

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA – CÂMPUS DE ARAÇATUBA

LUCAS TAKESHI SIQUEIRA ITO

**RELAÇÃO DO CORTISOL COM IL-12, TGF- β E PD-1 NA
LEISHMANIOSE CANINA.**

Araçatuba

2025

LUCAS TAKESHI SIQUEIRA ITO

**RELAÇÃO DO CORTISOL COM IL-12, TGF- β E PD-1 NA
LEISHMANIOSE CANINA.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Medicina Preventiva e Produção animal

Orientadora: Profa. Titular Dra. Valéria Marçal Félix de Lima

Araçatuba

2025

I89r	Ito, Lucas Takeshi Siqueira RELAÇÃO DO CORTISOL COM IL-12, TGF-B E PD-1 NA LEISHMANIOSE CANINA. / Lucas Takeshi Siqueira Ito. -- Araçatuba, 2025 83 p. : il., tabs. Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba Orientadora: Valéria Marçal Felix de Lima 1. Leishmaniose visceral. 2. Cão. 3. Distúrbio hormonal. 4. Glicocorticoide. I. Título.
------	--

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS TAKESHI SIQUEIRA ITO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA - CÂMPUS DE ARAÇATUBA.

Aos 14 dias do mês de janeiro do ano de 2025, às 8h30min, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de LUCAS TAKESHI SIQUEIRA ITO, intitulada **Relação do Cortisol com IL-12, TGF-B e PD-1 na Leishmaniose Canina**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Titular VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/UNESP, Prof. Dr. BRENO FERNANDO MARTINS DE ALMEIDA (Participação Virtual) do(a) Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos / UNIFIO, Profa. Dra. VANESSA CARREGARO PEREIRA (Participação Virtual) do(a) Departamento de Bioquímica e Imunologia / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: 4 - aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Profa. Titular VALERIA MARÇAL FELIX DE LIMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me proporcionou saúde e sanidade para durante o período da graduação, que me deu força nas horas mais tempestuosas e trouxe luz quando tudo parecia mais escuro.

Um agradecimento especial a minha mãe, Luiza, que sempre me apoiou em minhas escolhas desde o início de minha vida acadêmica, me proporcionando ensino de qualidade e buscando sempre me ajudar a realizar meus sonhos. Sempre confiando em minha capacidade e estimulando meu crescimento dia a dia, servindo de exemplo de como devo ser: corajoso e nunca desistir. Muito obrigado por todos sacrifícios que fez por mim e por ter acreditado no meu potencial. Se cheguei até aqui é por você! Te amo mãe.

Ao meu pai e a minha Bá-chan que mesmo não presentes fisicamente, sei que espiritualmente estão presentes sempre me dando força e me inspira o caminho que devo percorrer.

Agradeço a toda minha família, irmão, tios, tias, primos, primas e meu cachorro Billy, obrigado por estarem presentes e sempre fornecerem o apoio durante minha pós-graduação, em especial a meu Di-chan e minha avó que aos 90 anos e são exemplos de força e perseverança.

Aos meus amigos e amigas que estiveram presentes e dando apoio seja no restaurante ou em casa tomando tereré para recarregar a energia. Um agradecimento especial para a turma do *beach tennis*, Igor, Vinicius, Gabriel e Márcia; aos amigos que estão distantes fisicamente, mas que compartilham da minha trajetória desde o ensino fundamental, Felipe e Igor; e, por fim, a minha amiga veterinária, mas futura médica, Juliana, muito obrigado, vocês foram luz e força durante esses dois anos de pós-graduação.

Também agradeço imensamente, minha orientadora, Professora Valéria Marçal Felix de Lima, que me aceitou novamente ao grupo de pesquisa como mestrando, e se tudo der certo, doutorando. Muito obrigado por toda confiança para com o projeto, pelos importantes momentos de aprendizagem e por acreditar em mim. A senhora é um exemplo de professora e pesquisadora para mim, muito obrigado!

Aos meus colegas de laboratório imunologia Gabriela Venturin, João Victor, Gisele Mitsuo, Mayla Abbas e a todos os ICs, um muito obrigado! Sem vocês esse trabalho não existiria. Não posso me esquecer de agradecer a minha amiga do

laboratório de patologia, Giulia Jussiani, amigos do laboratório de ornitopatologia, Guilherme Dumalaska e Bruno Itoyama, e por fim, a minha amiga do setor de oftalmo, Marcela Moretti, obrigado pela companhia, cafés, desabafos e fazerem parte da minha rotina.

Desejo exprimir os meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta dissertação se concretizasse, em especial a banca de qualificação, Prof. Wagner e Profa. Gisele, pelas correções e considerações dadas ao trabalho. Os senhores são exemplos profissionais de dedicação e comprometimento. Obrigado por fazerem parte desta trajetória.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao trabalho que deu origem a este artigo, concedido por meio do Processo nº [2023/04680-8](#) e [2023/04301-7](#).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), por financiar o discente por um período.

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.” Paulo Freire

ITO, L.T.S. et al. **Relação do Cortisol com IL-12, TGF- β E PD-1 na Leishmaniose Canina**. 2024. 81p. Dissertação (Mestrado). Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LCan) é uma zoonose tropical causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum* no Brasil. Distúrbios no eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) foram relatados em doenças infecciosas, incluindo leishmaniose visceral humana e experimental, ainda não relatava na LCan. O cortisol é um hormônio esteroide que regulam diversos processos fisiológicos, incluindo as respostas imunológicas. O objetivo deste estudo foi investigar os distúrbios hormonais do eixo HPA em cães com LCan e sua relação com a resposta imunológica do hospedeiro. Para isso, os níveis séricos de cortisol e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foram quantificados em 12 cães saudáveis e 23 cães naturalmente infectados com *Leishmania* spp. utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) competitivo e de captura, respectivamente. A expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e arginase-1, bem como da proteína de morte celular programada-1 (PD-1), foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) isoladas, marcadas com anticorpos conjugados a fluoróforos e analisadas por citometria de fluxo. Além disso, os níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) foram quantificadas no soro por ELISA de captura. A carga parasitária no sangue periférico e swab conjuntival foi quantificada por qPCR. Todos os parâmetros avaliados foram correlacionados com os níveis séricos de cortisol. Foi observado um aumento nos níveis de cortisol sérico, enquanto os níveis de ACTH estavam reduzidos em cães com LCan. As expressões de iNOS, arginase-1 e PD-1 também estavam elevadas nas CMSP de e as citocinas sericas IL-10, IL-12 e IFN- γ apresentaram níveis aumentados em cães com LCan. O cortisol demonstrou correlação negativa com globulinas, PD-1 e IL-12, mas correlação positiva com as plaquetas, albumina e TGF- β . Esses achados sugerem que *L. infantum* pode induzir desregulação do eixo HPA e modular a resposta imunológica nos cães infectados, contribuindo para o entendimento dos mecanismos patogênicos da doença.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, cão, distúrbio hormonal, glicocorticoide

ITO, L.T.S. et al. **Relationship of Cortisol with IL-12, TGF- β , and PD-1 in Canine Leishmaniasis**. 2024. 81p. Dissertação (Mestrado). Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) is a tropical zoonosis caused by the protozoan *Leishmania (L.) infantum* in Brazil. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has been reported in infectious diseases, including human and experimental visceral leishmaniasis, but it has not yet been reported in CVL. Cortisol is a steroid hormone that regulates various physiological processes, including immune responses. The aim of this study was to investigate hormonal disturbances in the HPA axis in dogs with CVL and their relationship with the host immune response. For this purpose, serum levels of cortisol and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) were measured in 12 healthy dogs and 23 naturally infected dogs with *Leishmania spp* using competitive and sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), respectively. The expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase-1, and programmed cell death protein-1 (PD-1) was evaluated in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated, labeled with fluorochrome-conjugated antibodies, and analyzed by flow cytometry. Additionally, serum levels of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, interferon-gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and transforming growth factor-beta (TGF- β) were quantified using sandwich ELISA. Parasite load was determined by qPCR. All parameters were correlated with serum cortisol levels. The results showed increased serum cortisol levels in dogs with CVL, while ACTH levels were reduced. The expression of iNOS, arginase-1, and PD-1 was also elevated in dogs with leishmaniasis. The cytokines IL-10, IL-12, and IFN- γ were increased. Cortisol demonstrated a negative correlation with globulins, PD-1, and IL-12, but a positive correlation with platelets, albumin, and TGF- β . These findings suggest that *L. infantum* may induce HPA axis dysregulation and modulate the immune response in infected dogs, contributing to the understanding of the pathogenic mechanisms of the disease.

Keywords: visceral leishmaniasis; dogs; hormonal disturbances; glucocorticoid.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL.....	12
1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	13
1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	15
1.4 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO	18
1.5 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	21
2 CAPÍTULO 1 – RELAÇÃO DO CORTISOL COM IL-12, TGF-B E PD-1 NA LEISHMANIOSE CANINA	23
2.1 RESUMO	24
2.2 RESUMO DO AUTOR.....	25
2.3 INTRODUÇÃO	25
2.4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.4.1 Ética.....	28
2.4.2 Triagem dos animais	28
2.4.3 Colheita e acondicionamento das amostras sanguíneas e conjuntivais	29
2.4.4 Diagnóstico da LCan por teste imunocromatográfico dpp e elisa indireto	30
2.4.5 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	30
2.4.6 Quantificação de INOS, arginase-1 e PD-1 usando citometria de fluxo	30
2.4.7 Mensuração do cortisol e do acth usando kit comercial elisa	31
2.4.8 Quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β usando elisa de captura	31
2.4.9 Extração de DNA e quantificação da carga parasitária	31
2.4.10 Análise estatística	32
2.5.RESULTADOS.....	33
2.5.1 Achados clínicos e laboratoriais	33
2.5.2 O cortisol sérico aumentou e o acth sérico diminuiu em cães com leishmaniose	34
2.5.3 Cortisol apresentou correlação com as plaquetas, albumina e globulinas nos cães com leishmaniose	34
2.5.4 Cortisol não apresentou correlação com INOS, arginase-1 e carga parasitária nos cães com leishmaniose	35

2.5.5 PD-1 apresenta expressão aumentada nas CMSP e correlação negativa com o cortisol nos cães com leishmaniose.	37
2.5.6 IL-10, IL-12 e IFN- γ estão aumentadas nos cães com leishmaniose.....	37
2.5.7 O cortisol correlacionou negativamente com IL-12 e positivamente com TGF- β nos cães com leishmaniose.	38
2.6 DISCUSSÃO	39
2.7 AGRADECIMENTOS.....	42
2.8 REFERÊNCIAS	42
2.9 INFORMAÇÕES DE APOIO.....	49
APÊNDICE – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	57
ANEXO A – Normas para publicação da revista PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES	66

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL

As leishmanioses são doenças zoonóticas tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* da ordem Kinetoplastida e da família *Trypanosomatidae*, as quais apresentam mais de 20 espécies que infectam humanos e animais (1,2). As diferentes espécies desses protozoários podem levar a três formas principais de manifestação da doença em humanos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LCM) e leishmaniose visceral (LV) (3). A LV é a forma mais severa das leishmanioses e é causada pelas espécies *Leishmania (L.) donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) no novo mundo (2).

O parasito apresenta-se sob duas formas: a forma promastigota que exibe flagelo aparente e se desenvolve no tubo digestivo dos vetores; e a forma amastigota que não possui flagelo aparente e se multiplica em células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado (4). Uma vez infectado, o hospedeiro pode manter-se assintomático ou evoluir para um amplo espectro de manifestações clínicas, como febre, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. A doença ainda pode ser de forma progressiva, que caso não seja realizado o tratamento correto, leva a morte do paciente (5).

A LV é amplamente distribuída no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Em todo o mundo, estima-se que ocorram 50.000 a 90.000 casos novos da infecção, entretanto apenas 25 a 45% dos casos são reportados a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2). Nas américas, a LV é endêmica em 13 países, com uma média anual de 2488 casos e uma taxa de letalidade de quase 8%, considerada a maior taxa em comparação com outros continentes (6).

O Brasil é o principal país endêmico para LV nas Américas (2) e concentra 90% dos casos registrados na região (6). Dados do Ministério da Saúde do Brasil demonstram que em 2022 foram registrados 1684 casos de LV no país com 165 óbitos, sendo a maioria dos casos registrados na região Nordeste (43%) seguido das regiões Norte (14%), Sudeste (14,5%) Centro Oeste (6%) e Sul (0,5%) (7). Dos casos de LV registrados no Brasil no ano de 2022, 83 foram no estado de São Paulo, com 11 óbitos (7). No estado de São Paulo, a doença foi notificada pela primeira vez no município de Araçatuba no ano de 1999 (8), quando foi confirmado o primeiro caso

canino autóctone no município (9) e desde de então, entre 1999 a 2022 foram 8.553 casos registrado no estado com 266 óbitos (10).

O principal meio de transmissão da LV entre os mamíferos vertebrados ocorre pela picada da fêmea do flebotomíneo hematófago *Lutzomyia longipalpis* (11). Contudo, são encontrados formas promastigotas da *Leishmania* em carrapatos e pulgas, porém, o papel desses vetores na sua transmissão ainda não é conhecido (12,13). Outros meios de transmissão são a transmissão venérea (14,15), transplacentária (16) e foi sugerido transmissão por transfusão sanguínea (17,18).

A infecção da *L. infantum* também ocorre em espécies de animais silvestres (19), e animais domésticos, como gatos (20) e, mais frequente, os cães (21). Em áreas urbanas, os cães domésticos são considerados os principais reservatórios do protozoário (22). Há uma relação significativa entre a prevalência da doença em humanos e a presença de cães soropositivos, especialmente em áreas endêmicas (23,24). Essa conexão deve-se à proximidade dos cães com os humanos, ao elevado parasitismo na pele de cães infectados, particularmente em regiões ulceradas (25), à alta prevalência da infecção em cães em áreas endêmicas, sendo que muitos permanecem assintomáticos (26), e à dificuldade no diagnóstico de animais infectados que não apresentam sintomas (27). Dessa forma, os cães se tornam um alvo estratégico nas medidas de controle da doença (21).

1.2 LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A infecção canina tem início quando as fêmeas dos flebotomíneos infectados realizam o repasto sanguíneo e inoculam as formas promastigotas do parasito na corrente sanguínea do animal. No interior dos macrófagos, essas formas promastigotas transformam-se em amastigotas (28). Os macrófagos podem ativar mecanismos leishmanicidas para eliminar a infecção (29), entretanto, tais mecanismos não são eficientes, tornando assim um lugar seguro para a replicação intracelular do parasito (30).

Assim, as amastigotas continuam se replicando no interior do macrófago e são transportados para o linfonodo drenante. Ocorre então a disseminação linfática para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário como: baço, fígado, medula óssea e pele (27,31). Nesses órgãos, o parasito continua a se multiplicar no interior dos macrófagos, até provocar a ruptura dessas células, o que possibilita a infecção de novos macrófagos (32). Esse ciclo contribui para uma

inflamação crônica que induz alterações estruturais e funcionais nos órgãos atingidos (33,34), levando ao desenvolvimento da doença.

A evolução e manifestação clínica da Leshmaniose Canina (LCan) depende do equilíbrio entre a capacidade do hospedeiro de induzir mecanismos leishmanicidas e as estratégias do parasito para suprimir ou evadir a resposta imune do hospedeiro (35). Desta maneira, alguns cães controlam a infecção por um período de tempo sem o aparecimento de sinais (26) enquanto outros apresentam evolução aguda ou progressiva da doença, que se não tratada pode levar à morte (27).

A LCan é uma doença sistêmica, podendo afetar tanto a pele quanto outros órgãos, levando a sinais clínicos que são, muitas vezes, inespecíficos (25). Os sinais clínicos podem se desenvolver de três meses a vários anos após os cães serem infectados (33) sendo os mais frequentes: onicogribose, lesões cutâneas, linfadenopatia generalizada, caquexia, febre, diarreia, hepatoesplenomegalia e pode levar a uma doença renal (36); manifestando-se em um estágio inicial, marcado por proteinúria leve, ou evoluir para formas mais graves, como síndrome nefrótica ou insuficiência renal terminal. A insuficiência renal crônica é uma complicação severa da doença e constitui a principal causa de óbito em cães afetados pela doença (37,38). Algumas alterações laboratoriais como anemia não regenerativa, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, trombocitopenia, proteinúria, azotemia renal e aumento de enzimas hepáticas também são encontradas nos cães doentes (39).

O diagnóstico da LCan apresenta desafios devido à ampla variação do quadro clínico e às múltiplas alterações clinicopatológicas que podem ser observadas. Assim é essencial adotar uma abordagem diagnóstica personalizada para cada paciente, considerando o contexto clínico ao investigar a suspeita dessa doença (39). Alguns testes sorológicos para detecção de anticorpos específicos (40) e técnicas de pesquisa do DNA da *Leishmania* spp. (41) são cruciais para o diagnóstico preciso da doença.

O tratamento da LCan apresenta altos índices de recidiva, independentemente do protocolo terapêutico adotado, seja com o uso de um único medicamento ou em terapias combinadas (27). Além disso, alcançar a cura clínica e parasitológica é um desafio, e a resistência aos medicamentos representa uma preocupação crescente (42). Nesse contexto, terapias imunológicas têm mostrado potencial na luta contra a LCan, buscando principalmente restaurar a resposta imunológica do hospedeiro para conter a infecção e controlar o parasito (43). Assim, a resposta imunológica

desempenha um papel crucial não apenas na evolução clínica da doença, mas também no sucesso das estratégias terapêuticas, tornando-a um elemento-chave no manejo da LCan.

1.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A resposta imunológica desenvolvida pelo cão frente à infecção por *L. infantum* é complexa e determinante para a resistência ou susceptibilidade (22). A primeira linha de defesa contra o protozoário é a imunidade inata. Uma parte dos promastigotas inoculadas na derme após a picada do flebotomíneo são mortos decorrentes da ação do sistema complemento (29), porém, inibidores do complemento presente na saliva do flebotomíneo e mecanismos de inativação do C3b pelo protozoário podem induzir a falha da resposta imune neste momento (44,45). Algumas moléculas do parasito que sobreviveram a ação do complemento, são reconhecidas por receptores do sistema imune inato, conhecidos como *Toll-Like Receptor* (TLRs) que são presentes em células de *Langerhan*, *Kupffer*, dendríticas, *natural killer*, monócitos/macrófagos e neutrófilos (28,30). Os TLRs utilizam de proteínas adaptadoras para desencadear uma transdução de sinais afim de produzir citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ e IL-12, assim como moléculas coestimulatórias que estimulam macrófagos infectados a ativar mecanismos leishmanicidas e induzem a resposta imune adaptativa (46).

A ativação do inflamossoma pelo receptor NLRP3, do tipo NODlike (NLR), durante a imunidade inata também é um mecanismo que envolvido na infecção por *L. infantum* (46). Após ativação do NLRP3, ocorre a ativação da caspase-1 e clivagem da pré-IL-1b em IL-1b ativa, citocina pró-inflamatória importante para produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, aumentando a ação leishmanicida contra o parasito (47).

Contudo, o controle do parasito depende da ativação da resposta imune adaptativa. Tanto a resposta celular (Th1) quanto a humoral (Th2) são ativadas, e o equilíbrio entre elas desempenha um papel crucial na progressão da LCan (48,49). Durante a resposta inata, células apresentadoras de antígenos (APCs) são recrutadas para capturar leishmanias ou seus fragmentos e migrar para os linfonodos drenantes (31). Após o processamento do antígeno, as APCs apresentam peptídeos do parasito associados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I e II), aumentam a expressão de moléculas coestimulatórias (50) e produzem IL-2, IL-12

(51). Esse conjunto de eventos estimulam a proliferação e diferenciação de linfócitos T naive em células T efectoras Th1 (T CD4+ e T CD8+) (51).

A imunidade protetora da LCan está associada a resposta do tipo Th1, visto que, as células T CD4+ produzem duas importantes citocinas: o IFN- γ e o TNF- α (52,53). Estas moléculas atuam em mecanismos leishmanicidas ativando macrófagos infectados a produzirem NO e outras espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e íon superóxido) levando a morte intracelular do protozoário (51,54). As células T CD8+ também podem produzir IFN- γ ou exercer atividade citotóxica sobre células infectadas pela leishmania (55).

No entanto, a suscetibilidade da infecção e a progressão da LCan estão associadas com a predominância da resposta humoral do tipo Th2, na qual há aumento da produção de anticorpos, em sua maioria imunoglobulina G (IgG), que leva à supressão da resposta efectora Th1 e, conseqüentemente, aumento da carga parasitária (56,57). A fase clínica da doença é caracterizada por uma hipergamaglobulinemia (39). Estes anticorpos se ligam aos antígenos da leishmania formando imunocomplexos (58,52), que se depositam em órgãos como o rim levando a danos renais e, eventualmente, à insuficiência renal em estágios mais avançados da doença (59). Para melhor compreensão, as diferenças principais da resposta Th1 e Th2 estão presentes na figura 1.

Durante a resposta Th2, ocorre o estímulo à produção da citocina anti-inflamatória IL-10 e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β). Esses mediadores desempenham um papel crucial na supressão da resposta imunológica celular, reduzindo a capacidade leishmanicida dos macrófagos (56,60,58,52). Além de sua produção aumentada, a IL-10 em sobrenadantes de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) mostra uma relação direta com a carga parasitária nas CMSPs de cães diagnosticados com LCan (61).

O TGF- β também tem seus níveis elevados durante a infecção canina por *L. infantum* (62), reforçando sua importância na progressão da doença. Outra citocina relevante para a suscetibilidade à infecção é a IL-6, cuja produção também está aumentada em soro sanguíneo e sobrenadante de células esplênicas de cães com LCan (63,64). Ela pode atuar inibindo a atividade microbicida dos macrófagos, o que facilita a proliferação do parasito. Além disso, níveis elevados dessa citocina têm sido associados aos casos mais graves da doença e à mortalidade em pacientes humanos (65).

Os macrófagos possuem um papel importante durante a resposta contra a infecção. Assim, por se replicar e viver obrigatoriamente dentro dos macrófagos, a sobrevivência da *Leishmania* spp. depende do balanço de duas enzimas induzíveis, a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e arginase 1 (66). O IFN- γ estimula o macrófago a aumentar produção da enzima iNOS, gerando o perfil microbicida, M1, que utiliza a L-arginina para a produção de NO que leva a morte do parasito intracelular (67). A alta expressão de iNOS foi presente em macrófagos nos quais continham poucas ou nenhuma presença da forma amastigotas da *L. infantum* em amostras caninas, enquanto que em macrófagos com a baixa expressão da enzima continha alta carga parasitária (68), confirmando o papel leishmanicida da iNOS durante a infecção. Devido a modulação da resposta imunológica do hospedeiro pelo protozoário os macrófagos sofrem uma polarização para o perfil M2, no qual há indução da enzima arginase 1, que hidrolisa a L-arginina produzindo dois compostos: L-ornitina e uréia. A L-ornitina é a principal fonte intracelular de poliaminas, as quais são necessárias para crescimento do parasito (69,70). A inibição da arginase pode ser uma estratégia promissora para tratamento da leishmaniose visceral, visto que alguns compostos fenólicos obtiveram uma ação inibitória com a enzima, e microbicida contra a *L. infantum* (71).

Além disso, o parasito e seus antígenos também regulam a expressão de moléculas co-estimulatórias (72). A ativação da molécula co-estimulatória *Programmed Cell Death* (PD-1), que pertence à família B7-CD28, desempenha um papel crucial ao induzir apoptose, inibir a proliferação celular e suprimir a produção de citocinas (73). Na LCan, a expressão elevada da molécula PD-1 foi observada em linfócitos T CD3⁺ e linfócitos B CD21⁺, tanto em sangue periférico quanto em células mononucleares esplênicas (73). A interação entre PD-1 e seus ligantes está associada à apoptose de células T e à regulação de mediadores imunológicos, como TNF- α , IL-4 e NO (72). Assim, PD-1 regula a atividade leishmanicida de leucócitos esplênicos em cães com leishmaniose e prejudica a resposta imune do hospedeiro (74).

Sabe-se que a supressão do sistema imunológico celular, junto com uma intensa resposta humoral, ocorre devido aos mecanismos que o parasito desenvolveu para modular a resposta imune. Assim, durante a resposta inata e adaptativa do hospedeiro, ocorre um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias sistematicamente que modulam, não só o sistema imune como também, o eixo Hipotálamo, Pituitária Adrenal (HPA) levando a alterações hormonais em doenças

infecciosas (75). Além disso, há uma ação hormonal, principalmente em situações de estresse, sobre a modulação da resposta imunológica no hospedeiro (76). Portanto, conhecer os mecanismos que as alterações hormonais regulam a resposta imune durante a LCan, é fundamental para entender a progressão da doença e também identificar possíveis alvos terapêuticos para a doença.

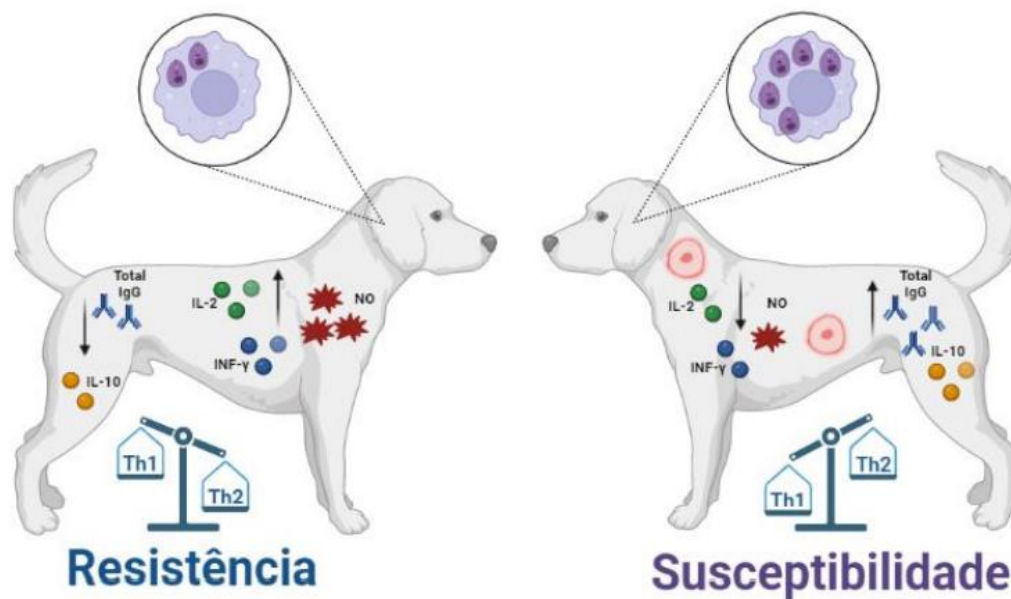


Figura 1: Na Leishmaniose Visceral Canina a resposta celular (Th1) e humoral (Th2) são ativadas. A resistência ou progressão da doença são determinadas pelo balanço entre essas duas respostas. Os que apresentam uma maior ativação da resposta celular decorrente do aumento de citocinas como IL-2 e INF-γ ativam macrófago a produzirem NO que são eficazes para eliminação do parasito intracelular, levando a uma resistência a infecção. Entretanto, animais que apresentam uma ativação exacerbada da resposta humoral, apresentam uma elevada produção de anticorpos e produção da citocina IL-10, que inibe a ativação de mecanismos leishmanicidas e promove a replicação do parasito. (Figura retirada da tese de doutorado “*MicroRNA-194 regulates parasitic load and IL-1β-dependent nitric oxide production in the peripheral blood mononuclear cells of dogs with leishmaniasis*”. Costa et al., 2023)

1.4 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema endócrino e o sistema imunológico desempenham papéis cruciais no controle de inúmeras funções fisiológicas, bioquímicas e funcionais do organismo, quanto em situações de desordens, como doenças infecciosas e metabólicas (77,78). Essas interações imune endócrinas ocorrem através de mecanismos bidirecionais, mediados por moléculas especializadas de comunicação, identificadas como citocinas

e hormônios, respectivamente (79). A variedade de interações entre os componentes endócrinos e imunológicos pode levar a disfunções em um ou mais desses mecanismos contribuindo para o surgimento ou agravamento de diversas patologias (78).

As comunicações bidirecionais que ocorrem entre o sistema imunológico e neuroendócrino, atuam no nível do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) e do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide (HPT) (80). Na resposta inata, os TLRs reconhecem padrões moleculares associados a bactérias e vírus e, em associação com a prostaglandina E2, parecem contribuir para a ativação precoce do eixo HPA (81,82).

O hormônio liberador de corticotropina (CRH) é produzido por neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo e liberado na circulação hipofisária. Esse hormônio estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula pituitária anterior, que, por sua vez, induz a produção de glicocorticoides (GCs), como o cortisol, pela glândula adrenal, além de produzir dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato éster (DHEAS). A secreção de CRH é regulada positivamente por neurotransmissores como serotonina, norepinefrina, histamina e dopamina, enquanto o ácido γ -aminobutírico (GABA), opiáceos e hormônios como ACTH e GCs atuam como reguladores negativos por meio de um mecanismo de feedback (83,79,84).

As citocinas sintetizadas pelo sistema imune, como a IL-1, IL-6 e TNF- α atuam diretamente no Sistema Nervoso Central (SNC) ativando o eixo HPA (79), muitas vezes, em situações de processos inflamatórios intensos contra agente infecciosos (85). Outra citocina com o papel de regulador na comunicação entre o sistema imunológico e neuroendócrino, é a IL-10. Além de atuar estimulando a produção de CRH e ACTH nos tecidos hipotalâmicos e hipofisários, também atua estimulando a produção de GCs diretamente na glândula adrenal (79). Assim, as citocinas produzidas localmente ou periférica podem atuar ativando eixo HPA.

Estímulos de estresse, sejam externos ou internos, podem levar à desregulação do eixo HPA, resultando no aumento da secreção de GCs pela glândula adrenal, sendo o cortisol o principal exemplo (86). Os GCs são hormônios esteroides que regulam diversos processos fisiológicos, incluindo as respostas imunológicas (87). Sua ação ocorre por meio de dois tipos de receptores: os receptores mineralocorticoides (MRs) e os receptores glicocorticoides (GRs) (88), que desempenham funções tanto no eixo HPA quanto nas células imunológicas. Quase

todas as células do sistema imune expressam receptores para esses hormônios em sua superfície (89). A modulação imunológica mediada pelos GCs ocorre por duas vias principais: diretamente, pela ligação aos receptores presentes na superfície das células; ou indiretamente, por meio da desregulação na produção de citocinas (90,91).

Os GCs levam a efeitos genômicos e não genômicos quando se ligam aos GRs e modulam fatores de transcrição envolvidos na sinalização inflamatória, como a proteína ativadora-1 (AP-1) e o fator nuclear κ B (NF- κ B) (92), reduzindo a expressão de genes pró inflamatórios. Assim, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e as relacionadas a uma resposta do tipo Th1 como a IL-2, IL-12, IFN- γ , enquanto estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10, favorecendo uma resposta Th2 (79,84).

A ativação das células T também são atenuadas pelos GCs. Esses hormônios modulam a sinalização do receptor de células T (TCR), reduzindo os eventos de fosforilação inicial após sua interação com as células apresentadoras de antígeno (APCs) (93). Além disso, os GCs inibem a atividade e a maturação das células dendríticas, regulando negativamente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (92). Adicionalmente, esses hormônios promovem a regulação positiva da expressão de PD-1 em células T e NK (94,95,96), um coestimulador negativo envolvido na apresentação de antígenos, como já descrito.

O NF- κ B desempenha um papel importante na regulação das respostas inflamatórias, aumentando a expressão de mediadores inflamatórios como a iNOS (97). Consequentemente, os GCs também regulam a produção de NO, diminuindo a expressão de iNOS em resposta à estímulo inflamatório (98,99) o que pode favorecer o crescimento do agente infecciosos durante uma infecção.

Diversos estudos indicam que, embora o efeito geral dos glicocorticoides seja a redução da atividade das células T, sua ação é seletiva. Esses hormônios tendem a suprimir predominantemente as resposta das célula Th1, ao mesmo tempo em que preservam, ou até mesmo favorecem, a função das células Th2 e das células T reguladoras (Treg) (87). Por outro lado, o DHEA estimula uma resposta Th1, através da estimulação do ativador células T para produzir IL-2 (79). Para melhor entendimento, efeitos dos GCs nas populações de células imunes na figura 2.

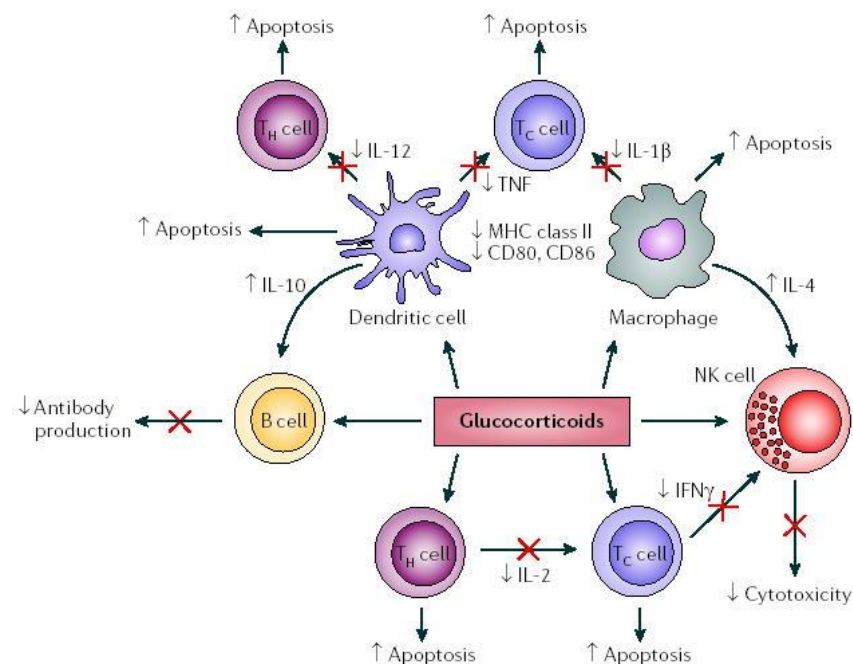


Figura 2: Os glicocorticoides agem nas células imunes tanto direta quanto indiretamente para suprimir a indução de respostas pró-inflamatórias. Eles inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF, enquanto promovem a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, por macrófagos e células dendríticas. Eles também promovem a apoptose de macrófagos, células dendríticas e células T, levando à inibição das respostas imunes.

Fonte: Imagem retirada do artigo Sternberg, 2007.

Ainda como um sistema bidirecional, o cortisol também pode diminuir a quimiotaxia para linfócitos, monócitos e granulócitos, além de promover o desbalanço da resposta celular e humoral, exacerbando a resposta de anticorpos (79). Diferentes modelos experimentais de infecção mostram que tal desequilíbrio do eixo HPA impede o hospedeiro de montar uma resposta imune adequada, que por sua vez pode influenciar a suscetibilidade à doença (75). Assim, torna-se válido estudos sobre a influência do eixo HPA sobre o sistema imunológico durante uma infecção, principalmente sobre durante a LCan.

1.5 EIXO HIPOTÁLAMO-PITUITÁRIA-ADRENAL E A LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Existem estudos avaliando os distúrbios hormonais do eixo HPA nas doenças psicológicas e neurodegenerativas (88,100,101). No entanto, o impacto direto ou indireto de agentes infecciosos sob o eixo HPA, tem sido menos estudado (75). Nas doenças infecciosas, a modulação do eixo HPA gera um aumento de cortisol já

observado em outras doenças infecciosas como malária (102), doença de chagas (103), tuberculose (104,105), em doenças virais (106,107) e LV em hamsters (108) e humanos (109) mas ainda não caracterizado em cães.

Na leishmaniose cutânea os níveis plasmáticos de cortisol não estão alterados (110). Contudo, na LV humana, os níveis plasmáticos de ACTH e cortisol estão elevados nos pacientes humanos doentes sugerindo uma disfunção no sistema endócrino na fase crônica (109). Porém, não há estudos sobre a ação da disfunção hormonal na progressão da doença.

Em hamsters infectados experimentalmente com *L. infantum*, altos níveis plasmáticos de cortisol são observados após a infecção. Com exceção dos monócitos, as concentrações de todos os outros leucócitos apresentaram forte correlação negativa com o cortisol, enquanto as transaminases foram positivamente correlacionadas. A produção de cortisol apresentou uma correlação positiva com os marcadores imunológicos pró-inflamatórios (IL-6 e IL-1 β), anti-inflamatórios (IL-10 e TGF- β) e com a enzima arginase; enquanto o IFN- γ e a enzima iNOS apresentaram correlações negativas, sugerindo um importante papel desse hormônio na regulação da resposta imunológica à *Leishmania* spp.(108). Entretanto, a relação dos distúrbios hormonais e a regulação imunológicas na LCan não foram avaliadas.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os níveis séricos de cortisol e ACTH nos cães naturalmente infectados com *L. infantum* e avaliar como os hormônios regulam a resposta imunológica durante a doença. Sugerimos a hipótese que o ACTH e o cortisol têm papel na supressão da resposta imune contra a *Leishmania* spp. tendo o cão como espécie de estudo. A descoberta desses mecanismos pode ser importante para o melhor entendimento da imunopatogenese da doença, como também na utilização em novas estratégias terapêuticas.

2 CAPÍTULO 1 – RELAÇÃO DO CORTISOL COM IL-12, TGF- β E PD-1 NA LEISHMANIOSE CANINA

Lucas Takeshi Siqueira Ito^a, Gisele Mitsue Umino^a, Mayla Abbas Guimarães^a, Bianca Maciel Marques de Souza^b, Sofia Furrier Soares^b, Valéria Marçal Felix de Lima^{a*}

^a Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba.

^b Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba.

* Autor para correspondência:

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba.

Rua Clóvis Pestana 793 - Jardim Dona Amélia - CEP 16050-680 - São Paulo, Brasil Telefone: +55-18-36361422

Email: Lucas Takeshi Siqueira Ito: lucas.ito@unesp.br

Valéria Marçal Felix de Lima: valeria.lima@unesp.br

O artigo será publicado na revista PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

2.1 RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LCan) é uma zoonose tropical causada pelo protozoário *Leishmania (L.) infantum* no Brasil. Distúrbios no eixo hipotálamo pituitária adrenal (HPA) foram relatados em doenças infecciosas, incluindo leishmaniose visceral humana e experimental, ainda não relatava na LCan. O cortisol é um hormônio esteroide que regulam diversos processos fisiológicos, incluindo as respostas imunológicas. O objetivo deste estudo foi investigar os distúrbios hormonais do eixo HPA em cães com LCan e sua relação com a resposta imunológica do hospedeiro. Para isso, os níveis séricos de cortisol e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foram quantificados em 12 cães saudáveis e 23 cães naturalmente infectados com *Leishmania spp* utilizando ensaios imunoenzimáticos (ELISA) competitivo e de captura, respectivamente. A expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e arginase-1, bem como da proteína de morte celular programada-1 (PD-1), foi avaliada em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) isoladas, marcadas com anticorpos conjugados a fluoróforos e analisadas por citometria de fluxo. Além disso, os níveis séricos das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) foram quantificadas no soro por ELISA de captura. A carga parasitária foi quantificada no sangue periférico e swab conjuntival por qPCR. Todos os parâmetros avaliados foram correlacionados com os níveis séricos de cortisol. Os resultados mostraram aumento nos níveis de cortisol sérico, enquanto os níveis de ACTH estavam reduzidos em cães com LCan. As expressões de iNOS, arginase-1 e PD-1 também estavam elevadas nas CMSP de e as citocinas séricas IL-10, IL-12 e IFN- γ apresentaram níveis aumentados em cães com LCan. O cortisol demonstrou correlação negativa com globulinas, PD-1 e IL-12, mas correlação positiva com as plaquetas, albumina e TGF- β . Esses achados sugerem que *L. infantum* pode induzir desregulação do eixo HPA e modular a resposta imunológica nos cães infectados, contribuindo para o entendimento dos mecanismos patogênicos da doença.

Palavras Chaves: Leishmaniose visceral, cães, distúrbios hormonais, glicocorticóides

2.2 RESUMO DO AUTOR

A leishmaniose visceral canina (LCan) é uma doença tropical transmitida por um protozoário chamado *Leishmania (L.) infantum*, endêmica no Brasil. Já se sabe que algumas infecções, como a leishmaniose visceral humana e em hamster, podem causar alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), mas isso ainda não tinha sido investigado em cães com LCan. O cortisol, o hormônio do stress, é peça-chave nesse eixo e tem um papel importante na regulação de vários processos fisiológicos, especialmente nas respostas imunológicas contra o parasito. Neste estudo, buscamos entender como a LCan afeta o eixo HPA e sua relação com a resposta imunológica dos cães. Para isso, medimos os níveis de cortisol e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) no sangue de 12 cães saudáveis e 23 cães infectados naturalmente com *Leishmania spp* usando testes específicos (ELISA). Também analisamos a expressão de algumas proteínas e enzimas importantes, como iNOS, arginase-1 e PD-1, em células do sangue, utilizando a citometria de fluxo. Além disso, medimos várias citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β) no soro e avaliamos a carga parasitária por qPCR. Por fim, correlacionamos tudo isso com os níveis de cortisol. Os resultados mostraram que os cães com leishmaniose tinham níveis de cortisol mais altos no sangue, enquanto os níveis de ACTH estavam mais baixos. As proteínas iNOS, arginase-1 e PD-1 estavam mais expressas nos cães infectados, e as citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ também apresentaram níveis aumentados. Curiosamente, o cortisol se correlacionou negativamente com PD-1, globulinas e IL-12, mas positivamente com plaquetas, albumina e TGF- β . Esses dados indicam que a *Leishmania infantum* pode causar uma desregulação no eixo HPA e influenciar a resposta imunológica dos cães, o que pode ajudar a entender melhor os mecanismos por trás da doença.

2.3 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose causada por protozoários hemoflagelados intracelulares pertencentes à família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania*, sendo a *Leishmania infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) o principal agente etiológico no Brasil [1]. Estima-se que de 50.000 a 90.000 novos casos

ocorram anualmente em todo mundo, sendo que apenas de 25 a 45% dos casos são reportados a Organização Mundial de Saúde (OMS) [2]. O Brasil é considerado um país endêmico nas Américas para a doença, concentrando 90% dos casos registrados na região [2]. Os cães domésticos são considerados reservatórios da doença para os humanos em regiões urbanas [3], existindo uma correlação importante na prevalência da doença em humanos e cães soropositivos, principalmente em áreas endêmicas [4,5].

A evolução e manifestação clínica da Leishmaniose Visceral Canina (LCan) depende do equilíbrio entre a capacidade do hospedeiro de induzir mecanismos leishmanicidas e das estratégias do parasito para suprimir ou evadir a resposta imune do hospedeiro [6]. Os sinais clínicos são muitas vezes inespecíficos, sendo os mais frequentes: onicogribose, lesões cutâneas, linfadenopatia e perda de peso [7].

Cães resistentes a infecção, desenvolvem geralmente uma resposta imunológica celular do tipo Th1 com produção de citocinas, como IL-12, o IFN- γ e o TNF- α [8,9] estimulando macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) e outras espécies reativas de oxigênio (peróxido de hidrogênio e íon superóxido) levando a morte intracelular do protozoário [10,11]. Em contraste, cães susceptíveis a doença apresenta uma resposta humoral do tipo Th2, com produção exacerbada de anticorpos [12] e produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, TGF- β), aumentando a sobrevivência do parasito e levando ao aparecimento do quadro sintomático [9].

Por se replicar e viver obrigatoriamente nos macrófagos, para a sua sobrevivência, a *Leishmania* spp. depende do balanço de duas enzimas induzíveis, a iNOS e arginase 1 [13]. O IFN- γ aumenta a expressão de iNOS no macrófago estimulando a produção de NO que leva a morte do parasito intracelular [14]. Entretanto, a modulação da resposta imunológica do hospedeiro pelo protozoário, leva o macrófago a sofrer uma polarização para o perfil no qual há indução da enzima arginase 1, produzindo dois compostos: L-ornitina e uréia. A L-ornitina é a principal fonte intracelular de poliaminas, as quais são necessárias para crescimento do parasito intracelular [15,16].

Outra molécula importante para suscetibilidade da doença é a PD-1, molécula coestimuladora com a função negativa, expressa nos linfócitos do baço e do sangue periférico dos cães com leishmaniose visceral [17], diminuindo a capacidade proliferativa das células T [18] e a atividade microbicida do macrófago [19].

A resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro aumentam as citocinas pró-inflamatórias que modulam, não só o sistema imune como também, o eixo HPA levando a um aumento de cortisol já observado na leishmaniose visceral em hamster [20] e humanos [21] e em outras doenças infecciosas como malária [22], doença de chagas [23], tuberculose [24], em doenças virais [25] mas ainda não estudada na leishmaniose visceral em cães.

As citocinas IL-1 e IL-6 tem suas produções aumentadas durante a LCan [26,27]. Nas doenças infecciosas essas citocinas podem atuar diretamente no sistema nervoso central (SNC), resultando na ativação de eixos neuroendócrinos, principalmente o eixo HPA, causando aumento da produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo que induz a hipófise a sintetizar o ACTH que, por sua vez, estimula as glândulas adrenais para produzir esteroides, glicocorticoides, dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato éster (DHEAS) [28,29]. Esses hormônios podem atuar na resposta imunológica durante a LCan.

Os glicocorticoides (GCs) exercem efeitos tanto genômicos quanto não genômicos, modulando fatores de transcrição associados à sinalização inflamatória, como o fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) [30]. Essa modulação resulta na redução da expressão de genes pró-inflamatórios que, conseqüentemente, inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α , bem como as relacionadas à resposta imune do tipo Th1, incluindo IL-2, IL-12 e IFN- γ . Paralelamente, os GCs estimulam a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, promovendo uma resposta imune do tipo Th2 [28,31].

Esses hormônios também desempenham um papel relevante na atenuação da ativação de células T, modulando a sinalização do receptor de células T (TCR) [32] e induzem a regulação positiva da expressão de PD-1 em células T e células *natural killer* (NK) [33,34] regulando a apresentação de antígenos durante a resposta adaptativa. Além disso, também podem regular a produção de NO, reduzindo a expressão de iNOS em resposta a estímulos inflamatórios [35,36], o que pode ser benéfico para replicação do parasito.

Ainda como um sistema bidirecional, o cortisol também pode diminuir a quimiotaxia para linfócitos, monócitos e granulócitos, além de promover o desbalanço da resposta celular e humoral, exacerbando a resposta de anticorpos [28]. Diferentes modelos experimentais de infecção mostram que tal desequilíbrio do eixo HPA impede o hospedeiro de montar uma resposta imune adequada, que por sua vez

pode influenciar a suscetibilidade à doença [29]

Em pacientes humanos com LV, a evidência dos distúrbios hormonais foi relatada, porém pouco sobre sua influência na doença foi elucidado [21]. Em hamsters infectados experimentalmente com *L. infantum*, observou-se altos níveis de cortisol após a infecção. Todos os leucócitos, exceto os monócitos, apresentaram uma forte correlação negativa com o cortisol, enquanto as transaminases mostraram correlação positiva. O cortisol também se correlacionou positivamente com marcadores imunológicos pró e anti-inflamatórios, além da enzima arginase-1. Em contraste, o IFN- γ e a enzima iNOS mostraram correlações negativas, indicando que o cortisol pode desempenhar um papel crucial na regulação da resposta imunológica ao parasito. [20]. Neste estudo, buscamos investigar as alterações do eixo HPA na LCan, analisando os níveis séricos do cortisol e ACTH e sua associação com parâmetros clínicos, laboratoriais e imunológicos envolvidos na progressão da doença.

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1. Ética

Todos os procedimentos e métodos utilizados no estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da FOA, UNESP, Araçatuba/SP, nº 282-2023.

2.4.2. Triagem dos Animais

Para compor o grupo de cães com leishmaniose foram considerados 23 cães machos, entre um e oito anos de idade, de várias raças e pesos, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba/SP ou de tutores locais, mediante termo de consentimento assinado anterior a colheita das amostras. O diagnóstico da LCan foi realizado por métodos sorológico: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) [37] ou teste imunocromatográfico (Teste Rápido DPP/BioManguinhos, BR) para detecção dos anticorpos anti-*Leishmania* e confirmado por método molecular para DNA da *Leishmania* spp em amostras de sangue ou swab conjuntival [38]. Todos os cães apresentaram ao menos três sinais clínicos característicos da doença [7]. Exames hematológicos e bioquímicos séricos para avaliação do perfil renal e

hepáticos do grupo foram realizados para determinação do estadiamento clínico desses animais. Foram selecionados apenas cães no estágio moderado da doença segundo estadiamento previamente proposto [39].

Selecionamos 12 cães machos, entre um e cinco anos de idade, de várias raças e pesos diferentes, provenientes de tutores locais, mediante termo de consentimento assinado anterior a colheita das amostras para compor o grupo saudável. Todos os cães apresentaram testes sorológicos ELISA e imunocromatográfico para LCan negativos e ausência do DNA da *Leishmania* spp em amostras de sangue e swab conjuntival. Os animais apresentavam – se clinicamente saudáveis após realização de exame físico completo e não apresentaram alterações em exames hematológicos e nos perfis bioquímicos condizentes a outras infecções.

Como critério de inclusão apenas cães machos foram utilizados para evitar a interferência dos hormônios que atuam no ciclo reprodutivo das fêmeas na produção de cortisol.

2.4.3. Colheita e acondicionamento das amostras sanguíneas e conjuntivais.

Para minimizar o efeito do ciclo circadiano, as amostras sanguíneas de todos os cães foram coletadas entre 8 e 10 horas da manhã. Com agulhas hipodérmicas e seringas descartáveis, o sangue total foi coletado por meio da punção da veia jugular dos cães de ambos os grupos. Três mililitros (ml) foram acondicionados em tubos plásticos contendo heparina (Becton-Dickson, EUA), (10 UI/ml de sangue) destinados à obtenção das células mononucleares. Para obtenção do soro sanguíneo, 12 ml foram acondicionados em tubos plásticos contendo ativador de coágulo (Vacuplast GmbH, Austria) e centrifugados a 3.000 rpm por 5 minutos e separados para avaliação dos marcadores bioquímicos e testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-*leishmania*. Dois ml de soro sanguíneo foram acondicionadas em -80°C para dosagem das citocinas, do cortisol e ACTH. Outros 1 ml de sangue total foram acondicionados em tubo plástico contendo K₂EDTA (Becton-Dickson, EUA) para realização do hemograma e extração de DNA para qPCR. As amostras sanguíneas para os exames laboratoriais foram levadas imediatamente para processamento em laboratório externo.

As amostras conjuntivais foram coletadas com swab estéril em região de conjuntiva palpebral superior de ambos os olhos acondicionadas em microtubos DNA/RNA free (Eppendorf, EUA) e armazenadas em -20°C até a extração de DNA.

2.4.4. Diagnóstico da LCan por teste imunocromatográfico DPP e ELISA indireto

O teste imunocromatográfico DPP foi realizado seguindo as instruções do fabricante. Os soros dos cães foram analisados por ELISA indireto, utilizando como antígeno o lisado total de promastigotas *L. chagasi* (MHOM/BR00/MER02). A técnica utilizada para preparação e realização de ELISA foi conforme protocolo previamente descrito [37].

2.4.5. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP de ambos os grupos foram isoladas usando gradiente de Histopaque 1077 (Sigma, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. As hemácias foram lisadas usando um tampão de lise contendo 7,46 g/L de cloreto de amônio. Em seguida, as células isoladas foram lavadas com três vezes em solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2 e ressuspensas em 1 ml de RPMI 1640 (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco, EUA), 0,03% L -glutamina (Sigma, EUA), 100 UI / mL de penicilina (Sigma, EUA) e 100 mg / mL de estreptomicina (Sigma, EUA).

2.4.6. Quantificação de iNOS, Arginase-1 e PD-1 usando Citometria de Fluxo

Para quantificação da expressão de iNOS e Arginase 1, as CMSP foram fixadas com 500 µl de tampão de fixação (Invitrogen) e incubadas por 10 min em temperatura ambiente. As células foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e lavadas duas vezes com tampão de permeabilização (Invitrogen). Em seguida, as células foram ressuspensas com 50 µl de tampão de permeabilização (Invitrogen) e incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-iNOS de camundongo conjugado a PE (BIORBYT) reagente com espécie canina; e anticorpo de coelho anti-arginase 1 de humano conjugado a FITC (BIORBYT). O blast da proteína humana ([#NP_000036.2](#)) tem similaridade com a proteína canina ([#XP_038409331](#)) de 92,24%. Para evitar ligação inespecífica, as CMSPs foram incubadas com seus respectivos isotipos controles (BIORBYT) por 60 minutos a 26°C. As células foram lavadas PBS (pH 7,2) com 1% de albumina sérica bovina (BSA) e armazenadas a 4°C no escuro até a análise.

Para quantificação da molécula coestimuladora negativa PD-1, as CMSP

isoladas foram lavadas com PBS (pH 7,2) e centrifugadas a 400 g por 5 minutos. Após centrifugação, foram bloqueadas com 1000 µL de PBS com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA) e centrifugadas novamente a 400 g por 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-PD1 conjugado com PE (anti-humano CD279, BD Biosciences, EUA) (a proteína PD-1 mostra um alto grau de homologia entre as espécies canina e humana) [40] e com seu isotipo controle (BD Biosciences, EUA), conforme recomendação do fabricante. As células foram lavadas PBS (pH 7,2) com 1% de BSA e armazenadas a 4°C no escuro até a análise.

Para todos os alvos, a aquisição de 10.000 eventos foi realizada em citômetro de fluxo Accuri C5 (BD Biosciences, EUA) e analisada usando BD Accuri C6 Software, versão 1.0.264.21 (BD Biosciences, CA, EUA).

2.4.7. Mensuração do Cortisol e do ACTH usando Kit Comercial ELISA

A mensuração do cortisol sérico dos cães foi realizada usando kit comercial *QuicKey Pro Canine Cortisol* ELISA (MyBioSource, San Diego, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O ACTH sérico dos cães foi avaliado usando kit comercial *Canine Adrenocorticotrophic Hormone* (ACTH) ELISA (MyBioSource, San Diego, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.4.8. Quantificação das Citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF- α e TGF- β usando ELISA de Captura

A quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IFN- γ e TNF- α no soro dos cães de ambos os grupos foram realizadas utilizando o kit DuoSet ELISA *Development Systems* kits caninos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A quantificação do TGF- β no soro dos cães de ambos os grupos foi realizada utilizando kit Quantikine™ ELISA Canine TGF- β 1 Immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

2.4.9. Extração de DNA e Quantificação da Carga Parasitária

A extração de DNA das amostras do sangue e da conjuntiva dos cães foram realizadas utilizando o kit comercial DNAeasy® kit (Quiagen, Valencia, Califórnia, 91355, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi

analisado em espectrofotômetro 260/280 (NanoDrop Technologies ND 1000 UV/VIS, USA) para avaliação do grau de pureza e quantificação.

A quantificação da carga parasitária foi realizada por PCR em tempo real (qPCR) usando iniciadores que amplificam um fragmento de 116 pb do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp. (5' CCTATTTTACACCAACCCCCAGT 3' e 5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA 3'). Para a reação de qPCR, foi padronizado com 50 ng de DNA genômico purificado, 12,5 µl de SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 900 nM de primer e 9,5 µl de água ultrapura para um volume final da reação completar 25 µl. A condição de amplificação utilizada foi composta por um aquecimento inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos por 40 ciclos de denaturação (94°C por 40 segundos), anelamento (56°C por 30 segundos) e extensão (72°C por 30 segundos). No final da amplificação, uma curva de dissociação do fragmento amplificado foi determinada de 60°C a 95°C com um aumento de 0,5°C a cada 5 segundos. A quantificação do DNA do parasito das amostras dos cães com leishmaniose foi determinada comparando a uma curva padrão com 450 ng de DNA de promastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/BR00/MER02) com uma diluição em série com fator 5. A curva padrão e amostras foram realizadas em duplicatas.

2.4.10. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o software GraphPad Prism V10 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente, todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade utilizando teste de Shapiro-Wilk. A correlação entre o nível sérico de cortisol dos cães com leishmaniose com as variáveis do hemograma, neutrófilos, marcadores bioquímicos renais (creatinina e ureia) e proteinograma (proteína total, albumina e globulinas), enzimas iNOS e Arginase-1; molécula PD-1 e citocinas IL-12 e TGF-β foi usado o teste de correlação de Pearson. O teste de correlação de Spearman foi usado para correlacionar o nível sérico de cortisol com os sinais clínicos e com as variáveis do leucograma (exceto os neutrófilos), plaquetas, marcadores bioquímicos hepáticos (ALT, AST e FA) e com as citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e IFN-γ.

Para comparação entre os grupos, o teste T de Student foi usado para as variáveis das células vermelhas, neutrófilos, marcadores bioquímicos renais (creatinina e ureia) e proteinograma (proteína total, albumina e globulinas), enzimas iNOS e Arginase-1; e para as citocinas IL-12 e TGF-β. O teste de Mann-Whitney para

variáveis do leucograma (exceto os neutrófilos), plaquetas, marcadores bioquímicos hepáticos (ALT, AST e FA), hormônios cortisol e ACTH, citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ ; e molécula PD-1.

Foram considerados valores com significância quando $p < 0,05$ para todas as análises descritas acima.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Achados Clínicos e Laboratoriais

Cães com leishmaniose (grupo leishmaniose) apresentaram ao menos três sinais clínicos característicos da doença, sendo a onicogribose a mais frequentes (91%[21/23]), seguido da linfadenopatia e lesão cutânea (83%[19/23]), lesão periocular (61%[14/23]) e alopecia (52%[12/23]). Outros sinais característicos, como caquexia (39%[9/23]), hepatoesplenomegalia (39%[9/23]), seborreia (30%[7/23]) e afecções oftálmicas (22%[5/23]) foram observadas com menor frequência em nosso estudo. Os cães incluídos no grupo saudáveis (grupo saudável) não apresentaram sinais clínicos (Tabela S1). Os cães selecionados no grupo leishmaniose apresentaram teste sorológico reagente para anticorpos anti-*Leishmania* no ELISA indireto [37] e 15 cães foram reagentes em teste rápido DPP. Também foi detectado o DNA da *Leishmania* spp. por qPCR (Tabela S1). Os cães saudáveis foram negativos em todos os testes diagnóstico sorológicos e molecular para leishmaniose (Tabela S1)

Nos achados hematológicos dos cães com leishmaniose, a contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, linfócitos e plaquetas foram estatisticamente menores quando comparados aos cães saudáveis, sendo que doze cães apresentaram anemia e onze com trombocitopenia (Tabela S2-S3). No perfil bioquímico, a hipoalbuminemia associada a uma hiperglobulinemia levando a um aumento da proteína total plasmática foi o achado mais frequente nos cães com leishmaniose (96%[22/23]) (Tabela S4). No perfil bioquímico hepático cães apresentaram aumento do aspartato aminotransferase (AST) e dois apresentaram aumento da fosfatase alcalina (FA) (Tabela S4). Cães que apresentaram com elevados níveis de creatinina ou ureia foram descartados do projeto. Os cães incluídos no grupo controle, não apresentaram alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Tabela S2 – S4).

2.5.2. O cortisol sérico aumentou e o ACTH sérico diminuiu em cães com leishmaniose.

Doenças infecciosas podem levar a distúrbios hormonais no hospedeiro [41]. Os níveis de cortisol plasmáticos apresentaram-se elevados durante a infecção em hamsters [20] e em humanos [21] com *L. infantum*. Mensuramos a concentração sérica do cortisol e do ACTH nos cães de ambos os grupos.

O nível sérico de cortisol foi maior (Teste Mann-Whitney, $p = 0,046$; Fig 1A), enquanto o ACTH sérico foi menor (Teste de Mann-Whitney, $p = 0,002$; Fig 1B) nos cães com leishmaniose quando comparados aos cães saudáveis.

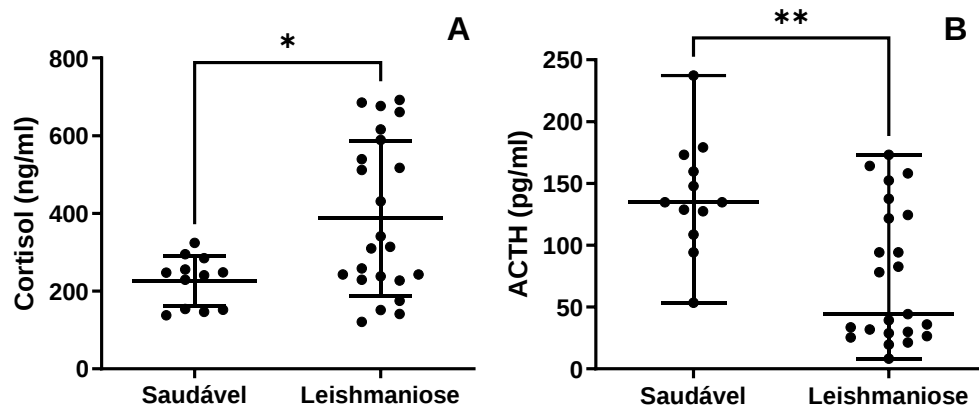


Fig 1: Nível sérico de cortisol e ACTH nos cães saudáveis (Saudável) e dos cães com leishmaniose (Leishmaniose). As avaliações do nível sérico de cortisol (A) e ACTH (B) foram realizadas usando kit *QuicKey Pro Canine Cortisol ELISA* e kit comercial *Canine Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH) ELISA*, respectivamente, dos cães saudáveis ($n=12$) e dos cães com leishmaniose ($n=23$). Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 e 75). Os símbolos representam dados individuais para cada animal. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste de Mann-Whitney para as duas variáveis, $p < 0,05$).

2.5.3. Cortisol apresentou correlação com as plaquetas, albumina e globulinas nos cães com leishmaniose.

Glicocorticoides podem modular resposta imunológica, com ação anti-inflamatórias, diminuindo quimiotaxia de leucócitos [42]. Além disso, o cortisol parece ter uma associação com os parâmetros clínicos e imunológicos durante a leishmaniose visceral [20]. Avaliamos a correlação dos níveis de cortisol sérico com os parâmetros clínicos e laboratoriais em cães com leishmaniose. O cortisol apresentou correlação positiva com a contagem de plaquetas (Teste de Correlação

de Spearman, $r = 0,427$; $p = 0,042$) e albumina (Teste de Correlação de Pearson, $r = 0,523$; $p = 0,010$). Por outro lado, cortisol e a globulina apresentaram uma correlação negativa (Teste de Correlação de Pearson, $r = -0,458$; $p = 0,028$) (Tabela 1).

Tabela 1. Correlações entre os níveis séricos de cortisol com os achados clínicos, sorológicos, variáveis hematológicas, bioquímicas dos cães com leishmaniose.

Variáveis	Nível de Cortisol	
	r^a	p^b
Sinais Clínicos	-0,360	0,092
D.O. (ELISA)	-0,264	0,225
Hemácias	0,352	0,099
Hemoglobina	0,343	0,110
Hematócrito	0,329	0,125
VCM	0,043	0,847
CHCM	0,258	0,236
Neutrófilos	0,112	0,610
Linfócitos	0,124	0,574
Monócitos	0,142	0,517
Eosinófilos	0,165	0,451
Plaquetas	0,427	0,042
Albumina	0,523	0,010
ALT	0,006	0,979
AST	-0,272	0,209
Creatinina	-0,177	0,418
FA	-0,185	0,398
Globulina	-0,458	0,028
Proteína Total	-0,269	0,215
Ureia	-0,033	0,881

Abreviação: densidade óptica (D.O.), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA). Variáveis em negrito demonstra correlação significativa.

a. Correlação utilizando teste de Pearson para distribuições paramétricas e teste de Spearman para não paramétricas com coeficientes de correlação representados por valores de r ; $n = 23$.

b. Valor de significância $p < 0.05$.

2.5.4. Cortisol não apresentou correlação com iNOS, arginase-1 e carga parasitária nos cães com leishmaniose.

Os GCs podem atuar na polarização dos macrófagos, regulando

negativamente fatores de transcrição responsáveis pelo aumento da expressão de iNOS durante estímulos inflamatórios [36]. Avaliamos a expressão das enzimas iNOS e Arginase -1 nas CMSP dos cães com leishmaniose por citometria de fluxo.

A iNOS participa da produção de NO pelo macrófago, levando a ação microbicida, enquanto a Arginase-1, participa na síntese de poliaminas, essenciais para a sobrevivência do parasito intracelular [13]. Observamos um aumento significativo na expressão da iNOS (Teste T de Student, $p = 0,002$ Fig 2A) e da arginase-1 (Teste T de Student, $p = 0,011$; Fig 2B) nas CMSPs dos cães com leishmaniose. Apesar de observamos aumento da enzima iNOS não indica ativação de macrófago e controle da infecção, sendo que arginase-1 apresenta maior expressão em comparação a própria iNOS nas CMSP dos cães com leishmaniose (Teste T de Student, $p < 0,0001$; Fig S1).

Para avaliar se o cortisol tem relação com a polarização do macrófago infectado e, conseqüentemente, com sobrevivência do parasito, correlacionamos o cortisol com a expressão das enzimas iNO, arginase-1 e carga parasitária. Observamos que o cortisol não apresentou correlação com iNOS, arginase-1 e carga parasitária durante a LCan (Tabela S5).

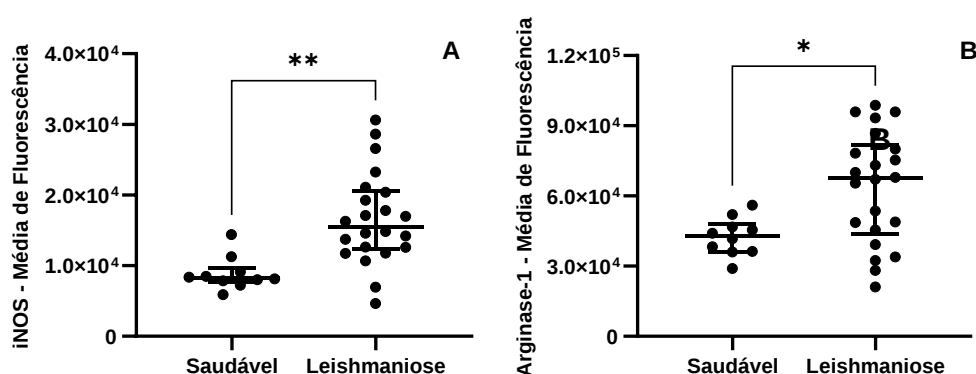


Fig 2. Expressão das enzimas iNOS e Arginase-1 nas CMSPs dos cães saudáveis (Saudável) e dos cães com leishmaniose (Leishmaniose). As avaliações da expressão de iNOS (A) e Arginase-1 (B) foram realizadas nas CMSPs dos cães saudáveis (grupo saudável, $n=10$) e dos cães com leishmaniose (grupo leishmaniose, $n=22$) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 e 75). Os símbolos representam dados individuais para cada animal. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste T de Student para iNOS e Arginase-1 $p < 0,05$).

2.5.5. PD-1 apresenta expressão aumentada nas CMSP e correlação negativa com o cortisol nos cães com leishmaniose.

O PD-1 desempenha um papel essencial na regulação da ativação dos linfócitos, ao se ligar aos ligantes presentes nas células apresentadoras de antígeno, contribuindo para a manutenção da tolerância imunológica, da homeostase e para a prevenção de respostas excessivas [17,18]. O papel do PD-1 durante a LCan pode estar associado a inibição da ativação das células T, regulando e diminuindo a resposta imune com o parasito [19]. Observamos que a PD-1 foi mais expresso nas CMSP dos cães doentes em comparação aos cães saudáveis (Teste T de Student, $p = 0,021$; Fig 3A).

Uma ação importante dos GCs é a modulação da expressão de PD-1 nos linfócitos T e nas células NK durante situação de câncer [33,34]. O nível de cortisol sérico apresentou correlação negativa com a expressão de PD-1 na LCan (Teste de Correlação de Pearson; $r = -0,506$; $p = 0,016$; Fig. 3B).

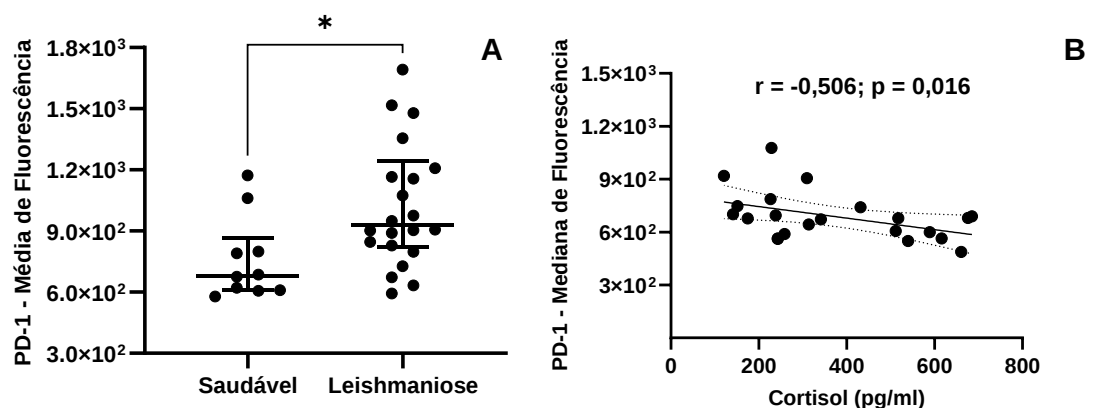


Fig 3. Expressão da molécula coestimuladora PD-1 nas CMSPs de cães saudáveis e cães com leishmaniose, e correlação com os níveis séricos de cortisol dos cães com leishmaniose. (A) Expressão de PD-1 nas CMSPs de cães saudáveis ($n = 10$) e cães com leishmaniose ($n = 22$), analisada por citometria de fluxo. (B) Gráfico de dispersão mostrando a correlação entre os níveis séricos de cortisol e a mediana da fluorescência de PD-1, com a reta de regressão linear ajustada. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 e 75). Os símbolos representam dados individuais para cada animal. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste t de Student para comparação entre os grupos; Teste de Correlação de Pearson, "r" representa o coeficiente de correlação; $p < 0,05$).

2.5.6. IL-10, IL-12 e IFN- γ estão aumentadas nos cães com leishmaniose.

O cortisol parece ter relação com a produção de citocinas durante a infecção

experimental da leishmaniose visceral em hamsters [20], avaliamos a produção das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) no soro sanguíneo dos cães infectados com *Leishmania* spp. pelo método ELISA de captura com kits comerciais específicos.

Observamos um aumento significativo dos níveis séricos de IL-10, IFN- γ (Teste de Mann Whitney, $p = 0,0006$, $p = 0,027$; Fig 4A e 4C) e IL-12 (Teste T de Student, $p < 0,0001$; Fig 4B) nos cães com leishmaniose. Entretanto, IL-1 β , IL-6, TNF- α (Teste de Mann Whitney, $p = 0,427$, $p = 0,6291$, $p = 0,474$) e TGF- β (Teste T de Student, $p = 0,639$) não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Fig. S2).

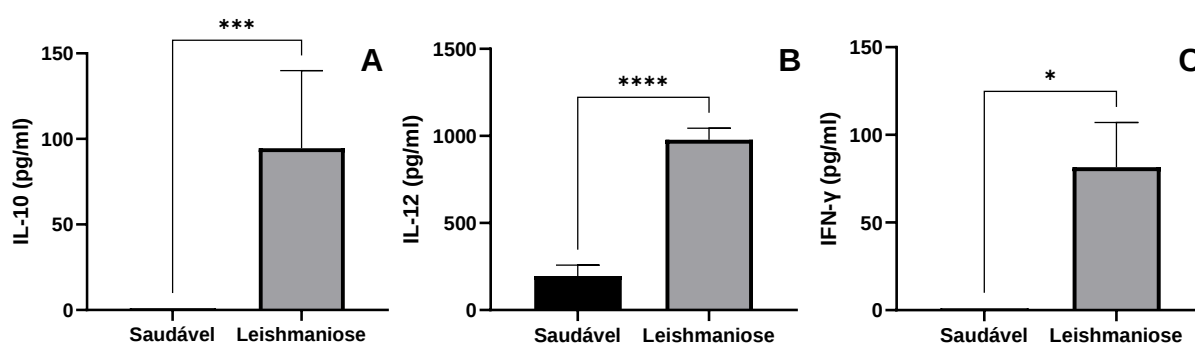


Fig 4: Níveis séricos de IL-10, IL-12 e IFN- γ nos cães saudáveis (Saudável) e nos cães com leishmaniose (Leishmaniose). As avaliações dos níveis séricos das citocinas IL-10 (A), IL-12 (B) e IFN- γ (C) foram realizadas para o método de ELISA de captura com kit comercial dos cães saudáveis (grupo saudáveis, $n=10$) e dos cães com leishmaniose (grupo Leishmaniose, $n=21$). Os dados são expressos em barras indicando média dos níveis das citocinas com erro padrão da média em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste de Mann-Whitney para IL-10 e IFN- γ ; e Teste T de Student para IL-12, $p < 0,05$).

2.5.7. O cortisol correlacionou negativamente com IL-12 e positivamente com TGF- β nos cães com leishmaniose.

Para avaliar a relação do cortisol com a resposta imunológica na LCan, realizamos uma correlação entre o nível sérico do cortisol e os níveis séricos das citocinas. IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α não apresentaram correlação significativa com o cortisol (Tabela S5). Porém, observamos uma correlação negativa com a IL-12 (Teste de Correlação de Pearson; $r = -0,536$; $p = 0,012$; Fig. 5A) e positiva com o TGF- β (Teste de Correlação de Pearson; $r = 0,491$; $p = 0,024$; Fig. 5A) nos cães com leishmaniose.

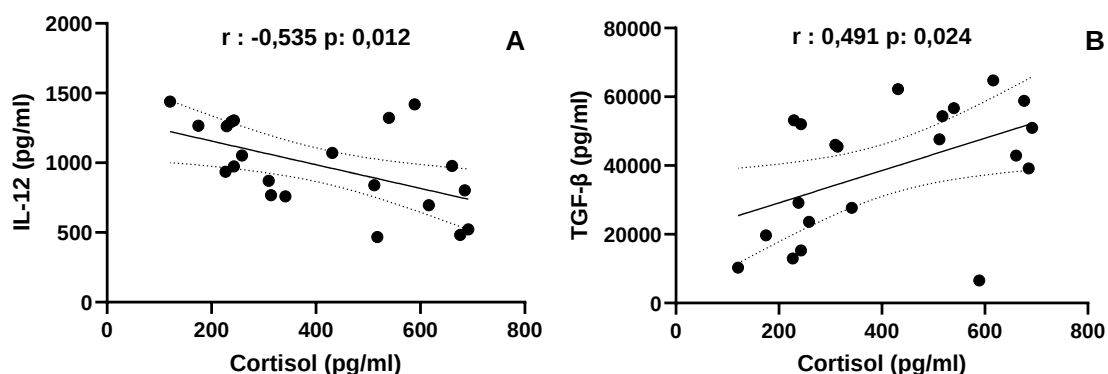


Fig 5. Correlação entre os níveis séricos de IL-12 e TGF- β com o nível sérico de cortisol dos cães com leishmaniose Correlação entre o nível sérico de cortisol e a IL-12 (A) e TGF- β com a reta de regressão linear ajustada. Os símbolos representam dados individuais para cada animal. (Teste de Correlação de Pearson, "r" representa o coeficiente de correlação; $p < 0,05$).

2.6. DISCUSSÃO

Na LCan, a sobrevivência do parasito está associada a uma resposta ineficaz produzida pelo hospedeiro, que induz um perfil anti-inflamatório com exacerbada resposta humoral e baixa resposta celular [43]. Sabe-se que elevadas concentrações de GCs podem atenuar a secreção de citocinas pró-inflamatórias e estimular um perfil de resposta humoral [28,29]. A regulação endócrina atuando na resposta imunológica em cães com leishmaniose ainda não foi elucidada. No presente estudo, investigamos os distúrbios no eixo HPA determinando os níveis séricos de cortisol e ACTH nos cães com leishmaniose e relacionando-os com os achados clínicos, laboratoriais e com os marcadores imunológicos circulantes que atuam na progressão da doença.

Os cães diagnosticados com sorológicos e molecular para leishmaniose apresentaram onicogribose, linfadenopatia, lesão cutânea e periocular como os achados clínicos mais frequentes e compatíveis com sinais clássicos esperado na LCan [7,44]. Devido ao desenho experimental do estudo, selecionamos animais no estágio moderado da doença [39], assim, cães sem sinais clínicos característicos ou que apresentaram alterações clínicas condizentes a outras doenças não entraram para o estudo, propondo assim, uma menor dispersão do grupo estudado.

Apesar do estágio moderado da doença, a produção de IgG média a alta é observada nesse estágio [39]. De fato, um aumento da globulina sérica foi observado

em nosso estudo. A alta concentração de anticorpos favorece a ligação a antígenos do parasito formando complexos imunes, que se depositam em órgãos como o rim, articulações e olho [45], processo responsável pelas manifestações clínicas observadas nos cães doentes. Alterações nos bioquímicos séricos renais não foram observados devido a condições de inclusão do estudo.

Estudo anterior avaliou que a ação do glicocorticoide cortisol é importante na regulação da imunidade na leishmaniose visceral em hamsters infectados [20]. Em cães com leishmaniose, altos níveis séricos de cortisol, mas não de ACTH, foram observados. Similares a nossos achados, pacientes humanos com leishmaniose visceral apresentaram altos níveis de cortisol [21]. Os distúrbios no eixo HPA já foram observados em outros modelos de infecção de infecções sistêmicas como exemplo, na malária [22] e na doença de Chagas [23], sugerindo que alguns protozoários podem atuar desregulando o eixo HPA, de modo que elevam os níveis de cortisol sistematicamente.

Curiosamente, observamos uma diminuição do ACTH nos cães com leishmaniose. Algo semelhante foi observado em ratos infectados experimentalmente com *Trypanosoma brucei* no qual, a infecção levou um aumento inicial e, em seguida, uma diminuição da concentração plasmática do ACTH [46]. Entretanto, é conhecido que a regulação da secreção de CRH e ACTH é ocasionado pelo *feedback* negativo do cortisol circulante que atua diretamente no hipotálamo e pituitária [31,47] através de dois tipos de receptores: mineralocorticoides (MR) e glicocorticoides (GR) [48]. Além disso, estressores externos e internos podem levar à desregulação do eixo HPA aumentando a produção de cortisol [49]. Assim, é possível que a leishmaniose visceral crônica atue como estressor interno e com a desregulação do eixo HPA, o aumento do cortisol sérico, atue nos receptores GR levando a uma diminuição da secreção de ACTH pela glândula pituitária por mecanismo de *feedback* negativo. Estudos futuros deverão ser realizados para melhor ratificar esses resultados.

Anteriormente, foi observado uma ação inibitória dos GCs na iNOS [36], enzima precursora do NO, molécula com ação microbicida contra o parasito [14]. Apesar da alta expressão de iNOS pelas CMSPs de cães com leishmaniose, não indica eliminação completa do parasito intracelular, pois, a alta expressão da arginase-1 também foi observada e superior a expressão da iNOS. Assim, buscamos avaliar se o cortisol apresentava relação com mecanismos microbicidas e de sobrevivência do parasito diretamente do macrófago, visto ao que foi observado em estudo anterior

[20]. Contudo, nos cães com leishmaniose, o cortisol não parece ter relação com a polarização de macrófagos e com a carga parasitária. É possível, que na LCan, o cortisol possa estar regulando a resposta através de outros marcadores imunes.

Identificamos uma alta expressão da molécula co-estimulatória inibitória PD-1 em nossos cães com leishmaniose. Embora os GCs modulem positivamente a expressão de PD-1 nas células T e NK no contexto tumoral [34,52], durante a LCan, observamos um padrão distinto. Essa correlação negativa pode ser devido a modulação distinta que os GCs possuem em diferentes contextos da resposta imunológica [53]. A ligação do hormônio em seu receptor presente na célula imune, ativa fatores de transcrição que podem inibir ou estimular a resposta [54], com implicações importantes durante leishmaniose. Esse achado sugere que na LCan, a regulação do PD-1 pelo cortisol é mais complexa. Outros estudos devem ser realizados para melhorar o entendimento dessa regulação na doença.

Apesar das citocinas IL-10, IL-12 e IFN- γ estarem elevadas nos cães com leishmaniose, apenas a IL-12 apresentou correlação negativa com o cortisol. Semelhante a esse achado, a dexametasona, um GC exógeno, inibe a produção de IL-12p40 em monócitos humanos [56] e altera o perfil da resposta Th1 para Th2 [57] o que torna benéfico para a sobrevivência da *Leishmania* spp. Além disso, o TGF- β , ainda que não parece estar elevado em nossos cães, apresentou uma correlação positiva com o cortisol. Semelhante ao que foi observado em hamster após infecção experimental com *L. infantum* [20]. Os efeitos imunossupressores dos GCs são atribuídos à sua capacidade de regular a transcrição genética, seja por meio da ligação a elementos de resposta hormonal nos promotores de diversos genes, seja pela modulação da expressão gênica através da interação com outros fatores de transcrição, como NF- κ B e proteína ativadora -1 [58,59] que atuam nas vias gênicas. Esses achados sugerem que o cortisol atua na LCan, regulando a resposta imunológica produção de citocinas que modulam o perfil de resposta da célula T.

Neste estudo, apresentamos que elevados níveis séricos de cortisol e baixos níveis séricos de ACTH são observados durante a LCan. Geralmente, os glicocorticoides são produzidos pelas glândulas adrenais através da ação do ACTH no seu receptor melanocortina 2 (MC2R) [42]. Contudo, outras vias podem atuar durante as doenças infecciosas e na LCan. As citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α podem atuar diretamente nos receptores da glândula induzindo a secreção hormonal [28,29]; e não podemos descartar que, anteriormente foi relatada a presença de parasito na

hipófise [60] e na glândula adrenal [61] de cães com leishmaniose, levando a processos inflamatório local e atuando diretamente no eixo HPA levando a sua desregulação.

Concluimos que os nossos resultados indicam que a desregulação do eixo HPA, caracterizada por elevados níveis de cortisol e baixos níveis de ACTH, pode desempenhar um papel na patogênese da LCan, devido ao cortisol se relacionar com a citocina anti-inflamatória TGF- β e na polarização das células T. Outros estudos serão necessários para elucidar melhor os mecanismos subjacentes à desregulação do eixo HPA na progressão da doença e suas implicações terapêuticas, no ponto de vista da resposta imunológica e à sobrevivência do parasito.

2.7. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelas concessões 2023/04680-8 e 2023/04301-7, e a Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

2.8. REFERÊNCIAS

1. Ready P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014; 147. doi:10.2147/CLEP.S44267
2. World Health Organization. No Title. In: Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. 5 Aug 2023.
3. Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine Leishmaniasis. 2004. pp. 1–88. doi:10.1016/S0065-308X(04)57001-X
4. Teixeira-Neto RG, da Silva ES, Nascimento RA, Belo VS, de Oliveira C di L, Pinheiro LC, et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. Parasit Vectors. 2014;7: 485. doi:10.1186/s13071-014-0485-7
5. Costa DNCC, Bermudi PMMB, Rodas LAC, Nunes CM, Hiramoto RM, Tolezano JE, et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine

- control measures. *Rev Saude Publica*. 2018;52: 92. doi:10.11606/S1518-8787.2018052000381
6. Buates S, Matlashewski G. General Suppression of Macrophage Gene Expression During *Leishmania donovani* Infection. *The Journal of Immunology*. 2001;166: 3416–3422. doi:10.4049/jimmunol.166.5.3416
 7. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2009;165: 1–18. doi:10.1016/j.vetpar.2009.05.022
 8. Toepp AJ, Petersen CA. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. *Res Vet Sci*. 2020;130: 19–25. doi:10.1016/j.rvsc.2020.02.004
 9. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, del Real G, Ruitenbergh J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 1994;62: 229–235. doi:10.1128/iai.62.1.229-235.1994
 10. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004;201: 239–253. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x
 11. Panaro MA, Fasanella A, Lisi S, Mitolo V, Andriola A, Brandonisio O. Evaluation of Nitric Oxide Production by *Leishmania Infantum*-infected Dog Macrophages. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1998;20: 147–158. doi:10.3109/08923979809034814
 12. Solano-Gallego L, Montserrat-Sangrà S, Ordeix L, Martínez-Orellana P. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. *Parasit Vectors*. 2016;9: 317. doi:10.1186/s13071-016-1598-y
 13. Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol*. 2007;10: 301–308. doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x
 14. Olekhovitch R, Bousso P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. *Trends Parasitol*. 2015;31: 653–664. doi:10.1016/j.pt.2015.08.001
 15. Badirzadeh A, Taheri T, Taslimi Y, Abdossamadi Z, Heidari-Kharaji M, Gholami E, et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of

- Leishmania parasites. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11: e0005774. doi:10.1371/journal.pntd.0005774
16. Pessenda G, da Silva JS. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. Parasite Immunol. 2020;42. doi:10.1111/pim.12722
 17. Chiku VM, Silva KLO, de Almeida BFM, Venturin GL, Leal AAC, de Martini CC, et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. Immunobiology. 2016;221: 879–888. doi:10.1016/j.imbio.2016.03.007
 18. Esch KJ, Juelsgaard R, Martinez PA, Jones DE, Petersen CA. Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. The Journal of Immunology. 2013;191: 5542–5550. doi:10.4049/jimmunol.1301810
 19. Rebech GT, Venturin GL, Siqueira Ito LT, Bragato JP, de Carvalho Fonseca BS, Melo LM, et al. PD-1 regulates leishmanicidal activity and IL-17 in dogs with leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol. 2020;219: 109970. doi:10.1016/j.vetimm.2019.109970
 20. Barros-Gonçalves T de D, Saavedra AF, Silva-Couto L da, Ribeiro-Romão RP, Bezerra-Paiva M, Gomes-Silva A, et al. Increased levels of cortisol are associated with the severity of experimental visceral leishmaniasis in a *Leishmania* (L.) infantum-hamster model. PLoS Negl Trop Dis. 2021;15: e0009987. doi:10.1371/journal.pntd.0009987
 21. Lima Verde FA, Lima Verde FAA, Saboia Neto A, Almeida PC, Lima Verde EM. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2011;84: 668–673. doi:10.4269/ajtmh.2011.09-0171
 22. Esfandiari F, Sarkari B, Turki H, Arefkhah N, Shakouri N. Level of circulating steroid hormones in malaria and cutaneous leishmaniasis: a case control study. Journal of Parasitic Diseases. 2019;43: 54–58. doi:10.1007/s12639-018-1055-2
 23. Savino W. Endocrine Immunology of Chagas Disease. 2017. pp. 160–175. doi:10.1159/000452914
 24. Rey A del, Mahuad C V., Bozza V V., Bogue C, Farroni MA, Bay ML, et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. Brain Behav Immun. 2007;21: 171–179. doi:10.1016/j.bbi.2006.06.005

25. Silverman MN, Pearce BD, Biron CA, Miller AH. Immune Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Viral Infection. *Viral Immunol.* 2005;18: 41–78. doi:10.1089/vim.2005.18.41
26. Rebech GT, Bragato JP, Costa SF, de Freitas JH, dos Santos MO, Soares MF, et al. miR-148a regulation interferes in inflammatory cytokine and parasitic load in canine leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023;17: e0011039. doi:10.1371/journal.pntd.0011039
27. de Lima VMF, Peiro JR, de Oliveira Vasconcelos R. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115: 189–193. doi:10.1016/j.vetimm.2006.10.003
28. Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol.* 2002;133: 1–19. doi:10.1016/S0165-5728(02)00357-0
29. Pérez AR, Bottasso O, Savino W. The Impact of Infectious Diseases upon Neuroendocrine Circuits. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16: 96–105. doi:10.1159/000180264
30. Cain DW, Cidlowski JA. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* 2017;17: 233–247. doi:10.1038/nri.2017.1
31. Miyake S. Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2012;3: 1–15. doi:10.1111/j.1759-1961.2011.00023.x
32. Van Laethem F, Baus E, Smyth LA, Andris F, Bex F, Urbain J, et al. Glucocorticoids Attenuate T Cell Receptor Signaling. *J Exp Med.* 2001;193: 803–814. doi:10.1084/jem.193.7.803
33. Adorisio S, Cannarile L, Delfino D V., Ayroldi E. Glucocorticoid and PD-1 Cross-Talk: Does the Immune System Become Confused? *Cells.* 2021;10: 2333. doi:10.3390/cells10092333
34. Maeda N, Maruhashi T, Sugiura D, Shimizu K, Okazaki I, Okazaki T. Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2019;294: 19896–19906. doi:10.1074/jbc.RA119.010379
35. Dong J, Li J, Cui L, Wang Y, Lin J, Qu Y, et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF- κ B and MAPK pathways. *BMC Vet Res.* 2018;14: 30. doi:10.1186/s12917-018-1360-0

36. Hämäläinen M, Lilja R, Kankaanranta H, Moilanen E. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;21: 331–339. doi:10.1016/j.pupt.2007.08.003
37. Lima VMF de, Biazzone L, Silva AC, Correa APFL, Luvizotto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 2005;25: 215–218. doi:10.1590/S0100-736X2005000400005
38. Fernandes MA, Leonel JAF, Isaac JA, Benassi JC, Silva DT, Spada JCP, et al. Molecular detection of *Leishmania infantum* DNA according to clinical stages of leishmaniasis in dog. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.* 2019;28: 194–202. doi:10.1590/s1984-29612019015
39. Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2011;4: 86. doi:10.1186/1756-3305-4-86
40. Folkl A, Wen X, Kuczynski E, Clark ME, Bienzle D. Feline programmed death and its ligand: Characterization and changes with feline immunodeficiency virus infection. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;134: 107–114. doi:10.1016/j.vetimm.2009.10.019
41. Pérez AR, Bottasso O, Savino W. The Impact of Infectious Diseases upon Neuroendocrine Circuits. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16: 96–105. doi:10.1159/000180264
42. Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, et al. Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology.* Wiley; 2016. pp. 603–621. doi:10.1002/cphy.c150015
43. Melo LM, Bragato JP, Venturin GL, Rebech GT, Costa SF, Garcia LE, et al. Induction of miR 21 impairs the anti-*Leishmania* response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. *PLoS One.* 2019;14: e0226192. doi:10.1371/journal.pone.0226192
44. Torrecilha RBP, Utsunomiya YT, Bosco AM, Almeida BF, Pereira PP, Narciso LG, et al. Correlations between peripheral parasite load and common clinical and laboratory alterations in dogs with visceral leishmaniasis. *Prev Vet Med.* 2016;132: 83–87. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.08.006

45. Esch KJ, Schaut RG, Lamb IM, Clay G, Morais Lima ÁL, do Nascimento PRP, et al. Activation of Autophagy and Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat–Containing-Like Receptor Family, Pyrin Domain–Containing 3 Inflammasome during *Leishmania infantum*–Associated Glomerulonephritis. *Am J Pathol.* 2015;185: 2105–2117. doi:10.1016/j.ajpath.2015.04.017
46. Maina CI. Plasma ACTH concentration and pituitary gland histo-pathology in rats infected with. *Afr Health Sci.* 2018;17: 1029. doi:10.4314/ahs.v17i4.10
47. Cowan JS, Layberry RA. Feedback suppression of ACTH secretion by Cortisol in dogs: lags after large signals equal those following very small signals. *Can J Physiol Pharmacol.* 1983;61: 1281–1288. doi:10.1139/y83-185
48. Spiga F, Harrison LR, Wood SA, Atkinson HC, MacSweeney CP, Thomson F, et al. Effect of the Glucocorticoid Receptor Antagonist Org 34850 on Basal and Stress-Induced Corticosterone Secretion. *J Neuroendocrinol.* 2007;19: 891–900. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01605.x
49. Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. *Endocr Rev.* 2000;21: 55–89. doi:10.1210/edrv.21.1.0389
50. Iniesta V, Carlos Gómez-Nieto L, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, et al. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol.* 2002;24: 113–118. doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00444.x
51. Nadaes NR, Silva da Costa L, Santana RC, LaRocque-de-Freitas IF, Vivarini Á de C, Soares DC, et al. DH82 Canine and RAW264.7 Murine Macrophage Cell Lines Display Distinct Activation Profiles Upon Interaction With *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.00247
52. Quatrini L, Wieduwild E, Escaliere B, Filtjens J, Chasson L, Laprie C, et al. Endogenous glucocorticoids control host resistance to viral infection through the tissue-specific regulation of PD-1 expression on NK cells. *Nat Immunol.* 2018;19: 954–962. doi:10.1038/s41590-018-0185-0
53. Xing K, Gu B, Zhang P, Wu X. Dexamethasone enhances programmed cell death 1 (PD-1) expression during T cell activation: an insight into the optimum application of glucocorticoids in anti-cancer therapy. *BMC Immunol.* 2015;16: 39. doi:10.1186/s12865-015-0103-2

54. Bally APR, Lu P, Tang Y, Austin JW, Scharer CD, Ahmed R, et al. NF- κ B Regulates PD-1 Expression in Macrophages. *The Journal of Immunology*. 2015;194: 4545–4554. doi:10.4049/jimmunol.1402550
55. Hu X, Li W-P, Meng C, Ivashkiv LB. Inhibition of IFN- γ Signaling by Glucocorticoids. *The Journal of Immunology*. 2003;170: 4833–4839. doi:10.4049/jimmunol.170.9.4833
56. Ma W, Gee K, Lim W, Chambers K, Angel JB, Kozlowski M, et al. Dexamethasone Inhibits IL-12p40 Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytic Cells by Down-Regulating the Activity of c-Jun N-Terminal Kinase, the Activation Protein-1, and NF- κ B Transcription Factors. *The Journal of Immunology*. 2004;172: 318–330. doi:10.4049/jimmunol.172.1.318
57. Agarwal SK, Marshall GD. Dexamethasone Promotes Type 2 Cytokine Production Primarily Through Inhibition of Type 1 Cytokines. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2001;21: 147–155. doi:10.1089/107999001750133159
58. Almawi WY, Beyhum HN, Rahme AA, Rieder MJ. Regulation of cytokine and cytokine receptor expression by glucocorticoids. *J Leukoc Biol*. 1996;60: 563–572. doi:10.1002/jlb.60.5.563
59. Sternberg EM. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 318–328. doi:10.1038/nri1810
60. Frigerio ED, Guizelini C de C, Jussiani GG, Marçó KS, de Melo GD, Watanabe TTN, et al. Lymphocytic hypophysitis in dogs infected with *Leishmania* spp. *Front Vet Sci*. 2023;10. doi:10.3389/fvets.2023.1208919
61. Momo C, Rocha NA de S, Moreira PRR, Munari DP, Bomfim SRM, Rozza DB, et al. Morphological changes and parasite load of the adrenal from dogs with visceral leishmaniasis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2014;23: 30–35. doi:10.1590/S1984-29612014004

2.9. Informações de Apoio

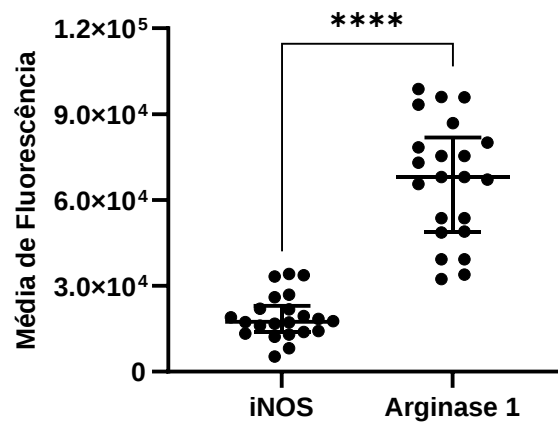


Fig S1: Expressão das enzimas iNOS e Arginase-1 nas CMSPs dos cães com leishmaniose. As avaliações da expressão de iNOS e Arginase-1 foram realizadas nas CMSPs dos cães com leishmaniose (grupo leishmaniose, n=22) e analisadas por citometria de fluxo. Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25 e 75). Os símbolos representam dados individuais para cada animal. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste T de Student $p < 0,05$).

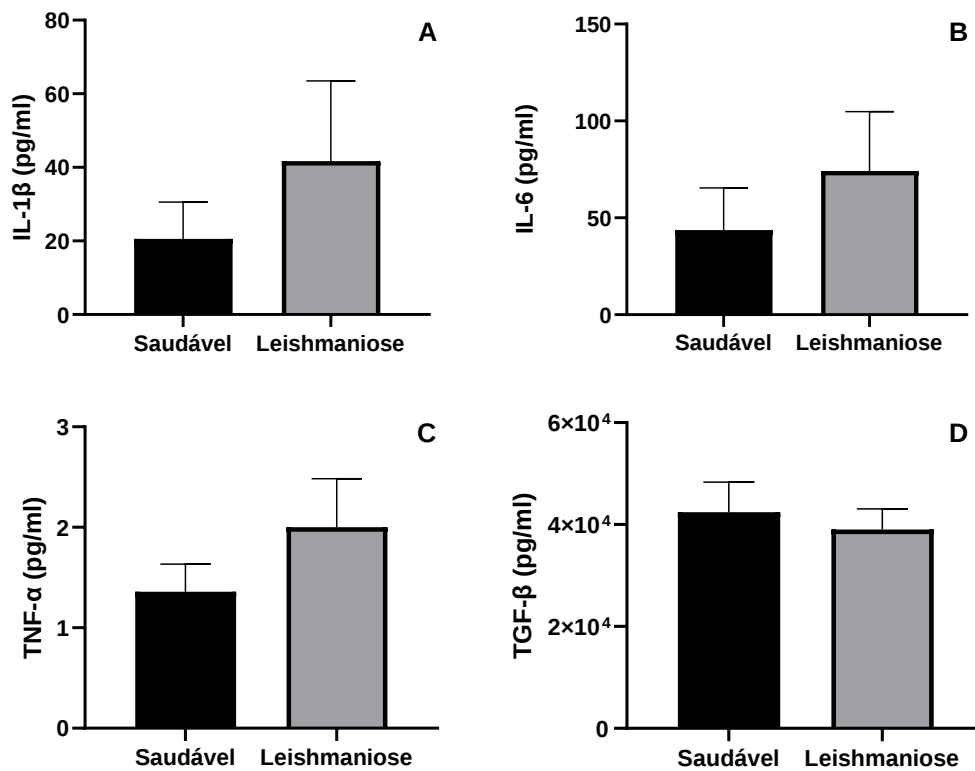


Fig S2: Níveis séricos de IL-1 β , IL-6, TNF- α e TGF- β nos cães saudáveis (saudável) e com leishmaniose (Leishmaniose). As avaliações dos níveis séricos das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C) e TGF- β (D) foram realizadas pelo método de ELISA de captura com kit comercial dos cães saudáveis (grupo saudável, n=10) e dos cães com leishmaniose (grupo Leishmaniose, n=21). Os dados são expressos em barras indicando média dos níveis das citocinas com erro padrão da média em cada grupo. Asteriscos indicam diferenças significativas (Teste de Mann-Whitney para IL-1 β , IL-6 e TNF- α ; e Teste T de Student para TGF- β , $p < 0,05$).

Tabela S1. Sinais Clínicos, diagnóstico sorológico e molecular dos cães com leishmaniose (Leishmaniose) e dos cães saudáveis (Saudáveis).

Cães	Sinais Clínicos	Diagnóstico		
		DPP	PCR	D.O. ELISA
Leishmaniose				
Infectado 1	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, alopecia	+	+	0,754
Infectado 2	Linfoadenopatia, onicogribose, caquexia, lesões cutâneas, lesão periocular, alopecia, hepatoesplenomegalia e afecção oftálmica	+	+	0,579
Infectado 3	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas e lesão periocular	-	+	0,322
Infectado 4	Onicogribose, caquexia, lesões cutâneas, alopecia e hepatoesplenomegalia	+	+	0,729
Infectado 5	Linfoadenopatia, caquexia e lesão cutâneas	+	+	0,738
Infectado 6	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular e seborreia	+	+	0,887
Infectado 7	Linfoadenopatia, onicogribose, lesão periocular e hepatoesplenomegalia	-	+	0,305
Infectado 8	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas e lesão periocular	-	+	0,375
Infectado 9	Onicogribose, caquexia, lesões cutâneas, seborreia e alopecia	+	+	0,675
Infectado 10	Linfoadenopatia, onicogribose, caquexia, leão periocular e afecção oftálmica	-	+	0,317
Infectado 11	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas e alopecia	+	+	0,865
Infectado 12	Linfoadenopatia, onicogribose, lesão cutâneas e lesão periocular	-	+	0,294
Infectado 13	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular, seborreia, alopecia e afecção oftálmica	+	+	0,575
Infectado 14	Onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular, afecção oftálmica e hepatoesplenomegalia	+	+	0,580
Infectado 15	Linfoadenopatia, caquexia, lesões cutâneas, lesão periocular, seborreia e alopecia	-	+	0,500
Infectado 16	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular e hepatoesplenomegalia	+	+	0,635
Infectado 17	Onicogribose, caquexia,, lesões cutâneas, seborreia e alopecia	+	+	0,650
Infectado 18	Linfoadenopatia, onicogribose,lesões cutâneas, alopecia e hepatoesplenomegalia	+	+	0,657
Infectado 19	Linfoadenopatia, onicogribose, caquexia e alopecia	-	+	0,360
Infectado 20	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular, seborreia, alopecia, afecção oftálmica e hepatoesplenomegalia	+	+	0,850
Infectado 21	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas, lesão periocular, seborreia e hepatoesplenomegalia	+	+	0,600
Infectado 22	Linfoadenopatia, onicogribose, caquexia, alopecia e hepatoesplenomegalia	-	+	0,660
Infectado 23	Linfoadenopatia, onicogribose, lesões cutâneas e lesão periocular	+	+	0,470
Saudáveis				
Controle 1	Sem sinais clínicos	-	-	0,106
Controle 2	Sem sinais clínicos	-	-	0,102
Controle 3	Sem sinais clínicos	-	-	0,210
Controle 4	Sem sinais clínicos	-	-	0,207
Controle 5	Sem sinais clínicos	-	-	0,171
Controle 6	Sem sinais clínicos	-	-	0,092
Controle 7	Sem sinais clínicos	-	-	0,097
Controle 8	Sem sinais clínicos	-	-	0,121

Controle 9	Sem sinais clínicos	-	-	0,115
Controle 10	Sem sinais clínicos	-	-	0,186
Controle 11	Sem sinais clínicos	-	-	0,248
Controle 12	Sem sinais clínicos	-	-	0,150

Abreviação: teste imunocromatográfico (DPP), Reação em Cadeia da Plimerase (PCR) densidade óptica (D.O). Ponto de corte D.O. >0,270

Tabela S2. Parâmetros das células vermelhas cães com leishmaniose (Leishmaniose) e dos cães saudáveis (Saudáveis).

Cães	Intervalo de Referência	Hemácias	Hemoglobina	Hematócrito	VCM	CHCM
		5,5 - 8,5 x10 ¹² /mm ³	12,0-18,0 g/dl	37-55 %	60-77 fL	31-35%
Leishmaniose						
Infectado 1		5,0	9,6	29,0	57,7	33,1
Infectado 2		7,4	14,8	45,0	60,8	32,9
Infectado 3		7,3	16,5	48,0	65,6	34,4
Infectado 4		5,7	14,0	40,0	70,2	35,0
Infectado 5		7,3	16,7	50,0	68,4	33,4
Infectado 6		6,4	12,8	41,0	64,1	31,2
Infectado 7		7,4	17,8	52,0	70,0	34,2
Infectado 8		6,0	14,7	42,0	70,5	35,0
Infectado 9		4,2	8,6	27,0	64,3	31,9
Infectado 10		7,8	17,3	50,0	64,1	34,6
Infectado 11		3,2	8,5	24,0	74,8	35,4
Infectado 12		6,7	15,7	47,0	70,4	33,4
Infectado 13		3,3	6,5	21,0	63,6	31,0
Infectado 14		5,2	9,3	31,0	59,5	30,0
Infectado 15		4,6	8,6	30,0	65,4	28,7
Infectado 16		6,4	14,9	44,0	68,5	33,9
Infectado 17		3,4	7,4	24,0	70,8	30,8
Infectado 18		5,1	11,3	33,0	64,6	34,2
Infectado 19		7,3	16,3	49,0	67,4	33,3
Infectado 20		3,5	7,2	22,0	63,0	32,7
Infectado 21		4,1	8,8	26,0	63,1	33,8
Infectado 22		5,2	11,8	35,0	66,8	33,7
Infectado 23		5,1	11,4	34,0	66,3	33,5
	Média±DV	5,6±1,50 ^a	12,2±3,68 ^a	36,7±10,24 ^a	66,1±4,05 ^a	33,1±1,72 ^a
Saudáveis						
Controle 1		7,5	17,4	49,0	65,6	35,5
Controle 2		7,8	18,0	54,0	69,5	33,3
Controle 3		7,7	19,3	55,0	71,2	35,1
Controle 4		8,0	17,9	53,0	66,2	33,8
Controle 5		7,6	17,8	51,0	67,5	34,9
Controle 6		8,5	18,6	57,0	67,3	32,6
Controle 7		6,4	16,3	47,0	73,6	34,7
Controle 8		7,7	18,4	53,0	68,7	34,7
Controle 9		6,3	14,2	42,0	66,9	33,8
Controle 10		6,8	15,8	50,0	73,6	31,6
Controle 11		6,7	15,8	46,0	68,8	34,4
Controle 12		6,7	15,2	45,0	67,3	33,8
	Média±DV	7,3±0,70 ^a	17,0±1,50 ^a	50,2±4,60 ^a	68,8±2,58 ^a	34,0±0,94 ^b

Abreviação: volume corpuscular médio (VCM), concentração média de hemoglobina corpuscular (CMHC), desvio padrão (SD). Letras iguais em colunas iguais indicam diferença estatística usando Teste T de Student ($p < 0,05$).

Tabela S3. Parâmetros das células branca e plaquetas dos cães com leishmaniose (Leishmaniose) e dos cães saudáveis (Saudáveis).

Cães	Valores de Referência	Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	Plaquetas
		3.000-11.500 x10 ⁶ /L	1.000-4.800 x10 ⁶ /L	150-1.350 x10 ⁶ /L	150-1.250 x10 ⁶ /L	160-440 x10 ³
Leshmaniose						
Infectado 1		3.355	1.198	360	1.078	206
Infectado 2		8.503	761	1.650	1.777	220
Infectado 3		4.080	4.998	816	306	240
Infectado 4		5.041	1.917	152	84	180
Infectado 5		6.037	1.230	234	120	150
Infectado 6		6.052	1.958	178	712	204
Infectado 7		3.861	660	102	457	229
Infectado 8		3.590	1.300	248	1.052	275
Infectado 9		4.945	563	376	313	127
Infectado 10		3.660	2.379	61	0	200
Infectado 11		2.178	1.089	0	33	100
Infectado 12		6.237	1.782	535	356	151
Infectado 13		3.357	392	480	87	122
Infectado 14		6.358	225	224	598	191
Infectado 15		7.146	82	487	406	180
Infectado 16		4.110	1.781	343	548	125
Infectado 17		5.143	612	245	122	425
Infectado 18		3.995	611	47	47	140
Infectado 19		6.845	1.423	622	0	122
Infectado 20		3.902	447	74	74	82
Infectado 21		4.818	5.735	344	344	140
Infectado 22		9.250	393	147	0	188
Infectado 23		2.960	680	120	240	80
	Média±DP	5.018±1789,1 ^a	1.401±1.401,6 ^a	341±350,3 ^a	381±435,9 ^a	177±76,1 ^a
Saudáveis						
Controle 1		7.839	3.042	117	702	240
Controle 2		6.438	2.001	174	142	250
Controle 3		4.697	1.098	150	305	240
Controle 4		9.120	4.016	608	456	200
Controle 5		8.400	1.904	448	448	200
Controle 6		5.200	2.640	80	180	240
Controle 7		6.362	2.386	298	894	389
Controle 8		3.876	2.720	136	168	180
Controle 9		6.144	2.372	216	922	236
Controle 10		3.620	2.391	273	346	220
Controle 11		3.362	3.514	382	382	153
Controle 12		4.421	3.039	276	1.174	229
	Média±DP	5.790±1.922,5 ^b	2.594-±767,8 ^a	263±154,5 ^b	510±336,9 ^b	231±57,5 ^b

Abreviações: desvio padrão (SD). Letras iguais em colunas iguais indicam diferença estatística usando T de Studente (variável neutrófilo) e Teste de Mann Whitney (para as restantes) ($p < 0,05$).

Tabela S4. Parâmetros bioquímicos dos cães com leishmaniose (Leishmaniose) e dos cães saudáveis (saudáveis).

Cães	Valores de Ref.	Albumina 2,6-3,3 g/L	ALT 21-102 U/L	AST 23-66 U/L	Creatinina 0,5-1,5 mg/dL	FA 20-156 U/L	Globulina 2,7-4,4 g/L	Proteína Total 5,4-7,1 g/L	Ureia 10,03- 50,03 mg/dL
Leishmaniose									
Infectado 1		2,5	26	47	1,1	66	7,0	9,5	25,0
Infectado 2		2,1	36	41	1,0	41	6,4	8,5	26,0
Infectado 3		3,1	36	47	1,4	33	4,5	7,6	48,0
Infectado 4		2,0	22	50	1,0	40	8,0	10,0	30,0
Infectado 5		1,4	31	52	1,4	66	9,9	11,3	33,0
Infectado 6		1,8	36	23	1,4	24	9,0	10,8	36,0
Infectado 7		3,1	41	26	1,1	66	4,9	8,0	27,0
Infectado 8		2,9	26	26	1,1	24	4,9	7,8	33,0
Infectado 9		1,2	15	52	0,6	58	8,1	9,3	35,0
Infectado 10		2,4	36	20	0,9	74	6,2	8,6	45,0
Infectado 11		2,7	32	55	0,8	87	7,3	10,0	26,0
Infectado 12		2,7	57	26	0,9	41	5,7	8,4	25,0
Infectado 13		1,0	62	204	1,1	91	6,9	7,9	42,0
Infectado 14		1,4	20	47	1,1	182	7,8	9,2	33,0
Infectado 15		2,0	20	26	0,9	41	7,8	9,8	9,0
Infectado 16		2,5	31	15	1,2	24	7,8	10,3	27,0
Infectado 17		1,8	31	36	1,1	58	5,2	7,0	47,0
Infectado 18		2,2	21	88	1,0	107	7,2	9,4	60,0
Infectado 19		2,4	62	52	1,0	99	5,2	7,6	41,0
Infectado 20		1,1	62	94	0,9	265	7,8	8,9	43,0
Infectado 21		1,2	57	41	0,9	74	6,7	7,9	19,0
Infectado 22		2,1	31	41	0,9	58	6,3	8,4	33,0
Infectado 23		2,1	31	26	0,7	66	6,4	8,5	30,0
	Média±DV	2,1±0,6^a	36±14,5^a	49±38,9^a	1,0±0,2^a	73±54,3^a	6,8±1,4^a	8,9±1,1^a	33,6±10,9^a
Saudáveis									
Controle 1		4,0	24	66	1,2	23	3,6	7,6	48,1
Controle 2		4,0	53	61	0,8	49	3,0	7,0	40,6
Controle 3		3,8	41	55	1,3	91	4,0	7,8	29,7
Controle 4		3,3	24	23	1,3	154	2,9	6,2	35,0
Controle 5		3,8	31	61	1,2	23	2,4	6,2	32,0
Controle 6		4,0	30	32	0,9	39	3,6	7,6	24,2
Controle 7		3,0	52	47	1,2	41	3,4	6,4	40,0
Controle 8		3,9	68	28	1,1	20	2,3	6,2	32,4
Controle 9		2,8	41	31	1,5	74	2,4	5,2	29,0
Controle 10		3,1	26	20	1,2	49	3,5	6,5	42,0
Controle 11		3,4	57	31	0,7	41	4,0	7,4	20,0
Controle 12		3,1	57	36	1,4	74	2,8	5,9	47,0
	Média±DV	3,5±0,4^a	42±15,1^b	45±22,6^a	1,1±0,2^b	57±37,9^b	3,1±0,6^a	6,7±0,8^a	35,0±8,8^b

Abreviação: referência (Ref.), albumina transferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), desvio padrão (SD). Letras iguais em colunas iguais indicam diferença estatística usando Teste de Mann Whitney (AST, ALT e FA) e Teste T de Student (restante) ($p < 0,05$).

Tabela S5. Correlações entre os níveis séricos de cortisol com marcadores imunológicos e carga parasitária dos cães com leishmaniose.

Variáveis	Nível de Cortisol	
	r	p
iNOS CMSP	-0,216	0,333
Arginase CMSP	-0,302	0,173
IL-1 β (pg/ml)	0,153	0,507
IL-6 (pg/ml)	0,065	0,780
IL-10 (pg/ml)	-0,079	0,733
IFN- γ (pg/ml)	0,140	0,544
TNF- α (pg/ml)	0,064	0,782
Carga Parasitária Sangue	-0,250	0,367
Carga Parasitária Conjuntiva	-0,044	0,861

Abreviação: óxido nítrico sintase induzível (iNOS) células mononucleares do sangue periférico (CMSP), interleucina (IL), picograma (pg), mililitro (ml), interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF). Variáveis em negrito demonstra correlação significativa.

- a. Correlação utilizando teste de Pearson para distribuições paramétricas e teste de Spearman para não paramétricas com coeficientes de correlação representados por valores de r ;
- b. Valor de significância $p < 0.05$

APÊNDICE – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- [1] BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 15 set. 2018.
- [2] **WHO 2023**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [3] **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9122>>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [4] READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, p. 147–154, 3 maio 2014.
- [5] COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p. 386–392, ago. 2010.
- [6] **Leishmaniasis - PAHO/WHO | Pan American Health Organization**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [7] **Publicações**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica/publicacoes>>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [8] **Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil) | Request PDF**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284848943_Aspectos_clinicos_de_c_aes_com_leishmaniose_visceral_no_municipio_de_Aracatuba_-_Sao_Paulo_Brasil>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [9] FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v. 28, p. 36–44, 1 jan. 2000.
- [10] **Situação Atual - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.saude.sp.gov.br/coordenadoria-de-controle-de-doencasvetores/programas/leishmaniose-visceral/situacao-atual>>. Acesso em: 30 nov. 2024.
- [11] ALENCAR JE, D. R. Leishmaniose visceral (calazar). Em: **Doenças infecciosas e parasitárias**. 8th ed ed. Rio de Janeiro: Veronesi R, 1991. p. 706–717.
- [12] VIOL, M. A. et al. Identification of Leishmania spp. promastigotes in the intestines, ovaries, and salivary glands of Rhipicephalus sanguineus actively infesting dogs. **Parasitology Research**, v. 115, n. 9, p. 3479–3484, set. 2016.

- [13] FERREIRA, M. G. P. A. et al. Possível papel das pulgas de cachorro no ciclo de *Leishmania* spp. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 150–154, 28 out. 2009.
- [14] NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 67, 1 abr. 2012.
- [15] SILVA, F. L. et al. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 9 mar. 2009.
- [16] BOGGIATTO, P. M. et al. Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 12 abr. 2011.
- [17] DEY, A.; SINGH, S. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 165–170, jul. 2006.
- [18] FERREIRA-SILVA, M. M. et al. Socio-epidemiological characterisation of blood donors with asymptomatic *Leishmania infantum* infection from three Brazilian endemic regions and analysis of the transfusional transmission risk of visceral leishmaniasis. **Transfusion Medicine (Oxford, England)**, v. 28, n. 6, p. 433–439, dez. 2018.
- [19] ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 29 ago. 2014.
- [20] BERENGUER, L. K. A. R. et al. *Leishmania infantum* Infection in a Domestic Cat: A Real Threat or an Occasional Finding? **Acta Parasitologica**, v. 66, n. 2, p. 673–676, jun. 2021.
- [21] ALVAR, J. et al. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 57, p. 1–88, 2004.
- [22] MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 1 set. 2002.
- [23] COSTA, D. N. C. C. et al. Leishmaniose visceral em humanos e relação com medidas de controle vetorial e canino. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, p. 92, 23 nov. 2018.
- [24] TEIXEIRA-NETO, R. G. et al. Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 485, 20 out. 2014.
- [25] SILVA, F. M. DE F. et al. Parasite load in intact and ulcerative skin of dogs with leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, p. 127–130, 18 mar. 2016.

- [26] BANETH, G.; AROCH, I. Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 14–15, 1 jan. 2008.
- [27] RIBEIRO, R. R. et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 3296893, 29 mar. 2018.
- [28] RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. Leishmania–Host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–297, 1 jul. 2000.
- [29] PAPADOGIANNAKIS, E. I.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 163, n. 3–4, p. 94–102, fev. 2015.
- [30] RODRIGUES, A. V. et al. Zoonotic Visceral Leishmaniasis: New Insights on Innate Immune Response by Blood Macrophages and Liver Kupffer Cells to *Leishmania infantum* Parasites. **Biology**, v. 11, n. 1, p. 100, 9 jan. 2022.
- [31] THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes Infiltrate the Skin and Draining Lymph Nodes in Response to the Protozoan *Leishmania infantum* chagasi. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, jan. 2011.
- [32] BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134, jan. 1998.
- [33] KOUTINAS, A.; KOUTINAS, C. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum*/chagasi. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, mar. 2014.
- [34] SANTANA, C. C. et al. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: A study on naturally infected dogs. **Parasite Immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–524, out. 2008.
- [35] BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. General Suppression of Macrophage Gene Expression During *Leishmania donovani* Infection1. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 5, p. 3416–3422, 1 mar. 2001.
- [36] SOLANO-GALLEGO, L. et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1, p. 1–18, 28 out. 2009.
- [37] COSTA, F. A. L. et al. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 6, p. 677–684, 1 nov. 2003.
- [38] ZATELLI, A. et al. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. 1 maio 2003.
- [39] SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 4, p. 86, 20 maio 2011.

- [40] METTLER, M. et al. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic Leishmania Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519, nov. 2005.
- [41] MAIA, C. et al. Diagnosis of canine leishmaniasis: Conventional and molecular techniques using different tissues. **The Veterinary Journal**, v. 179, n. 1, p. 142–144, 1 jan. 2009.
- [42] MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261–272, abr. 2019.
- [43] ROATT, B. M. et al. A Vaccine Therapy for Canine Visceral Leishmaniasis Promoted Significant Improvement of Clinical and Immune Status with Reduction in Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 217, 7 mar. 2017.
- [44] FILHO, A. A. P. et al. Evasão do sistema do complemento pela *Leishmania* através da captação do fator H, uma proteína reguladora do complemento. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106152, 1 dez. 2021.
- [45] MENDES-SOUSA, A. F. et al. The Sand Fly Salivary Protein Lufaxin Inhibits the Early Steps of the Alternative Pathway of Complement by Direct Binding to the Proconvertase C3b-B. **Frontiers in Immunology**, v. 8, 31 ago. 2017.
- [46] ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, maio 2015.
- [47] LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, jul. 2013.
- [48] BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.
- [49] HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGU, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95–115, jan. 2017.
- [50] PINELLI, E. et al. Compensation for Decreased Expression of B7 Molecules on *Leishmania infantum*-Infected Canine Macrophages Results in Restoration of Parasite-Specific T-Cell Proliferation and Gamma Interferon Production. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 237–243, jan. 1999.
- [51] KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 239–253, 2004.
- [52] TOEPP, A. J.; PETERSEN, C. A. The balancing act: Immunology of leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 130, p. 19–25, jun. 2020.

- [53] VIDA, B. et al. Immunologic Progression of Canine Leishmaniosis Following Vertical Transmission in United States Dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 169, p. 34–38, jan. 2016.
- [54] PANARO, M. A. et al. Evaluation of Nitric Oxide Production by *Leishmania Infantum*-infected Dog Macrophages. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 147–158, jan. 1998.
- [55] TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 139–146, 1 jun. 2005.
- [56] GANTT, K. R. et al. Activation of TGF- β by *Leishmania chagasi*: Importance for Parasite Survival in Macrophages 1. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 5, p. 2613–2620, 1 mar. 2003.
- [57] SOLANO-GALLEGO, L. et al. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 317, 3 jun. 2016.
- [58] MILES, S. A. et al. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, n. 5, p. 747–754, 7 mar. 2005.
- [59] ESCH, K. J. et al. Activation of Autophagy and Nucleotide-Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing-Like Receptor Family, Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome during *Leishmania infantum*-Associated Glomerulonephritis. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 8, p. 2105–2117, ago. 2015.
- [60] MESQUITA, I. et al. The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, Special issue: Infection, Inflammation and Immunometabolomes. v. 112, p. 16–20, 1 dez. 2018.
- [61] BOGGIATTO, P. M. et al. Immunologic Indicators of Clinical Progression during Canine *Leishmania infantum* Infection. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, v. 17, n. 2, p. 267–273, fev. 2010.
- [62] CORRÊA, A. P. F. L. et al. Evaluation of transformation growth factor β 1, interleukin-10, and interferon- γ in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3, p. 267–274, 28 fev. 2007.
- [63] DE LIMA, V. M. F.; PEIRO, J. R.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R. IL-6 and TNF- α production during active canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1, p. 189–193, 15 jan. 2007.
- [64] REBECH, G. T. et al. miR-148a regulation interferes in inflammatory cytokine and parasitic load in canine leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 1, p. e0011039, 31 jan. 2023.

- [65] DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, jan. 2016.
- [66] NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania–macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301–308, 2008.
- [67] OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653–664, dez. 2015.
- [68] ZAFRA, R. et al. High iNOS expression in macrophages in canine leishmaniasis is associated with low intracellular parasite burden. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3, p. 353–359, 15 jun. 2008.
- [69] BADIRZADEH, A. et al. Arginase activity in pathogenic and non-pathogenic species of Leishmania parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005774, 14 jul. 2017.
- [70] PESSEDA, G.; DA SILVA, J. S. Arginase and its mechanisms in Leishmania persistence. **Parasite Immunology**, v. 42, n. 7, p. e12722, 2020.
- [71] GARCIA, A. R. et al. Leishmania infantum arginase: biochemical characterization and inhibition by naturally occurring phenolic substances. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 34, n. 1, p. 1100–1109, 24 maio 2019.
- [72] CHIKU, V. M. et al. PD-1 function in apoptosis of T lymphocytes in canine visceral leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 221, n. 8, p. 879–888, 1 ago. 2016.
- [73] ESCH, K. J. et al. Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5542–5550, 1 dez. 2013.
- [74] REBECH, G. T. et al. PD-1 regulates leishmanicidal activity and IL-17 in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 219, p. 109970, 1 jan. 2020.
- [75] PÉREZ, A. R.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W. The Impact of Infectious Diseases upon Neuroendocrine Circuits. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 2, p. 96–105, 2009.
- [76] HAWKLEY, L. C.; CACIOPPO, J. T. Stress and the aging immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 18, n. 2, p. 114–119, 1 mar. 2004.
- [77] E SILVA, P. M. R. et al. Down-Regulation of Allergic Responses in Conditions of Experimental Diabetes: A Role for Glucocorticoids? **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 13–18, 2009.
- [78] SAVINO, W. et al. Hormonal control of T-cell development in health and disease. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 2, p. 77–89, fev. 2016.

- [79] HADDAD, J. J.; SAADÉ, N. E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, n. 1–2, p. 1–19, dez. 2002.
- [80] O’CONNOR, K. M. et al. Influence of innate immune activation on endocrine and metabolic pathways in infancy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 321, n. 1, p. E24–E46, jul. 2021.
- [81] MOUIHATE, A. et al. Early Life Activation of Toll-Like Receptor 4 Reprograms Neural Anti-Inflammatory Pathways. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 23, p. 7975–7983, 9 jun. 2010.
- [82] ZACHAROWSKI, K. et al. Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 16, p. 6392–6397, 18 abr. 2006.
- [83] CALOGERO, A. E. et al. Multiple feedback regulatory loops upon rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion. Potential clinical implications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 3, p. 767–774, set. 1988.
- [84] MIYAKE, S. Mind over cytokines: Crosstalk and regulation between the neuroendocrine and immune systems. **Clinical and Experimental Neuroimmunology**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2012.
- [85] YAN, T. et al. Single-cell transcriptomic analysis reveals rich pituitary-Immune interactions under systemic inflammation. **PLOS Biology**, v. 21, n. 12, p. e3002403, 18 dez. 2023.
- [86] SAPOLSKY, R. M.; ROMERO, L. M.; MUNCK, A. U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions*. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 1, p. 55–89, 1 fev. 2000.
- [87] BIDDIE, S. C.; CONWAY-CAMPBELL, B. L.; LIGHTMAN, S. L. Dynamic regulation of glucocorticoid signalling in health and disease. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 51, n. 3, p. 403–412, mar. 2012.
- [88] KNEZEVIC, E. et al. The Role of Cortisol in Chronic Stress, Neurodegenerative Diseases, and Psychological Disorders. **Cells**, v. 12, n. 23, p. 2726, 29 nov. 2023.
- [89] GLASER, R.; KIECOLT-GLASER, J. K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 3, p. 243–251, mar. 2005.
- [90] PADGETT, D. A.; GLASER, R. How stress influences the immune response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 8, p. 444–448, 1 ago. 2003.
- [91] WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine Regulation of Immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 125–163, abr. 2002.

- [92] CAIN, D. W.; CIDLOWSKI, J. A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature reviews. Immunology**, v. 17, n. 4, p. 233–247, abr. 2017.
- [93] VAN LAETHEM, F. et al. Glucocorticoids Attenuate T Cell Receptor Signaling. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 7, p. 803–814, 2 abr. 2001.
- [94] ADORISIO, S. et al. Glucocorticoid and PD-1 Cross-Talk: Does the Immune System Become Confused? **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2333, 6 set. 2021.
- [95] BIRON, C. A. Glucocorticoids and NK cell PD-1. **Nature Immunology**, v. 19, n. 9, p. 908–910, set. 2018.
- [96] MAEDA, N. et al. Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 52, p. 19896–19906, 27 dez. 2019.
- [97] KAR, S.; UKIL, A.; DAS, P. K. Signaling events leading to the curative effect of cystatin on experimental visceral leishmaniasis: Involvement of ERK1/2, NF- κ B and JAK/STAT pathways. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 3, p. 741–751, 2009.
- [98] DONG, J. et al. Cortisol modulates inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 cells via the NF- κ B and MAPK pathways. **BMC Veterinary Research**, v. 14, p. 30, 30 jan. 2018.
- [99] HÄMÄLÄINEN, M. et al. Inhibition of iNOS expression and NO production by anti-inflammatory steroids. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 331–339, abr. 2008.
- [100] OUANES, S. et al. Cerebrospinal Fluid Cortisol and Dehydroepiandrosterone Sulfate, Alzheimer's Disease Pathology, and Cognitive Decline. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 14, p. 892754, 2022.
- [101] SHINDEL, C.; HOLLAND, J. M.; GALLAGHER-THOMPSON, D. The Link between Activities of Daily Living and Cortisol in Late-Life Depression. **Clinical Gerontologist**, v. 43, n. 4, p. 430–440, 2020.
- [102] **(PDF) Effect of falciparum malaria on some plasma proteins in males: With special reference to the levels of testosterone and cortisol.** Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228806836_Effect_of_falciparum_malaria_on_some_plasma_proteins_in_males_With_special_reference_to_the_levels_of_testosterone_and_cortisol>. Acesso em: 5 dez. 2024.
- [103] SAVINO, W. Endocrine Immunology of Chagas Disease. Em: SAVINO, W.; GUARALDI, F. (Eds.). **Frontiers of Hormone Research**. [s.l.] S. Karger AG, 2017. v. 48p. 160–175.
- [104] BONGIOVANNI, B. et al. Effect of cortisol and/or DHEA on THP1-derived macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 562–569, set. 2015.

- [105] REY, A. D. et al. Endocrine and cytokine responses in humans with pulmonary tuberculosis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, n. 2, p. 171–179, fev. 2007.
- [106] JARA, L. J. et al. The immune-neuroendocrine system in COVID-19, advanced age and rheumatic diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 20, n. 11, p. 102946, nov. 2021.
- [107] SILVERMAN, M. N. et al. Immune Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Viral Infection. **Viral immunology**, v. 18, n. 1, p. 41–78, 2005.
- [108] BARROS-GONÇALVES, T. DE D. et al. Increased levels of cortisol are associated with the severity of experimental visceral leishmaniasis in a Leishmania (L.) infantum-hamster model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 11, p. e0009987, 23 nov. 2021.
- [109] LIMA VERDE, F. A. et al. Hormonal disturbances in visceral leishmaniasis (kala-azar). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 668–673, maio 2011.
- [110] BACCAN, G. C. et al. Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 548–554, mar. 2011.

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA RESVISTA PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

About the Journal

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Style and Format

When you first submit to the journal, providing you include all the necessary information needed for editorial assessment and review, we will not ask you to make any formatting changes. During resubmission, we may ask you to meet formatting requirements.

File format: Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.

LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.

Length: Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.

We encourage you to present and discuss your findings concisely.

Font: Use a standard font size and any standard font, except for the font named “Symbol”. To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.

Headings: Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.

Layout and spacing: Manuscript text should be double-spaced.

Do not format text in multiple columns.

Page and line numbers: Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).

Tables: Insert tables immediately after the first paragraph in which they are cited.

Supporting Information : Upload Supporting Information (SI) files separately.

Footnotes:Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.

Language : Manuscripts must be submitted in English.

You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.

Abbreviations : Define abbreviations upon first appearance in the text.

Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.Keep abbreviations to a minimum.

Reference style: PLOS uses “Vancouver” style, as outlined in the ICMJE sample references.

See reference formatting examples and additional instructions below.

Equations : We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable.

Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., “ $a^2 + b^2 = c^2$ ”), Greek or other symbols (e.g., β , Δ , or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., $\times$, $\geq$, or $\pm$) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.

Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid “hybrid” inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.

Nomenclature:

Use correct and established nomenclature wherever possible.

Units of measurement - Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.

Drugs Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).

Species names- Write in italics (e.g., *Homo sapiens*). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., *H. sapiens*).

Genes, mutations, genotypes, and alleles- Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HUGO for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).

Allergens- The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site.

Copyediting manuscripts

Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like “scientific editing service” or “manuscript editing service”.

Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- Title
- Authors and Affiliations
- Abstract
- Author Summary

- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments
- References
- Supporting information Captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Author names and affiliations

Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- First name (or initials, if used)
- Middle name (or initials, if used)

- Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled “current address.” At a minimum, the address must include the author’s current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

Corresponding author

The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included, these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles](#).

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS Neglected Tropical Diseases will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*?
- Why will your study inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

The cover letter will only be available to the editor and the journal staff.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

The Abstract should be succinct; it must not exceed 250–300 words. Authors should mention the techniques used without going into methodological detail and summarize the most important results with important numerical results given.

The Abstract is conceptually divided into the following three sections with these headings: Background, Methodology/Principal Findings, and Conclusions/Significance.

Do not include any citations. Avoid specialist abbreviations.

Author Summary

We ask that all authors of research articles include a 150-200 word non-technical summary of the work, immediately following the Abstract. Subject to editorial review and author revision, this short text is published with all research articles as a highlighted text box.

Distinct from the scientific abstract, the Author Summary should highlight where the work fits in a broader context of life science knowledge and why these findings are important to an audience that includes both scientists and non-scientists. Ideally aimed to a level of understanding of an undergraduate student, the significance of the work should be presented simply, objectively, and without exaggeration.

Authors should avoid the use of acronyms and complex scientific terms and write the author summary using the first-person voice. Authors may benefit from consulting with a science writer or press officer to ensure that they effectively communicate their findings to a general audience.

Introduction

The introduction should put the focus of the manuscript into a broader context. As you compose the Introduction, think of readers who are not experts in this field. Include a brief review of the key literature. If there are relevant controversies or disagreements in the field, they should be mentioned so that a non-expert reader can delve into these issues further. The Introduction should conclude with a brief statement of the overall aim of the experiments and a comment about whether that aim was achieved.

Methods

This section should provide enough detail for reproduction of the findings. Protocols for new methods should be included, but well-established protocols may simply be

referenced. Detailed methodology or supporting information relevant to the methodology can be published on our web site.

This section should also include a section with descriptions of any statistical methods employed. These should conform to the [criteria outlined by the Uniform Requirements](#), as follows:

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to judge its appropriateness for the study and to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as P values, which fail to convey important information about effect size and precision of estimates. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the statistical software package(s) and versions used. Distinguish prespecified from exploratory analyses, including subgroup analyses.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit **laboratory protocols** in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs). To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
[http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.\[PROTOCOL DOI\]](http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI])

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

PLOS ONE offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io articles. Read more [information on Lab Protocol articles](#).

Results

The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.

PLOS journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.

Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within [supporting information files](#) accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).

For more information on how best to provide data, read our [policy on data availability](#).

PLOS does not accept references to “data not shown.”

As outlined in the [Uniform Requirements](#), authors that present statistical data in the Results section should do the following:

Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as “random” (which implies a randomizing device), “normal,” “significant,” “correlations,” and “sample.”

Discussion

The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.

You may wish to discuss the following points also:

- How do the conclusions affect the existing knowledge in the field?
- How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?

Acknowledgments

Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.

Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- Published or accepted manuscripts
- Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., “unpublished work,” “data not shown”). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)
- Submitted research should not rely upon retracted research. You should avoid citing retracted articles unless you need to discuss retracted work to provide historical context for your submitted research. If it is necessary to discuss retracted work, state the article’s retracted status in your article’s text and reference list.

Ensure that your reference list includes full and current bibliography details for every cited work at the time of your article’s submission (and publication, if accepted). If cited work is corrected, retracted, or marked with an expression of concern before your article is published, and if you feel it is appropriate to cite the work even in light of the post-publication notice, include in your manuscript citations and full references for both

the affected article and the post-publication notice. Email the journal office if you have questions.

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., “We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data”). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the “Vancouver” style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpL9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i>. 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i>. 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute “Forthcoming” for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderlink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i>. 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. <i>Bargaining for life: A social history of tuberculosis</i> . 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.

Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. AIDS and the historian. Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. arXiv:1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1 Kording KP, Mensh B. Ten simple rules for structuring papers. BioRxiv [Preprint]. 2016 bioRxiv 088278 [posted 2016 Nov 28; revised 2016 Dec 14; revised 2016 Dec 15; cited 2017 Feb 9]: [12 p.]. Available from: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/088278v5 doi: 10.1101/088278
Published media (print or online newspapers and magazine articles)	Fountain H. For Already Vulnerable Penguins, Study Finds Climate Change Is Another Danger. The New York Times. 2014 Jan 29 [Cited 2014 March 17]. Available from: http://www.nytimes.com/2014/01/30/science/earth/climate-change-taking-toll-on-penguins-study-finds.html
New media (blogs, web sites, or other written works)	Allen L. Announcing PLOS Blogs. 2010 Sep 1 [cited 17 March 2014]. In: PLOS Blogs [Internet]. San Francisco: PLOS 2006 - . [about 2 screens]. Available from: http://blogs.plos.org/plos/2010/09/announcing-plos-blogs/ .
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cuminacad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.

Supporting information

Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.

Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an “S” and number. For example, “S1 Appendix” and “S2 Appendix,” “S1 Table” and “S2 Table,” and so forth.

Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.

Supporting information captions

List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.

The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.

Example caption

S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.

In-text citations

We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.

Figures and Tables

Figures

You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.

Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.

Figure captions

Insert figure captions in manuscript text, immediately following the paragraph where the figure is first cited (read order). Don't include captions as part of the figure files themselves or submit them in a separate document.

At a minimum, include the following in your figure captions:

- A figure label with Arabic numerals, and "Figure" abbreviated to "Fig" (e.g. Fig 1, Fig 2, Fig 3, etc). Match the label of your figure with the name of the file uploaded at submission (e.g. a figure citation of "Fig 1" must refer to a figure file named "Fig1.tif").
- A concise, descriptive title

The caption may also include a legend as needed.

Tables

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.

Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- Deposit data in the integrated repository of choice.
- Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories](#).

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

1 Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- [Ensembl](#)
- [Entrez Gene](#)
- [FlyBase](#)
- [InterPro](#)
- [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological

Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. We choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

Submission Criteria

- Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.
- It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- High resolution: between 300-600 dpi
- Single panel
- Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- Specific grant numbers
- Initials of authors who received each award
- URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- Study design
- Data collection and analysis
- Decision to publish
- Preparation of the manuscript

If they had no role in the research, include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."

If the study was unfunded, include this sentence as the Financial Disclosure statement: "The author(s) received no specific funding for this work."

Competing interests

The corresponding author is asked at submission to declare, on behalf of all authors, whether there are any financial, personal, or professional interests that could be construed to have influenced the work.

Any relevant competing interests of authors must be available to editors and reviewers during the review process and will be stated in published articles.

Related manuscripts

When submitting a manuscript, all authors are asked to indicate that they do not have a related or duplicate manuscript under consideration (or accepted) for publication elsewhere. If related work has been or will be submitted elsewhere or is in press elsewhere, then a copy must be uploaded with the article submitted to PLOS. Reviewers will be asked to comment on the overlap between related submissions.

Preprints

PLOS encourages authors to post preprints to accelerate the dissemination of research. Posting a manuscript on a preprint server does not impact consideration of the manuscript at any PLOS journal.

Authors posting preprints on [bioRxiv](#) or [medRxiv](#) can choose to concurrently submit their manuscripts to relevant PLOS journals through the direct transfer service.

Authors submitting manuscripts in the life and health sciences to *PLOS Neglected Tropical Diseases* may choose to have PLOS forward their submission to bioRxiv or medRxiv, depending on the scope of the paper, for consideration for posting as a preprint.

Reviewer and editor suggestions

We ask authors to suggest suitable editors and at least four potential reviewers when submitting their manuscript. Bear in mind any potential competing interests when making these suggestions. It is not appropriate to suggest recent collaborators or other researchers at your institution. See our [policy on competing interests](#) for more information.