

LUCILLY LUIZA SANTOS

Comparação da infectividade *in vitro* de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* causadora de leishmaniose cutânea atípica com cepas causadoras de leishmaniose visceral

LUCILLY LUIZA SANTOS

Comparação da infectividade *in vitro* de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* causadora de leishmaniose cutânea atípica com cepas causadoras de leishmaniose visceral

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel, junto ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas com habilitação em Gerenciamento Costeiro, do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus do Litoral Paulista.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

São Vicente, SP
2025

S237c	Santos, Lucilly Luiza Comparação da infectividade in vitro de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> chagasi causadora de leishmaniose cutânea atípica com cepas causadoras de leishmaniose visceral / Lucilly Luiza Santos. -- São Vicente, 2025 33 p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, São Vicente Orientador: Luiz Felipe Domingues Passero 1. <i>Leishmania infantum</i>. 2. Leishmaniose visceral. 3. Infectividade in vitro. 4. Comparação. I. Título.
-------	---

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a toda a minha família, meus irmãos, e, em especial à minha mãe Jussara e minha avó Aparecida, fontes de inspiração e de um amor imensurável.

Agradeço aos amigos do “Costas”, da turma XIX e da UNESP que me acompanharam durante toda a graduação, pelas risadas, incentivo e carinho, espero levá-los por toda a minha vida.

Agradeço ao professor Luiz Felipe por toda a orientação, suporte, paciência, por todos os chocolates e acima de tudo, por sua amizade. A sua presença tornou o caminho muito mais leve e satisfatório, sou imensamente grata por todos os momentos que compartilhamos em laboratório.

Agradeço aos amigos de laboratório Ana e Diogo, por estarem sempre dispostos a ajudar, e por tornar a jornada mais divertida.

Às minhas queridas amigas, Heloysa e Gabriela, por todos os anos de amizade, com muito carinho, apoio e incentivo.

Agradeço à Profa. Dra. Márcia Dalastra Laurenti, chefe do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM50), do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP pela abertura das portas do seu laboratório. Agradeço a todos os funcionários e colegas do LIM-50, em especial a Gabriela Araújo, Italo, Sarah e Thaise por todo o suporte, paciência para me ensinarem “do zero” e momentos de descontração.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (2024/20115-1) e pelo projeto regular de pesquisa 2023/01641-1 que financiou este projeto.

Agradeço ao Instituto de Biociências do Câmpus do Litoral Paulista (IB-CLP) e ao Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR-UNESP) por fornecer todo o suporte necessário para minha graduação, pesquisa e formação.

Finalmente, agradeço a Deus, a nossa Senhora de Aparecida e a meus guias, por todos os conselhos, suporte e amor.

RESUMO

A leishmaniose é considerada uma zoonose de ordem prioritária para a Organização Mundial da Saúde (OMS), apresentando-se de maneira visceral (LV) e cutânea, a depender da espécie infectante do parasito. Na América do Sul, a LV é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, a qual afeta principalmente o baço, fígado e medula óssea. Por outro lado, a mesma espécie além de causar a LV clássica também é o agente etiológico da leishmaniose cutânea não ulcerada (LCNU) ou leishmaniose atípica na América Central. Na tentativa de compreender diferenças biológicas entre as cepas sul-americanas e centro-americana (isolada em Honduras), o presente trabalho comparou o crescimento de formas promastigotas, a infectividade *in vitro* e a sensibilidade de formas promastigotas e amastigotas à anfotericina B. Em relação ao crescimento de formas promastigotas, observou-se que a cepa hondurenha apresentou uma fase estacionária mais prolongada que as demais, demonstrando uma possível adaptação a condições estressores como deficiências nutricionais ou melhor eficiência metabólica. Quanto a infecção *in vitro* em macrófagos da linhagem J774, a cepa hondurenha também apresentou destaque, com índice de infecção maior em relação às cepas sul-americanas, sugerindo que essa cepa possui um melhor mecanismo de evasão dos macrófagos, implicando uma maior infectividade (*in vitro*). Durante os ensaios de sensibilidade à anfotericina, a cepa atípica apresentou maior resistência tanto nos testes realizados em formas promastigotas quanto em amastigotas. Portanto, os resultados apresentados destacam a importância de estudar cepas atípicas, como a hondurenha, para compreender melhor a diversidade biológica de *Leishmania* e suas implicações para o controle da leishmaniose, principalmente no que diz respeito à resistência a tratamentos e à resposta imune. A variabilidade entre as cepas pode representar um desafio significativo para o manejo e a prevenção da doença, especialmente em regiões onde cepas mais virulentas podem estar presentes, o que exige uma abordagem mais específica e adaptada no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*. Leishmaniose visceral. Infectividade *in vitro*. Comparação.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered a priority zoonosis by the World Health Organization (WHO), presenting in visceral (VL) and cutaneous forms depending on the infecting parasite species. In South America, VL is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, which primarily affects the spleen, liver, and bone marrow. On the other hand, this same species, in addition to causing classical VL, is also the etiological agent of non-ulcerated cutaneous leishmaniasis (NUCL) or atypical leishmaniasis in Central America. In the attempt to understand the biological differences between South Americans and Central American strains (the latter isolated in Honduras), the present study compared the growth of promastigote forms, *in vitro* infectivity, and the susceptibility of both promastigote and amastigote forms to amphotericin B. Regarding promastigote growth, the Honduran strain exhibited a longer stationary phase than the others, suggesting a possible adaptation to stressful conditions such as nutritional deficiencies or greater metabolic efficiency. In terms of *in vitro* infection in J774 macrophages, the Honduran strain also stood out, showing higher infection indices compared to the South American strains, suggesting that this strain has a better macrophage evasion mechanism, it implies that this strain has a superior infectivity. During the amphotericin susceptibility assays, the atypical strain showed increased resistance in tests performed with both promastigote and amastigote forms. Therefore, the results highlight the importance of studying atypical strains, such as the Honduran one, to better understand the biological diversity of *Leishmania* and its implications for leishmaniasis control, particularly regarding treatment resistance and immune response. The variability among strains may represent a significant challenge for disease management and prevention, especially in regions where more virulent strains may be present, requiring a more specific and adapted approach to the treatment of both visceral and cutaneous leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania infantum*. Leishmaniose visceral. *In vitro* infectivity. Comparison.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 – Aspectos gerais das leishmanioses	8
1.2 – A leishmaniose cutânea não-ulcerada causada por L. (L.) infantum chagasi	12
1.3 – A resposta imunológica nas leishmanioses	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. OBJETIVO GERAL	15
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Parasitos	17
3.2 Célula hospedeira	17
3.3 Crescimento de formas promastigotas	17
3.4 Infecção in vitro de macrófagos	18
3.4 Sensibilidade de promastigotas à anfotericina B	19
3.5 Sensibilidade de amastigotas à anfotericina B	19
3.6 Análise estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Análise do crescimento de formas promastigotas	20
4.3 Infecção in vitro de macrófagos da linhagem J774	23
4.2. Sensibilidade à anfotericina B em promastigotas	24
4.4. Sensibilidade de amastigotas à anfotericina B em	26
5. CONCLUSÃO	28
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais das leishmanioses

A leishmaniose é uma doença antroponozoonótica, causada por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, e ao gênero *Leishmania*. Atualmente, este gênero abriga diversas espécies patogênicas a seres humanos (OPAS/ OMS, 2021). Mais recentemente, Espinosa e colaboradores (2018), propuseram a divisão sistemática de *Leishmania* em dois clados: *Euleishmania* e *Paraleishmania*, sendo que no primeiro agrupam-se os subgêneros *Leishmania*, *Viannia* e *Sauroleishmania*, sendo os dois primeiros os principais causadores das infecções cutâneas e viscerais em humanos.

Atualmente, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença parasitária de ordem prioritária, tratada como um dos objetivos de desenvolvimento sustentável contidos na agenda 2030 para a eliminação de doenças de tropicais negligenciadas (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA., 2013). Devido a negligência com a qual é tratada, recursos de prevenção limitados e alta taxa de expansão geográfica. A doença é endêmica em 98 países, contudo estima-se que 85% dos casos registrados ocorram em 10 países, sendo 4 deles, localizados na América do Sul (Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru). Em relação à Leishmaniose visceral, 68% dos casos ocorrem de maneira concentrada no Brasil, Índia, Sudão e Quênia. (OPAS/ OMS, 2024). A Figura 1 apresenta um mapa com a distribuição espacial de áreas endêmicas de leishmaniose, em suas diferentes formas, no mundo em 2023.

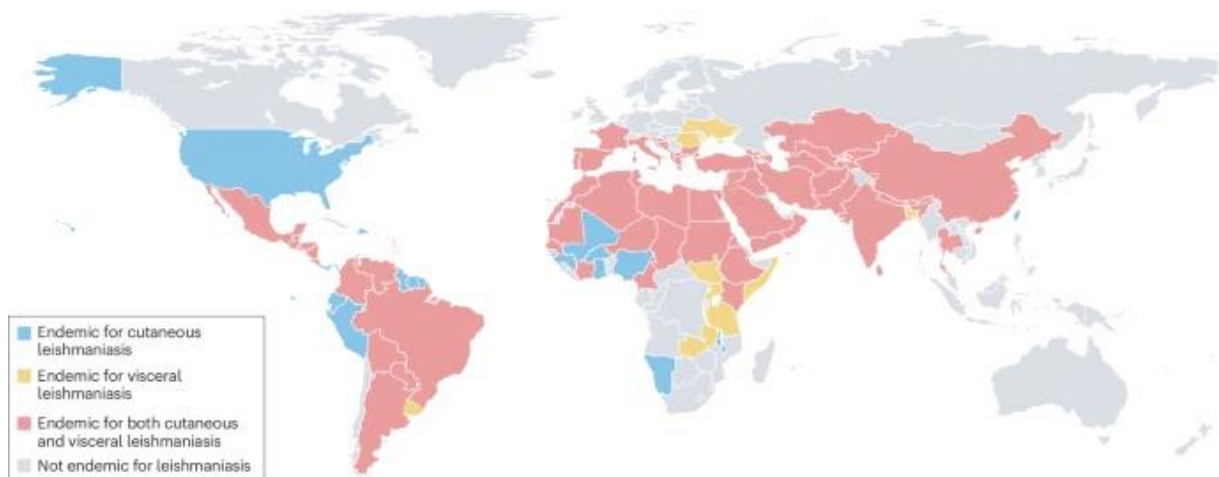


Figura 1: Mapa global da distribuição da leishmaniose humana em 2023. A coincidência de áreas endêmicas de leishmaniose cutânea e visceral é observada principalmente no Leste da África (como Etiópia e Sudão), no Sul da Ásia (especialmente nas zonas fronteiriças entre Índia e Paquistão), no Brasil e na região do Mediterrâneo/Oriente Médio. Nessas localidades, condições ecológicas favoráveis possibilitam a circulação simultânea de espécies de *Leishmania* responsáveis por ambas as formas da doença. (PAREYN et al., 2025)

O parasito apresenta duas formas ao longo de seu ciclo vital: a forma promastigota, localizada no tubo digestório dos insetos vetores, e as formas amastigotas, encontradas no interior de macrófagos teciduais dos hospedeiros mamíferos vertebrados (TORRES-GUERRERO, et al., 2017). A infecção pelo protozoário tem início quando a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Nesse momento, o inseto ingere células infectadas com as formas amastigotas do parasito, que se diferenciam em formas promastigotas procíclicas, estas que posteriormente, diferenciam-se nas formas metacíclicas (infectivas), que habitam diferentes áreas do tubo digestório do animal (BATES, 2018).

Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea do inseto vetor regurgita as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro (PACHECO, 2022), as quais são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais do hospedeiro, transformando-se em formas amastigotas; estas, multiplicam-se até que ocorra a lise da célula, fazendo com que outros macrófagos possam ser infectados, dando início a doença cutânea ou visceral (FLORES, 2022). A figura 1 ilustra o ciclo de vida do parasito em hospedeiro invertebrado (em vermelho) e hospedeiro vertebrado (azul).

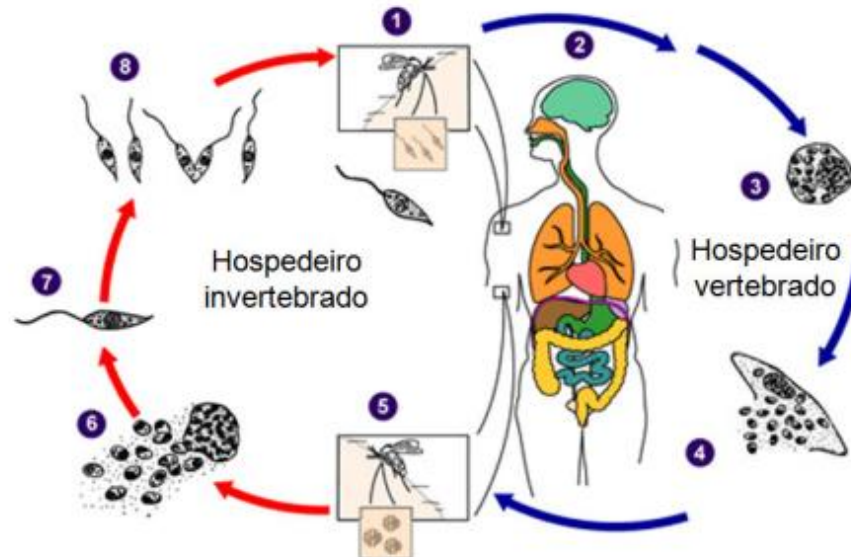


Figura 2: Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*. (1) repasto sanguíneo realizado por fêmeas de flebotomíneos infectadas, iniciando a infecção humana. (2) após a infecção, as formas promastigotas são fagocitadas por células ativadoras do sistema imunológico, e se diferenciam em amastigotas, multiplicando-se de maneira rápida nas células hospedeiras e ocasionando em sua lise celular (3). Posteriormente, ocorre um novo repasto em um hospedeiro vertebrado, as fêmeas de mosquitos podem ingerir células infectadas (4), que devido a múltiplas enzimas digestivas do inseto serão rompidas liberando as formas amastigotas (5), onde novamente se diferenciam em formas promastigotas do parasita (6), se ligarão à superfície intestinal destes artrópodes e se multiplicarão (7), desta maneira, tornando a infecção viável novamente (8) e reiniciando o ciclo. Adaptado de *Centers for Disease Control (CDC)*.

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de infecção. Esta pode se manifestar de três maneiras: leishmaniose cutânea localizada – LCL (FIGURA 2A); leishmaniose cutânea anérgica difusa – LCAD (FIGURA 2B); e leishmaniose mucocutânea – LM (FIGURA 2C) (ABADÍAS-GRANADO, I. et al, 2021) A LCL é a manifestação mais frequente da doença, cuja manifestação clínica envolve lesões arredondadas e com bordas elevadas em regiões expostas do corpo. A LCAD apresenta múltiplos nódulos, que afetam todo o corpo (FREITES et al., 2018). A LM é restrita à América Latina (STEVERDING, 2017); e os pacientes afetados apresentam lesões nas mucosas nasais, boca e garganta, posteriormente, causa a destruição de

tecido mucoso e cartilaginoso causando deformidades significativas (STEVERDING, 2017). A Figura 2 ilustra as principais manifestações clínicas da leishmaniose cutânea, destacando suas diferentes formas.

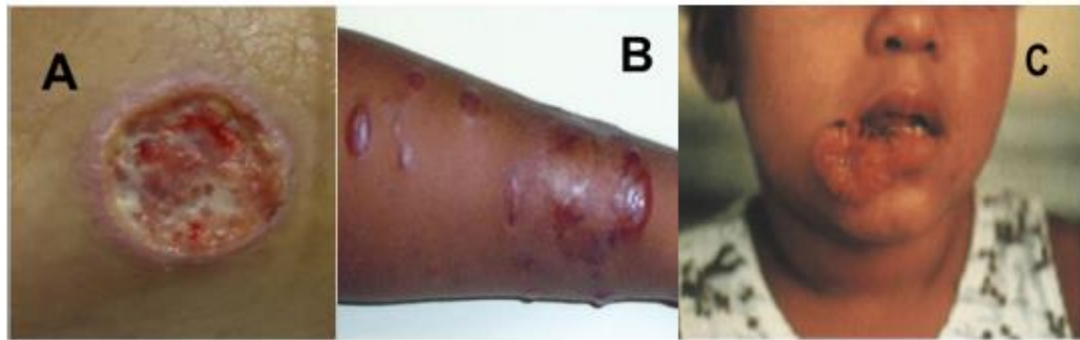


Figura 3: Diferentes manifestações de leishmaniose cutânea: (A) Leishmaniose cutânea ulcerada localizada, manifestação típica; (B) leishmaniose cutânea anérgica difusa; (C) leishmaniose mucocutânea acometendo a língua, com aspecto infiltrativo e vegetante. Adaptado de: A = Fiocruz Minas (s.d.); B = Azeredo-Coutinho; Mendonça (2014); C = Ramos-e-Silva; Zaitz (1999).

Por sua vez, a leishmaniose visceral (LV), conhecida em certas regiões como “calazar”, é causada pelo parasito *Leishmania (L.) infantum chagasi* nas Américas, e *L. (L.) donovani* na Europa, Ásia e África. Esta forma clínica é classificada como sendo mais grave em comparação à LC, e potencialmente fatal se o paciente não for tratado adequadamente (CONDE et al., 2022; COSTA et al., 2023). Após a inoculação dos parasitas pelo vetor, ocorre a infecção dos macrófagos na derme, estes se disseminam pela via linfática até órgãos hematopoiéticos, como o baço, fígado, gânglios linfáticos e medula óssea (FLORES, 2022; GOTO, 2023). Após o período de incubação, ocorre a manifestação de sinais clínicos clássicos como febre a intervalos irregulares, assim como o aumento progressivo do baço (esplenomegalia) e do fígado (hepatomegalia); a medula óssea apresenta hiperplasia mieloide. Devido a leucopenia e a desnutrição que acompanha a doença, os indivíduos afetados tornam-se suscetíveis a outras infecções, que podem agravar a doença e levar à morte (PACHECO, 2017). A figura 3 ilustra a leishmaniose visceral em um adulto com desnutrição e hepatomegalia.



FIGURA 4: Caso clínico avançado de leishmaniose visceral com sinais de aumento abdominal compatíveis com comprometimento de órgãos internos. Fonte: FIOCRUZ Minas. Leishmanioses.

1.2 – A leishmaniose cutânea não-ulcerada causada por *L. (L.) infantum chagasi*

Ainda que classicamente a *L. (L.) infantum chagasi* nas Américas esteja fortemente associada à LV, em 1980, na América Central, na Costa Rica, El Salvador, Honduras e Nicarágua foi reportado casos de lesões cutâneas não ulceradas em regiões tipicamente endêmicas de leishmaniose visceral, os quais foram nominados como leishmaniose cutânea não ulcerada atípica ou anérgica (LCNU), as quais eram causadas por *Leishmania infantum chagasi* (ZELEDÓN et al., 1982; PACHECO, 2022). As lesões de tais pacientes foram identificadas pelo aspecto de pápulas ou placas eritematosas não ulcerativas, com diâmetro entre 1 a 10 mm, distribuídas por áreas expostas do corpo. Nesta forma clínica não ocorre a visceralização do parasito, caracterizando a hepatoesplenomegalia, características que, de fato, destoam da infecção clássica por *L. infantum chagasi* que causam a leishmaniose visceral.

Especificamente em Honduras, observou-se em habitantes de uma área endêmica de LV (Isla del Tigre, Honduras) que a maioria dos infectados apresentam lesões cutâneas pouco numerosas (1 a 3), com diâmetro de 3 a 7mm, papulares, não ulceradas e hipopigmentadas. Os pacientes não apresentavam sinais de imunocomprometimento, febres ou desnutrição, e não possuíam história ou suspeita de leishmaniose visceral antes do aparecimento das lesões cutâneas (PONCE et al.,

1991). Ainda foi verificado que o vetor incriminado era *Lutzomyia longipalpis* (MEJÍA et al., 2018; SOSA-OCHOA, et al., 2020). Embora a LCNU seja considerada uma forma mais benigna de leishmaniose, é de grande importância epidemiológica, visto a probabilidade de que os pacientes infectados por esta forma clínica possam ser uma fonte de infecção para o vetor flebotomíneo. A figura 4 ilustra a LCNU em pacientes hondurenhos (ARAUJO FLORES 2017).

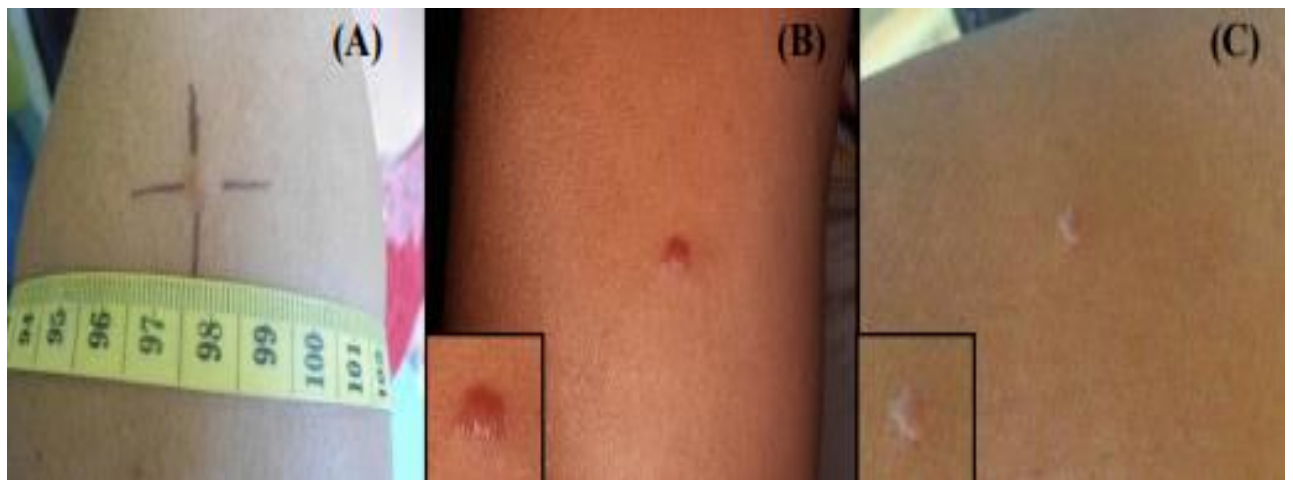


Figura 5: Acompanhamento do aspecto clínico da lesão de leishmaniose cutânea não-ulcerada, onde (A) demonstra o diâmetro da lesão, (B) uma lesão recente de aproximadamente 7 meses e (C) uma lesão crônica de 180 meses. Fonte: ARAUJO FLORES (2017).

1.3 – A resposta imunológica nas leishmanioses

Em relação à resposta imunológica na leishmaniose, os macrófagos tornam-se as principais células hospedeiras do parasito, as quais são decisivas para determinar o curso de infecção (GOTO; HARUKA, 2023). Após inoculação de *Leishmania* na derme do hospedeiro vertebrado, uma série de fatores do parasito atuam como mecanismo de evasão, como por exemplo, os antígenos conhecidos como a metaloproteinase de 63 kDa (gp63) e o lipofosfoglicano (LPG). A gp63 cliva o componente C3b do sistema complemento, o tornando inativo (C3bi). As moléculas de C3bi se ligam ao LPG na membrana das formas promastigotas levando a um processo de fagocitose silencioso, o que de fato, inibe a explosão respiratória dos

macrófagos, permitindo a sobrevivência de *Leishmania* sp. (MANDELL; BEATTY; BEVERLY, 2022; MAZUMDER et al., 2022). Adicionalmente, a gp63 também pode causar a ruptura de proteínas da matriz extracelular das células hospedeiras, permitindo que o parasita se mova no tecido conjuntivo (SREEDHARAN e BHASKARA, 2023).

Após a infecção de macrófagos por *Leishmania* sp., as respostas imunológicas são moduladas não apenas pelos mecanismos de combate do hospedeiro ao parasita, mas também pelas estratégias de evasão imunológica que o protozoário possui (GOTO, 2023). Nesse contexto, a resposta imune adaptativa é fortemente influenciada pela ativação e polarização dos macrófagos, que podem assumir perfis funcionais distintos conforme os sinais recebidos. Quando expostos a citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) ou estímulos microbianos como lipopolissacarídeo (LPS), os macrófagos, ativados pelos linfócitos T auxiliares CD4⁺, tendem a adotar o perfil M1, caracterizado por atividade inflamatória intensa e capacidade microbicida, essencial para a eliminação do patógeno. Em contrapartida, sob ativação alternativa, mediada por citocinas como IL-4 e IL-13, manifesta-se o perfil M2, associado à regulação da inflamação, reparo tecidual e resolução da resposta imune. Dessa forma, a polarização M1/M2 desempenha um papel central na orientação da imunidade, permitindo ao organismo adaptar sua estratégia defensiva de acordo com a natureza e as características do desafio imunológico (NANDAN; BRAR; REINER, 2024). Apesar dos avanços atuais, ainda há poucos dados sobre a interação de certas espécies de *Leishmania* com suas células hospedeiras. Isso implica que os mecanismos utilizados por *L. (L.) infantum chagasi*, cepa associada à leishmaniose cutânea atípica, para se manter viável no interior da célula hospedeira permanecem pouco compreendidos.

Isolada pela primeira vez em 1959 por meio de culturas fermentadoras de *Streptomyces nodosus* (CAVASSIN et al., 2021), a anfotericina B é atualmente um

fármaco amplamente utilizado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por fungos ou parasitas (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER., 2005). No combate à leishmaniose, o fármaco apresenta alto potencial, uma vez que liga-se ao ergosterol presente nas células destes protozoários, formando poros em suas membranas celulares e ocasionalmente levando à morte celular (KUMARI et al., 2022). No entanto,

diferentes cepas de *Leishmania* podem apresentar variações na resposta ao tratamento, indicando a possibilidade de resistência e destacando a importância de avaliar a eficácia do fármaco para cada cepa estudada.

Apesar disso, se reconhece que a forma de manifestação e a progressão da doença, assim como a severidade da infecção, estão relacionadas à espécie do parasita, ao seu grau de infectividade e ao estado imunológico do hospedeiro. Recentemente, Silveira e colaboradores (2025) propuseram uma revisão taxonômica para *L. (L.) infantum chagasi* baseada em divergências fenotípicas e genotípicas dos isolados hondurenhos. Entre essas diferenças estão variações na capacidade de infectar células, além da possibilidade de que tais parasitos tenham diferentes sensibilidades aos fármacos comumente utilizados na terapia, podendo todas essas características reforçar a diferenciação entre as cepas. Os achados anteriores sugerem que a cepa hondurenha pode representar uma linhagem diferenciada, possivelmente merecendo uma nova nomenclatura. Assim, os dados aqui obtidos podem reforçar que a *L. (L.) infantum chagasi* causadora de LCNU mereça ser alocada em outro patamar taxonômico.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar aspectos biológicos de uma cepa de *L. (L.) infantum chagasi* isolada de leishmaniose cutânea não ulcerada com cepas que causam LV típica

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o crescimento de formas promastigotas de cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* que causam a LV clássica, com uma cepa isolada de um caso clínico de LCNU em Honduras.
- Comparar a infectividade (*in vitro*) de cepas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* que causam LV clássica, com uma cepa de LCNU;
- Comparar a sensibilidade de formas promastigotas das diferentes cepas utilizadas neste estudo ao fármaco anfotericina B;
- Comparar a sensibilidade de formas amastigotas das diferentes cepas utilizadas neste estudo ao fármaco anfotericina B.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Parasitos

No presente estudo foram utilizadas três cepas de *L. (L.) infantum chagasi*: duas cepas brasileiras, isoladas de casos clínicos de leishmaniose visceral (MHOM/BR/1972/BH-46 (BH46) e MHOM/BR/1974/PP75 (PP75), e uma cepa isolada de um caso clínico de leishmaniose cutânea atípica, MHOM/HND/2017/AMA-65, (AMA-65) isolada em Playa Grande, no município de Amapala, em Honduras. Os parasitos foram caracterizados isoenzimaticamente e por PCR-RFLP (ARAUJO FLORES et al., 2023) no Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), e no Laboratório de Patologia das Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP, Brasil. As cepas foram cultivadas a 25 °C, em meio Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de L-glutamina, 10 µg/mL de gentamicina e 1000 UI/mL de ampicilina (S10). Em todos os experimentos foram utilizadas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (obtidas após 5 dias de cultivo).

3.2 Célula hospedeira

Para os experimentos, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774, disponível no biorepositório do Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMAR) da UNESP. As células foram cultivadas em placas de cultura de 75cm² em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB e 2 mM de glutamina em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO₂ durante o período experimental.

3.3 Crescimento de formas promastigotas

Formas promastigotas das cepas referenciadas no item 3.1 foram coletadas, quantificadas e ajustadas para uma concentração de 10⁶ parasitas/mL, com 100µL/poço. As amostras foram então adicionadas, em triplicata, a placas de 24 poços contendo meio S10. Durante 10 dias consecutivos foram retirados 10 µL de cada cultura para contagem em câmara de Neubauer, visando analisar o crescimento das

diferentes cepas. Anteriormente à mensuração, a alíquota de parasitos foi fixada em formalina 1%. A diluição utilizada dependeu da densidade de parasitos contida no poço, a qual foi observada em microscópio invertido anteriormente à quantificação. Após fixação, 10 µL dos parasitos fixados foram adicionados à câmara de Neubauer e contados sob microscopia óptica. Este experimento foi feito em quadruplicata.

3.4 Infecção *in vitro* de macrófagos

Macrófagos da linhagem J774 foram coletados das garrafas de cultura após 5 dias de crescimento, ajustados a concentrações de 10^6 células/mL, onde 100µl por poço foram acondicionados em placas de 24 poços contendo lamínulas estéreis. As células foram alocadas em incubadora celular umidificada à 37°C, 5% de CO₂, 24h, para garantir sua fixação. Após este período, as células foram infectadas com as formas promastigotas das cepas de *L. (L.) infantum chagasi* em fase estacionária de crescimento nas proporções de 5 e 10 parasitos por macrófagos durante 24 e 72 horas.

Após tais períodos, os poços foram lavados três vezes com PBS a 37°C e as lamínulas foram coletadas e coradas pelo método do panótico rápido. Após completa secagem, as lamínulas redondas foram coladas sobre lâminas de vidro e identificadas. Utilizando microscópio óptico foram quantificadas ao menos 200 células totais e registrado o número de macrófagos totais, macrófagos infectados assim com o número de formas amastigotas intracelulares.

O índice de infecção (II) de cada situação experimental será mensurado conforme expressão matemática:

$$II = (\% \text{ Macrófagos infectados}) \times \left(\frac{N^{\circ} \text{ de formas amastigotas}}{N^{\circ} \text{ Macrófagos infectados}} \right)$$

3.4 Sensibilidade de promastigotas à anfotericina B

Promastigotas das cepas citadas no item 3.1 foram ajustadas a uma concentração de 10^6 parasitos/poço, em placas estéreis de 96 poços. Nestes poços, foram adicionadas oito concentrações de anfotericina B, variando de 0,039 a 5 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Nos grupos controle, sem adição do fármaco, foi adicionada somente meio S10. Os parasitos foram mantidos em incubadora a 25°C durante 24h e 72h.

Após tais períodos, os poços contendo os parasitos foram lavados 3 vezes com PBS através de centrifugações a 3000 rpm, 4°C, e a viabilidade parasitária foi avaliada utilizando resazurina 5% diluída em meio de cultura. A resazurina adentra, passivamente, as células dos parasitas e é reduzida pelo metabolismo das células viáveis em resorufina, um composto altamente fluorescente de cor rosada. Dessa forma, a intensidade da fluorescência gerada correlaciona-se diretamente com o número de parasitas viáveis. Assim, após 3 horas, a fluorescência dos poços foi analisada em leitor de placas (Fluostar Omega, utilizando o comprimento de onda de excitação em 544 nm e a de emissão em 590-10 nm).

Utilizando o software GraphPad Prism versão 9.0 para Windows, foram estimadas as concentrações de anfotericina B que eliminam 50% (CE_{50}) da população de parasitas de cada cepa através de curvas de regressão linear, e então, a comparação entre as concentrações foi realizada.

3.5 Sensibilidade de amastigotas à anfotericina B

Para a análise de sensibilidade das formas amastigotas à anfotericina B, macrófagos da linhagem J774 foram infectados com as cepas de *L. (L.) infantum chagasi* de maneira similar àquela descrita no item 3.4 com 10 parasitos/célula. Após 24h da infecção às células infectadas foi adicionado 0,01, 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. Após 24 e 72h de tratamento com anfotericina B o índice de infecção foi estimado de acordo com o item 3.4, e a concentração efetiva 50% foi avaliada usando regressão linear.

3.6 Análise estatística

Os experimentos foram repetidos três vezes e os dados apresentados com a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística empregada foi o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação de grupos múltiplos. A diferença foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

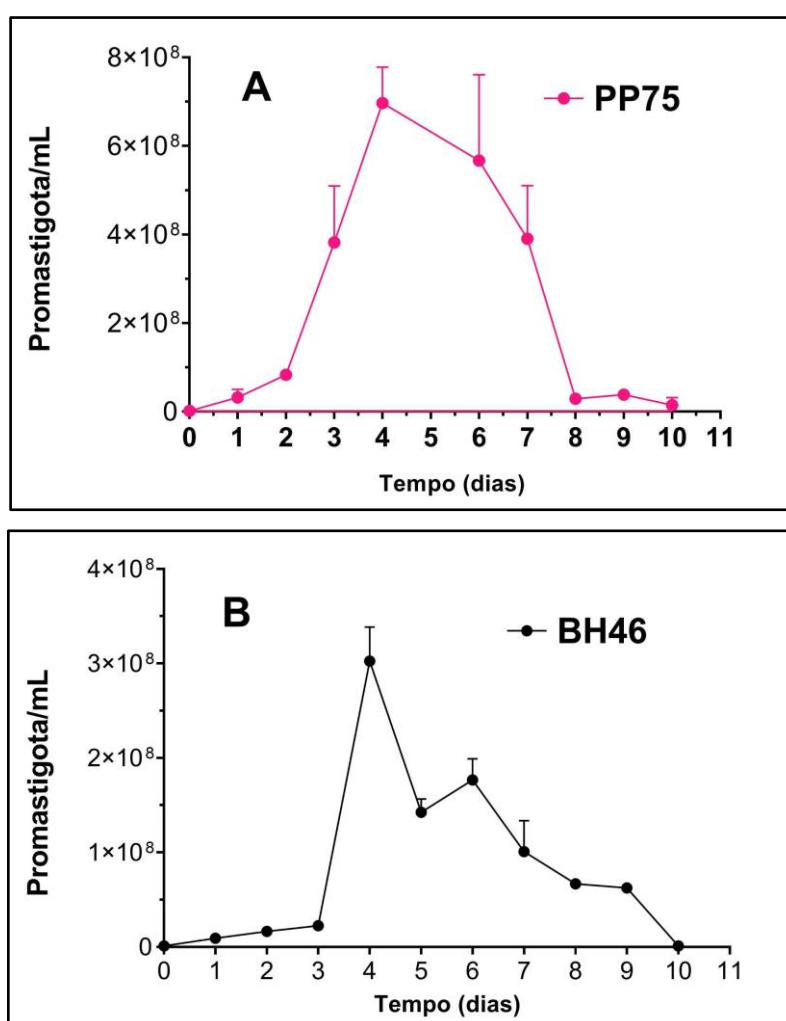
4.1. Análise do crescimento de formas promastigotas

O crescimento das formas promastigotas de todas as cepas foi avaliado ao longo de 10 dias de cultivo. Observou-se que todas apresentaram uma fase *lag*, esta que se refere ao período inicial do crescimento dos parasitas que se estendeu até aproximadamente o 3º dia, seguida pela entrada na fase *log* (período em que ocorre máxima multiplicação das promastigotas) a partir do 3º dia de cultivo, exceto a cepa PP75 que entrou em fase log no segundo dia de cultivo. Em comparação com as demais cepas analisadas, AMA-65, a cepa atípica (Figura 5C), exibiu uma fase estacionária mais prolongada, mantendo um crescimento estável entre o 4º ao 6º dia, enquanto as cepas brasileiras apresentaram menor fase estacionária (Figura 5A e 5B).

Comparativamente, no 5º dia de crescimento, período em que os parasitos apresentaram crescimento acentuado, representando a fase exponencial de *Leishmania*, a forma promastigota da cepa AMA65 apresentou um crescimento de $1,3 \times 10^8$. Em contraste, as cepas brasileiras exibiram densidades celulares consideravelmente maiores, onde a cepa BH46 (figura 2B) alcançou $1,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^6$ promastigota/mL, enquanto PP75 (figura 5A) apresentou o maior valor entre todas, com $3,5 \times 10^8 \pm 6,1 \times 10^7$ promastigota/mL.

Esses dados indicam que, durante o período exponencial (5º dia), as cepas brasileiras demonstram um potencial replicativo mais intenso, especialmente a cepa PP75, que supera amplamente as demais na taxa de multiplicação. A cepa BH46 também mantém um padrão de crescimento elevado, ainda que intermediário entre as cepas estudadas. Por outro lado, a AMA-65 apresenta um crescimento mais

discreto, atingindo densidades celulares menores no mesmo intervalo, o que sugere um perfil replicativo reduzido. Esse comportamento reforça um padrão biológico distinto para a cepa hondurenha, que pode refletir diferenças intrínsecas em metabolismo, adaptação ao meio ou capacidade replicativa.



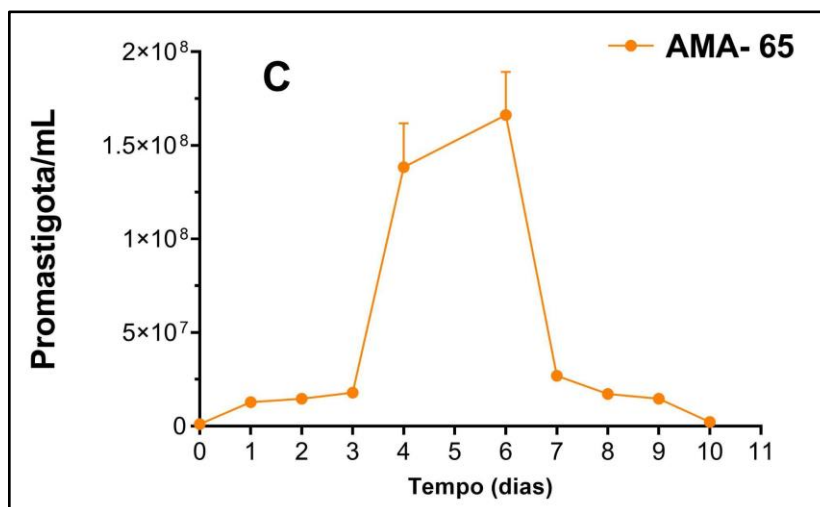


Figura 6: Crescimento de formas promastigotas das cepas de *L. (L.) infantum chagasi*. As culturas foram plaqueadas a uma concentração inicial de 10^6 parasitos/mL, e o crescimento foi monitorado diariamente por 10 dias consecutivos por meio de contagens em câmara de Neubauer. São mostrados os perfis de crescimento das cepas: PP75 (A), BH46 (B) e AMA65 (C), todas associadas à leishmaniose visceral clássica.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que as cepas apresentaram um padrão de crescimento semelhante nas fases iniciais, caracterizado por uma fase lag até aproximadamente o 2º dia e entrada na fase estacionária por volta do 4º dia. Esse comportamento é consistente com o descrito para promastigotas de *Leishmania*, cuja adaptação inicial ao meio de cultura tende a anteceder a fase de proliferação acelerada, como evidenciado por ZABALA-PENAFIELI et al., (2022) com cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e Cunha et al., (2013) com *Leishmania infantum*. No entanto, diferenças interessantes entre as cepas emergem a partir do estabelecimento da fase estacionária (5º dia). Com base nos resultados, é possível levantar algumas hipóteses para a fase estacionária mais constante e prolongada observada na cepa AMA-65. Ishikawa et al. (2002) relataram que a diversidade genética entre cepas, mesmo pertencentes à mesma espécie, pode estar relacionada a diferenças no padrão de crescimento, especialmente quando essas cepas são oriundas de localidades distintas. Como segunda hipótese, a duração ampliada da fase estacionária da cepa AMA-65 pode estar relacionada a diferenças em sua

eficiência metabólica, possibilitando um aproveitamento mais eficaz dos nutrientes residuais do meio ou uma maior capacidade de adaptação a condições de estresse nutricional (SILVA; CORDEIRO; COOMBS., 2011).

Estudos anteriores (ALCOLEA et al., 2023; INTAKHAN et al., 2024) evidenciaram que a glicólise, β -oxidação e o metabolismo de aminoácidos têm sido associadas a variações no ritmo de crescimento entre diferentes cepas de *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, respectivamente. A forma como cada cepa utiliza seus nutrientes e produz energia pode influenciar diretamente sua velocidade de multiplicação, o que pode justificar a diferença na fase estacionária mais longa de AMA-65. Assim, sugerindo que cada uma possui sua própria maneira de explorar os recursos do meio, o que ajuda a explicar o comportamento registrado.

4.3 Infecção *in vitro* de macrófagos da linhagem J774

Em relação a infecção *in vitro*, os resultados apresentados mostram diferenças no índice de infecção das cepas avaliadas, tanto em 24h quanto em 72h, em ambas as proporções utilizadas (5 e 10 parasitos/célula), evidenciando diferentes potenciais infectivos.

Quando os macrófagos da linhagem J774 foram infectados com 5 parasitos por macrófagos (figura 6A), que o II foi significativamente maior a 72h em relação a 24h em todas as cepas avaliadas ($p < 0,05$). Comparativamente observou-se que 24h todas as cepas apresentaram II similar, contudo a 72h observou-se que a cepa AMA-65 apresentou um II similar à PP75, mas significativamente superior a BH-46 ($p < 0,05$). Já na proporção de 10 parasitos por macrófago (figura 6B), não se observou diferenças significativas entre o II a 24 com o II a 72h. Contudo, observou-se que em ambos os períodos experimentais a cepa AMA-65 apresentou maior índice de infecção quando a infecção foi iniciada com 10 parasitos por macrófagos ($p < 0,05$).

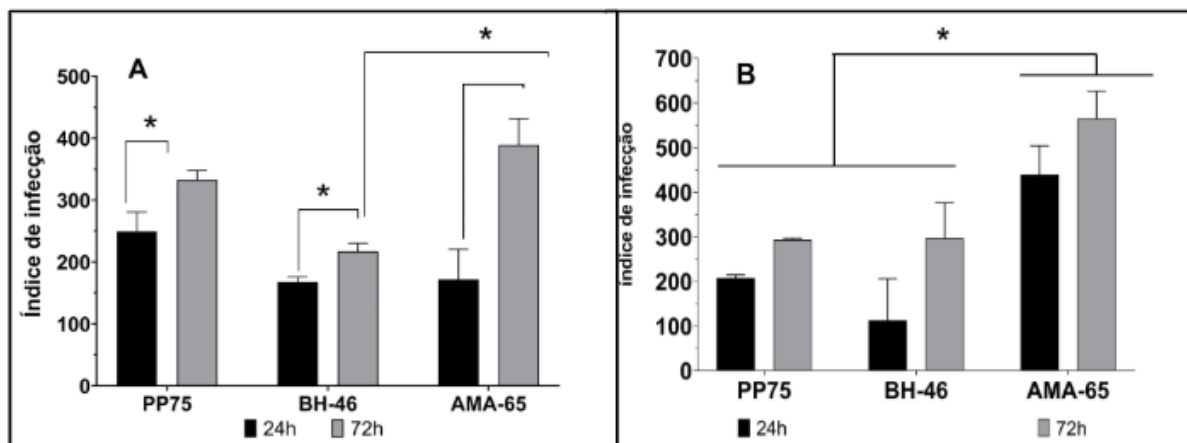


Figura 7: Macrófagos da linhagem J774 (10^6 macrófagos/mL) foram infectados com 5 (A) ou 10 (B) formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* por macrófago. Após 24 ou 72h os macrófagos infectados foram corados pelo método de panótico rápido, e o índice de infecção avaliado. * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em comparação ao índice de infecção (II) da cepa BH-46 no tempo de 72h.

Devido às diferenças apresentadas quando comparadas, a principal hipótese sugerida para o grande nível de infecção de AMA-65 em comparação com as demais cepas analisadas é uma infectividade superior a macrófagos da linhagem J774, uma vez que parasitos isolados de diferentes linhagens de *L. infantum* exibem diferentes perfis infectivos, interagindo de maneiras diferentes com as células hospedeiras (MARQUES et al., 2015).

4.2. Sensibilidade à anfotericina B em promastigotas

Quanto aos testes antiparasitários realizados nas formas promastigotas das diferentes cepas utilizando o fármaco anfotericina B, neste estudo, foi observado que a 24h de incubação a cepa AMA-65 apresentou resistência significativa superior à anfotericina B em comparação às cepas brasileiras, apresentando CE_{50} de $8,68 \pm 1,05$ ng/mL, seguido pela cepa BH-46 ($2,42 \pm 0,44$ ng/mL) e PP75 ($1,98 \pm 0,02$ ng/mL). Por outro lado, a 72h todas as cepas apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade, variando de $0,81 \pm 0,03$ a $1,08 \pm 0,19$ ng/mL (Tabela 1).

Tabela 1: Formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* das cepas foram incubadas com diferentes concentrações de anfotericina B (1.0 – 0,01 ng/mL) por 24 ou 72h, quando a viabilidade celular foi avaliada utilizando resazurina. Para cada situação experimental os valores da concentração efetiva 50% (CE₅₀) foram estimados e apresentados como a média $\pm$ desvio padrão. *p<0,05 em comparação à sensibilidade das cepas brasileiras à anfotericina B.

CE ₅₀ da anfotericina B (ng/mL)		
Cepa	24h	72h
MHOM/BR/1974/PP75	1,98 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,03
MHOM/BR/1972/BH-46	2,42 $\pm$ 0,44	1,08 $\pm$ 0,19
MHOM/HND/2017/AMA-65	8,68 $\pm$ 1,05*	0,99 $\pm$ 0,20

Quando são abordadas terapias farmacológicas no tratamento de leishmanioses, é essencial compreender como diferentes linhagens de parasitos se comportam às drogas testadas no combate aos parasitas, uma vez que essa diferença pode influenciar diretamente na eficácia do tratamento utilizado, sejam nas concentrações utilizadas por dosagem ou na resposta ao longo do tempo de exposição do fármaco (SANTI; MURTA., 2022). Apesar disso, o presente estudo objetiva investigar se a cepa AMA-65, isolada em Honduras, possuía alguma diferença de sensibilidade específica a anfotericina B. Nesse caso, observamos que a 24h o parasito é o mais resistente ao fármaco, reforçando para diferenças espécie-específicas, como evidenciado por Araujo e colaboradores (2022).

Por outro lado, a 72h observou-se que todas as cepas apresentaram sensibilidade similares ao fármaco empregado, sugerindo que este período experimental pode ser extremamente longo para analisar diferenças específicas (VOAK et al., 2018).

Quanto à resistência inicial apresentada por AMA-65, é possível que essa cepa possua um metabolismo basal mais lento, corroborando com os ensaios aplicados em 4.1, onde a cepa analisada também apresenta fase estacionária mais longa. Saunders et al., (2021) demonstraram em seu estudo que *Leishmania* sp. são capazes de adotar estados metabólicos de aquiescência, ou seja, estados de atividade metabólica reduzida para lidar com estressores externos, o que resulta em diminuição da

atividade biossintética. Ainda segundo os autores, parasitos com crescimento mais lento apresentam uma menor taxa de renovação de suas membranas e menor demanda energética, o que reduz a acessibilidade de alvos moleculares fundamentais para a ação de drogas como a anfotericina B. Esta hipótese pode explicar a resistência maior de AMA-65 nas primeiras 24h de incubação com anfotericina B, que nesta situação é o agente estressor, uma vez que ao apresentar um possível metabolismo mais lento, a cepa centro-americana tenha reagido de forma mais lenta à exposição ao fármaco, ainda que, com o tempo essa resistência foi vencida a 72h (JARA et al., 2023).

Outra hipótese que pode ser aplicada neste caso, diz respeito à possíveis adaptações estruturais na membrana lipídica dos parasitos pertencentes a linhagem hondurenha. A anfotericina B é um fármaco conhecido por ter como propriedades a capacidade de ligar-se aos esteróis (que fazem parte da composição lipídica e *Leishmania* sp. na membrana das células-alvo, formando “poros” que induzem a morte celular, e alterações na quantidade de esteróis podem diminuir a efetividade do fármaco (PURKAIT; 2012). Estudos recentes demonstram que cepas de *Leishmania* que apresentaram resistência a anfotericina B frequentemente substituem o ergosterol por precursores ou outros esteróis, ou modificam a fluidez da membrana, reduzindo a penetração do fármaco (NING et al., 2020; ALPIZAR-SOSA et al., 2022; FERREIRA et al., 2024). Dessa forma, é possível que essa adaptação estrutural atue em conjunto com a hipótese do metabolismo basal mais lento, explique a resistência inicial de AMA-65.

Assim, a combinação de alterações lipídicas e metabolismo reduzido pode explicar o padrão observado nos ensaios de CE₅₀ e reforça a importância de investigar a composição da membrana em cepas atípicas de *Leishmania*.

4.4. Sensibilidade de amastigotas à anfotericina B em

No que se refere aos testes antiparasitários utilizados para avaliar a sensibilidade das formas amastigotas à anfotericina B, observou-se que a cepa AMA-65 apresentou sensibilidade à anfotericina B similar às cepas brasileiras no período de 24h, variando de $0,21 \pm 0,07$ a $0,30 \pm 0,07$ µg/mL (Tabela 2).

Por outro lado, a 72h de incubação observou-se um padrão similar de sensibilidade à anfotericina nas cepas brasileiras, variando de $0,06 \pm 0,01$ a $0,08 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$, no entanto, as formas amastigotas da cepa hondurenha apresentaram maior resistência à anfotericina B comparada às demais ($0,19 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$). Neste estudo, foi possível observar que 50% da população de amastigotas de *L. infantum chagasi* das cepas brasileiras (PP75 e BH46, respectivamente) foram eliminadas por concentrações similares nas primeiras 24h de incubação. Por outro lado, a cepa centro-americana apresentou maior resistência à anfotericina B após 72h de incubação, necessitando concentrações mais elevadas do fármaco para eliminar 50% dos parasitos em comparação às cepas brasileiras.

Tabela 2: Macrófagos murinos da linhagem J774 foram infectados com cepas de *L. (L.) infantum chagasi* a uma proporção de 10 parasitos por macrófago. Após 24h as células infectadas foram tratadas com diferentes concentrações de anfotericina B durante 24 e 72h. Após esses períodos, a concentração efetiva 50% (CE_{50}) foi estimada e os valores foram expressos por média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ em comparação à CE_{50} das cepas brasileiras.

CE_{50} da anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)		
Cepa	24h	72h
MHOM/BR/1974/PP75	$0,28 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,02$
MHOM/BR/1972/BH-46	$0,21 \pm 0,07$	$0,06 \pm 0,01$
MHOM/HND/2017/AMA-65	$0,30 \pm 0,07$	$0,19 \pm 0,04^*$

Estudos anteriores realizados por LIMA et al., (2023) demonstraram que, durante a exposição à miltefosina, fármaco utilizado no tratamento oral das leishmanioses em certas regiões do globo, as formas amastigotas de AMA-65 demonstraram ter resistência significativa ao fármaco em comparação a espécies sul-americanas que causam doença cutânea, como a *L. amazonensis*, o que corrobora com os dados apresentados neste estudo, denotando assim uma resistência aumentada da cepa AMA-65 aos fármacos usados na terapia. A maior tolerância da cepa centro americana observada no presente estudo pode estar relacionada a particularidades metabólicas ou adaptativas já descritas para isolados de *Leishmania* provenientes de diferentes regiões geográficas. Com uma maior sensibilidade desta cepa a 72h, é possível que existam características intrínsecas que favorecem a sobrevivência frente a distintos compostos antiparasitários. Esses dados, somados à

resistência previamente relatada para miltefosina, reforçam a hipótese de que a AMA-65 possua um perfil de resistência maior quando comparada às demais cepas avaliadas.

5. CONCLUSÃO

Em suma, com os resultados apresentados neste trabalho, foi possível observar algumas diferenças quando comparamos as cepas que causam a LV clássica com a cepa centro-americana, responsável pela LCNU. A cepa AMA-65 apresentou crescimento discreto entre as duas cepas brasileiras que causam LV clássica, além de uma fase estacionária de crescimento mais prolongada. Em macrófagos da linhagem J774 infectados com 10 promastigotas por célula, o IL induzido pela cepa AMA-65 foi significativamente maior em comparação às cepas brasileiras.

No que se refere aos testes de sensibilidade, as promastigotas da cepa AMA-65 mostraram-se mais resistentes à anfotericina em 24h quando comparadas às brasileiras; contudo, em 72h, todas as cepas apresentaram perfil semelhante de sensibilidade à anfotericina B. As formas amastigotas da cepa AMA-65 exibiram o mesmo perfil de sensibilidade à anfotericina B observado nas cepas brasileiras; porém, em 72h, a cepa centro-americana mostrou-se mais resistente ao fármaco. As diferenças biológicas referentes ao crescimento de formas extracelulares e intracelulares, assim como o perfil de resistência à anfotericina B, podem reforçar a necessidade de revisão da nomenclatura da espécie. Além disso, a diversidade nas características de virulência, resistência a tratamentos e adaptação ao ambiente do hospedeiro sugere que uma abordagem mais personalizada e atenta às particularidades de cada cepa seja necessária, especialmente no contexto de terapias e estratégias de controle. Isso é crucial para compreender não apenas a dinâmica da doença, mas também para aprimorar as intervenções e os tratamentos aplicados em diferentes cenários epidemiológicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADÍAS-GRANADO, I. et al. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, v. 112, n. 7, p. 601-618, 2021.
- ALCOLEA, Pedro J. et al. An insight into differential protein abundance throughout *Leishmania donovani* promastigote growth and differentiation. *International Microbiology*, v. 26, n. 1, p. 25-42, 2023.
- ALPIZAR-SOSA, Edubiel A. et al. Amphotericin B resistance in *Leishmania mexicana*: Alterations to sterol metabolism and oxidative stress response. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 9, p. e0010779, 2022.
- ARAUJO FLORES, Gabriela Venicia et al. Infectivity studies of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi isolated from non-ulcerated cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 67, p. e21, 2025.
- ARAUJO FLORES, Gabriela Venicia. Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica nos municípios de Amapala (Valle) e Orocuina (Choluteca), Honduras: avaliação da resposta imune inflamatória e regulatória in situ em lesões de pele. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BATES, Paul A. Revising *Leishmania*'s life cycle. *Nature microbiology*, v. 3, n. 5, p. 529-530, 2018.
- CAVASSIN, Francelise B. et al. Sixty years of amphotericin B: an overview of the main antifungal agent used to treat invasive fungal infections. *Infectious Diseases and Therapy*, v. 10, n. 1, p. 115-147, 2021.
- CONDE, Luciana et al. Humoral response in Leishmaniasis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 12, p. 1063291, 2022.
- COSTA, Carlos HN et al. From infection to death: an overview of the pathogenesis of visceral leishmaniasis. *Pathogens*, v. 12, n. 7, p. 969, 2023.
- CUNHA, Joana et al. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV-patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 6, n. 1, p. 122, 2013.

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

FÁTIMA, Horta Maria et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. 2012.

FERREIRA, Bianca A. et al. Amphotericin B resistance in *Leishmania amazonensis*: In vitro and in vivo characterization of a Brazilian clinical isolate. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 18, n. 5, p. e0012175, 2024.

FIALHO JUNIOR, Luiz et al. Proteomic analysis reveals differentially abundant proteins probably involved in the virulence of amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Parasitology Research**, v. 120, n. 2, p. 679-692, 2021.

FIOCRUZ MINAS. Lesão cutânea típica de leishmaniose cutânea [imagem]. s.d. Disponível em: <https://minas.fiocruz.br/leishmanioses>. Acesso em: 28 nov. 2025.

FLORES, Gabriela Venicia Araujo. Avaliação da evolução da infecção experimental in vitro e in vivo em hamster, *Mesocricetus auratus*, causada por *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* isoladas de pacientes com leishmaniose visceral humana e leishmaniose cutânea atípica no município de Amapala. 2022. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FLORES, Gabriela Venicia Araujo. Avaliação da evolução da infecção experimental in vitro e in vivo em hamster, *Mesocricetus auratus*, causada por *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* isoladas de pacientes com leishmaniose visceral humana e leishmaniose cutânea atípica no município de Amapala. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2022.

GOTO, Yasuyuki; MIZOBUCHI, Haruka. Pathological roles of macrophages in *Leishmania* infections. *Parasitology International*, v. 94, p. 102738, 2023.

INTAKHAN, Nuchpicha et al. Synergistic effects of artesunate in combination with amphotericin B and miltefosine against *leishmania infantum*: potential for dose reduction and enhanced therapeutic strategies. *Antibiotics*, v. 13, n. 9, p. 806, 2024.

ISHIKAWA, E. A. Y. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. Supplement_1, p. S111-S121, 2002.

JARA, Marlene et al. Unveiling drug-tolerant and persister-like cells in *Leishmania braziliensis* lines derived from patients with cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, p. 1253033, 2023.

LEISHMANIOSE. *Paho.org*. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 24 ago. 2024.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, Oliver. Amphotericin b. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2005.

LIMA, Sarah Kymberly Santos de et al. High Selectivity of 8-Hydroxyquinoline on *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) Species Correlates with a Potent Therapeutic Activity In Vivo. *Pharmaceuticals*, v. 16, n. 5, p. 707, 2023.

LIU, Xianfeng et al. Targeting foam cell formation and macrophage polarization in atherosclerosis: the therapeutic potential of rhubarb. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 129, p. 110433, 2020.

MANDELL, Michael A.; BEATTY, Wandy L.; BEVERLEY, Stephen M. Quantitative single-cell analysis of *Leishmania major* amastigote differentiation demonstrates variably extended expression of the lipophosphoglycan (LPG) virulence factor in different host cell types. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 16, n. 10, p. e0010893, 2022.

NANDAN, Devki; BRAR, Harsimran Kaur; REINER, Neil. Manipulation of Macrophages: Emerging Mechanisms of Leishmaniasis. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, v. 29, n. 8, p. 292, 2024.

NING, Y. et al. Lathosterol Oxidase (Sterol C-5 Desaturase) Deletion Confers Resistance to Amphotericin B and Sensitivity to Acidic Stress in *Leishmania major*. *mSphere*, 2020.

OLIVO FREITES, Christian et al. First case of diffuse leishmaniasis associated with *Leishmania panamensis*. In: *Open Forum Infectious Diseases*. US: Oxford University Press, 2018. p. ofy281.

PACHECO, Carmen Maria Sandoval. Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica causada por *L. (L.) infantum chagasi* no município de Amapala, Valle, Honduras: caracterização imunohistopatológica das lesões de pele com ênfase na participação das células apresentadoras de antígenos. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2022.

Pareyn M., Alves F., Burza S., Chakravarty J., Alvar J., Diro E., Kaye P. M., van Griensven J. et al. Leishmaniasis. *Nature Reviews Disease Primers* 11, Article number: 81 (2025).

PONCE, Carlos et al. *Leishmania donovani chagasi*: new clinical variant of cutaneous leishmaniasis in Honduras. *The Lancet*, v. 337, n. 8733, p. 67-70, 1991.

PRATES, Fernanda Ventin de Oliveira. Ensaio clínico randomizado e controlado do uso de Fluconazol no tratamento da Leishmaniose Cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2016.

PURKAIT, Bidyut et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 1031-1041, 2012.

RAMOS-E-SILVA, M.; ZAITZ, C. Mucocutaneous leishmaniasis: tongue with infiltrative and vegetating aspect [figura]. 1999.

RODRIGUES, Juliany Cola Fernandes; GODINHO, Joseane Lima Prado; DE SOUZA, Wanderley. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*, p. 1-42, 2013.

SANDOVAL PACHECO, Carmen Maria. Leishmaniose cutânea não ulcerada ou atípica causada pela *Leishmania infantum chagasi* no município de Amapala, Valle, Honduras: caracterização imuno-histopatológica das lesões de pele. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, 2017.

SANDOVAL, Carmen et al. In situ cellular immune response in non-ulcerated skin lesions due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, v. 27, p. e20200149, 2021.

SANTI, Ana Maria Murta; MURTA, Silvane Maria Fonseca. 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, 2022.

SAUNDERS, Eleanor C. et al. Metabolic stringent response in intracellular stages of *Leishmania*. *Current opinion in microbiology*, v. 63, p. 126-132, 2021.

SILVA, Ana Marta; CORDEIRO-DA-SILVA, Anabela; COOMBS, Graham H. Metabolic variation during development in culture of *Leishmania donovani* promastigotes. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 5, n. 12, p. e1451, 2011.

SILVEIRA, Fernando Tobias et al. A comprehensive phenotypic and genotypic taxonomic review of *Leishmania* (*Leishmania*) *poncei* n. sp. (Kinetoplastea: Trypanosomatidae): a novel agent of cutaneous (non-ulcerated) and visceral leishmaniasis in Honduras, Central America. *Tropical Diseases, Travel Medicine and Vaccines*, v. 11, n. 1, p. 27, 2025.

SOSA-OCHOA, Wilfredo et al. Detection of *Leishmania infantum* DNA in *Pintomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* in Honduras. *Parasites & Vectors*, v. 13, p. 1-5, 2020.

SREEDHARAN, Veena; RAO, KV Bhaskara. Protease inhibitors as a potential agent against visceral Leishmaniasis: a review to inspire future study. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, n. 01, p. 102739, 2023.

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, v. 10, p. 1-10, 2017.

STRIZOVA, Zuzana et al. M1/M2 macrophages and their overlaps – myth or reality?. *Clinical Science*, v. 137, n. 15, p. 1067-1093, 2023.

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

VOAK, Andrew A. et al. Pharmacodynamics and cellular accumulation of amphotericin B and miltefosine in *Leishmania donovani*-infected primary macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 5, p. 1314-1323, 2018.

ZABALA-PEÑAFIEL, Anabel et al. Novel insights into *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in vitro fitness guided by temperature changes along with its subtilisins and oligopeptidase B. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 805106, 2022.

ZELEDÓN, Rodrigo et al. Cutaneous leishmaniasis in Honduras, Central America. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 76, n. 2, p. 276-277, 1982.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: LUCILLY LUIZA SANTOS

Título: "Comparação da infectividade in vitro de Leishmania (Leishmania) infantum chagasi causadora de leishmaniose cutânea atípica com cepas causadoras de leishmaniose visceral"

Orientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero	Aprovada
MSC. Ítalo Novais Cavallone	Aprovada

PARECER:

A aluna apresentou seu trabalho de maneira clara e objetiva. Durante a arguição respondeu aos questionamentos com domínio de tema, fazendo correlações com a literatura da área.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente **Lucilly Luiza Santos** obteve o seguinte conceito:



APROVADO



REPROVADO

São Vicente, 08 de dezembro de 2025.

Luiz Felipe Domingues Passero

Prof. Dr. Luiz Felipe Domingues Passero

Italo Novais Cavallone

MSC. Ítalo Novais Cavallone