsh, H-2, and an H-11-linked gene on visceralization and metastasis associated with *Leishmania mexicana* infection in mice. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 875–881, 1989.

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

ROLÃO, Nuno; MELO, Cláudia; CAMPINO, Lenea. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 123–126, 2004.

ROMA, Eric Henrique *et al.* Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 9, p. 193, 2016.

ROMANO, Audrey *et al.* Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen *Leishmania major*. **PLoS pathogens**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. e1006479, 2017.

ROSS, Ronald. FURTHER NOTES ON LEISHMAN'S BODIES. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 2, n. 2239, p. 1401, 1903.

ROUSSEAU, D *et al.* Progression of visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in BALB/c mice is markedly slowed by prior infection with *Trichinella spiralis*. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 65, n. 12, p. 4978–4983, 1997.

ROUSSEAU, Déborah *et al.* In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. **BMC Microbiology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 17, 2001.

SACKS, D L; PERKINS, P V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews. Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.

SALAZAR-SUAZO, N. *et al.* Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 801–811, 1999.

SANGUEZA, O. P. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis: a clinicopathologic classification. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 927–932, 1993.

SANTOS, Gustavo de Almeida *et al.* Systematic Review of Treatment Failure and Clinical Relapses in Leishmaniasis from a Multifactorial Perspective: Clinical Aspects, Factors Associated with the Parasite and Host. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 430, 2023.

SCHUBACH, A. *et al.* Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 824–827, 1998.

SCORZA, Breanna M.; CARVALHO, Edgar M.; WILSON, Mary E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

SEABRA, Sergio H.; DE SOUZA, Wanderley; DAMATTA, Renato A. *Toxoplasma gondii* exposes phosphatidylserine inducing a TGF-beta1 autocrine effect orchestrating macrophage evasion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 324, n. 2, p. 744–752, 2004.

SGHAIER, Rabiaa M. *et al.* Healed Lesions of Human Cutaneous Leishmaniasis Caused By *Leishmania major* Do Not Shelter Persistent Residual Parasites. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 12, p. 839216, 2022.

SHERMAN, I. W.; PRUDHOMME, J.; TAIT, J. F. Altered membrane phospholipid asymmetry in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 242–243, 1997.

SHIRIAN, Sadegh *et al.* Three Leishmania/L. species – *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* – as causative agents of mucosal leishmaniasis in Iran. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 107, n. 5, p. 267–272, 2013.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.

SILVEIRA, Fernando T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], p. trz037, 2019.

SILVEIRA, Fernando T.; LAINSON, Ralph; CORBETT, Carlos E. P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SINGH, Om Prakash *et al.* Asymptomatic Leishmania Infection: A New Challenge for Leishmania Control. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, [s. l.], v. 58, n. 10, p. 1424–1429, 2014.

SINGH, Sneha *et al.* Transcriptome Analysis of Dermal Fibroblasts Derived From Visceral Leishmaniasis and Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis Patients Reveal Disease-Specific Gene Expression and Pathological Regulation. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 227, n. 10, p. 1132–1142, 2023.

SMIRLIS, Despina *et al.* Leishmania histone H1 overexpression delays parasite cell-cycle progression, parasite differentiation and reduces Leishmania infectivity in vivo. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 60, n. 6, p. 1457–1473, 2006.

SOARES, M. Melina; KING, Steven W.; THORPE, Philip E. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1357–1362, 2008.

SOONG, Lynn. Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 2008.

SOUSA, L. M. A. *et al.* Neutrophils have a protective role during early stages of Leishmania amazonensis infection in BALB/c mice. **Parasite immunology**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 13–31, 2014.

SOUZA, Celeste da Silva Freitas de *et al.* *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/32787>. Acesso em: 7 out. 2023.

SOUZA, Valderes Lemos de *et al.* Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. [s. l.], 2000. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/5627>. Acesso em: 27 out. 2023.

STENGER, S. *et al.* Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **The Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 183, n. 4, p. 1501–1514, 1996.

STIERHOF, York-Dieter *et al.* Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. **European Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 78, n. 10, p. 675, 1999.

SVOBODOVÁ, Milena *et al.* *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 361–364, 2003.

TACCHINI-COTTIER, F. *et al.* An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 165, n. 5, p. 2628–2636, 2000.

TALBOTT, Heather E. *et al.* Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 1161–1180, 2022.

TANAKA, Tetsuya *et al.* Parasitocidal activity of human α -defensin-5 against *Toxoplasma gondii*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 560–565, 2010.

TAYLOR, Rebecca C.; CULLEN, Sean P.; MARTIN, Seamus J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 231–241, 2008.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; SARAVIA, N. G. The inflammatory response promotes cutaneous metastasis in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 454–457, 1996.

TURCO, S. J.; SPÄTH, G. F.; BEVERLEY, S. M. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 223–226, 2001.

TURETZ, Meredith L. *et al.* Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

TZEN, M. *et al.* A novel *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase. **Parasite**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 141–147, 2007.

UENO, Norikiyo; WILSON, Mary E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.

UZONNA, Jude E. *et al.* Immune Elimination of *Leishmania major* in Mice: Implications for Immune Memory, Vaccination, and Reactivation Disease¹. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 167, n. 12, p. 6967–6974, 2001.

VALIGUROVÁ, Andrea; KOLÁŘOVÁ, Iva. Unrevealing the Mystery of Latent Leishmaniasis: What Cells Can Host *Leishmania*?. **Pathogens**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 246, 2023.

VAN ENGELAND, Manon *et al.* Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 1–9, 1998.

VAN GRIENSVEN, J. *et al.* Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 286–299, 2014.

VAN ZANDBERGEN, Ger *et al.* Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VAN ZANDBERGEN, Ger *et al.* *Leishmania* disease development depends on the

presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 103, n. 37, p. 13837–13842, 2006.

VANCE, Jean E.; STEENBERGEN, Rineke. Metabolism and functions of phosphatidylserine. **Progress in Lipid Research**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 207–234, 2005.

VANLOUBBEECK, Y.; ACKERMANN, M. R.; JONES, D. E. Late cutaneous metastases in C3H SCID mice infected with *Leishmania amazonensis*. **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 226–228, 2005.

VOLL, R. E. *et al.* Immunosuppressive effects of apoptotic cells. **Nature**, [s. l.], v. 390, n. 6658, p. 350–351, 1997.

VOLPEDO, Greta *et al.* Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 11, 2021.

WALKER, Dawn M. *et al.* Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, [s. l.], v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 2014.

WANDERLEY, João L. M. *et al.* Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 176, n. 3, p. 1834–1839, 2006.

WANDERLEY, João Luiz M.; BARCINSKI, Marcello A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 1653–1659, 2010.

WANDERLEY, Joao Luiz Mendes *et al.* CD4+ T Cell-Dependent Macrophage Activation Modulates Sustained PS Exposure on Intracellular Amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 105, 2019.

WANDERLEY, João Luiz Mendes *et al.* Cooperation between Apoptotic and Viable Metacyclics Enhances the Pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. e5733, 2009.

WANDERLEY, Joao Luiz Mendes *et al.* Phosphatidylserine exposure on the surface of *Leishmania amazonensis* amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function. **Parasite immunology**, [s. l.], v. 35, n. 3–4, p. 109–119, 2013.

WANDERLEY, João Luiz Mendes; DAMATTA, Renato Augusto; BARCINSKI, Marcello André. Apoptotic mimicry as a strategy for the establishment of parasitic infections: parasite- and host-derived phosphatidylserine as key molecule. **Cell Communication and Signaling : CCS**, [s. l.], v. 18, p. 10, 2020.

WANG, Weihong *et al.* Mobilizing phospholipids on tumor plasma membrane implicates phosphatidylserine externalization blockade for cancer immunotherapy. **Cell Reports**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 111582, 2022.

WEBSTER, P.; RUSSELL, D. G. The flagellar pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today (Personal Ed.)**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 201–206, 1993.

WEI, Kevin; NGUYEN, Hung N.; BRENNER, Michael B. Fibroblast pathology in inflammatory diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 131, n. 20, 2021. Disponível em: <https://www.jci.org/articles/view/149538>. Acesso em: 25 nov. 2023.

WHO, EXPERT COMMITTEE ON THE CONTROL OF THE LEISHMANIASIS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010, Geneva, WHO technical report series ; 949, 2010.

WHO. Leishmaniasis. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>. Acesso em: 6 out. 2023.

XIN, Lijun *et al.* Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v.

184, n. 12, p. 7047–7056, 2010.

YANAGIHASHI, Yuichi *et al.* Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 114, n. 33, p. 8800–8805, 2017.

ZAPH, Colby *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, [s. l.] v.10, n.10, p. 1104-1110, 2004], v. 10, n. 10, p. 1104–1110, 2004.