



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRO-REITORIA DE ENSINO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A  
ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL**

**AMANDA KAROLINY FIGUEREDO BRITO**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTANTE E DO PERFIL DE  
RESPOSTA MACROFÁGICA (LINHAGEM DH82) A DIFERENTES  
ISOLADOS DE *Leishmania* spp. OBTIDOS DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS**

**TERESINA-PI  
2024**

**AMANDA KAROLINY FIGUEREDO BRITO**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTANTE E DO PERFIL DE  
RESPOSTA MACROFÁGICA (LINHAGEM DH82) A DIFERENTES  
ISOLADOS DE *Leishmania* spp. OBTIDOS DE CÃES  
NATURALMENTE INFECTADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional, da Universidade Federal do Piauí, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Linha de pesquisa:** Diagnóstico e terapêutica em medicina veterinária

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz

**Coorientador:** Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos

**TERESINA- PI  
2024**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação Temática da Informação

B862a Brito, Amanda Karoliny Figueredo.  
Avaliação da capacidade infectante e do perfil de resposta  
macrofágica (Linhagem DH82) a diferentes isolados de *leishmania*  
*spp.* obtidos de cães naturalmente infectados / Amanda Karoliny  
Figueredo Brito. -- 2024.  
35 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro  
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Tecnologias  
Aplicadas a Animais de Interesse Regional, 2024.

“Orientadora: Profª. Dra. “Maria do Socorro Pires e Cruz.”

1. Macrófagos. 2. Infecção. 3. Leishmanioses. 4. Resposta  
Imunológica. I. Cruz, Maria do Socorro Pires e. II. Título.


CDD 636.7089364

Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTANTE E DO PERFIL DE RESPOSTA MACROFÁGICA A DIFERENTES ISOLADOS DE LEISHMANIA spp. OBTIDOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM MACRÓFAGOS DE LINHAGEM (DH82)**


Amanda Karoliny Figueredo Brito

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **MARIA DO SOCORRO PIRES E CRUZ**  
Data: 21/08/2024 13:34:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Profª. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz  
(Presidente / Orientadora) DMV/CCA/UFPI

Documento assinado digitalmente  
 **ANDRE LUIS SOUZA DOS SANTOS**  
Data: 20/08/2024 11:14:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. André Luis Sousa Santos  
(Coorientador) IMPG/UFRJ

Documento assinado digitalmente  
 **MICHEL MUALEM DE MORAES ALVES**  
Data: 21/08/2024 11:02:01-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Prof. Dr. Michel Muálem de Moraes Alves  
(Examinador interno) DMV/CCA/UFPI

*Monique Paiva de Campos*

Dra. Monique Paiva de Campos  
(Examinadora externa) FIOCRUZ



**PPGTAIR**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS  
APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIAS APLICADAS A ANIMAIS DE INTERESSE REGIONAL  
Campus Universitário "Máximo Góes Pereira" - Bairro Ininga  
CEP 64048-550 - Teresina-PI e-mail: ppgtair@ufpi.edu.br

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de **Amanda Karoliny Figueredo Brito**, nos sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e quatro, às 14:00 horas, reuniu-se, a Banca Examinadora da Defesa de Mestrado composta pelos Professores(as) doutores(as) Maria do Socorro Pires e Cruz – Universidade Federal do Piauí, Presidente; André Luis Sousa Santos – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Examinador; Michel Muílem de Moraes Alves – Universidade Federal do Piauí, Examinador; Monique Paiva de Campos – Fundação Oswaldo Cruz, Examinadora; perante a qual **Amanda Karoliny Figueredo Brito**, discente regularmente matriculada no Curso de Mestrado em Ciências, área Medicina Veterinária, do Programa de Tecnologias Aplicadas a Animais de Interesse Regional – PPGTAIR, da Universidade Federal do Piauí, defendeu, para o cumprimento do requisito de Mestre, sua dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE INFECTANTE E DO PERFIL DE RESPOSTA MACROFÁGICA A DIFERENTES ISOLADOS DE *Leishmania* spp. OBTIDOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS EM MACRÓFAGOS DE LINHAGEM (DH82)". A defesa da referida dissertação ocorreu das 14:00 às 16:00 horas, tendo a mestranda sido submetida à sabatina, dispondo cada membro da banca do tempo determinado para tal. Finalmente, a Banca reuniu-se em separado e concluiu por considerar a mestranda Aprovada (Aprovado/Reprovado). Eu, **Maria do Socorro Pires e Cruz**, que presidi a Banca de Defesa de Dissertação, assino a presente Ata, juntamente com os demais membros e dou fé. Em Teresina-PI, 07 de fevereiro de 2024.

*Maria do Socorro Pires e Cruz*

Profª. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz  
Universidade Federal do Piauí  
(Presidente)

*Michel Muílem de Moraes Alves*  
Prof. Dr. Michel Muílem de Moraes Alves  
Universidade Federal do Piauí  
(Examinador)

*Monique Paiva de Campos*  
Dra. Monique Paiva de Campos  
Fundação Oswaldo Cruz  
(Examinadora)

*André Luis Sousa Santos*  
Prof. Dr. André Luis Sousa Santos  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
(Examinador)

*Dedico,  
Ao Pai celestial por toda a força  
A minha família por ser meu pilar  
Ao meu amor pela ciência*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me guiado, me dado força, luz, saúde e discernimento que me concebeu para encarar esse período de mestrado em meio a uma pandemia e não ter me deixado desistir.

A minha família por sempre me incentivar a continuar e por ser minha maior base nos momentos de dificuldade, em especial minha mãe Francisca Assunção, que mesmo distante é minha maior incentivadora e apoio. A minha avó Raimunda, que infelizmente se foi no final desta trajetória.

À Universidade Federal do Piauí por toda a oportunidade, pela estrutura, corpo docente e qualificação essencial para minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Prof. Dra. Maria do Socorro Pires e Cruz pela orientação, dedicação e principalmente pela confiança no meu trabalho, meu muito obrigada aos seus sábios conselhos e por conduzir este trabalho da melhor forma.

Ao Prof. Dr. André Luis Souza dos Santos por fazer parte da construção deste trabalho, sempre instruindo para o melhor desenvolvimento desde o princípio.

Aos pós-graduandos do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt) e do Laboratório de Imunologia Veterinária (LIV) em especial a minha colega de pós, Nathália Castelo Branco por ser uma pessoa persistente e, mesmo frente às dificuldades, sempre foi uma incentivadora e nunca me deixou desistir. A Ana Gabriellen, Wandersson, Profa Dra. Dayseanny e Prof<sup>o</sup> Michel Mualém por terem me ensinado tanto e por diversos conselhos que me foram extremamente úteis nesta jornada. E aos amigos de laboratório Samuel, Caroline, Jackellyne, Camile, Kamila, Felipe, Elyse, Luana e Leopoldo por terem me ajudado incontáveis vezes. A todos vocês, minha eterna gratidão.

Aos funcionários do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt). A Janete, Maria e Gleuce por toda a paciência do mundo e total disposição.

E a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho. Gratidão!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcutá.

## RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os macrófagos são importantes células de defesa contra microrganismos intracelulares e desempenham um papel importante neste tipo de infecção, uma vez que são as células alvo do parasito. O objetivo deste estudo é avaliar a capacidade infectante e o perfil de resposta macrofágica a diferentes isolados de *Leishmania* spp., obtidos de cães naturalmente infectados. Foram utilizadas três cepas isoladas de cães oriundos da cidade de Teresina-PI, naturalmente infectados (A1, A2 e A3) e uma amostra de *Leishmania infantum* MHOM/5745 utilizada como cepa referência. As cepas foram semeadas até que atingissem a quantidade de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL. Os macrófagos DH82 foram cultivados, plaqueados e infectados na proporção de 10 parasitos/macrófagos e incubados por 5 e 12 horas, o sobrenadante foi coletado e armazenado para a dosagem de óxido nítrico (NO). Ao final deste período foi realizada a contagem randômica de 100 células em cada lamínula e a dosagem de óxido nítrico. Os resultados demonstram que a cepa isolada do animal A3 apresentou um percentual de infecção de 91%, sendo superior as demais amostras que variaram de 85,5% a 86,5%. Na média de amastigotas por macrófago, os resultados foram de 3,94, 3,83 e 3,69 para A2, A1 e A3, respectivamente, enquanto a cepa referência foi de 3,56. Os resultados referentes ao índice de associação, as cepas isoladas dos animais A2 e R3 obtiveram valores de 337,29 e 336,24, que foram superiores à do isolado do animal A1 (327,89) e da cepa referência de *L. infantum* (308,37). Na avaliação da produção de NO, no tempo de 5 horas, a cepa isolada do animal A1 e a cepa referência produziram quantidades significativamente maiores de NO em comparação às cepas isoladas dos animais A2 e A3 e dos macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Na avaliação de 12 horas de infecção, todas diminuíram significativamente a produção de NO, com exceção do isolado do animal A1, que se manteve com a produção em quantidades maiores que as demais cepas. Assim podemos concluir que a capacidade de infecção das cepas de cães naturalmente infectados não foi diferente da cepa referência e que as cepas mesmo induzindo uma produção de NO em quantidades diferentes nos tempos avaliados, observou-se um destaque para o cão assintomático.

**Palavras-chave:** Macrófagos; Infecção; Leishmanioses; Resposta Imunológica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Macrophages are important defense cells against intracellular microorganisms and play a significant role in this type of infection, as they are the target cells of the parasite. The aim of this study is to evaluate the infective capacity and macrophage response profile to different isolates of *Leishmania* spp., obtained from naturally infected dogs. Three strains isolated from dogs from the city of Teresina-PI, naturally infected (A1, A2, and A3), and a sample of *Leishmania infantum* MHOM/5745 used as a reference strain were used. The strains were cultured until they reached a quantity of  $5 \times 10^6$  parasites/mL. DH82 macrophages were cultured, plated, and infected at a ratio of 10 parasites/macrophage and incubated for 5 and 12 hours; the supernatant was collected and stored for nitric oxide (NO) measurement. At the end of this period, a random count of 100 cells on each slide and nitric oxide measurement were performed. The results demonstrate that the strain isolated from animal A3 showed an infection rate of 91%, higher than the other samples ranging from 85.5% to 86.5%. The mean number of amastigotes per macrophage was 3.94, 3.83, and 3.69 for A2, A1, and A3, respectively, while the reference strain was 3.56. Regarding the association index, the strains isolated from animals A2 and R3 obtained values of 337.29 and 336.24, which were higher than those of the isolate from animal A1 (327.89) and the reference strain of *L. infantum* (308.37). In the evaluation of NO production, at the 5-hour time point, the strain isolated from animal A1 and the reference strain produced significantly higher amounts of NO compared to the strains isolated from animals A2 and A3 and macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS). In the evaluation of 12 hours of infection, all strains significantly decreased NO production, except for the isolate from animal A1, which maintained production in quantities higher than the other strains. Thus, we can conclude that the infective capacity of strains from naturally infected dogs was not different from the reference strain, and although the strains induced NO production in different quantities at the evaluated times, there was a highlight for the asymptomatic dog.

**Keywords:** Macrophages; Infection; Leishmaniasis; Immune Response.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01.** Desenhos esquemáticos das formas apresentadas pela *Leishmania* spp.  
12
- Figura 02.** Desenhos esquemáticos primeiro macrófago e o segundo macrófago  
18

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	11
<b>1.1 Leishmaniose: Visão Geral</b> .....	11
1.1.1 Introdução à Leishmaniose.....	11
1.1.2 Epidemiologia global e a importância da leishmaniose no contexto da saúde pública.....	12
1.1.3 A Leishmaniose no Piauí.....	13
<b>1.2 Aspectos Clínicos e Patológicos da Leishmaniose</b> .....	14
1.2.1 Sintomas e manifestações clínicas.....	14
<b>1.3 Vetores de Leishmaniose</b> .....	15
1.3.1 Vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose.....	15
1.3.2 Ciclo de vida do vetor e sua relação com a disseminação da doença .....	15
<b>1.4 Resposta Imunológica</b> .....	17
1.4.1 Papel dos macrófagos na resposta imune inata e adaptativa. ....	17
1.4.2 Resposta imune do hospedeiro durante a infecção por <i>Leishmania</i> spp. ....	18
<b>1.5 Linhagens Celulares Imortalizadas DH82</b> .....	20
<b>1.6 Variação Genética em Cepas de <i>Leishmania</i> spp</b> .....	20
1.6.1 A diversidade genética, virulência e patogenicidade entre diferentes cepas .....	20
2. CAPÍTULO I*.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MÉTODOS.....	25
Cultivo dos parasitos e macrófagos DH82.....	25
Infecção de Macrófagos .....	25
Dosagem de óxido nítrico .....	26
Análise estatística da Infecção de macrófagos e Dosagem de NO .....	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSSÃO .....	28
AGRADECIMENTOS .....	34
REFERÊNCIAS .....	34
CONFLITO DE INTERESSE.....	35
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
4. REFERÊNCIAS .....	36

# 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Leishmaniose: Visão Geral

### 1.1.1 Introdução à Leishmaniose

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo retratadas desde a antiguidade. Alguns manuscritos datados entre 1.500 a 2.500 anos a.C. descreviam lesões compatíveis àquelas que ocorrem em casos de leishmaniose. No entanto, o parasito causador da doença foi descrito apenas no início do século XX. Apesar de se tratar de uma doença amplamente distribuída, conhecida e pesquisada, continua como importante problema para a saúde pública uma vez que ainda não há uma medida de controle que seja completamente eficaz (WHO, 2020).

Os protozoários deste gênero foram inicialmente identificados por Ross em 1903 e pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. São parasitos intracelulares obrigatórios, apresentando um ciclo de vida que se desenvolve parcialmente no inseto (flebotomíneo) e parcialmente em um mamífero, sendo essenciais para a transmissão dos parasitos. As leishmanioses, representam importantes doenças tropicais negligenciadas em humanos, afetando também animais domésticos e silvestres (Baxarias *et al.*, 2019).

A maioria das leishmanioses são zoonoses, embora ocorram formas antroponóticas, nas quais o ser humano é o único reservatório. Em contraste com o vetor invertebrado, os hospedeiros reservatórios abrangem várias espécies de mamíferos, incluindo caninos, roedores e marsupiais, desempenhando um papel crucial na manutenção, a longo prazo, do parasito na natureza. A maioria desses hospedeiros apresenta boa adaptação, desenvolvendo infecções subclínicas ou leves que podem persistir por anos. No entanto, uma notável exceção é o cão, que pode desenvolver uma forma generalizada e fatal da doença (Van Assche *et al.*, 2011).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam duas formas distintas, a forma amastigota, encontrada nos hospedeiros vertebrados e a promastigota encontradas no inseto vetor. A forma amastigota possui um formato arredondado a oval e mede por volta de 2 a 5µm. Tem um núcleo normalmente excêntrico, um cinetossoma e um cinetoplasto e um flagelo rudimentar, não exteriorizado. São parasitos intracelulares principalmente de macrófagos, que se multiplicam por divisão binária simples e infectam outras células

fagocíticas mononucleares. A forma promastigota tem um formato alongado, com 15 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3,5  $\mu\text{m}$  de largura, com núcleo localizado centralmente e o cinetossoma e o cinetoplasto localizados numa posição anterior ao núcleo, com um flagelo medindo de 15 a 28  $\mu\text{m}$  de comprimento, como podemos observar na figura 01 (Sunter e Gull, 2017).

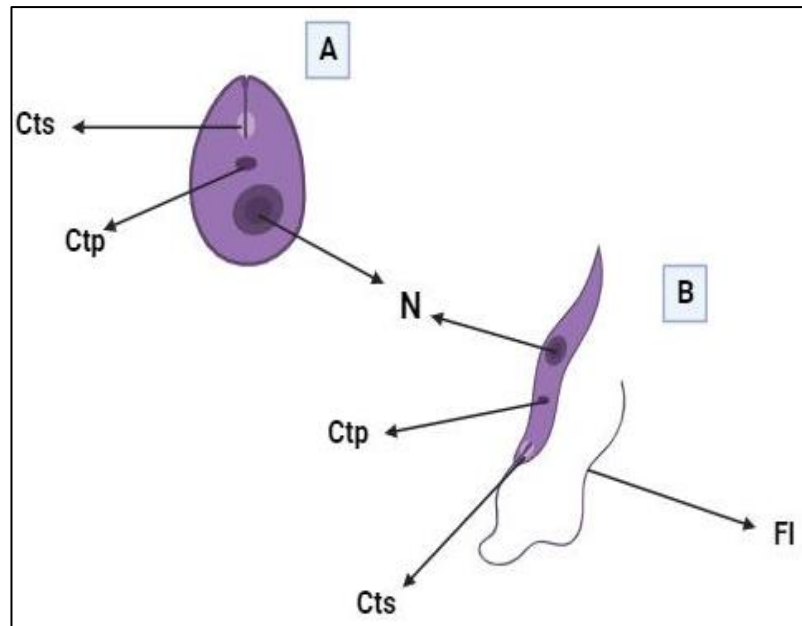


Figura 1. Desenhos esquemáticos das formas apresentadas pela *Leishmania* spp. A-Amastigota; B-Promastigota. Legenda: Cinetoplasto (Ctp); Cinetossoma (Cts); Flagelo (F); Flagelo livre (Fl); núcleo (N). (SUNTER e GULL, 2017). Fonte: Arquivo pessoal

### 1.1.2 Epidemiologia global e a importância da leishmaniose no contexto da saúde pública.

Disseminada em mais de 90 países, a leishmaniose é encontrada principalmente no Sudeste Asiático, África Oriental e Brasil, entretanto também ocorre na bacia do mediterrâneo. As formas da doença são notavelmente diversas. Na maioria dos casos, é dividido em três formas clínicas principais: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea/Mucosa (LM) e Leishmaniose Visceral (LV) (Freitas *et al.*, 2012; Marcondes e Rossi, 2013).

A OMS reconhece e divide a leishmaniose em duas formas principais: 1) Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), incluindo mucosa, cutânea, mucocutânea e cutânea difusa e 2) Leishmaniose Visceral. No chamado Velho Mundo, os agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar são *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, enquanto *L. donovani* e *L. infantum* causam leishmaniose visceral. Nas Américas, a espécie *L. infantum* (sinon. *chagasi*) está associada à leishmaniose visceral e diversas outras espécies do gênero causam leishmaniose

cutânea, como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guianensis*, *L. panamensis* e *L. mexicana* (Cardoso *et al.*, 2014).

A leishmaniose visceral, que é fatal quando não tratada adequadamente, é responsável por milhares de mortes a cada ano e é causada por *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo ou *L. infantum* no Novo Mundo (Van Assche *et al.*, 2011; Foganholi e Zappa, 2011; Coelho *et al.*, 2014).

O gênero *Leishmania* apresenta uma grande diversidade e variabilidade de espécies, sendo *L. infantum*, *L. brasiliensis* e *L. amazonensis* as principais causadoras dos diferentes tipos de leishmaniose no Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2018). A complexidade na luta contra as infecções leishmanióticas se explica por vários fatores, entre eles a grande diversidade do agente etiológico, grande número de espécies reservatórios, tornando-se um grave problema de saúde pública (Foganholi e Zappa, 2011).

### 1.1.3 A Leishmaniose no Piauí

Até a década de 1970, a leishmaniose no Brasil estava limitada às áreas rurais, mas a partir da década 80 a doença começou a ocorrer de forma endêmica e epidêmica nas grandes cidades brasileiras. Essa urbanização da leishmaniose ocorreu primariamente nas capitais do Nordeste, e desde então se estendeu a cidades de outras regiões do país e para outros países latino-americanos (Cerbino Neto *et al.*, 2009).

Em pesquisas feitas nos bancos de dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e do Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), na década de 90, a região nordeste do Brasil era a responsável por quase 90% dos casos da doença. Devido ao processo de expansão da LV para outras regiões, as notificações do nordeste passaram a corresponder por 43% dos casos, de acordo com dados levantados em 2012. No estado do Piauí, onde se iniciou a urbanização da doença, a primeira grande epidemia urbana de LV ocorreu entre os anos 1980 e 1986, com um maior número de casos em 1983 e 1984. Ao avaliar o número de casos da doença na cidade de Teresina, observou-se um registro de uma segunda grande epidemia no estado no período de 1992 a 1995. Em dados mais recentes de LV no Piauí, segundo o Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde (CIEVS), nos últimos cinco anos foram notificados 1.039 casos de leishmaniose visceral (Batista *et al.*, 2021).

Segundo Melo *et al.* (2023), em pesquisas sobre as áreas prioritárias para o controle da leishmaniose visceral no Brasil, entre 2001 e 2020, foram notificados 63.966 casos de LV no

Brasil, com uma taxa de incidência acumulada de 33,53 casos por 100.000 habitantes, classificando o Piauí com um dos Estados de alto risco.

O Estado do Piauí e a capital Teresina são consideradas áreas endêmicas para LV, segundo o Ministério da Saúde/SVSA - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, foram registrados mais de 700 casos da doença confirmados em humanos, entre os anos de 2018-2022 (Batista *et al.*, 2021).

O Piauí nos últimos anos apresentou um elevado crescimento populacional levando a uma ocupação de lugares periféricos com a presença de áreas cobertas por florestas tropicais e densa vegetação, o que favorece a expansão dos vetores da doença. Grande parte da população da região é de baixo poder econômico, vivendo em áreas com moradia e saneamento precários, o que leva a um acúmulo de matéria orgânica gerada pelos moradores e animais domésticos, favorecendo o aumento das à proliferação do inseto vetor e consequentemente, expondo à população a um risco maior de infecção (Lemos *et al.*, 2019).

## 1.2 Aspectos Clínicos e Patológicos da Leishmaniose

### 1.2.1 Sintomas e manifestações clínicas.

A LV no cão tem uma evolução lenta e seu início é de difícil reconhecimento, sendo variável de animal para animal, com o aparecimento dos sinais clínicos podendo levar meses ou até anos. Isso acontece em decorrência do tipo de resposta imunológica do animal após o contato com o parasito, podendo este se tornar um portador assintomático, porém fonte de infecção, ou apresentar várias manifestações clínicas e evoluir para o óbito. A doença é caracterizada por disseminação linfática ou hematogênica, sendo os sinais clínicos mais comuns a perda de apetite, emagrecimento, pelo opaco, queda de pelos, aparecimento de feridas na pele (em especial na face, focinho e ponta de orelhas), aumento dos linfonodos, baço e fígado. Quando em estágio mais avançado da doença, a onicogribose, blefarite, uveíte e conjuntivite são os sinais comumente encontrados e podendo chegar até a perda dos movimentos das patas traseiras (parestesia) (Brito *et al.*, 2006; Van Assche *et al.* 2011; Castro *et al.*, 2012). O Ministério da Saúde descreve os sintomas da LV em humanos como febre irregular de longa duração (mais de 7 dias), falta de apetite, emagrecimento e fraqueza, barriga inchada (pelo aumento do fígado e do baço, com o passar do tempo).

## 1.3 Vetores de Leishmaniose

### 1.3.1 Vetores envolvidos na transmissão da leishmaniose

Estes protozoários são transmitidos por um inseto vetor, o flebotomíneo. Os vetores, por sua vez, são mosquitos da ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, que sugam junto com o sangue as formas amastigotas de um animal infectado, que se alojam em partes de seu intestino onde se transformam em promastigotas, a forma infectante. No sistema digestivo de seus vetores, multiplicam-se por aparente divisão binária simples e assexuada e migram para a probóscida do inseto após aproximadamente 4 a 5 dias, quando bloqueiam o proventrículo e são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado, junto com a saliva (Burza, Croft e Boelaert, 2018).

### 1.3.2 Ciclo de vida do vetor e sua relação com a disseminação da doença

A duração do ciclo evolutivo pode variar, dependendo da espécie e da influência das condições de temperatura, umidade e disponibilidade de alimento (Sunter e Gull, 2017; Burza, Croft e Boelaert, 2018). O ciclo de vida de *L. infantum* inicia-se com a infecção de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*, sendo a espécie *Lu. longipalpis* a mais prevalente no nosso país, encontrado tanto em ambientes naturais como em rurais e urbanos, estando muito bem adaptado ao ambiente peridomiciliar (Pimenta *et al.*, 2012; Secundino *et al.*, 2012; Freitas *et al.*, 2012; Veloso *et al.*, 2021).

Com relação aos fatores que contribuem para a propagação e adaptação de *Leishmania* spp., em diferentes ambientes, podemos citar a sua capacidade de adaptação, sobrevivência e transmissão por flebotomíneos específicos. O conhecimento da capacidade deste parasito de se ligar ao intestino médio do mosquito, estabelecer e de se propagar, diferenciando-se em promastigotas infecciosas e ser transmitido durante a próxima refeição de sangue é de grande relevância (Poinar e Poinar, 2004; Sacks e Kamhawi, 2001; Bourdeau *et al.*, 2020).

## 1.4 Resposta Imunológica

### 1.4.1 Papel dos macrófagos na resposta imune inata e adaptativa.

O sistema imunológico dos humanos e animais é conceitualmente dividido em imunidade inata e imunidade adaptativa. A imunidade inata representa uma resposta rápida, composta por barreiras físicas, químicas e biológicas. Neste tipo de resposta, as células especializadas e moléculas solúveis, agem independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, e não se altera após o contato. As principais células efetoras dessa imunidade são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural

Killer – NK. A segunda linha de defesa do organismo aos antígenos, pode ser chamada de resposta imune adquirida, adaptativa ou específica, recebe esse nome porque esta resposta é a imunidade que um indivíduo desenvolve após ter tido contato com algum tipo de antígeno (Abbas, 2019; Cruvinel *et al.*, 2010).

Com relação a origem das células de defesa do nosso organismo, os monócitos no tecido conjuntivo ou parênquima de órgãos, dão origem a macrófagos. Os macrófagos são fagócitos eficientes, englobando diferentes tipos de patógenos. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos podem permanecer no tecido por meses a anos, atuando como verdadeiros sentinelas. Além de seu papel na imunidade inata, processam e apresentam antígenos via moléculas de MHC, estimulando, assim, a resposta mediada por Linfócitos T-LTs (Abbas, 2019; Cruvinel *et al.*, 2010; Sheu e Hoffmann, 2022).

Os macrófagos são heterogêneos e suas funções são reguladas pelo microambiente circundante. Geralmente existem em dois subconjuntos distintos, os primeiros macrófagos classicamente ativados ou M1 e temos macrófagos alternativamente ativados ou M2. Eles têm características únicas, destruindo patógenos ou reparando a lesão associada à inflamação. Quando a infecção ou inflamação é grave o suficiente para afetar um órgão, macrófagos exibem primeiro o fenótipo M1 para liberar citocinas pro-inflamatórias contra o estímulo. Entretanto, se a fase M1 continuar, pode causar danos nos tecidos, portanto, macrófagos do tipo M2 secretam grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias e imunorreguladores para suprimir a inflamação e contribuir para a homeostase (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Na inflamação, os macrófagos atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs), potencializando a ativação de Linfócitos T e B pela expressão de moléculas coestimuladoras, e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e quimiocinas. Também produzem espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e intermediários reativos do nitrogênio cujo principal representante é o óxido nítrico (NO). O NO é produzido pela sintetase do óxido nítrico induzível (iNOS), ausente em macrófagos em repouso, mas induzida por ativação de receptores Toll-like (TLRs) em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), especialmente na presença de IFN- $\gamma$  (Souza, 2004; Cruvinel *et al.*, 2010).

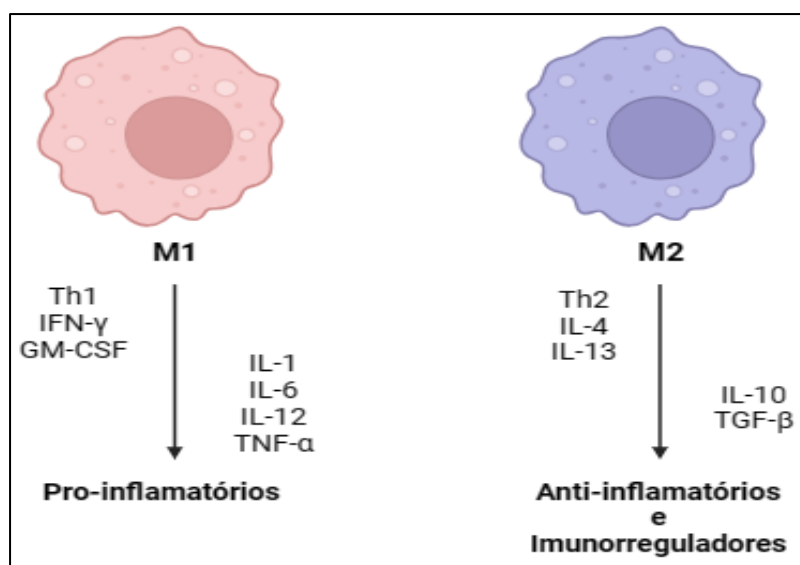


Fig.3: Desenhos esquemáticos, do primeiro macrófago denominado como classicamente ativados ou M1, que são pró-inflamatórios; E o segundo macrófago, denominado como alternativamente ativado ou M2, que são anti-inflamatórios e imunorreguladores (CRUVINEL *et al.*, 2010). Fonte: Arquivo Pessoal

#### 1.4.2 Resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *Leishmania spp.*

Após a entrada no hospedeiro, as promastigotas evadem os mecanismos extracelulares de defesa e invadem as células alvo, modificando o ambiente intracelular e estabelecendo a infecção. Como não conseguem penetrar ativamente, passam a depender da ação fagocítica das células (Dantas-Torres, 2011; Alvar *et al.*, 2012; Vermelho *et al.*, 2017).

A fagocitose é uma arma importante no arsenal do sistema imunológico inato contra todos os tipos de antígenos, e direciona os microrganismos para um compartimento celular onde podem ser fagocitados. No entanto, os parasitos de *Leishmania spp.*, desenvolveram mecanismos para subverter a atividade microbicida dos macrófagos. A internalização de promastigotas ocorre pelo tipo clássico de fagocitose em 'zíper', bem como pela fagocitose em 'enrolamento'. No mecanismo do zíper, a ligação inicial do microrganismo aos receptores no fagócito desencadeia o recrutamento de receptores adicionais da membrana circundante, com um rearranjo simultâneo do citoesqueleto. Isso possibilita a extensão de um pseudópode, que avança ao longo do organismo como um zíper, envolvendo-o em um fagossomo. A fagocitose por enrolamento envolve a ocorrência assimétrica de espirais de pseudópodes e outras pilhas de pseudópodes multicamadas e tem sido sugerida como um mecanismo adicional para a absorção do parasito. O receptor do complemento (CR) desempenha papéis importantes em

ambos os processos e podem atuar em conjunto para facilitar a ligação e absorção do parasito. É provável que múltiplas interações receptor-ligante ocorram simultaneamente, dependendo do estado de ativação do macrófago (Cuervo *et al.*, 2018; Cruvinel *et al.*, 2010; Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018; Sheu e Hoffmann, 2022).

Para o sucesso na evasão da resposta imunológica, levando em conta a diversidade de hospedeiros da *Leishmania* spp., o parasito procura utilizar diferentes receptores para obter acesso a diferentes células do hospedeiro, que transportam as amastigotas do local inicial da infecção na pele até os gânglios linfáticos de drenagem, onde os antígenos do parasito são apresentados às células T virgens e onde persistem indefinidamente. O mecanismo de saída das amastigotas do macrófago infectado não é claro. Estudos mostram que, o macrófago densamente parasitado se rompe, liberando parasitos nas imediações de outros macrófagos. Outras pesquisas sugerem que os vacúolos contendo amastigotas se acumulam na periferia das células infectadas e as amastigotas são liberados ao longo de várias horas em um processo que lembra a exocitose (Cruvinel *et al.*, 2010; Podinovskaia e Descoteaux, 2015).

O padrão de resposta é tipo Th1 com produção de IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2 e IL-12, cujo o controle da infecção é feito por ativação macrofágica e destruição parasitária. As IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  (Silva e Alves, 2014; Park *et al.*, 2018).

## 1.5 Linhagens Celulares Imortalizadas DH82

Nas pesquisas *in vitro* a utilização de macrófagos já está bem estabelecida, e os modelos animais murinos têm sido extremamente utilizados para desenvolver e testar hipóteses experimentais na área de imunologia. Entretanto, apesar de camundongos e humanos conter genomas altamente conservados (menos de 1% de genes homólogos ausentes em ambas as espécies), existe diferenças significativas no desenvolvimento do sistema imune, na ativação e na resposta aos desafios, tanto na imunidade inata com adquirida. Atualmente com o grande avanço da ciência e tecnologias, já é possível utilizar células de diferentes espécies (Mestas e Ley, 2008).

A linhagem celular DH82 tem uma morfologia semelhante a dos macrófagos. É uma linhagem originária de tecido hematopoiético da espécie *Canis lupus familiaris*, com propriedades de crescimento aderente. São amplamente utilizadas em estudos que fazem o uso de macrófagos. O uso de uma linhagem celular de macrófagos caninos para estudar os

primeiros aspectos da interação de *Leishmania* spp., é mais fácil e mais prático quando se compara com a utilização de macrófagos obtidos da medula-óssea ou isolado de células mononucleares de sangue periférico de cães, diminuindo o trabalho do pesquisador e o sofrimento animal. Adicionado a isso, a utilização de uma linhagem celular de uma espécie animal que seja o reservatório do parasita pode contribuir para uma melhor compreensão sobre a infecção e as diferenças de respostas celulares. Alguns trabalhos relataram o uso do DH82, como modelo para estudar infecção por diferentes microrganismos como vírus, bactérias e protozoários (Nadaes *et al.*, 2020).

Em pesquisa desenvolvida com células DH82, Calvay-Sánchez *et al.* (2015) fizeram uma avaliação da infectividade de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. peruviana* a fim de determinar um modelo de infecção *in vitro* mais adequado. E obtiveram taxas de infecção com 13% e 9,5% respectivamente, e não houve diferença significativa entre a capacidade infecciosa de ambas as espécies.

## **1.6 Variação Genética em Cepas de *Leishmania* spp.**

### *1.6.1 A diversidade genética, virulência e patogenicidade entre diferentes cepas de Leishmania spp.*

A identificação destas espécies de *Leishmania*, é importante para o direcionamento de terapias aos pacientes humanos e animais. A combinação da identificação com o diagnóstico reduzirá custos e tempo e contribuirá para medidas de controle, fornecendo dados epidemiológicos sobre as espécies de parasitos e possíveis reservatórios que circulam na área de estudo. A virulência das diferentes espécies é influenciada por fatores genéticos, imunológicos e ambientais, bem como pelas interações complexas entre o parasito, o vetor e o hospedeiro. A variação na patogenicidade, também pode ser influenciada por fatores genéticos tanto do parasito quanto do hospedeiro, bem como por fatores ambientais. O entendimento destas diferenças é crucial para o diagnóstico e tratamento adequados da doença (Ishikawa *et al.*, 2002; Morais *et al.*, 2016; Santi e Murta, 2022).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a capacidade infectante de diferentes isolados de *Leishmania* spp., obtidos de cães naturalmente infectados em cultura de linhagem imortalizada, assim como analisar o perfil de resposta macrofágica que elicitam.

## **2. CAPÍTULO I\***

(Manuscrito submetido ao periódico “Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical”).

## AValiação DA CAPACIDADE INFECTANTE E DO PERFIL DE RESPOSTA MACROFÁGICA (LINHAGEM DH82) A DIFERENTES ISOLADOS DE *Leishmania* spp. OBTIDOS DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS

Amanda Karoliny Figueredo Brito<sup>1\*</sup>, Caroline de Jesus Sousa<sup>1</sup>, Samuel da Silva Sousa<sup>1</sup>, Wanderson Gabriel Gomes de Melo<sup>2</sup>, Michel Muálem de Moraes Alves<sup>3</sup>, Ivete Lopes de Mendonça<sup>4</sup>, André Luís Souza dos Santos<sup>5</sup>, Maria do Socorro Pires e Cruz<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Imunologia Veterinária, UFPI, Teresina-PI, <sup>2</sup>Laboratório de Células-Tronco, UFPI, Teresina-PI, <sup>3</sup>Laboratório de Atividade Antileishmania, UFPI, Teresina-PI <sup>4</sup>Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos, UFPI, Teresina-PI, <sup>5</sup>Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, Rio de Janeiro-RJ

**Introdução:** As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os macrófagos são importantes células de defesa contra microrganismos intracelulares e desempenham um papel importante neste tipo de infecção. **Métodos:** Foram utilizadas três cepas isoladas de cães oriundos da cidade de Teresina-PI, naturalmente infectados e uma amostra de *Leishmania infantum* MHOM/5745 utilizada como cepa referência. As cepas e os macrófagos DH82 foram cultivados, plaqueados e as infecções foram feitas na proporção de 10 parasitos/macrófagos e incubados. **Resultados:** Os resultados referentes a avaliação da capacidade infectante, os valores de intensidade, percentual de infecção e índice de associação não foram diferentes estatisticamente significativos, porém observando os resultados numéricos do índice de associação, as cepas isoladas dos animais naturalmente infectados foram maiores com relação a cepa referência. Na avaliação da produção de óxido nítrico (NO), no tempo de 5 horas, a cepa isolada do animal A1 e a cepa referência produziram quantidades significativamente maiores de NO em comparação às cepas isoladas dos animais A2, A3 e dos macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Na avaliação de 12 horas de infecção, todas diminuíram significativamente a produção de NO, com exceção do isolado do animal A1, que se manteve com a produção em quantidades maiores que as demais. **Conclusões:** Assim podemos concluir que a capacidade de infecção das cepas de cães naturalmente infectados não foi diferente da cepa referência e que as cepas mesmo induzindo uma produção de NO em quantidades diferentes nos tempos avaliados, observou-se um destaque para o cão assintomático.

**Palavras-chave:** Macrófagos; Infecção; Leishmaniose; Resposta Imunológica.

---

<sup>1\*</sup> Correspondência: A.K.F. Brito. Laboratório de Imunologia Veterinária - LIV, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil. amandakarolinymedvet@gmail.com.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças negligenciadas, causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*. Esse complexo grupo apresenta alta morbidade e mortalidade em países tropicais e subtropicais, concentrando-se no Sudeste Asiático, África Oriental e América Latina. É considerada a terceira doença, causada por parasitos, mais prevalente em todo o mundo e um grave problema de saúde pública (Dagnino *et al.*, 2015; Marinho *et al.*, 2017).

O ciclo biológico da *Leishmania* spp. envolve duas formas principais: a promastigota e amastigota. Tendo início no intestino médio dos flebotomíneos fêmeas, onde as amastigotas se transformam em promastigotas, multiplicam-se e migram para a probóscide. Os insetos vetores infectados regurgitam promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo. Após a entrada no hospedeiro, as promastigotas escapam dos mecanismos extracelulares de defesa e invadem as células alvo, modificando o ambiente intracelular e estabelecendo a infecção (Alvar *et al.*, 2012; Vermelho *et al.*, 2017; Sunter e Gull, 2017; Burza, Croft e Boelaert, 2018).

Os protozoários deste gênero apresentam uma grande diversidade e variabilidade de espécies, sendo a *Leishmania infantum*, uma das principais causadoras de leishmaniose no Brasil (Vasconcelos *et al.*, 2018). Essa espécie é a principal causadora da Leishmaniose Visceral (LV), que pode acometer animais e seres humanos (Cardoso *et al.*, 2014).

A região Nordeste do Brasil enfrenta uma alta incidência de casos da doença, o que destaca a urgência de pesquisas voltadas para compreender os mecanismos de infecção e, conseqüentemente, desenvolver estratégias mais eficazes de controle. Nos dados sobre as leishmanioses no Brasil, o estado do Piauí e com foco para sua capital Teresina são consideradas como áreas endêmicas para LV. De acordo com o Ministério da Saúde/SVSA - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, foram confirmados mais de 700 casos de LV em humanos, entre os anos de 2018-2022 (Batista *et al.*, 2021).

A interação entre o parasito e as células do sistema imunológico do hospedeiro é um mecanismo decisivo para o desenvolvimento de uma doença. Na leishmaniose os macrófagos são uma das células-alvo mais importantes, pois desempenhando um papel fundamental para o controle dos sintomas ou para a progressão da infecção. Entretanto, a *Leishmania* spp. possui mecanismos próprios para escapar da resposta imune do hospedeiro (Mas *et al.*, 2022).

Em seus mecanismos de evasão da resposta imunológica, estes parasitos possuem

moléculas fortemente imunogênicas, com capacidade de induzir o sistema imunitário do hospedeiro a desenvolver uma resposta ineficaz. As pesquisas demonstraram que ocorre a inibição da síntese de óxido nítrico (NO) nos macrófagos e que o parasito tem a habilidade de resistir ao pH ácido das células onde se desenvolve, multiplicando-se dentro do fagolisossoma. Estes últimos, ao serem infectados por *Leishmania* spp., são menos eficientes na produção de citocinas e/ou estimulação das outras células efetoras. À medida que o parasito se diferencia, o macrófago perde a capacidade de ser uma célula apresentadora de antígeno (Cabrita, Campino e Maia, 2011).

Teresina é uma cidade considerada endêmica para esta doença e por isso se faz relevante, dada a sua posição estratégica no contexto epidemiológico das Leishmanioses na região nordeste do Brasil. A proposta de análise comparativa da capacidade infectante e do perfil de resposta macrofágica destes protozoários busca contribuir com os estudos sobre os mecanismos de interação do parasito com as células do sistema imune, da evasão da resposta imunológica e da adaptação aos diferentes tipos de hospedeiros.

## MÉTODOS

### Cultivo dos parasitos e macrófagos DH82

As amostras utilizadas foram obtidas no banco de amostra do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia Veterinária, Laboratório de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos e pelo Laboratório Antileishmania, da UFPI. Foram utilizadas três cepas isoladas de cães oriundos da cidade de Teresina-PI, naturalmente infectados, sendo A1 um cão assintomático, atendido para realização de cirurgia eletiva e apresentando trombocitopenia e assim tendo passado por teste rápido, sorológicos e parasitológico em lâmina com resultados negativos e as amostras A2 e A3 de cães com linfonodos aumentados e parasitológico positivo, e uma amostra de *Leishmania infantum* MHOM/5745, utilizada como cepa referência.

As cepas foram semeadas em garrafa de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio Schneider's (Meio de Schneider's para insetos - Thermo Fisher Scientific) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen-Gibco®) inativado e 500 µL de antibióticos (Penicilina 10.000 U/mL e Estreptomicina 10.000 µg/mL - Gibco®), incubadas em estufa BOD a 24°C por três semanas até que atingissem a quantidade de 5x10<sup>6</sup> parasitos/mL. Os macrófagos DH82 foram cultivados em garrafa de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> com Meio de Eagle modificado de Dulbecco-DMEM glutamax (Invitrogen-Gibco®) suplementado com 15% de SFB ativado,

1% de solução de aminoácidos não essenciais (NEA, 100x- Gibco®), 2% de glutamina (L-Glutamine 200 mM- Gibco®), 1% de antibióticos (Penicilina 10.000 U/mL e Estreptomicina 10.000 µg/mL) por 6 dias. Após este período, os macrófagos passaram por um processo de tripsinização, foram distribuídos em placa de 24 poços na concentração de  $5 \times 10^5$  macrófagos por poço contendo lamínulas de vidro de 13 mm estéreis e incubados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 5 e 12 horas.

### **Infecção de Macrófagos**

Os macrófagos DH82 foram infectados com as cepas de *Leishmania* spp., isoladas de cães naturalmente infectados e com a cepa referência de *L. infantum* MHOM/5745. Para tanto, os parasitos foram centrifugados com solução salina estéril a 800 rpm por 10 minutos a 4°C para a precipitação dos parasitos mortos. Após este procedimento, o sobrenadante foi coletado, centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 1 mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB inativado, 1% de NEAA, 2% de glutamina e 1% de antibióticos. Após isso, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL. Os macrófagos cultivados foram infectados com formas promastigotas em uma proporção de 10:1 (parasitos:macrófago). As co-culturas foram feitas em duplicatas e incubadas por 5 e 12 horas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizados os tempos de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para a dosagem de óxido nítrico (NO) e as lamínulas contendo os macrófagos infectados foram lavadas com solução salina estéril para remoção dos parasitos não internalizados.

As lamínulas então foram coladas em lâminas, identificadas e coradas com Giemsa (Solução Modificada de Coloração Giemsa - 1.000 mL – Sigma®). Foram feitas as contagens de 100 células de forma randômica e foi calculada a intensidade de infecção pela média de macrófagos infectados (MMI) contando o número de amastigotas internalizadas em cada um dos macrófagos infectados. Foi calculada também, a percentual de infecção (%I) que foi determinada pelo número de macrófagos infectados dividido pelo número total de células e multiplicado por 100. E por fim, foi calculado o índice de associação ou infecção (IA), que foi obtido pela multiplicação da média do número de macrófagos infectados (MMI) pela média do número de amastigotas por macrófago (MAM).

### **Dosagem de NO**

O ensaio foi realizado utilizando o método de Griess descrito por Maksouri *et al.*, (2017). Resumidamente, 50 µL dos sobrenadantes foram distribuídos em placas de 96 poços em triplicada e adicionado 50 µL de reagente de Griess (sulfanilamida 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 10% [v:v] diluído em água Milli-Q, adicionada partes iguais de naftilenodiamina 0,1% diluído em água Milli-Q). A concentração de NO foi calculada a partir de uma curva padrão gerada com NaNO<sub>2</sub> variando de 0 a 160 µM. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam a média de 6 experimentos independentes. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos e procedidas as leituras da densidade óptica (OD), em espectrofotômetro (BioTek-modelo ELx800), em um comprimento de onda de 570 nm.

### **Análise estatística da Infecção de macrófagos e Dosagem de NO**

As análises das medidas de intensidade de associação (IA), percentual de infecção (%I) e dosagem de NO foram realizadas em software estatístico. Os experimentos foram realizados em duplicata para cada cepa (em IA e %I) e em triplicata para a dosagem de NO. Para curva padrão os dados de absorbância foram submetidos a uma análise de regressão linear para avaliar a relação entre a variável independente ( $\underline{x}$ ) e a variável dependente ( $\underline{y}$ ). A regressão linear foi conduzida utilizando o método dos mínimos quadrados, sendo calculado o coeficiente de determinação R<sup>2</sup>.

Os dados foram submetidos a testes de normalidade para avaliar a distribuição, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Em casos de dados com distribuição normal, procedeu-se análise de variância por One-Way ANOVA seguido de teste post-hoc de Dunnett, para comparação de médias. Em caso de constatação de dados que não apresentavam uma distribuição normal, procedeu-se à análise não paramétrica, por meio do teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste post-hoc de Dunn para avaliar possíveis diferenças entre as cepas. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## **RESULTADOS**

A capacidade infectante das cepas foi avaliada em um único tempo de 12 horas, levando em consideração os valores de média de macrófagos infectados (MMI) com pelo menos uma cepa a partir da contagem de 100 células, a média de amastigotas por células (MAM), taxa/porcentagem de infecção (%I) e pelo índice de associação (IA).

Na figura 1 podemos observar os resultados referentes à intensidade de infecção e

percentual de infecção. Na cepa isolada do animal A3, o percentual de infecção das células DH82 foi de 91%, superior as das demais amostras que variaram de 85,5% a 86,5%. Os resultados referentes às médias de amastigotas por macrófagos das cepas dos animais A2, A1 e A3 foram de 3,94, 3,83 e 3,69 respectivamente, enquanto a média da cepa de referência foi de 3,56. Com relação aos resultados dos índices de associação, as cepas dos animais A2 e A3 obtiveram valores de 337,29 e 336,24, que foram superiores a do animal A1 (327,89) e da cepa de referência *L. infantum* (308,37). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados de percentual e intensidade de infecção, quanto aos índices de associação, também não foram observados diferenças estatísticas, porém as diferenças numéricas entre as cepas de cães naturalmente infectados e da cepa referência foram consideráveis.

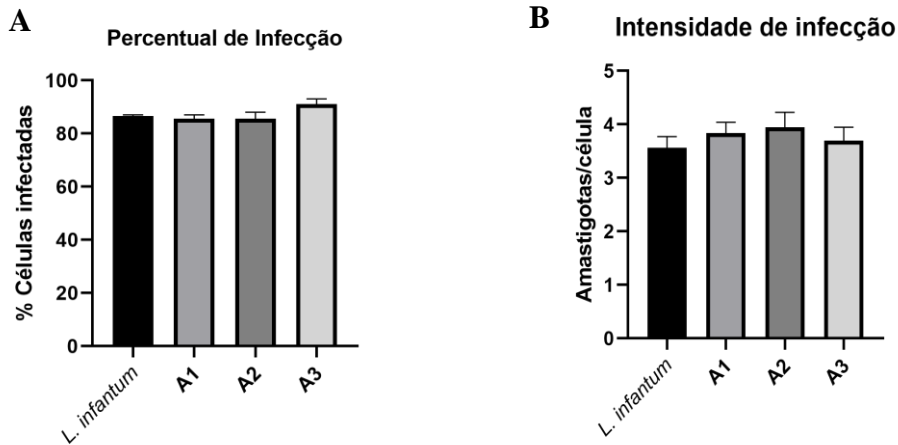


Figura 01. As células DH82 foram infectadas com cepas de animais naturalmente infectados e com uma cepa referência de *Leishmania infantum* MHOM/5745, em uma proporção de 10:1 parasitos:células por 12 horas. A intensidade de infecção (A) e a porcentagem de células infectadas (B) foram determinados 12 horas pós-infecção. Dados (média  $\pm$  DP) de quatro experimentos independentes são mostrados. A análise estatística foi realizada com os testes Kruskal-Wallis e Dunn's, para comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

Na figura 02 podemos observar macrófagos caninos DH82 infectados com os isolados utilizados neste estudo, é possível observar as duas formas distintas do parasito, com amastigotas infectando o macrófago e promastigotas que circundam a célula.

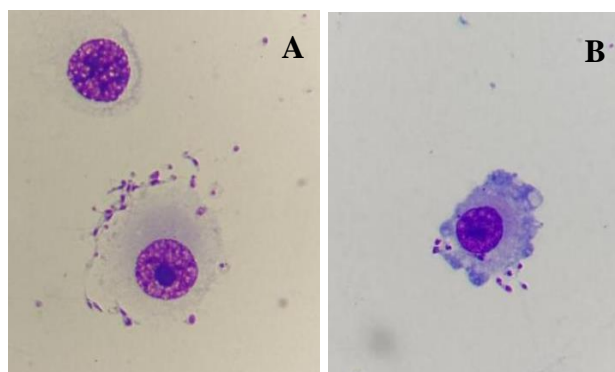


Figura 02. Macrófagos DH82 infectados com formas amastigotas de cepas isoladas de cães naturalmente infectados, em microscópio de luz, com objetiva de 100x.

Na avaliação da produção de óxido nítrico (NO) foram testados dois tempos, 5 e 12 horas. Nas infecções de 5 horas, a cepa isolada do animal A1 e a cepa referência produziram quantidades significativamente maiores de NO em comparação com as cepas isoladas dos animais A2 e A3 e dos macrófagos estimulados com LPS. Na avaliação de 12 horas de infecção, todas diminuíram significativamente a produção de NO, com exceção do isolado A1, que se manteve com a produção em quantidades maiores que as demais cepas (Figura 3).

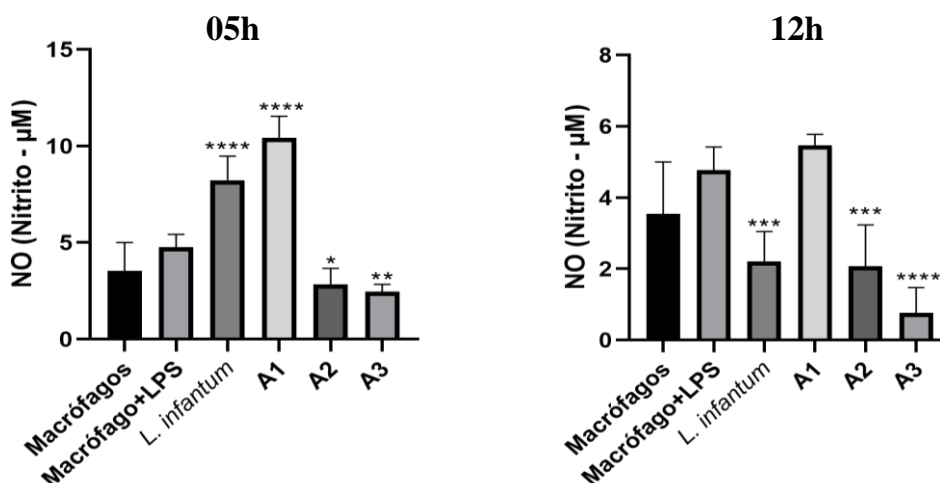


Figura 03. Os sobrenadantes do cultivo de macrófagos com as cepas e lipopolissacarídeo (LPS), foram coletados em 05 e 12 horas após infecção. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados representam a média de cinco experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido de teste post-hoc de Dunnett, para comparação de médias. Os asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas (\*p < 0,05).

tempo, a cepa do animal A1 após 12 horas de infecção, manteve uma produção de NO significativamente alta, em relação as outras cepas e aos macrófagos estimulados com LPS (Figura 4).

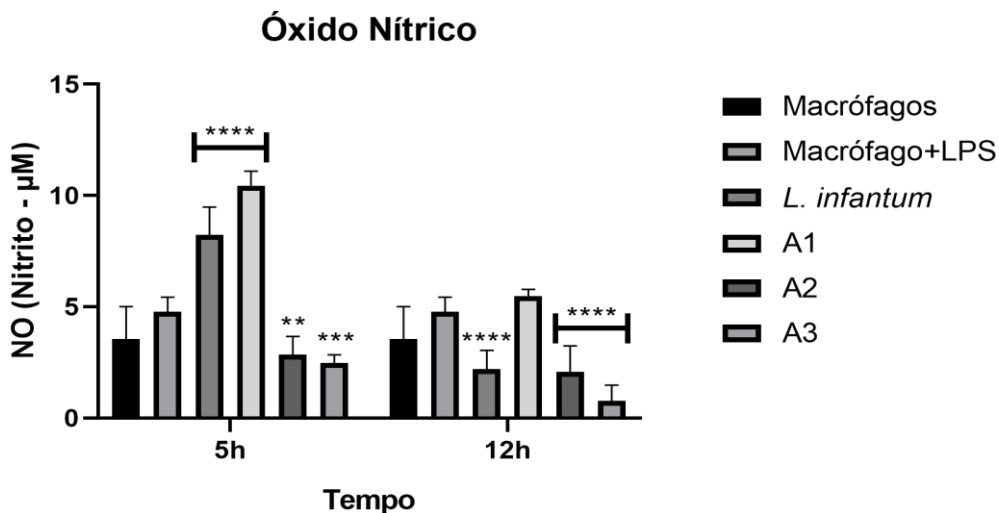


Figura 04. A análise estatística foi realizada com One-Way ANOVA seguido de teste post-hoc de Dunett, para comparação de médias. Os asteriscos (\*) indicam diferenças estatisticamente significativas (\* $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Mas *et al.* (2020), estudando a capacidade de infecção de uma amostra isolada a partir de um surto de leishmaniose humana em Madrid no ano de 2016 e uma cepa referência de *L. infantum* BCN150, relataram a ocorrência de alterações na interação parasito-hospedeiro e no perfil de virulência, os autores investigaram a capacidade de infecção dessas cepas em macrófagos isolados de células mononucleares de sangue periférico de cão e a cepa referência apresentou infectividade significativamente superior. Os mesmos autores, em estudos posteriores, utilizando o mesmo isolado de *L. infantum* e a mesma cepa referência, agora utilizando macrófagos de linhagem DH82, verificaram que a cepa referência também exibiu capacidade de infecção superior, quando comparado com a estirpe selvagem (Mas *et al.*, 2022).

Nadaes *et al.* (2020) em pesquisas sobre a interação da *L. infantum* com macrófagos caninos DH82 e murinos RAW264.7, buscaram avaliar se as cepas das diferentes espécies de *Leishmania* spp. e os macrófagos caninos DH82 poderiam ser considerados um modelo preciso para o estudo da interação com *Leishmania* spp. Os resultados demonstraram um índice de sobrevivência da *L. infantum* em macrófagos caninos DH82 três vezes maior do que nas células

murinas em dois tempos avaliados de 24 e 48h pós-infecção.

Ao avaliarmos a capacidade infectante das cepas isoladas de cães naturalmente infectados e da cepa referência de *L. infantum* utilizadas em nosso estudo as amostras não demonstraram diferenças significativas em seus resultados, demonstrando que macrófagos da linhagem DH82 caracterizam-se como um bom modelo para estudar a interação leishmania-hospedeiro e que as cepas isoladas de cães naturalmente infectados têm a capacidade de infectar estas células e estatisticamente não possuem uma infectividade maior que a cepa referência como podemos observar nos gráficos da figura 01(A) e (B), sendo necessários mais testes para avaliar se mesmo não possuindo uma infectividade diferentes, as cepas selvagens isoladas na cidade de Teresina poderiam expressar algum gene que a difere de outras cepas isoladas em outras localidades.

A produção de óxido nítrico (NO) pela NO sintase induzível (iNOS) é um mecanismo chave de defesa contra patógenos intracelulares como espécies de *Leishmania* (Olekhovitch e Bouso, 2015). O NO têm ação tóxica sobre a forma amastigota do parasito. Como os amastigotas são o estágio responsável pela disseminação e manutenção da doença no hospedeiro, uma das respostas leishmanicidas bastante eficiente é a mediada pelo NO (Souza, 2004). A partir do comparativo dos resultados encontrados, observamos que a cepa do animal A1, apesar de na avaliação da sua capacidade infectante não ter apresentando uma diferença estatística significativa das outras cepas avaliadas, demonstrou um perfil de resposta macrofágica maior que das outras cepas.

Em pesquisa com linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, de cães infectados com *L. infantum*, com diferentes status clínico (saudáveis, sintomáticos e assintomáticos), Vieira *et al.* (2022) avaliaram a capacidade destas células de ativar macrófagos para aumentar a atividade leishmanicida em um experimento *in vitro* de cocultura. Os macrófagos co-cultivados com linfócitos foram testados quanto à capacidade de controlar o parasitismo celular e sua função microbicida através de produção de NO e espécies reativas de oxigênio. O aumento de NO ocorreu independentemente de quais subconjuntos de linfócitos T estavam presentes no sistema de cocultura. Estas observações indicaram que os macrófagos de animais assintomáticos poderiam ter um estado de ativação mais robusto contra *Leishmania* spp. Podemos levantar hipóteses para o caso do animal A1, que foi diagnosticado com a leishmaniose, mas não apresentava sintomatologia clínica, diferentemente dos outros dois cães, o que poderia justificar a elevada produção de óxido nítrico nos tempos avaliados.

A infecção por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* depende da eficácia da resposta imune do hospedeiro para controlar e eliminar o protozoário. O processo co-evolutivo permitiu que espécies de *Leishmania* se adaptassem e sobrevivessem na linhagem de células mieloides. Embora a expressão de NO possa ser um marcador importante de efeito leishmanicida, muitos estudos relatam que há cepas de parasitos que “escapam” a este processo. As cepas humanas e caninas de *L. infantum* e *L. braziliensis* são resistentes ao NO liberado por doador exógeno, o que está associado ao agravamento clínico da leishmaniose humana e canina (Santos *et al.*, 2012; Gupta *et al.*, 2022).

Os resultados desta pesquisa demonstram que as cepas isoladas de animais naturalmente infectados da cidade de Teresina, apresentaram uma capacidade infectante igual a cepa referência, porém com diferentes respostas quanto a produção de NO, podendo ser explicado pelo estado clínico dos animais naturalmente infectados.

## **CONCLUSÃO**

Assim podemos concluir que as macrófagos da linhagem DH82 caracterizam-se como um bom modelo para o estudo da interação leishmania-hospedeiro, as cepas isoladas de cães naturalmente infectados tem a capacidade de infectar estas células e estatisticamente não possuem uma capacidade infectante maior que a cepa referência. Com em relação a produção de óxido nítrico em quantidades diferentes, pode ter ocorrido pelo mecanismo da cepa no intuito de evadir-se da resposta imunológica já condicionada com uma produção maior desse reativo, pois a resposta dos macrófagos de animais assintomáticos pode ter um estado de ativação mais robusto contra *Leishmania* spp.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Núcleo de Morfologia e Pesquisa com Células-Tronco (NUPCelt/UFPI), onde foi realizado todo o ensaio celular. Este estudo teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## **REFERÊNCIAS**

ACUÑA S.M. *et al.* (2017) Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS ONE** 12(11): e0187186. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187186>

ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

BATISTA, F.M.A. *et al.* Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Cadernos de Saúde Pública**. 37(11). 2021. Disponível em: Doi: 10.1590/0102-311X00340320

BURZA S., CROFT S.L., BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**. 2018 Sep v.15; 392(10151); p. 951-970.

CABRITA, E., CAMPINO, L., MAIA, C. Immune response in infection by *Leishmania infantum* based on animal model. **Saúde & Tecnologia**. Maio. 2011. ed.5, p. 17–22 .

CARDOSO, E. A. *et al.*; Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**. 2014. v.3, p. 279-288.

DAGNINO, A. P. *et al.* Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some Hypericum species. **Phytomedicine**. n. 22, p. 71–76, 2015.

GUPTA A.K. *et al.* The pathogenicity and virulence of Leishmania - interaction of virulence factors with host defenses. **Virulence**. Dez 2022; 13(1):903-935. Disponível em: Doi: 10.1080/21505594.2022.2074130.

MAKSOURI H. *et al.* Moroccan strains of Leishmania major and Leishmania tropica differentially impact on nitric oxide production by macrophages. **Parasites & Vectors**. (2017) 10:506 . Disponível em: DOI 10.1186/s13071-017-2401-4

MARINHO F.A. *et al.* The potent cell permeable calpain inhibitor MDL28170 affects the interaction of *Leishmania amazonensis* with macrophages and shows anti-amastigote activity. **Parasitology International**. 2017 Oct. n. 66(5), p. 579-583. Disponível em: Doi: 10.1016/j.parint.2017.06.010.

OLEKHNOVITCH R. and BOUSSO P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Cell Press - Trends in Parasitology**. December 2015, Vol.31, No.12. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2015.08.001>

SANTOS P.L. *et al.* Leishmania chagasi naturally resistant to nitric oxide isolated from humans and dogs with visceral leishmaniasis in Brazil. **Nitric Oxide**. 2012. Jun 30;27(1):67-71. Disponível em: Doi: 10.1016/j.niox.2012.04.004.

SOUZA P. R. K. *Leishmania* spp: mechanisms of infection and immune response evasion. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano II, n. 3, jan. / jun. 2004.

SUNTER J.; GULL K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**. 2017 Sep;7(9):170165.

VASCONCELOS, J.M. *et al.* American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

VERMELHO, A. B. *et al.* Carbonic anhydrases from Trypanosoma and Leishmania as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1543-1555, mar. 2017. Disponível em: DOI: 10.1016/j.bmc.2016.09.051.

VIEIRA J.F.P, et al. CD4+ T-lymphocytes from asymptomatic dogs infected with Leishmania infantum

are able to activate macrophages for higher leishmanicidal ability in an in vitro co-culture experiment. **Molecular Immunology**. 151:61-69. Nov. 2022 Disponível em: Doi: 10.1016/j.molimm.2022.

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo da análise comparativa da capacidade infectante e do perfil de resposta macrofágica destes protozoários apresenta-se como mais uma contribuição para o enfrentamento da problemática de saúde pública das Leishmanioses na cidade de Teresina-PI, pois traz um olhar sobre os mecanismos de interação do parasito com as células do sistema imune, da evasão da resposta imunológica e da adaptação aos diferentes tipos de hospedeiros.

Por fim, em tempos atuais de descredibilização da ciência, esta modesta pesquisa reiterou a relevância da compreensão sobre a interação entre o parasito e as células hospedeiras, fornecendo também *insights* sobre a variabilidade da capacidade infectante das diferentes espécies de *Leishmania* spp., que circulam na nossa região.

### 4. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K. Imunologia básica. Elsevier Brasil, 2019.

AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, out. 2017.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1-12, 2012.

ASSIS, et al. Cost-effectiveness of a canine visceral leishmaniasis control program in Brazil based on insecticide-impregnated collars. **Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine**, v. 53, e20200680, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0680-2020>.

BATISTA, F.M.A. et al. Perfil epidemiológico e tendência temporal da leishmaniose visceral: Piauí, Brasil, 2008 a 2018. **Cadernos de Saúde Pública**. 37(11). 2021. Disponível em: Doi: 10.1590/0102-311X00340320

BAXARIAS M. et al. Immunotherapy in clinical canine leishmaniosis: a comparative update. **Research in Veterinary Science**, n.125, p. 218-226. Aug, 2019. Disponível em: Doi: 10.1016/j.rvsc.2019.06.009.

BEZERRA, É. A. et al. Garcinielliptone FC: Selective and immunomodulatory anti-mastigote effects on macrophages infected by *Leishmania amazonensis*. **Toxicology in Vitro**, v. 63, n. 104750, mar. 2020. Disponível em: Doi: 10.1016/j.tiv.2019.104750.

BOGDAN, C. Leishmaniose: Prinzipien der Immunantwort und Funktion von Stickstoffmonoxid [Leishmaniasis: principles of the immune response and function of nitric oxide]. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 111, n. 11-12, p. 409-414, nov./dez. 1998.

BOURDEAU, et al. Impact of different *Leishmania* reservoirs on sand fly transmission: Perspectives from xenodiagnosis and other one health observations. **Veterinary Parasitology**, v. 287, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109237>.

BURZA S., CROFT S.L., BOELAERT M. Leishmaniasis. **The Lancet**. v.15; 392(10151); p. 951-970. Setembro, 2018.

CABRITA, E., CAMPINO, L., MAIA, C. Immune response in infection by *Leishmania infantum* based on animal model. **Saúde & Tecnologia**. ed.5, p. 17–22. Maio, 2011.

CARDOSO, E. A. *et al.*; Leishmaniasis: History, Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**. v.3, p. 279-288. 2014.

CARSON, C. *et al.* Comparação do Leishmania OligoC-TesT PCR com PCR convencional e em tempo real para diagnóstico da infecção por Leishmania canina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3325-3330, set. 2010.

CASTRO, I.P. *et al.* Hepatic and proteic profile in dogs with visceral leishmaniasis. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 799-804, set./out. 2012.

CALVAY-SÁNCHEZ K.D. *et al.* Capacidad infectiva de promastigotes en fase estacionaria de *leishmania (viannia) braziliensis* y *leishmania (viannia) peruviana*, en línea celular dh82 [Infectivity of promastigotes in stationary phase of *Leishmania (viannia) braziliensis* and *leishmania (viannia) peruviana*, In cell line dh82. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**. n. 32(1): p. 33-40. Jan-Mar; 2015. Spanish.

CERBINO NETO J, Werneck GL, Costa CH. Factors associated with the incidence of urban visceral leishmaniasis: an ecological study in Teresina, Piauí State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**. (7):1543-51. Julho, 2009. Disponível em: Doi: 10.1590/s0102-311x2009000700012.

COELHO, A. C. *et al.* Susceptibilidade in vitro e in vivo à miltefosina de um isolado de *Leishmania amazonensis* de um paciente com leishmaniose cutânea difusa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, e2999, jul. 2014. Disponível em: Doi: 10.1371/journal.pntd.0002999.

COELHO, A. C. *et al.* In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, e2999, jul. 2014. Disponível em: Doi: 10.1371/journal.pntd.0002999.

COURA-VITAL, W. *et al.* Evaluation of changes in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new protocol for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, e91009, mar. 2014.

COSTA, D. N. C. C. *et al.* Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saúde Pública**. n. 52:92. 2018.

CUERVOA, P. *et al.* Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. **Acta Tropica**. n. 106, p. 143–148, 2008.

DAGNINO, A. P. *et al.*; Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some Hypericum species. **Phytomedicine**. n. 22, p. 71–76, 2015.

FREITAS, V.C *et al.*; Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Apr 1, 2012; 86 (4)

FOGANHOLI, J. N.; ZAPPA, V. Importance of the leishmaniasis in the public health. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Ano IX, n. 17, jul. 2011.

HANDMAN, E.; BULLEN, D. V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 8, p. 332-334. Agosto, 2002. Disponível em: Doi: 10.1016/s1471-4922(02)023528.

ISHIKAWA, E. A. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. 111-121, abr. 2002. Disponível em: Doi: 10.1016/s0035-9203(02)90061-1.

MARINHO F.A. et al. The potent cell permeable calpain inhibitor MDL28170 affects the interaction of *Leishmania amazonensis* with macrophages and shows anti-amastigote activity. **Parasitology International**. n. 66(5), p. 579-583. Oct., 2017. Disponível em: Doi: 10.1016/j.parint.2017.06.010.

MAS A. *et al.* Transcriptomic profile of DH82 canine macrophages infected by *Leishmania infantum* Promastigotes with different virulence behavior. **International Journal of Molecular Sciences**. 23(3):1466. Janeiro de 2022;

MELO S.N. de, et al. Spatio-temporal relative risks and priority areas for visceral leishmaniasis control in Brazil, between 2001 and 2020. **Acta Tropica**. 242:106912. Junho, 2023. Disponível em: Doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106912.

MENDONÇA P.H.B. et al. Canine Macrophage DH82 Cell Line a Model to Study Susceptibility to Dog Infection *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Immunology**. Maio, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose Tegumentar (LT). Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt>. Acesso em: Nov. 2023.

MORAIS, R. C. et al. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. **Experimental Parasitology**, v. 165, p. 43-50, jun. 2016. Disponível em: Doi: 10.1016/j.exppara.2016.03.005.

NADAES N.R., et al. Canine macrophage lines DH82 and RAW264.7 present distinct activation profiles in interaction with *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Junho, 2020. 12;10:247.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Síntesis de evidencia y recomendaciones: directrices para el tratamiento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, ed. 43, 2023.

PARK, S. Y. et al. Structural basis of cysteine protease inhibitor *Clonorchis sinensis* Stefin-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 1, p. 9-17, 2018.

PIMENTAL, P.F.P et al.; A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCTEM) - 2012.

POINAR, G.; POINAR Jr., R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. **Protist**, v. 155, p. 305–310, 2004.

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

10.2217/fmb.14.103.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.

SANTOS, L.O. et al. HIV Aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, e. 4918, 2009.

SANTI, A.M.M.; MURTA, S.M.F. Impact of Genetic Diversity and Genome Plasticity of *Leishmania* spp. in Treatment and the Search for Novel Chemotherapeutic Targets. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 826287, 24 jan. 2022. Disponível em: Doi: 10.3389/fcimb.2022.826287.

SECUNDINO N.F. et al. The transmission of *Leishmania infantum* chagasi by the bite of the *Lutzomyia longipalpis* to two different vertebrates. **Parasit Vectors**. 19;5:20. Jan. 2012.

SILVA, F.C.; ALVES, C.R. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014.

SILVA, J.M.C. et al. Aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos de cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. **Ciência Animal**, v. 29, n. 4, p. 84-100, 2019.

SUNTER J.; GULL K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**. 7(9):170165. Setembro, 2017.

VALENTE, J. S. Síntese de evidência e recomendações: directrizes para o tratamento de las leishmaniasis en la Región de las Américas. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, e. 42, 2023. Disponível em: DOI: 10.26633/RPSP.2023.42.

VAN ASSCHE T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**. 2011 Jul 15;51(2):337-51.

VASCONCELOS, J.M. et al. American integumentary leishmaniasis: epidemiological profile, diagnosis and treatment. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

VELOSO E.C.M, et al.. Socio-economic and environmental factors associated with the occurrence of canine infection by *Leishmania infantum* in Teresina, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. 24:100561. Abril, 2021. Disponível em: Doi: 10.1016/j.vprsr.2021.100561.

VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 5, p. 1543-1555, mar. 2017. Disponível em: Doi: 10.1016/j.bmc.2016.09.051.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Leishmaniasis. Who. int. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/es/newsroom/factsheets/detail/leishmaniasis>.