

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS FELINOS (Fcwf-4) POR *Leishmania amazonensis***

FERNANDA DE PAULA PEPINO MOREIRA

2026



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS FELINOS (Fcwf-4) POR *Leishmania amazonensis***

FERNANDA DE PAULA PEPINO MOREIRA

Sob a Orientação da Professora
Lucia Helena Pinto da Silva

e Co-orientação da Professora
Debora Decote Ricardo de Lima

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2026.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M
835c

Moreira, Fernanda de Paula Pepino , 20/04/94-
CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE
MACRÓFAGOS FELINOS (Fcwf-4) POR *Leishmania amazonensis*
/ Fernanda de Paula Pepino Moreira. - Seropédica,
2026.
70 f.: il.

Orientadora: Lucia Helena Pinto-da-Silva.
Coorientador: Debora Decote-Ricardo.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias, 2026.

1. Leishmaniose felina. 2. Fcwf-4. 3.
Glucuronoxilomanana (GXM). 4. Macrófagos. 5. L.
amazonensis. I. Helena Pinto-da-Silva, Lucia, 1975-,
orient. II. Decote-Ricardo, Debora, -, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 850/2026 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.012770/2026-75

Seropédica-RJ, 19 de março de 2026.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FERNANDA DE PAULA PEPINO MOREIRA

CARACTERIZAÇÃO DA INFECÇÃO DA LINHAGEM DE MACRÓFAGOS FELINOS (FCWF-4) POR *Leishmania amazonensis*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Dissertação aprovada em 24 de fevereiro de 2026.

BANCA EXAMINADORA:

(Assinado digitalmente em 20/03/2026 10:42)

DANIELA COSENTINO GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DBQ (11.39.00.24)
Matrícula: ###455#0

(Assinado digitalmente em 23/03/2026 08:09)

LUCIA HELENA PINTO DA SILVA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DMIV (12.28.01.00.00.00.54)
Matrícula: ###458#0

(Assinado digitalmente em 19/03/2026 16:29)

GABRIELA MARIA SANTOS GOMES
ASSINANTE EXTERNO
Passaporte: ###146#5

Dedico este trabalho a José Pepino Júnior †

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e à Nossa Senhora Aparecida, por me concederem força, sabedoria e proteção ao longo de toda essa caminhada, iluminando meus passos nos momentos de dificuldade e incerteza.

À minha família, minha base e meu alicerce, expresso minha mais profunda gratidão. Em especial aos meus pais, Virgínia e José Geraldo, pelo amor incondicional, incentivo constante aos estudos e por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos. Aos meus irmãos, Vitor e Vanessa, pelo apoio e parceria. À minha avó, Maria Aparecida Pepino, pelo carinho, incentivo e presença tão importantes ao longo dessa trajetória.

Ao meu namorado, Thiago, agradeço pelo companheirismo, paciência, cumplicidade e pela força diária, fundamentais para que eu seguisse firme mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus amigos Willian, Guilherme, Rayane, Julia, Nicole e Livia, que me acompanham desde a adolescência, agradeço pela amizade sincera, pelo apoio constante e por serem meu colo nos momentos difíceis, tornando essa caminhada mais leve.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Virologia, agradeço pelo convívio, aprendizado e colaboração. Em especial ao meu grupo de estudos, Nicolle, Luciana, Renata Q., Letícia, Ana e Yuri, pela parceria, dedicação e auxílio nos experimentos, que foram essenciais para a realização deste trabalho. Agradeço também às minhas amigas Renata S., Mayra e Juliana, por toda a compreensão, amizade, risadas e por tornarem meus dias no laboratório mais leves e agradáveis.

A todos os professores do laboratório, deixo meu sincero agradecimento pelo conhecimento compartilhado e pela contribuição à minha formação acadêmica. Em especial, às professoras Luciae Débora D., pela confiança em meu trabalho, por acreditarem em mim, pela orientação, ajuda e paciência ao longo desse processo.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta dissertação e para o meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

MOREIRA, Fernanda de Paula Pepino. **Caracterização da infecção da linhagem de macrófagos felinos (fcwf-4) por *Leishmania amazonensis***. 2026. 67p. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2026.

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, com uma vasta distribuição mundial e de alta relevância em saúde pública, ainda assim é negligenciada, acometendo principalmente países ainda em desenvolvimento. O Brasil mantém a maior parte dos registros de casos por leishmaniose da América Latina, apresentando formas tegumentares e viscerais da doença. Sua transmissão ocorre através de flebotomíneos infectados e possuem múltiplos reservatórios, em especial os canídeos. Contudo, a leishmaniose felina (FeL) tem sido cada vez mais descrita na literatura, o que sugere um potencial papel dos gatos como reservatórios secundários, principalmente, em áreas endêmicas. Desta forma, este trabalho tem o objetivo de estabelecer um modelo de infecção felina *in vitro* para elucidar os aspectos biológicos e imunológicos da leishmaniose felina, buscando caracterizar a linhagem de macrófagos felinos Fcwf-4 durante a infecção por *Leishmania amazonensis* e promover um modelo *in vitro* para futuros estudos. Foi observado que essa célula é capaz de promover interação com o parasita e que estes permanecem viáveis por pelo menos 48 horas. A fim de simular uma coinfeção, foi utilizado o polissacarídeo capsular glucuronoxilomanana (GXM) de *Cryptococcus neoformans*, que pode imunomodular negativamente a resposta celular, nossos dados mostraram que na presença deste, há alteração na produção de óxido nítrico (NO) e radicais de oxigênio (ROS), e na expressão de citocinas, o que favorece permanência intracelular do parasita.

Palavras-chave: Leishmaniose felina, Fcwf-4, *L. amazonensis*, Glucuronoxilomanana (GXM), macrófagos.

ABSTRACT

MOREIRA, Fernanda de Paula Pepino. **Characterization of infection of the feline macrophage cell line (FCWF-4) by *Leishmania amazonensis***. 2026. 67p. Dissertation (Master's degree in the Graduate Program in Veterinary Sciences) – Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2026.

Leishmaniasis are a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*, with a wide worldwide distribution and high relevance to public health; nevertheless, they remain neglected and mainly affect developing countries. Brazil accounts for most of the reported cases of leishmaniasis in Latin America, presenting both cutaneous and visceral forms of the disease. Transmission occurs through infected sandflies and involves multiple reservoirs, especially canids. However, feline leishmaniasis (FeL) has been increasingly reported in the literature, suggesting a potential role of cats as secondary reservoirs, particularly in endemic areas. Therefore, this study aimed to establish an in vitro feline infection model to elucidate the biological and immunological aspects of feline leishmaniasis, seeking to characterize the feline macrophage cell line Fcwf-4 during infection with *Leishmania amazonensis* and to provide an in vitro model for future studies. It was observed that this cell line is capable of interacting with the parasite and that the parasites remain viable for at least 48 hours. In order to simulate a coinfection, the capsular polysaccharide glucuronoxylomannan (GXM) from *Cryptococcus neoformans*, which can negatively immunomodulate the cellular response, was used. Our data showed that in its presence there are changes in nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production, as well as in cytokine expression, which favors the intracellular persistence of the parasite.

Keywords: Feline leishmaniasis, FCWF-4, *L. amazonensis*, glucuronoxylomannan (GXM), macrophages.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quadro de primers utilizados para análise de expressão gênica através de qPCR 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Apresentações clínicas de leishmaniose em humanos. (A) LV - hepatomegalia e esplenomegalia em paciente; (B) LV em criança de 4 anos de idade apresentando distensão abdominal decorrente de hepatoesplenomegalia, emagrecimento e palidez cutânea; (C) LC com úlcera na base do nariz; (D) LC apresentando uma lesão clássica da doença; (E) Leishmaniose mucocutânea com lesão ulcerada na face posterior da língua; (F) Leishmaniose mucocutânea com inchaço e ulceração do lábio superior e palato duro. 4

Figura 2. Tipos morfológicos principais encontrados no ciclo de vida da *Leishmania*. (A) Forma Promastigota e (B) Forma Amastigota. 6

Figura 3. Ciclo de infecção de *Leishmania* spp. 8

Figura 4. Distribuição mundial da infecção por *Leishmania* em gatos (*Felis* spp.) 12

Figura 5. Gatos com *Leishmania* spp. (A) úlceras (seta i), (B) opacidade da córnea em ambos os olhos, (C) descamação e úlceras na face (seta i), (D) no lábio superior (setas i), (E) úlceras na cavidade oral, sugerindo complexo gengivite-estomatite (setas i), (F) edema e hiperemia bilaterais da conjuntiva. 13

Figura 6. Diagrama da polarização de macrófagos. A polarização dos macrófagos ocorre predominantemente em dois fenótipos principais, M1 e M2, os quais se diferenciam conforme os estímulos celulares presentes no microambiente. O fenótipo M2 pode ainda ser subclassificado em quatro subtipos distintos: M2a, M2b, M2c, M2d. Esses diferentes fenótipos de macrófagos expressam marcadores específicos em sua superfície, permitindo sua identificação. Além disso, os macrófagos M1 e M2 produzem perfis distintos de citocinas ao longo do curso das doenças, desencadeando efeitos imunológicos opostos. 18

Figura 7. - Imagem óptica da linhagem celular Fcwf-4 em baixa densidade. 20

Figura 8. Diferentes micrografias e composições mostram a cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. (A) Suspensão das células em tinta da Índia; (B) Microscopia eletrônica de varredura; (C) Imunofluorescência usando mAbs específicos para a cápsula (fluorescência

verde e vermelha), mostrando também a localização na parede celular (fluorescência azul). (D) Composição de imagem 3D de uma célula de *C. neoformans* marcada com dois mAbs diferentes para a cápsula. Em azul, a parede celular. 22

Figura 9. Microscopia Óptica de Macrófagos Felinos Fcwf-4 Infectados por *L. amazonensis*: A, B e C= Macrófagos felinos infectados por *L. amazonensis* em 2, 24 e 48 horas, respectivamente; D, E e F = Macrófagos felinos tratados com GXM e infectados por *L. amazonensis* em 2, 24 e 48 horas, respectivamente. As setas indicam os parasitos. Coloração das células foi feita pelo método Giemsa, visualização em microscópio óptico 1000x 27

Figura 10. Infecção de Macrófagos Felinos Fcwf-4 com *L. amazonensis*. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com o polissacarídeo GXM [100 µg/ml] e incubados por 24 horas. Após o tratamento, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10p:1mo a 37°C/5% CO₂ por 2 horas. Posteriormente, as culturas foram lavadas e mantidas por diferentes tempos (2, 24 e 48 horas). Ao final de cada período, as lamínulas foram coradas por Giemsa, e o índice de infecção foi determinado por contagem de, no mínimo, 200 macrófagos por lamínula. (A) Número de parasitos por célula infectada; (B) Porcentagem de células infectadas; e (C) o índice de infecção. Dados = Média + SEM de três experimentos independentes em triplicata. *p < 0,05. 28

Figura 11. Viabilidade dos Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] e incubadas por 24 horas. Posteriormente, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10p:1mo) por 2 horas a 37 °C/ 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram lavadas e incubadas por (A) 24 e (B) 48 h a 37 °C/ 5% de CO₂. Ao final dos tempos experimentais, a porcentagem de viabilidade celular foi determinada por comparação com as células controle não tratadas e/ou infectadas CT = Controle, L = *L. amazonensis*, GXM = glucuronoxilomanano Dados = Média+SEM de três experimentos em triplicata. 29

Figura 12. Análise da Carga Parasitária em Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] por 24 horas a 37 °C/ 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10 p:1 mo) e incubadas por 2 horas a 37 °C/ 5% CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e mantidas nas mesmas condições acima. Em seguida, o meio foi substituído por meio Schneider, e os macrófagos felinos incubados em estufa BOD a 27°C. A

quantificação dos parasitos liberados foi realizada em câmara de Neubauer nos dias 3, 5 e 7 de incubação. Gráfico representativo de um experimento em triplicata.

30

Figura 13. Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com GXM [100 µg/ml], infectados ou não com *L.amazonensis* (10p:1mo), estimulados ou não com LPS [400ng/mL], por 24h. A concentração de nitrito foi determinada utilizando o sobrenadante por reação colorimétrica com reagente de Griess. Gráfico representativo de um experimento em triplicata. $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$; $p^{****} < 0,0001$.

31

Figura 14. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] por 24 horas a 37 °C/5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com *L. amazonensis* (10 p :1 Mo). Após 2 horas de infecção, foi adicionado ou não LPS [400ng/mL]. As culturas foram mantidas por mais 24 horas a 37 °C/5% de CO₂. Ao final da incubação, as células foram incubadas com a sonda fluorescente por 60 minutos no escuro a 37 °C. Posteriormente, a intensidade média de fluorescência foi determinada em fluorímetro, utilizando excitação a 493 nm e emissão a 522 nm. Dados = Media + SEM de três experimentos em triplicata. $p^{***} < 0,001$; $p^{****} < 0,0001$.

32

Figura 15. Perfil de Citocinas dos Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM, infectados ou não com *L. amazonensis* ou estimuladas com LPS [400ng/mL]. Após 24 horas, as células foram lisadas e submetidas à extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação por PCR em tempo real da expressão de citocinas e receptores de reconhecimento padrão. Dados = um experimento em sextuplicata $****p < 0,0001$; $***p < 0,001$; $**p < 0,01$; $*p < 0,05$.

34

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APCs – Células Apresentadoras de Antígeno

Arg1 – Arginase-1

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

CanL – Leishmaniose Canina

CCL – Ligante de Quimiocina do Motivo (CC - Chemokine Ligand)

CD – Cluster de Diferenciação

DAT – Teste De Aglutinação Direta

DC – Células Dendríticas

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Fc – Receptores Fc

FCoV – Coronavírus Felino

Fcwf-4 – *Felis catus* whole fetus 4

FeL – Leishmaniose Felina

FeLV – Vírus da Leucemia Viral Felina

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina

GalXM – Glucuronoxilomanogalactana

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GXM – Glucuronoxilomanana

IFAT – Teste de Imunofluorescência Indireta (Immunofluorescent Antibody Test)

IFN-γ – Interferon-gama

Ig – Imunoglobulinas

IGF-1 – fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL – Interleucinas

L – *Leishmania*

LC – Leishmaniose Cutânea

LV – Leishmaniose Visceral

LPS – Lipopolissacarídeos

MHC II – Complexo de Histocompatibilidade II

MO – Macrófagos

MP – Manoproteínas

MR – Receptor de Manose

NO – Óxido Nítrico

PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS – Tampão Fosfato-Salino

PCR – Reação em cadeia polimerase

PMS - *Phenazine Methosulfate*

qPCR – Reação em cadeia polimerase em tempo real

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RRP – Receptores de Reconhecimento de Padrões

SFB – Soro Fetal Bovino

TAMs – Macrófagos Associados ao Tumor

TGF- β – Fator de Crescimento Transformador Beta

Th – Subpopulação de linfócito T auxiliar

TLR – Receptores semelhantes a Toll

TNF- α – Fator alfa de necrose tumoral

XTT – 2,3-Bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl] -2H-tetrazolium-5-carboxinilide inner salt.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1Leishmaniose	2
2.2O parasita	5
2.3Ciclo	7
2.4Leishmaniose Felina	8
2.5Macrófagos	15
2.6 Fcwf-4	18
2.7 <i>Cryptococcus neoformans</i> e Glucuronoxilomanana (GXM)	20
3.MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Macrófagos	22
3.2 Parasitos	22
3.3 Polissacarídeo Capsular de <i>Cryptococcus</i>	23
3.5 Cinética de Infecção dos Macrófagos Felinos e Determinação do Índice de Infecção	23
3.6 Carga Parasitária/Killing	24
3.7 Detecção de Óxido Nítrico (NO)	24
3.8 Detecção de Radicais de Oxigênio (ROS)	24
3.9 Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR)	25
3.10 Análise Estatística	26
4.RESULTADOS	26
4.1 Cinética e Determinação do Índice de Infecção	26
4.2Viabilidade/Citotoxicidade Celular	28
4.3 Análise de Carga Parasitária/Killing	29
4.4 Produção de Óxido Nítrico (NO)	30
4.5 Produção de Radicais de Oxigênio (ROS)	31
4.6 Expressão Gênica	32
5.DISSCUSSÃO	34
6.CONCLUSÃO	40
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de grande importância para saúde pública. Causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, a progressão da infecção depende da interação célula-hospedeiro, sendo a principal célula infectada os macrófagos. A patogênese da doença é amplamente investigada em humanos e cães. Em felinos o número de casos relatados vem aumentando, principalmente, em regiões endêmicas. Ainda assim, os conhecimentos sobre a infecção em felinos são limitados. Desta forma, entender a biologia dos macrófagos felinos e suas características é fundamental para esclarecer os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta ao parasita e os fatores que podem contribuir para a manutenção da infecção nesses animais.

A falta de pesquisas sobre a interação entre *Leishmania* spp. e macrófagos felinos possivelmente decorre pela dificuldade na obtenção de células primárias (monócitos isolados do sangue periférico). Desta forma uma alternativa para promover essa interação é o uso de uma linhagem celular que apresente características de macrófagos, como a Fcwf-4, sendo assim uma alternativa relevante e reprodutível para o estudo da leishmaniose felina *in vitro*. Partindo desse ponto, esse modelo experimental possibilita a investigação dos eventos iniciais da infecção, a viabilidade celular, a capacidade fagocítica e a produção de mediadores microbicidas, como óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), que são um dos principais mecanismos utilizados pelos macrófagos para combater a infecção por *Leishmania*. Essas moléculas participam diretamente da atividade microbicida, atuando na eliminação do parasita após sua internalização. Assim, contribuem para a compreensão dos mecanismos celulares envolvidos no controle ou na progressão da infecção por *Leishmania* em felinos.

A proposta central deste estudo é promover a caracterização da infecção da linhagem de macrófagos felinos Fcwf-4 por *Leishmania amazonensis* partindo da hipótese que assim como outros macrófagos de linhagem (caninos, murinos), os macrófagos felinos também são suscetíveis à infecção por *Leishmania*, permitindo a internalização e a sobrevivência do parasita, podendo modular funções celulares essenciais, influenciando na resposta a da infecção.

A cápsula fúngica glucuronoxilomanana (GXM) de *Cryptococcus neoformans* é descrita por causar efeitos imunomoduladores negativos, contribuindo para inibição da resposta imune. Não existem relatos da interação desta cápsula com Fcwf-4, desta forma, utilizamos a

GXM como forma de explorar o efeito junto ao macrófago felino e simular uma coinfeção junto a *L. amazonensis*.

O objetivo geral deste trabalho é caracterizar e avaliar os aspectos funcionais da linhagem de macrófagos felinos Fcwf-4 durante a infecção por *Leishmania*, com ênfase em *L. amazonensis*, bem como estabelecer um modelo experimental in vitro aplicável a estudos futuros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae (Fiocruz, 2026). Elas representam um desafio, pois são consideradas umas das doenças negligenciadas, sendo um importante problema de saúde pública em 4 regiões ecoepidemiológicas: Américas, África Oriental, Norte da África e Oeste e Sudeste Asiático (OPAS, 2026). Choi et al. (2021), estimam que o número de novos casos da doença e número de mortes aproxima-se de 1 milhão e mais de 20 mil casos por ano, respectivamente. A endemia das leishmanioses ocorre em mais de 90 países de diferentes continentes, como Europa, Ásia e África (Velho Mundo) e América (Novo Mundo), afetando principalmente as populações de baixa renda (Choi et al., 2021; Sasidharan & Saudagar, 2021). O Brasil é responsável por mais de 90% dos casos notificados na América Latina (Teles et al., 2023) e apresentou 56.448 casos no período de 2021-2025 de leishmaniose tegumentar, segundo o Boletim Epidemiológico publicado pelo Ministério da Saúde (2025). Em 2023, o Brasil registrou aproximadamente 13 mil casos de leishmaniose tegumentar, sendo os estados da Região Norte, como Pará e Amazonas os mais afetados. A leishmaniose visceral, apresentou uma média de 2 mil casos, especialmente no Norte e Nordeste (Ministério da Saúde, 2024)

Segundo a WHO, 2023, a leishmaniose é causada por mais de 20 espécies de *Leishmania*. Mais de 90 espécies de flebotomíneos são conhecidas por transmitir o parasita. Existem três formas principais da doença (Figura 1):

- A **Leishmaniose Visceral (LV)**, também conhecida como calazar, possui evolução crônica, com acometimento sistêmico e, se não tratada, segundo os órgãos de saúde pode levar a óbito em 90% dos casos (WHO, 2023; Ministério da Saúde, 2026). Esta forma da doença caracteriza-se por crises irregulares de

febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia. A maioria dos casos ocorre no Brasil, na África Oriental e na Índia (WHO, 2023). Nos últimos cinco anos foram registrados em média cerca de 1.966 casos de leishmaniose visceral nas Américas, com letalidade média de 8,5%. A leishmaniose visceral foi registrada em 13 países, porém 94% dos casos ocorrem no Brasil (OPAS, 2026).

- A **Leishmaniose cutânea (LC)** é uma doença infecciosa, não contagiosa. É a forma mais comum e causa lesões cutâneas, principalmente úlceras, em partes expostas do corpo, cerca de 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central (WHO, 2023).
- A **leishmaniose mucocutânea** manifesta-se por danos nas mucosas nasal e oral, como ulceração no palato, edema gengival e nas narinas (David & Craft, 2009; Sasidharan & Saudagar, 2021). Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia (Estado Plurinacional), Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2023).

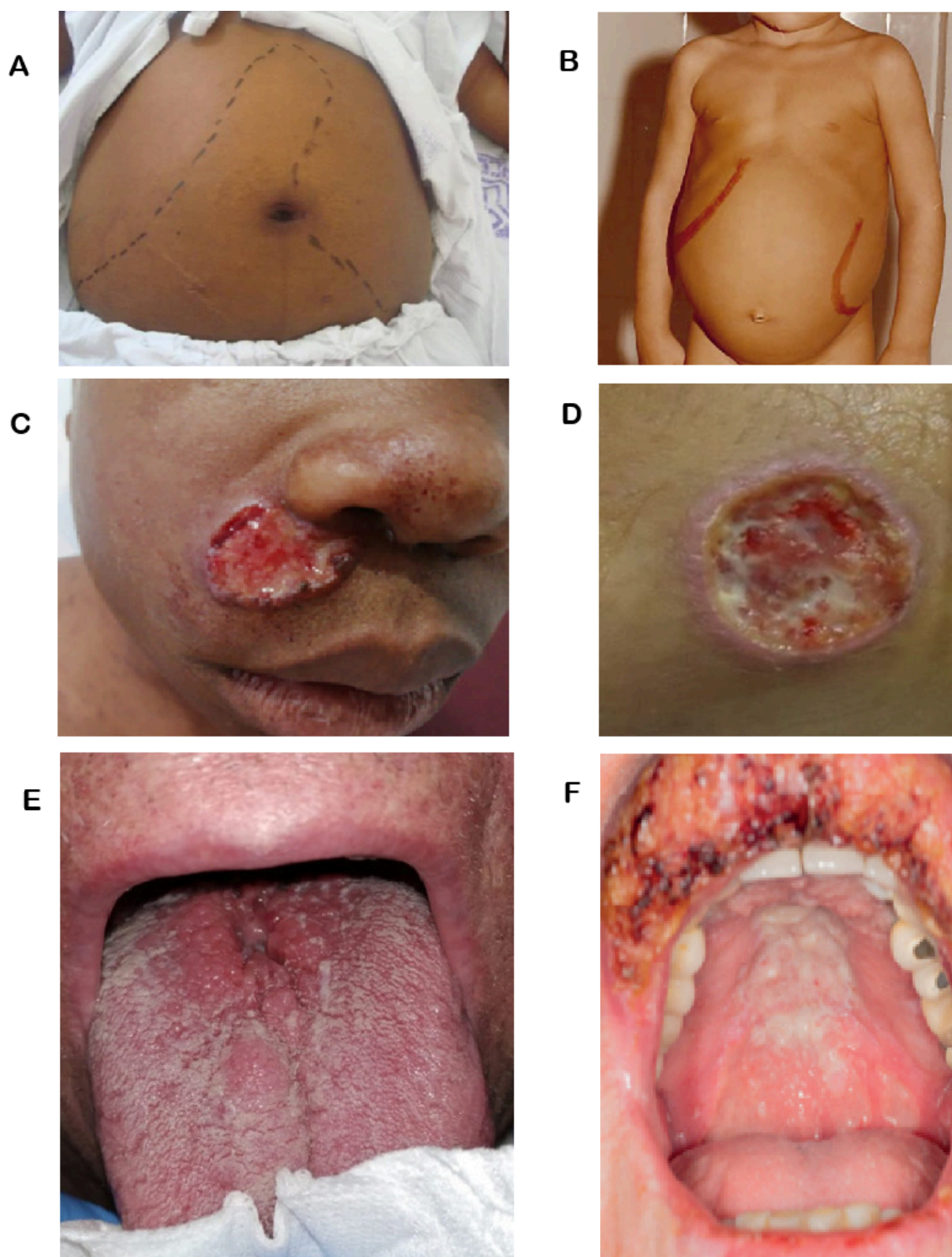


Figura 1. Apresentações clínicas de leishmaniose em humanos. (A) LV - hepatomegalia e esplenomegalia em paciente; (B) LV em criança de 4 anos de idade apresentando distensão abdominal decorrente de hepatoesplenomegalia, emagrecimento e palidez cutânea; (C) LC com úlcera na base do nariz; (D) LC apresentando uma lesão clássica da doença; (E) Leishmaniose mucocutânea com lesão ulcerada na face posterior da língua; (F) Leishmaniose mucocutânea com inchaço e ulceração do lábio superior e palato duro. (Fonte: Adaptado de Linse et al., 2022; Sánchez et al., 2021; Silveira et al., 2016; FIOCRUZ, 2026; Djabaté et al., 2024; Silva et al., 2014).

2.2 O parasita

As leishmanioses são causadas pelo parasita *Leishmania* spp. (Leishman, 1903) e transmitidas por um inseto-vetor, denominado flebotomíneo, que pertence à ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (Galati, 2003). Segundo, Kmetiuk et al., 2022. O gênero *Leishmania* provavelmente evoluiu na era Mesozóica antes de dividir o supercontinente Pangea, já a origem geográfica particular das diferentes espécies de *Leishmania* permanece controversa (Steverding, 2017).

O parasito *Leishmania* spp. possui duas formas evolutivas básicas (promastigota e amastigota) (Figura 2). No inseto vetor os promastigotas são as formas presentes e apresentam uma morfologia fusiforme que é sustentada por microtúbulos subpeliculares interligados, com exceção da bolsa flagelar que é a única região que não possui esse suporte e envolve a base do flagelo. Ao redor da bolsa flagelar concentra-se organelas das vias secretora e endocítica, sendo considerada o local principal de exocitose e endocitose no parasita (Landfear & Ignatushchnko, 2001). Nos promastigotas as organelas das vias secretoras são bem desenvolvidas (retículo endoplasmático e complexo de Golgi) e que a via endocítica inclui três estruturas principais, sendo elas: Endossomos tubulares que se localizam próximos à bolsa flagelar, corpos multivesiculares e um túbulo multivesicular (Waller & McConville, 2002). O citoesqueleto flagelar é formado por um axonema microtubular canônico de 9+2 microtubulares que é montado em um corpo basal. Uma estrutura filamentosa chamada haste paraflagelar está presente e corre paralela ao axonema, as promastigotas têm cerca de 10-20 µm de comprimento e 1,5-3,0 µm de largura. (Pereira, 2016). Após a internalização do parasita por macrófagos ocorre à diferenciação do promastigota para amastigota, uma forma mais esférica e adaptada ao ambiente intracelular envolvendo principalmente a redução e remodelação do flagelo, uma diminuição da relação superfície/volume, aumentando a resistência ao ambiente do vacúolo parasitóforo. Também ocorrem algumas alterações estruturais importantes como reorganização da bolsa flagelar (Sunter & Gull, 2017). Nos amastigotas, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são reduzidos e menos evidentes e o sistema lisossômico se expande. Na espécie *L. mexicana*, essa expansão é marcada por vacúolos lisossômicos denominados megassomos que são associados ao aumento da expressão de proteases de cisteína e à presença de glicoinositolfosfolopídeos no seu interior (Waller & McConville, 2002).

O flagelo dos promastigotas presentes no flebótomo promove a motilidade do parasita com a função de escapar da matriz peritrófica e migrar para o intestino anterior, também propicia a fixação das microvilosidades do intestino médio e à válvula estomodeal, além de exercer funções sensoriais auxiliando na sua orientação dentro do flebotomíneo (Sunter & Gull, 2017). O flagelo dos promastigotas podem chegar a 20 µm, as formas amastigotas possuem um flagelo curto, que se estende do corpo basal até a abertura da bolsa flagelar, medindo 2,5-6,8 µm de diâmetro e seu núcleo está localizado no polo posterior da célula (Pereira, 2016).

As formas amastigotas já foram encontradas em diversas espécies de mamíferos domésticos como: cães, gatos, vacas, cabras, coelhos e equinos e selvagens, como: raposa, gambás, rato selvagem, lebres, búfalos e cangurus vermelhos, o que demonstra uma grande diversidade na sua adaptação a biologia de vários animais (Mhadhbi & Sassi, 2020).

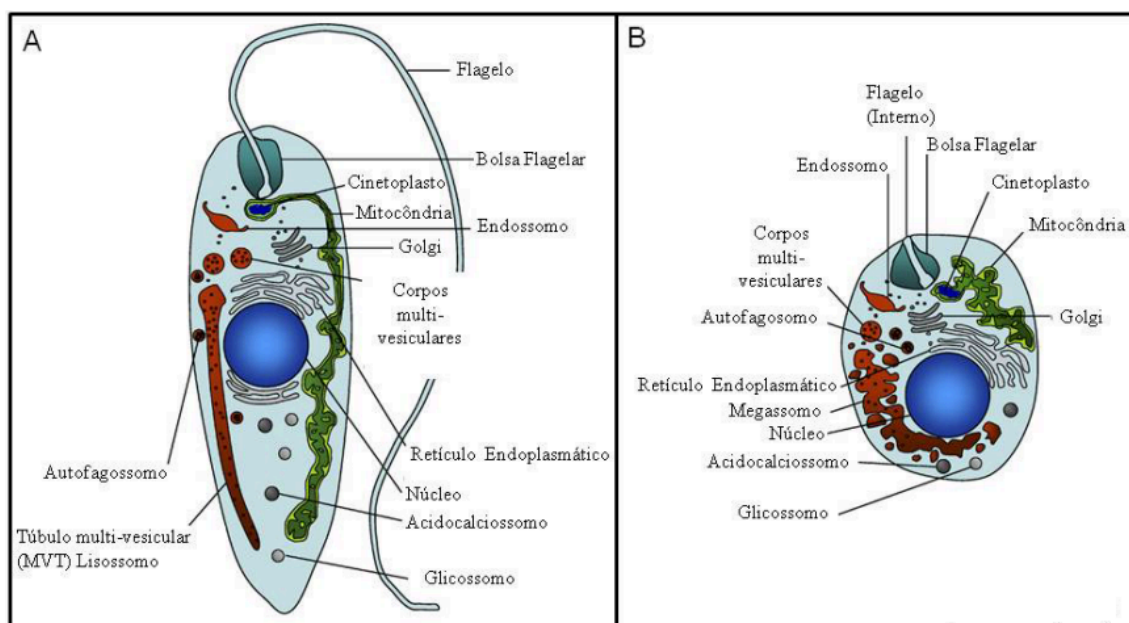


Figura 2. Tipos morfológicos principais encontrados no ciclo de vida da Leishmania. (A) Forma Promastigota e (B) Forma Amastigota.Fonte: Rocha, 2013.

Apesar das questões supracitadas, de forma geral, uma espécie é aceita como reservatório quando combina um xenodiagnóstico e a cultura de tecidos positivos mostra um potencial biodisponibilidade de parasitos ao vetor. Para a leishmaniose, algumas dessas espécies são: do gênero *Didelphis*, das ordens Pilosa, Cingulata, Rodentia, Chiroptera e Primata. Entretanto, até hoje os reservatórios mais significativos são os da ordem Carnivora:

os canídeos, e mais recentemente, os gatos domésticos (*Felis catus*) (Roque & Jansen, 2014; Santos & Oliveira, 2020).

2.3 Ciclo

Leishmania spp. são conhecidas por sua capacidade de infectar células fagocíticas do sistema imunológico, ou seja, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos (Ansari et al, 2025; Silva-Moreira et al., 2025). Seu ciclo (Figura 3) inicia-se quando um vetor pré-infectado (flebotomíneos fêmeas) regurgita, durante sua refeição sanguínea, formas infecciosas, porém, não proliferativas (promastigotas metacíclicas) na pele do hospedeiro mamífero (Assis et al., 2021), infectando neutrófilos que são atraídos para o local da picada. Os parasitos se transformam em amastigotas intracelulares antes que os neutrófilos sofram morte apoptótica, corpos apoptóticos de neutrófilos infectados mortos são capturados por macrófagos, que se tornam infectados (Silva-Moreira et al., 2025). Os amastigotas dentro dos macrófagos evitam as respostas imunes modulando as vias de sinalização do hospedeiro e inibindo a ativação celular. Eles se multiplicam por fissão binária dentro do vacúolo parasitóforo, causando a ruptura da célula hospedeira. Os amastigotas liberados infectam as células vizinhas, facilitando a disseminação sistêmica do parasita e contribuindo para as manifestações clínicas da leishmaniose (Ansari et al., 2025). A infecção do hospedeiro invertebrado se inicia quando a fêmea do flebotomíneo se infecta após ingerir células infectadas contendo amastigotas durante uma refeição de sangue em um hospedeiro vertebrado infectado. No trato digestivo do vetor, os amastigotas são liberados e se transformam em promastigotas flagelados, que se multiplicam por fissão binária. Seu ciclo de vida foi demonstrado que um é um ciclo semelhante ao sexual, com hibridização de parasitos de acasalamento fundidos. Também dentro do trato digestivo do flebotomíneo os promastigotas procíclicos não infectantes que passam por uma sequência de mudanças bioquímicas e morfológicas até se diferenciarem em promastigotas metacíclicos infecciosos, os quais são inoculados na derme de um hospedeiro mamífero em uma segunda refeição de sangue (Silva-Moreira et al., 2025).

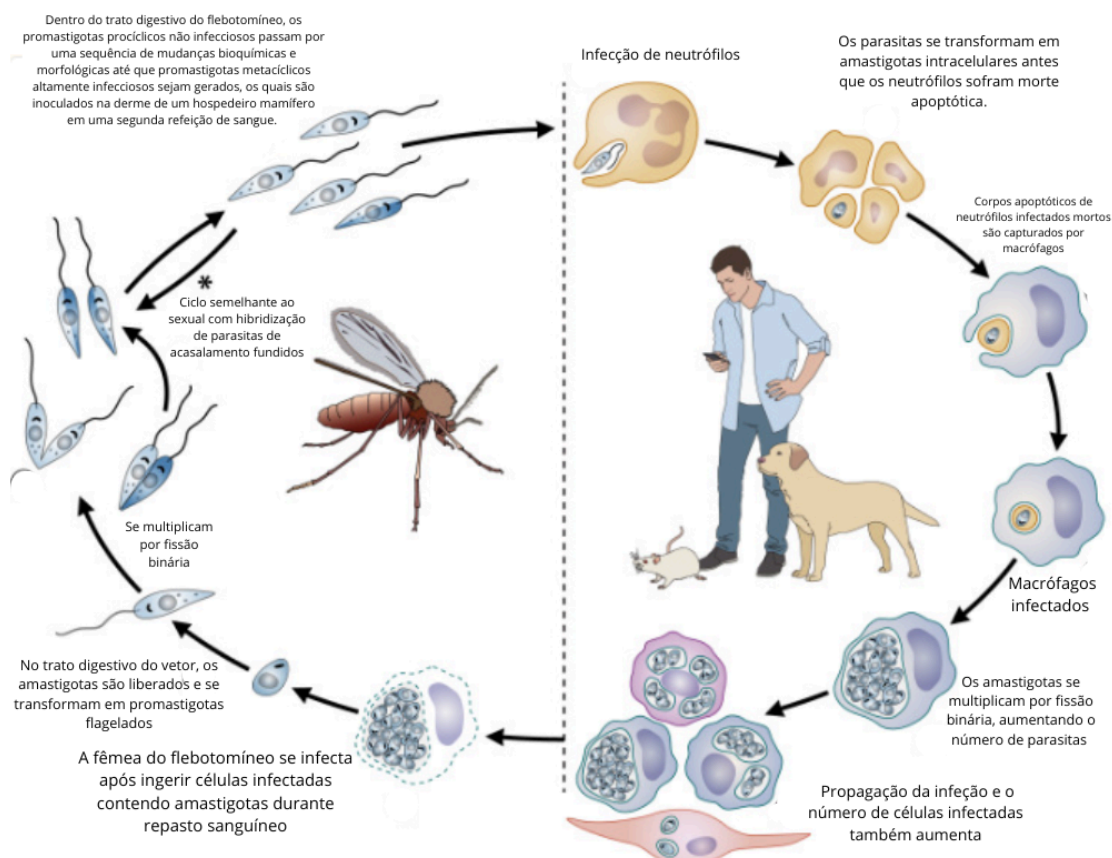


Figura 3. Ciclo de infecção de *Leishmania* spp.

Fonte: Adaptado de Silva-Moreira et al., 2025

2.4 Leishmaniose Felina

Os gatos têm sido uma escolha muito comum para tutores da atualidade, devido a um conjunto de fatores, entre eles praticidade e necessidade de menos espaço disponível ao animal, em relação aos cães. No passado, os gatos eram considerados como hospedeiros acidentais resistentes à leishmaniose, contudo, hoje o felino surge como uma peça relevante dentro do sistema ecológico em que os parasitos *Leishmania* se mantêm indefinidamente (Pereira & Maia, 2021).

A leishmaniose felina tem emergido mais comumente nos últimos 20 anos, em geral, nas regiões endêmicas (Mhadhbi & Sassi, 2020). A principal forma de transmissão atribuída aos felinos é a picada do flebotomíneo infectado. Os dados sobre os gatos domésticos infectados com *Leishmania* spp. são mais limitados que os de cães, além do fato que em geral suas infecções são subclínicas ou raras. No entanto, em regiões endêmicas, esses indivíduos podem atuar como um reservatório secundário, pois são capazes de infectar o flebotomíneo

(Mendonça et al., 2020). No Brasil, alguns estudos mostram que a prevalência varia de 6 a 30% de infecção em felinos em regiões endêmicas, e em algumas regiões, como Araçatuba, em São Paulo, chega a 49% (Pennisi & Persichetti, 2018; CRMVSP, 2021).

Ao longo dos últimos 40 anos, aproximadamente 80 estudos transversais sobre a prevalência da leishmaniose felina (FeL) em todo o mundo mostraram uma soroprevalência média mundial de 12%. Ao mesmo tempo, o número de artigos publicados sobre FeL aumentou em áreas endêmicas, principalmente na Europa e na América do Sul, notadamente no Brasil (Nascimento et al, 2022). Gatos infectados por parasitos *Leishmania* foram encontrados em todo o mundo e a leishmaniose felina surge como uma doença emergente, relatada principalmente em países banhados pelo Mar Mediterrâneo e no Brasil (Pereira et al, 2021). A FeL é causada principalmente por *Leishmania infantum* e tem sido relatada globalmente, especialmente em áreas endêmicas para leishmaniose humana e canina (Nascimento et al, 2022).

A infecção natural de um gato doméstico por *Leishmania* spp. foi descrita pela primeira vez na Argélia, em 1912, em um animal de quatro meses de idade, que convivia com um cão e uma criança, portadores de leishmaniose visceral. O achado de formas amastigotas do parasita na medula óssea do animal foi a base para um diagnóstico, sem a identificação da espécie causadora da enfermidade (Oliveira, 2019). No Brasil, um dos primeiros casos de FeL foi relatado em Belo Horizonte, Minas Gerais, em um gato doméstico, com numerosos amastigotas observados na coloração de Giemsa e posteriormente, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Soares, 2024). Entretanto, foi somente no ano 2000 que o primeiro caso de FeL foi relatado no estado de São Paulo, no qual *L. infantum* foi identificada (Nascimento et al., 2022), contudo outras espécies como *L. amazonensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania braziliensis* também foram identificadas em gatos infectados (LeishVet., 2024)

Até o momento, seis espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* e uma ao subgênero *Viannia* foram identificadas em gatos domésticos (*F. catus*) (Figura 4) por meio de métodos de tipagem baseados em DNA ou isoenzimas (Pereira & Maia., 2021; LeishVet., 2024).

Recentemente um estudo comparando gatos e cães de área endêmica para a leishmaniose mostrou que a imunopatogênese da infecção por *L. infantum* são semelhantes, embora o nível de resposta imunitária específica do parasita em cães tenha sido geralmente mais elevado que em gatos (Priolo et al., 2022). A coinfeção com outros microrganismos foi relatada em estudos epidemiológicos de gatos com leishmaniose. Gatos de área endêmicas para leishmaniose, coinfectados com *L. infantum* e outros microrganismos como *Toxoplasma*

gondii, esporotricose, criptococose, coronavírus felino, e especialmente com vírus da imunodeficiência felina (FIV) e vírus da leucemia viral felina (FeLV), poderiam explicar em parte o sucesso da infecção por *Leishmania* spp. nesses animais (Sobrinho et al., 2012; Spada et al., 2016; Iatta et al., 2019; Priolo et al., 2022; Sousa et al., 2025). Esses dados sugerem que as coinfeções possam modular o sistema imunológico e assim favorecer o desenvolvimento da infecção por *Leishmania*, uma vez que infecções com o FIV e FeLV modulam negativamente o sistema imunitário.

Estudos sugerem que os gatos são hipoteticamente menos suscetíveis ao desenvolvimento da doença por *L. infantum* quando comparados aos cães, apesar de também apresentarem parasitemia de longa duração (Pereira & Maia, 2021). Alguns sintomas são comuns às infecções caninas e felinas como linfadenomegalia, perda de peso, anorexia, letargia, poliúria e polidipsia, estomatite (Pennisi & Persichetti, 2018) e raramente são observados sinais de icterícia, hepatomegalia, esplenomegalia, caquexia, febre, vômito, diarreia, desidratação, corrimento nasal, dispnéia, sibilos, aborto e hipotermia. Além disso, dificilmente é observado azotemia, hipoalbuminemia, neutrofilia, pancitopenia, proteinúria e anemia regenerativa (Souza et al., 2020). Contudo, as características clínicas dos gatos domésticos associadas à infecção por *Leishmania* spp. não são patognomônicas e podem ser confundidas com muitas outras doenças, o que pode levar a uma subestimação considerável desta enfermidade (Gondim & Lima., 2023).

Acredita-se que gatos são subdiagnosticados devido à grande variedade de sinais clínicos e por serem achados clínicos inespecíficos (Figura 5), que podem ser confundidos com outras doenças, como por exemplo, infecções causadas por FeLV, FIV, histoplasmose e esporotricose (Pennisi, 2015). Dentre os achados clínicos estão: anorexia, êmese, linfadenomegalia, dermatites, uveítes, alopecia difusa, emaciação, hipertermia e atrofia do músculo temporal (Pirajá et al, 2013), perda de peso, desidratação, lesões crostosas nas pontas das orelhas e/ou áreas de alopecia na região cervical dorsal, espirros, gengivite e úlceras na cavidade oral, sugerindo complexo gengivite-estomatite (Santos et al., 2021), sinais oculares, lesão do canal auditivo, palidez da mucosa oral, lesão nasal (Nascimento et al., 2024).

A apresentação clínica combinada com o contexto epidemiológico pode levar a suspeita de leishmaniose felina, mas para um diagnóstico definitivo, são necessários testes laboratoriais específicos para *Leishmania*. Estes incluem testes diretos (citologia, histopatologia, imuno-histoquímica e PCR, que demonstram a presença do parasita ou de seus componentes, e testes indiretos (sorologia quantitativa, como IFAT, ELISA ou DAT) que avaliam a resposta do hospedeiro à infecção (Pereira & Maia, 2021; LeishVet, 2024).

Geralmente, o diagnóstico começa com uma anamnese, observando a área geográfica onde o animal vive o risco de exposição à flebotomíneos e o uso de repelentes, seguindo uma avaliação clínica e bioquímica para investigações mais específicas. Os principais métodos diagnósticos laboratoriais incluem: a análise parasitológica, métodos sorológicos e moleculares (Soares et al., 2016). Citologia de baço, fígado, medula óssea e linfonodos (órgãos classicamente afetados pelas formas amastigotas), geralmente coradas com Giemsa, são as mais frequentemente utilizadas (Savani et al., 2004; Coelho et al., 2011). Apesar da possibilidade do uso de várias técnicas diagnósticas, a PCR aparenta ser o teste com maior sensibilidade para o diagnóstico de animais positivos quando da infecção por *Leishmania* spp. (Morais, 2014).

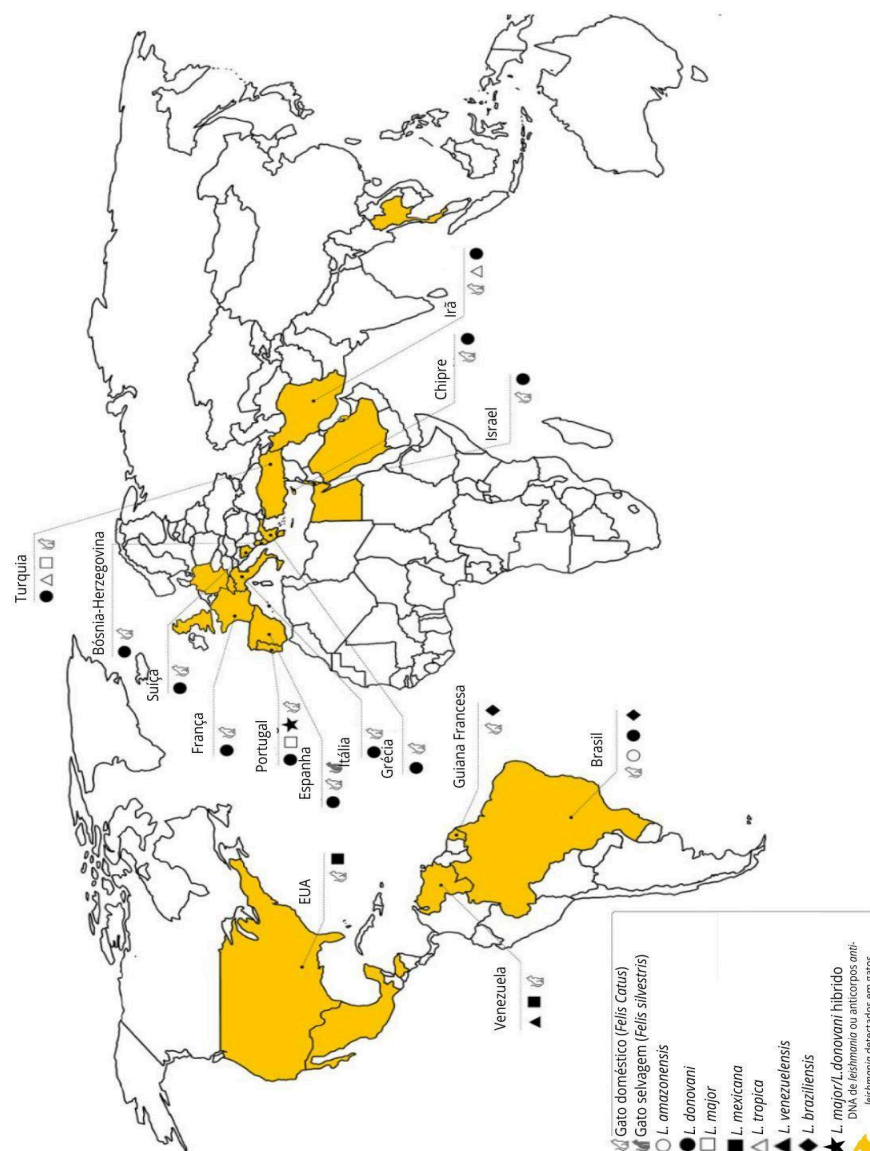




Figura 5. Gatos com *Leishmania* spp. (A) úlceras (seta i), (B) opacidade da córnea em ambos os olhos, (C) descamação e úlceras na face (seta i), (D) no lábio superior (setas i), (E) úlceras na cavidade oral, sugerindo complexo gengivite-estomatite (setas i), (F) edema e hiperemia bilaterais da conjuntiva. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2021) e Nascimento et al. (2024).

Pouco se sabe sobre o tratamento, mas, a literatura sugere que os mesmos fármacos utilizados no tratamento canino se mostram eficazes e seguros em gatos (Souza et al., 2020). O tratamento empírico se baseia no uso de alopurinol (10 mg/kg, a cada 12 h, ou 20 mg/kg, SID, PO, durante pelo menos 6 meses) e o antimoníato de meglumina (50 mg/kg, SID, SC, por 30 dias), sendo o alopurinol o mais utilizado, estes dois fármacos também são administráveis em combinação (Baneth et al., 2020; LeishVet, 2024). O mecanismo de ação do antimoníato de meglumina ocorre por meio da inibição da glicólise e oxidação de ácidos graxos do parasito, seu uso em longo prazo pode trazer consequências, como: pancreatite, alterações cardíacas e renais (Luiz et al., 2022). Em relação ao miltefosina, o propilenoglicol

está entre os excipientes de sua formulação oral licenciada para o tratamento da leishmaniose canina (CanL) e pode causar a formação de corpúsculos de Heinz em glóbulos vermelhos felinos, o que demonstrou causar a anemia, devido à diminuição da vida útil dos glóbulos vermelhos felinos. Portanto, a miltefosina não é recomendada para o tratamento da FeL (LeishVet, 2024).

A resposta imunológica felina contra a *Leishmania* ainda não está totalmente esclarecida e muito do que se sabe deriva de estudos em humanos e cães. O que se sabe é que em comparação com os cães, os gatos possuem certo grau de resistência à *Leishmania*, resultando em baixa infecção ou desenvolvimento da doença e menor manifestação dos sinais clínicos característicos da leishmaniose nesses animais (Nascimento et al., 2022). O desequilíbrio entre o perfil de células Th2/Th1 é o principal fator que leva ao desenvolvimento dos sinais clínicos (Solano-Gallego et al., 2009; Esch et al., 2013). Alguns estudos têm relacionado o agravamento da doença com o aumento na expressão de anticorpos anti-*Leishmania* spp., conforme também observamos nos cães. Em cães com sinais clínicos graves e infectados por *Leishmania donovani*, foi observada baixa produção de IFN- γ e, altos títulos de anticorpos, esses animais demonstraram alta parasitemia (Solano-Gallego et al., 2016). Recentemente, pela técnica de PCR, observou-se que a média da carga parasitária de *Leishmania* spp. em gatos, ao contrário dos cães, é significativamente menor nas amostras de sangue positivas. Isso pode estar associado em parte, com um menor título de anticorpos nesses gatos, possivelmente devido à prevalência de uma resposta Th1 (Priolo et al., 2019; Baneth et al., 2020). No trabalho de Silva (2019) houve um aumento significativo de linfócitos T CD4⁺ e ausência de uma expressão ativa de linfócitos T CD8⁺ em gatos com leishmaniose felina por *L. infantum*, quando comparado aos gatos não infectados, o que sugere a participação dos linfócitos CD4⁺ na progressão da doença. No mesmo estudo, o aumento significativo dos isotipos IgA, IgG e IgM em felinos doentes em relação ao grupo controle indicam a participação da resposta imune humoral na leishmaniose felina.

O curso da infecção nos felinos pode estar ligado à resposta imune do hospedeiro e a persistência e a multiplicação do parasita. Os componentes da imunidade inata e adaptativa interagem de forma complexa e diversa. A resposta imune inata tem um papel relevante no direcionamento da resposta imune adaptativa como demonstrado em animais experimentalmente infectados que são capazes de controlar a infecção (Moreno & Alvar, 2002). O principal mecanismo efetor de uma resposta imune protetora é a ativação dos macrófagos por IFN- γ e TNF- α , levando a morte das formas amastigotas do parasita através da produção de óxido nítrico pela via da L-arginina. O segundo maior papel dos macrófagos é

a apresentação de antígeno para os linfócitos T através das moléculas de complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II)(Pinelli et al., 1995; Rodrigues et al., 2007; Zafra et al., 2008). A ausência de uma resposta de célula T adequada para o controle do parasita leva ao aparecimento de sinais clínicos e de altos níveis de anticorpos contra *Leishmania* spp. e alta carga parasitária na pele, medula óssea, fígado, baço e linfonodos (Sanchez et al., 2004). Um estudo comparando a ativação das vias do sistema complemento em soro de gatos, cães e humanos frente a *L. infantum* mostrou que nos gatos a via lectínica é altamente ativada enquanto em cães e humanos foi observado a ativação da via alternativa e clássica após incubação com *L. infantum* (Tirado et al., 2021). Pereira & Maia (2021) mostraram que gatos naturalmente expostos à infecção por *L. infantum* produzem IFN- γ após estimulação sanguínea *ex vivo* com antígenos do parasita, conforme relatado em cães, isso destaca que os parasitos *Leishmania* podem desencadear uma resposta imune celular protetora em gatos. Trabalhos recentes mostram que células mononucleares primárias felinas obtidas de sangue periférico podem ser infectadas *in vitro* por *L. infantum* e *Leishmania tarentolae* (Mendonza-Roldan et al., 2025) e que gatos naturalmente infectados com *L. infantum* tem níveis de IL-12 mais alto no soro do que gatos saudáveis (Lode et al., 2025).

2.5 Macrófagos

Ilya Metchnikov descobriu, em 1908, células capazes de realizar fagocitose e as denominou macrófagos (Peng et al., 2023). Os macrófagos são células mieloides que fazem parte do sistema imune que desempenham um papel essencial na resposta imune inata e adaptativa (Ngambenjawong et al., 2017). Essas células são encontradas em todos os tecidos do corpo humano e exibem diversidade anatômica e funcional (Boutillier & Elsawa, 2021). Provenientes de precursores monocíticos sanguíneos, essas células heterogêneas passam por diferenciação nos tecidos que invadem guiadas por citocinas (Fujiwara et al., 2005; Dijkgraaf et al., 2013; Boutillier & Elsawa, 2021). Entretanto, alguns estudos têm reformulado substancialmente a compreensão sobre a origem dos macrófagos, ao demonstrar que muitos macrófagos residentes em tecidos são estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário e se mantêm na vida adulta independentemente da contribuição de monócitos circulantes em condições de homeostase (Epelman et al., 2014). Sua função não se limita apenas a eliminação dos patógenos com fagocitose, degradação e sua atividade microbicida, mas os macrófagos também são essenciais no desenvolvimento de tecidos, na manutenção da

homeostase do organismo na reparação de tecidos e são capazes de discriminar o próprio do não próprio (Peng et al., 2023).

Um dos principais papéis dos macrófagos na resposta imune é a capacidade de fagocitar, digerir e apresentar antígenos através do MHC II, que é fundamental para a ativação do sistema imune adaptativo (Boutillier & ElSawa, 2021). Durante a inflamação, os macrófagos exercem papel central na imunidade inata e adaptativa, atuando como células apresentadoras de antígeno (APCs), promovendo a ativação de linfócitos T e B e liberando citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Esses fagócitos produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). A resposta imune inata é desencadeada pela ativação do sistema complemento, pelo reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento de padrões (RRP), especialmente os receptores semelhantes ao Toll (TLR), culminando em fagocitose e produção de mediadores inflamatórios. O processo fagocítico envolve a internalização do patógeno e sua destruição no fagolisossomo, sendo a geração de ROS essencial para a eliminação microbiana (Cruvinel et al., 2010).

Quando estimulados, os macrófagos em repouso (M0) são polarizados e adquirem vários fenótipos (Li et al., 2023). Quando expostos a lipopolissacarídeos (LPS), adquirem o fenótipo tipo M1, conhecido como macrófagos pró-inflamatórios. Por outro lado, quando estimulado por IL-4, adquire o fenótipo tipo M2, conhecido por macrófagos anti-inflamatórios (Atri et al., 2018; Orecchioni et al., 2019; Viola et al., 2019; Abe et al., 2023).

Segundo Luo et al. (2024), os macrófagos M1 e M2 coexistem e mantêm um equilíbrio fisiológico *in vivo*, podendo sofrer mudanças funcionais reversíveis em resposta a alterações no microambiente inflamatório (Yunna et al., 2020). Esses fenótipos apresentam biomarcadores de superfície distintos, sendo CD80, CD86 e TLR-4 característicos de macrófagos M1, enquanto CD163, CD206 e CD209 são associados aos macrófagos M2. Além disso, os macrófagos M2 podem ser subdivididos em quatro subtipos, os quais, ao secretarem diferentes citocinas, exercem funções específicas em diversos processos inflamatórios e patológicos (Figura 6) (Orecchioni et al., 2019).

O fenótipo M2a é induzido por IL-4/IL-13 (Li et al., 2023; Luo et al., 2024) e os principais receptores da sua superfície incluem MHCII, MR, Arg1, CD206, que podem secretar IL-10, TGF- β , IGF-1, fibronectina, CCL22 e CCL17, que podem promover a cicatrização de feridas e fibrose (Roszer, 2015). O M2b exibe potentes propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras e são conhecidos como macrófagos reguladores,

ativados por complexos imunes e ligantes de TLR e envolvidos em reações imunes e inflamatórias (Li et al., 2023). MHCII, MRe CD86 são exemplos de receptores de superfície de M2b que podem secretar IL-1, IL-6, CCL1, CCL20 e outras substâncias (Luo et al., 2024). Os macrófagos M2c, que são ativados por glicocorticóides ou IL-10, exercem principalmente funções anti-inflamatórias (Li et al., 2023), secretam TGF- β , IL-10, metaloproteinases (MMPs), CCL18, por exemplo (Funes et al., 2018; Wang et al., 2019) e ao mesmo tempo, desempenha um papel na fagocitose, imunossupressão, angiogênese e desenvolvimento de fibrose tecidual (Luo et al., 2024). E por fim os macrófagos M2d que, são conhecidos como TAMs, são ativados por TLR e agonistas do receptor de adenosina A2, e desempenham papéis cruciais na regulação da progressão tumoral, angiogênese e metástase (Viola et al., 2019).

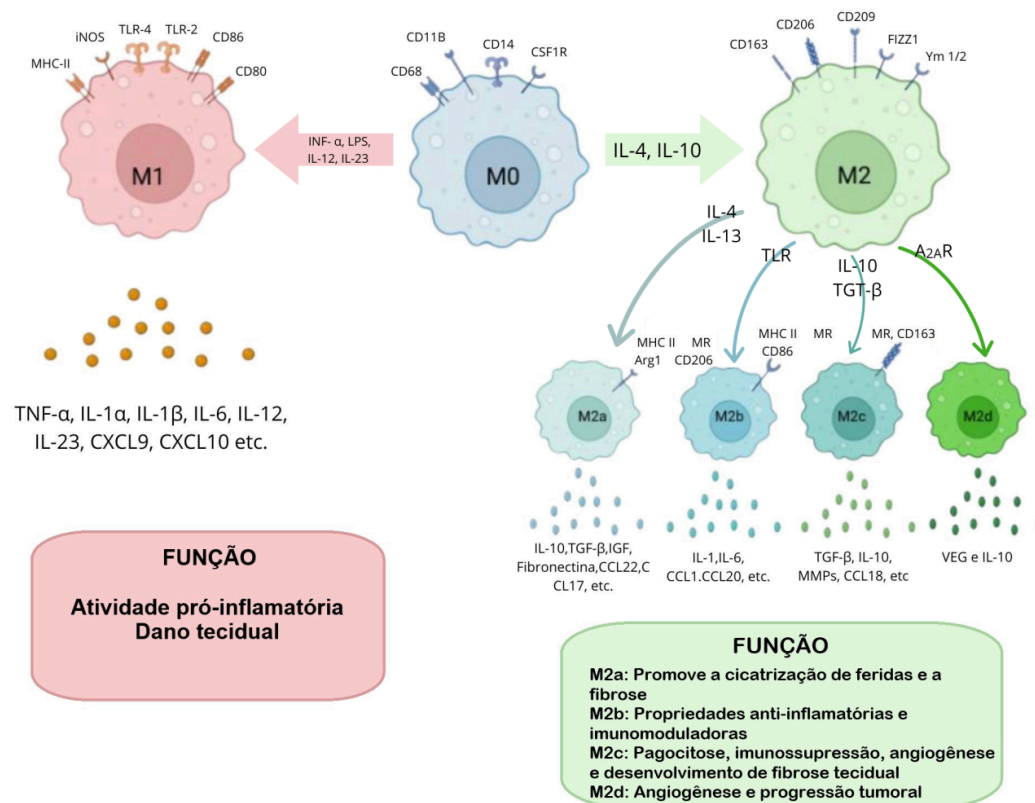


Figura 6. Diagrama da polarização de macrófagos. A polarização dos macrófagos ocorre predominantemente em dois fenótipos principais, M1 e M2, os quais se diferenciam conforme os estímulos celulares presentes no microambiente. O fenótipo M2 pode ainda ser subclassificado em quatro subtipos distintos: M2a, M2b, M2c, M2d. Esses diferentes fenótipos de macrófagos expressam marcadores específicos em sua superfície, permitindo sua identificação. Além disso, os macrófagos M1 e M2 produzem perfis distintos de citocinas ao longo do curso das doenças, desencadeando efeitos imunológicos opostos.

Fonte: Adaptado Lou, 2024.

2.6 Fcwf-4

A linhagem Fcwf-4 é um macrófago que possui capacidade fagocítica, receptores Fc e esterase não específica, é uma linhagem celular felina contínua que foi desenvolvida em 1979 por Niels C. Pedersen, derivada de feto de gato. São células aderentes com suscetibilidade ao vírus da peritonite infecciosa felina (ATCC, 2025). Estas células têm sido utilizadas para pesquisas em modelos de infecção (Kida et al., 2000; Balint et al., 2012; Tanaka et al., 2012; Zabiegala et al., 2026), reposicionamento de drogas (Cerna et al., 2024) tratamento do câncer (Maekawa et al., 2023) e resposta imunitária (Robert-Tissot et al., 2012; Jang et al., 2024).

Muitos avanços na elucidação de mecanismos patológicos em geral têm sido possíveis pela disponibilidade de linhagens celulares. As células (Fcwf-4) são uma linhagem de células semelhantes a macrófagos felinos (Jacobse-Geels & Horzinek, 1983). Essas células crescem em monocamadas em superfícies de vidro ou plástico e têm uma morfologia fusiforme a estrelada (Figura 7). As células contêm um núcleo oval com um ou dois nucléolos. Sua capacidade de crescimento é boa em passagens baixas (tempo de duplicação 24 h), mas diminui gradualmente após a passagem número 25 (tempo de duplicação 48 h). A fagocitose de partículas de carbono foi encontrada em cerca de 60% das células e as partículas de látex foram absorvidas em mais de 70%. Essas células são capazes de se ligarem a hemácias de carneiro (SRBC) opsonizadas por anticorpo (Jacobse-Geels & Horzinek, 1983).

Na literatura é possível encontrar uma gama de trabalhos utilizando essa linhagem celular, sendo a maioria para estudos virais, Alazawy et al. (2011), mostram a presença de coronavírus felino (FCoV) em células Fcwf-4 intracelular e extracelular após 48 horas. Cook et al. (2022), através de imunofluorescência, mostraram a expressão do marcador de macrófago CD14. A linhagem de macrófagos Fcwf-4 tratada com ácido poliinosínico-policitidílico [poli(I:C)] mostrou aumento na expressão dos genes IFN- γ , IL-1B, IL-2, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12A, IL-12B e TNF- α (Jang et al., 2024) e essa linhagem também se mostrou promissora na replicação de *Cytauxzoon felis*, sendo esse um novo sistema para cultivo desse parasita (Weerarathne et al., 2024).

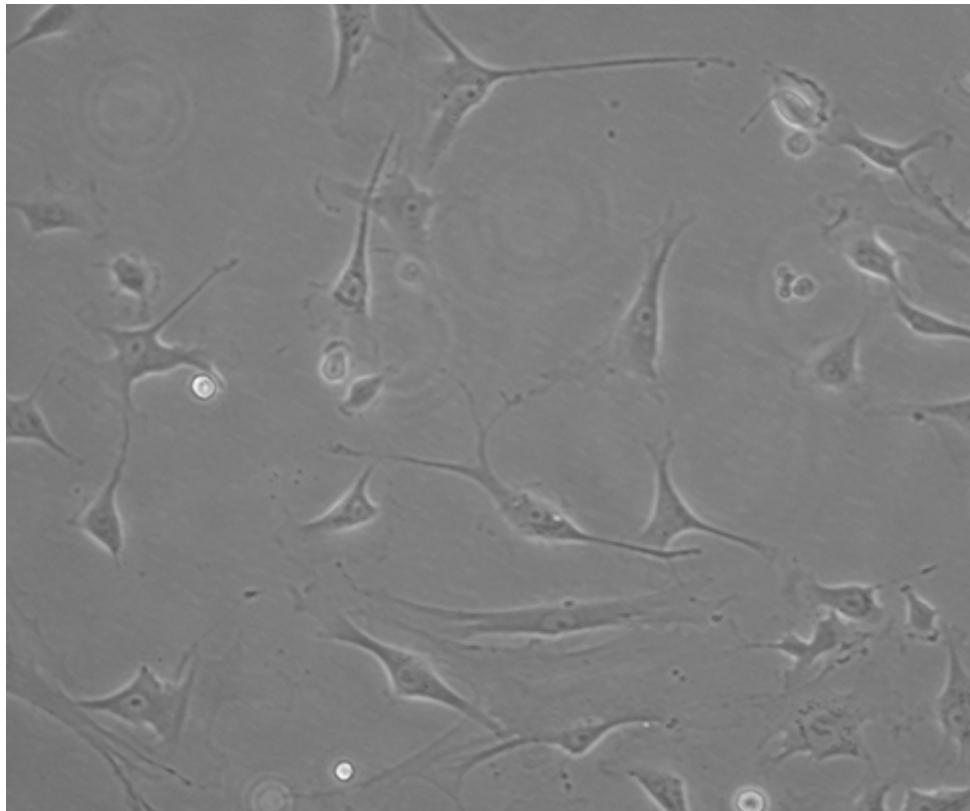


Figura 7. - Imagem óptica da linhagem celular Fcwf-4.

Fonte: ATCC, 2025.

2.7 *Cryptococcus neoformans* e Glucuronoxilomanana (GXM)

O *Cryptococcus neoformans* é um fungo patogênico que infecta humanos e animais e é encontrado em todo o mundo associado a excrementos de aves, como os pombos, canários e caturus no solo (Perfect & Casadevall, 2002). Esse fungo é conhecido por causar criptococose e foi classificado pela Organização Mundial da Saúde como um patógeno de grande importância e representa uma ameaça significativa para indivíduos imunocomprometidos, como receptores de transplante de órgãos sólidos ou indivíduos com AIDS (Crawford et al., 2024). É a doença fúngica sistêmica mais comum em gatos (Pennisi et al., 2013).

A célula fúngica do *C. neoformans* apresenta uma cápsula polissacarídica que é uma característica comum de patógenos bacterianos, mas em fungos está presente nas espécies de *Cryptococcus* (Rodrigues et al., 2009). As funções dessa cápsula estão ligadas à sobrevivência, virulência e classificação do fungo. Ela é composta pelos açúcares

glucuronoxilomanana (GXM) e glucuronoxilomanogalactana (GalXM), além de manoproteínas (MP) (Rodrigues et al., 2011).

A glucuronoxilomanana (GXM) é um polissacarídeo de alto peso molecular que representa cerca de 90% da massa capsular (McFadden et al., 2006) (Figura 8). Nesse modelo, a cápsula é a estrutura mais estudada, visto que é considerada um dos principais fatores de virulência. Na fase saprofítica, a cápsula polissacarídica protege o fungo contra diversos tipos de estresse e desidratação (Decote-Ricardo et al., 2019). O GXM, em particular, exerce diversos efeitos imunomoduladores: sua carga negativa confere uma propriedade antifagocítica, inibindo a interação entre as células efetoras do hospedeiro e o fungo, contribuindo para a falta de resposta imune e inibição da infiltração de neutrófilos em locais de inflamação (Guimarães-de-Oliveira, 2025). A sua presença leva a uma diminuição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ), enquanto aumenta a IL-10, uma citocina anti-inflamatória, (Chen et al., 2022). Os estudos também mostram que o GXM é capaz de induzir a apoptose em macrófagos por meio de um mecanismo associado ao aumento da expressão de Fas e Fas-L nas células hospedeiras (Decote-Ricardo et al., 2019). Esse polissacarídeo também é capaz de reduzir a expressão de MHCII, prejudicando a apresentação de antígenos por células dendríticas e a proliferação de linfócitos T (Guimarães-de-Oliveira, 2025).

A maioria dos estudos com o polissacarídeo utilizou células fagocíticas, entretanto o efeito da produção de GXM nessas células ainda é pouco explorado (Rodrigues et al., 2009). No entanto, essa molécula é considerada promissora para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Ferreira-dos-Santos, 2025).

Ao considerar que a criptococose é uma infecção fúngica sistêmica comum em gatos e os relatos de co-infecção *Leishmania* e outros patógenos, é relevante o estudo desse polissacarídeo em macrófagos felinos Fcwf-4, e assim esclarecer mecanismos envolvidos junto à infecção por *L. amazonensis*.

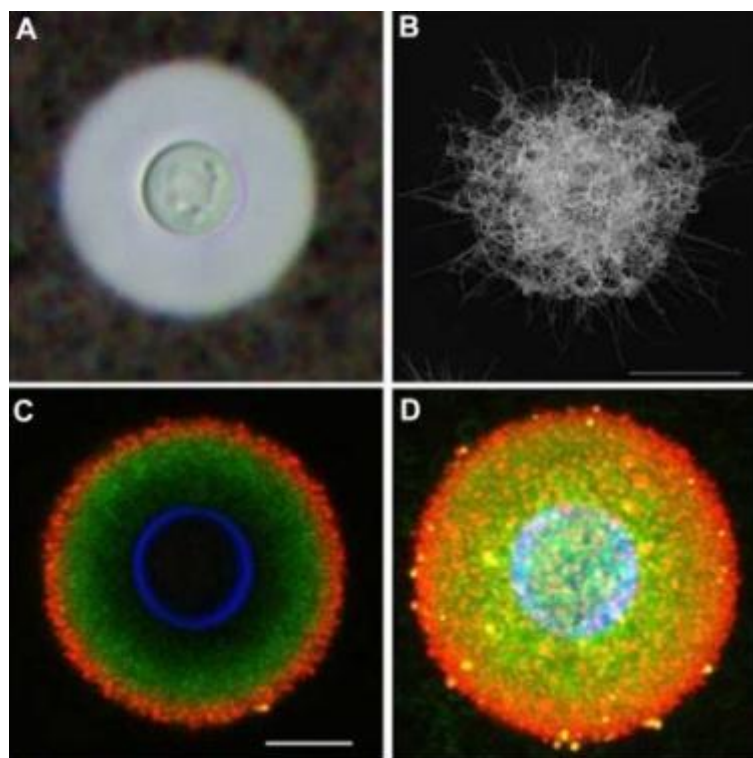


Figura 8. Diferentes micrografias e composições mostram a cápsula polissacarídica de *C. neoformans*. (A) Suspensão das células em tinta da Índia; (B) Microscopia eletrônica de varredura; (C) Imunofluorescência usando mAbs específicos para a cápsula (fluorescência verde e vermelha), mostrando também a localização na parede celular (fluorescência azul). (D) Composição de imagem 3D de uma célula de *C. neoformans* marcada com dois mAbs diferentes para a cápsula. Em azul, a parede celular. (Adaptado Zaragoza et al., 2009)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Macrófagos

A linhagem de macrófagos felinos Fcwf-4 foi cultivada em meio DMEM (Sigma) suplementado com 2mM de L-Glutamina (Gibco), 1mM de Piruvato de Sódio (Gibco), 50mM de β -Mercaptoetanol (Sigma), 10% de SFB (Gibco) e Aminoácidos Não-Essenciais na proporção 1:100 (Gibco:11140-050) em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

3.2 Parasitos

As culturas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram mantidas em meio de inseto *Schneider* (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) a 27°C. Após 4 dias de cultivo, os parasitos foram lavados em PBS (tampão fosfato salina) a 2000 xg por 10 min. a 22°C. As células foram ressuspensas em PBS e contadas na câmara de Neubauer.

3.3 Polissacarídeo Capsular de *Cryptococcus*

Os polissacarídeos capsulares do *C. neoformans* foram extraídos do sobrenadante de cultura das cepas B3501, que foram utilizadas para extração da molécula de Glucuronoxilomanana (GXM) e foi fornecida em uma concentração estoque de 1mg/mL, gentilmente pelo Prof. Célio Freire de Lima do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.4 Avaliação da Viabilidade dos Macrófagos Felinos Infectados com *Leishmania* spp.

Macrófagos felinos foram semeados (2×10^5 /poço) em placas de 96 poços, e as células não aderentes foram lavadas após 2 horas de incubação a 37°C/5% CO₂. Após esse período, as células foram tratadas ou não com 100 µg/mL de GXM e incubadas por 24 horas, em seguida foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção 10 parasita: 1 macrófago e incubadas a 37°C com 5 % de CO₂, por 2 horas. Posteriormente foram lavadas e incubadas por 24 e 48h. Após os tempos citados, as células foram lavadas com PBS a 37 °C e incubadas com 50µL de solução de XTT (Sigma-Aldrich), na concentração de 0,001g/mL, contendo 10% de Phenazine Methosulfate (PMS - 500µM) diretamente ao poço e após 4h de incubação a 37°C, a absorbância da reação foi lida em leitor de microplaca com filtro de 450nm. A porcentagem de células viáveis foi determinada em comparação a leitura das células controles não infectadas ou tratadas (100%).

3.5 Cinética de Infecção dos Macrófagos Felinos e Determinação do Índice de Infecção

Macrófagos felinos foram plaqueados (2×10^5 /poço) em lamínulas de vidro de 13mm em placas de 24 poços, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com PBS/37°C, após 2 horas de incubação a 37°C/5% CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com GXM e incubadas por 24 horas. A após 24 horas de tratamento, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos: 1 macrófago, incubadas a 37°C com 5 % de CO₂, por 2 horas, posteriormente foram lavadas e incubadas com meio por 2, 24 e 48 horas de infecção. A coloração das lamínulas foi feita pelo método de coloração por Giemsa. A determinação do índice de infecção (% de macrófagos infectados x número de

parasitos/macrófago) é feito após contagem de no mínimo 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000x).

3.6 Carga Parasitária/Killing

Macrófagos felinos foram plaqueados (2×10^5 /poço) em placas de 24 poços, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com PBS/37°C, após 2 horas de incubação a 37°C/5% CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com GXM em concentração 100 µg/mL e incubadas por 24h. Após esse tempo, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos: 1 macrófago, incubadas a 37°C com 5 % de CO₂, por 2 horas. Posteriormente os macrófagos felinos foram lavados com PBS a 37°C e incubados com meio DMEM por 24 horas a 37°C/5% CO₂. Após esse período, as células foram lavadas com PBS/37°C e adicionado meio de inseto Schneider aos macrófagos felinos que foram incubados em estufa BOD a 27 °C. A contagem dos parasitos liberados foi realizada em câmara de Neubauer nos dias 3, 5 e 7 de incubação.

3.7 Detecção de Óxido Nítrico (NO)

Macrófagos (2×10^5 /poço) foram semeados em placas de 96 poços, tratados ou não com GXM em concentração 100 µg/mL e incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ por 24 horas. Após esse período os macrófagos felinos foram infectados ou não com *L. amazonensis* na proporção 10 parasitos: 1 macrófago e/ou. Após 2 horas, as culturas foram lavadas para a remoção dos parasitos livres e foi acrescido meio novo adicionado ou não de LPS em concentração 400ng/mL aos poços por 24 horas, a 37°C /5% CO₂. Ao término da incubação, os sobrenadantes foram retirados e centrifugados. Em uma nova placa as amostras do sobrenadante foram recolocados e em paralelo foi feita uma curva de nitrito de sódio. O volume de 50 µL das soluções de Griess (solução A: sulfanilamida 1% e ácido ortofosfórico 5%; solução B: N-(1-naphthyl)-ethylenediamin 0,1% - Sigma) na proporção 1:1 foi adicionado às amostras e à curva de nitrito de sódio. Após 15 min foi feita a leitura por absorbância (Varioskan LUX), em um comprimento de onda de 540 nM.

3.8 Detecção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Macrófagos (2×10^5 /poço) foram semeados em placas de 96 poços, tratados ou não com GXM em concentração 100 µg/mL e incubadas a 37°C com 5 % de CO₂ por 24 horas.

Após esse período as células foram infectadas ou não com *L. amazonensis* na proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. Após 2 horas, as culturas foram lavadas para a remoção dos parasitos livres e foi acrescido meio novo adicionado ou não de LPS em concentração 400ng/mL por 24 horas 37°C /5% CO₂. Ao término da incubação, as células foram lavadas e incubadas com a sonda CM-H2DCFDA[10μM] por 60 minutos, no escuro, a 37°C. Após esse período, a intensidade média de fluorescência foi avaliada por Fluorescência (Varioskan LUX), com excitação 493 nM e emissão em 522 nM.

3.9 Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real (Real Time PCR)

Macrófagos felinos Fcwf-4 foram semeados (3x10⁶/poço) em placas de 24 poços, as células não aderentes foram retiradas por lavagem com PBS/37°C, após 2 horas de incubação a 37°C/5% CO₂. Após esse período, amostras foram tratadas ou não com GXM e incubadas e após 24 horas as células foram infectadas ou não com promastigotas de *L. amazonensis* (10p: 1 mo), incubadas a 37°C/5 % CO₂, por 2 horas. Posteriormente os macrófagos felinos foram lavados e foi acrescido meio novo adicionado ou não de LPS [400ng/mL] e incubados por 24 horas a 37°C/5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS/37°C e adicionado 500μL do reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) e o lisado foi submetido à extração de RNA utilizando o kit PureLink RNA Mini (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. A pureza e a concentração do RNA foram medidas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Inc.). O RNA total (500ng) foi submetido à transcrição reversa utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (ThermoFisher Scientific, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A mistura de reação continha 1 μL de Mistura Enzimática 20× (incluindo transcriptase reversa MuLV e inibidor de RNase), 4 μL de Mistura Tampão RT 2× (incluindo dNTPs, octâmeros aleatórios e oligo dT-16) e 1 μg de RNA total (4 μL de amostra de RNA), em um volume final de 20 μL. As reações foram conduzidas em um termociclador Veriti® (Thermo Fisher Scientific, EUA) sob as seguintes condições: 37°C por 60 min, seguido de 95°C por 5 min. As reações de qPCR foram realizadas em um sistema StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em volume final de 12 μL, contendo 1x FastStart SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 400nM de primers e 150ng/μL da amostra (3μL). As condições de ciclagem térmica foram 95°C por 3 segundos e 60°C por 30 segundos, com análise de curva de dissociação (melting curve). A linha limiar (threshold) foi padronizada para o mesmo valor de baseline em todas as placas de qPCR. Os conjuntos de primers utilizados estão listados a seguir (Tabela 1):

Tabela 1: Quadro de primers utilizados para análise de expressão gênica através de qPCR.

Linhagem Felina FCWF-4		
	Foward	Reverse
IL-10	5'-TCAAACCAAGGACGAGCTGC-3'	5'-TGTTTGATGTCTGGGTCCTCG-3'
TNF-α	5'-CCCACATGGCCTGCAACTAA-3'	5'-GCTACTGGCTTGTCACCTCGG-3'
GAPDH	5'-AGTATGATTCCACCCACGGCA-3'	5'-GATCTCGCTCCTGGAAGATGGT-3'
IFN-γ	5'-ATGTAGCAGATGGTGGGTCG-3'	5'-TCCTTTGAATGCGCTGGTCA-3'
TGF-β	5'-CCCTGGACACCAACTATTGC-3'	5'-TCCAGGCTCCAAATGTAGGG-3'
TLR-4	5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCA-3'	5'-GACACTCGCTCAGCTTCTTG-3'

3.10 Análise Estatística

Todos os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 9.5 software. A normalidade dos dados foi analisada através do teste estatístico Dàgostino-pearson omnibus normality test. Para análise das diferenças entre: uma variável com duas categorias foi utilizada o *Student's t-test*; uma variável com três ou mais categorias será usado o teste one-way ANOVA e para diferenças entre duas variáveis o teste two-way ANOVA. Foi considerado como diferença estatística significativa $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4.1 Cinética e Determinação do Índice de Infecção

Para que fosse possível dar início aos estudos, foi necessário avaliar a capacidade de interação entre promastigotas de *L. amazonensis* e as células Fcwf-4. Os parasitos foram incubados com os macrófagos de linhagem felina Fcwf-4, tratados ou não com polissacarídeo fúngico GXM por 2, 24 ou 48 horas e o índice de infecção foi avaliado, considerando o percentual de macrófagos infectados e o número de parasitos por macrófagos (Figura 9 a-d).

Os resultados demonstraram que os macrófagos felinos da linhagem Fcwf-4 são capazes de interagir, reconhecer e se ligar a *L. amazonensis*, estabelecendo um contato funcional em todos os tempos de infecção analisados. Em relação ao número de parasitos por

macrófagos, em 2 horas de interação não foi observado diferença entre macrófagos felinos infectados e tratados ou não com GXM. No tempo de 24 horas é observado um aumento do número de parasitos por macrófagos em células tratadas com GXM, onde se observou uma média de 1,9 parasitos por macrófagos em relação às células não tratadas no mesmo tempo, que apresentou uma média de 1,3 parasitos por célula. Já em 48 horas não observamos diferença estatística no número de parasitos por macrófagos (Figura 10a).

Em relação à porcentagem de macrófagos infectados, no tempo de 2 horas foi observado um percentual de 62% em macrófagos infectados não tratados com GXM enquanto o percentual de macrófagos infectados na presença de GXM foi de 49%. Em 24 horas não foi observado uma diferença estatística, embora tenha uma tendência de aumento do percentual de macrófagos infectados na presença de GXM. Entretanto, em 48 horas, foi observada uma maior porcentagem de macrófagos infectados em células tratadas com o polissacarídeo (24%) em comparação às células não tratadas (10%) (Figura 10b).

O índice de infecção mostrou que na infecção de macrófagos felinos Fcwf-4 por *L. amazonensis* na presença do polissacarídeo GXM é 2,9 e 3,04 vezes maior no período de 24 e 48 horas, respectivamente, do que na ausência desse polissacarídeo (Figura 10c).

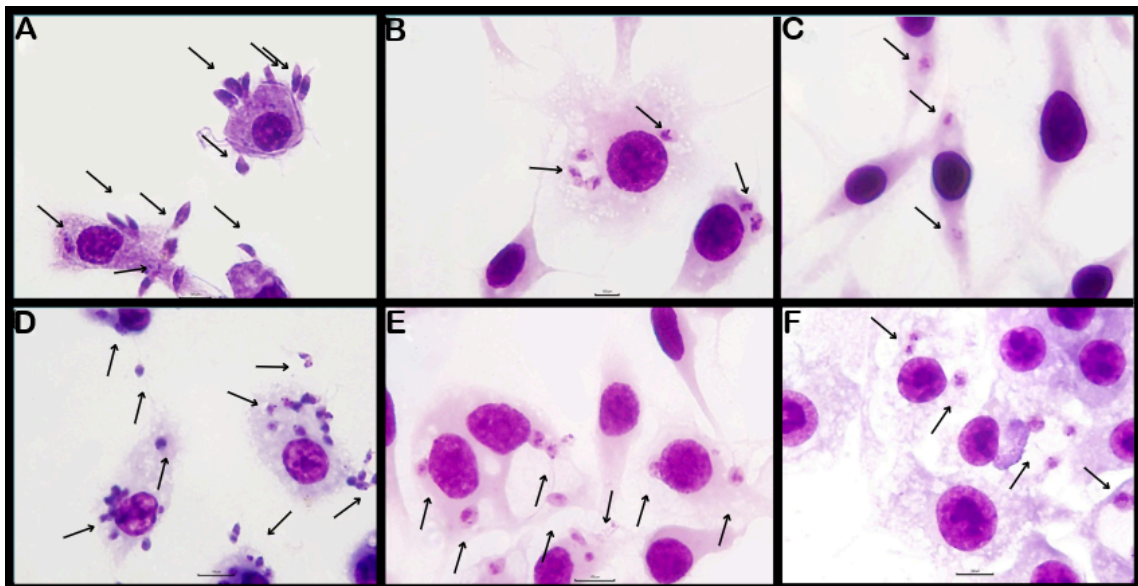


Figura 9. Microscopia Óptica de Macrófagos Felinos Fcwf-4 Infectados por *L. amazonensis*: A, B e C= Macrófagos felinos infectados por *L. amazonensis* em 2, 24 e 48 horas, respectivamente; D, E e F = Macrófagos felinos tratados com GXM e infectados por *L. amazonensis* em 2, 24 e 48 horas, respectivamente. As setas indicam os parasitos. Coloração das células foi feita pelo método Giemsa, visualização em microscópio óptico 1000x.

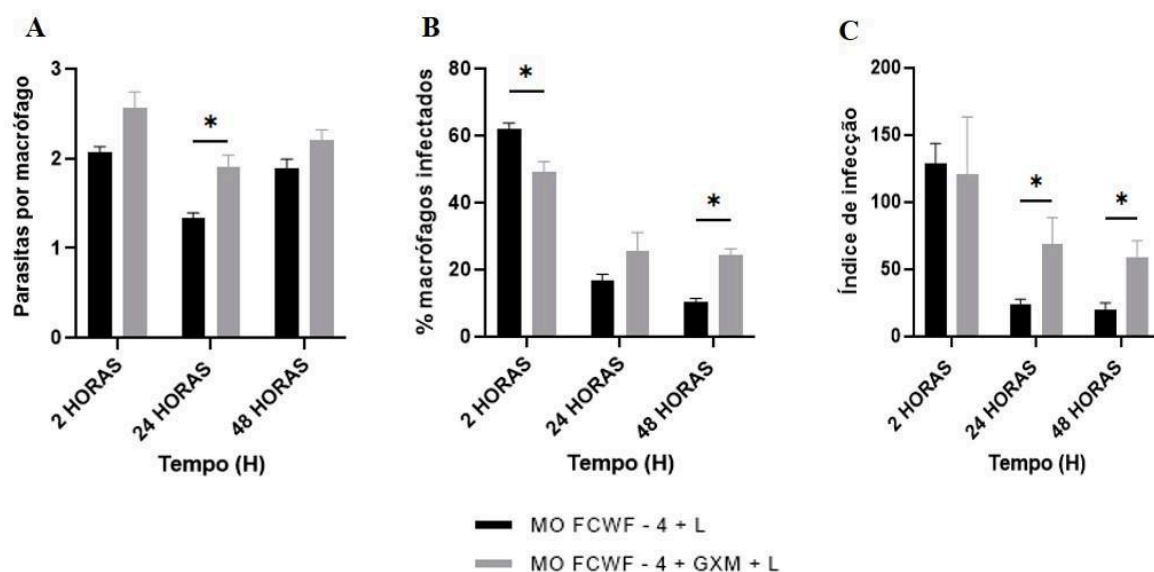


Figura 10. Infecção de Macrófagos Felinos Fcwf-4 com *L. amazonensis*. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com o polissacarídeo GXM [100 µg/ml] e incubados por 24 horas. Após o tratamento, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 10p:1mo a 37°C/5% CO₂ por 2 horas. Posteriormente, as culturas foram lavadas e mantidas por diferentes tempos (2, 24 e 48 horas). Ao final de cada período, as lamínulas foram coradas por Giemsa, e o índice de infecção foi determinado por contagem de, no mínimo, 200 macrófagos por lamínula. (A) Número de parasitos por célula infectada; (B) Porcentagem de células infectadas; e (C) o índice de infecção. Dados = Média + SEM de três experimentos independentes em triplicata. *p < 0,05.

4.2 Viabilidade/Citotoxicidade Celular

Em seguida foi analisada a viabilidade dos macrófagos felinos na presença de *L. amazonensis* e GXM. Os resultados mostraram que em 24 horas as células permanecem viáveis, onde se observa 100% de viabilidade em macrófagos felinos infectados com *L. amazonensis*, 98,7% em células tratadas com GXM e 98,8% de viabilidade em células infectadas com *L. amazonensis* e tratadas com GXM. Em 48 horas, em todas as situações, foi observada viabilidade acima de 98% (Figura 11).

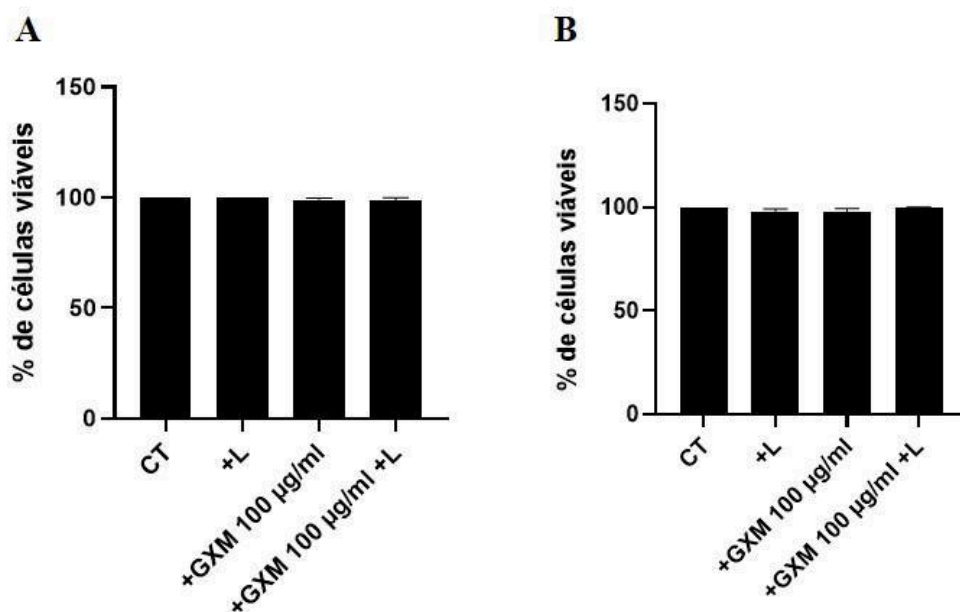


Figura 11. Viabilidade dos Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] e incubadas por 24 horas. Posteriormente, as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10p:1mo) por 2 horas a 37 °C/ 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram lavadas e incubadas por (A) 24 e (B) 48 h a 37 °C/ 5% de CO₂. Ao final dos tempos experimentais, a porcentagem de viabilidade celular foi determinada por comparação com as células controle não tratadas e/ou infectadas CT = Controle, L = *L. amazonensis*, GXM = glucuronoxilomanano Dados = Média+SEM de três experimentos em triplicata.

4.3 Análise de Carga Parasitária/Killing:

A fim de confirmar que os parasitos sobrevivem após fagocitose e se são capazes de proliferar e se manter viáveis no interior dos macrófagos felinos, foi realizado o experimento onde foi possível avaliar a carga parasitária a partir dos parasitos que são liberados dos macrófagos infectados. Os dados mostram a presença de *L. amazonensis* em todos os tempos analisados após incubação. Foi observado em 3 dias, 30,9 x 10⁵/mL parasitos em células não tratadas e 24 x 10⁵/mL em células tratadas com GXM. Com 5 dias os dados mostram 57,7 x 10⁵/mL e 69 x 10⁵/mL parasitos vivos em macrófagos felinos tratados ou não com GXM, respectivamente. Por fim, com 7 dias o número de parasitos viáveis em células não tratadas estimuladas foi de 108 x 10⁵/mL e nas células tratadas 81,7 x 10⁵/mL. Não houve diferença estatística no número de parasitos recuperados dos macrófagos felinos tratados ou não com GXM (Figura 12).

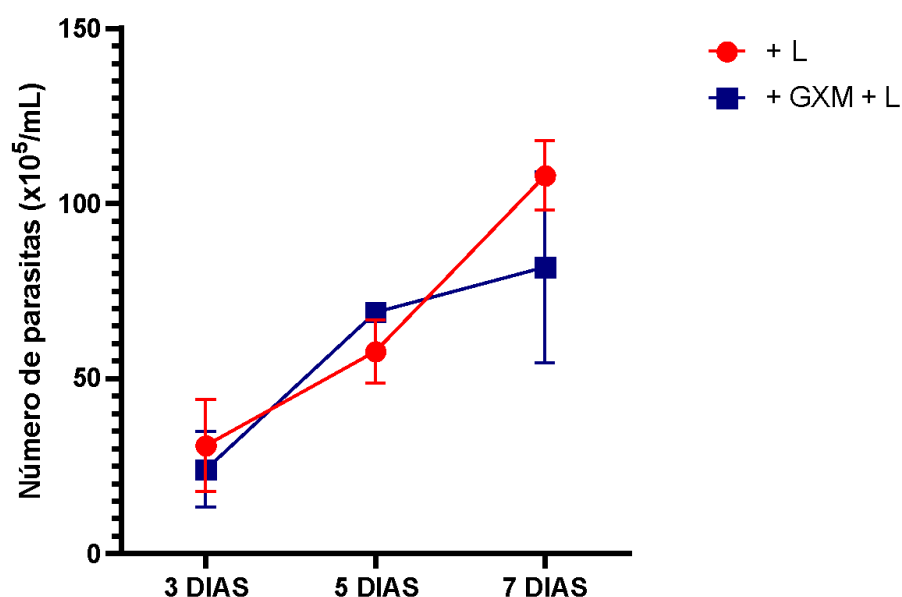


Figura 12. Análise da Carga Parasitária em Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] por 24 horas a 37°C/ 5% de CO₂. Após esse período, as culturas foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (10 p:1 mo) e incubadas por 2 horas a 37°C/ 5% CO₂. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e mantidas nas mesmas condições acima. Em seguida, o meio foi substituído por meio Schneider, e os macrófagos felinos incubados em estufa BOD a 27°C. A quantificação dos parasitos liberados foi realizada em câmara de Neubauer nos dias 3, 5 e 7 de incubação. L = *L. amazonensis*, GXM = glucuronoxilomanano. Gráfico representativo de um experimento em triplicata.

4.4 Produção de Óxido Nítrico (NO)

Com o intuito de avaliar a produção de óxido nítrico, um importante mecanismo microbicida presente nos macrófagos, foi determinada a produção indireta de NO através da dosagem de nitrito no sobrenadante dos macrófagos felinos tratados ou não com GXM infectados ou não com *L. amazonensis* e /ou estimulados ou não com LPS.

Nossos resultados preliminares mostram que as células Fcwf-4 são capazes de produzir NO quando estimuladas com LPS [400ng/mL], onde foi observado uma diferença significativa na produção de nitrito em relação ao controle (MO), sendo 1,19 vezes maior. No entanto, na presença de GXM foi observada uma redução de 0,91 vezes na produção de NO nos macrófagos felinos estimulados com LPS.

Os dados mostram também que macrófagos felinos Fcwf-4 infectados com *L. amazonensis* não mostraram diferença estatística na produção de NO em relação aos

macrófagos controles não infectados. Entretanto, em macrófagos felinos estimulados com LPS e infectados com *L. amazonensis* houve uma diminuição de 0,9 vezes na produção de NO em relação a células estimuladas com LPS. O mesmo foi observado em macrófagos tratados com GMX infectados com *L. amazonensis* e estimulados com LPS (Figura 13).

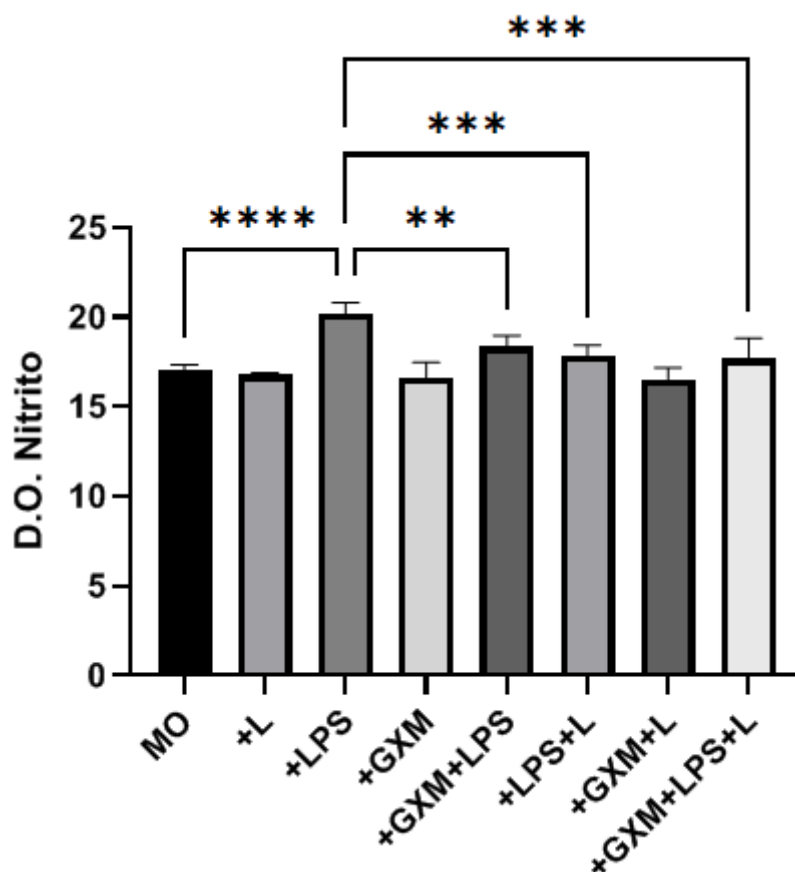


Figura 13. Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos Fcwf-4 foram tratados ou não com GXM [100 µg/ml], infectados ou não com *L. amazonensis* (10p:1mo), estimulados ou não com LPS [400 ng/mL], por 24h. A concentração de nitrito foi determinada utilizando o sobrenadante por reação colorimétrica com reagente de Griess. Gráfico representativo de um experimento em triplicata. p** < 0,01; p*** < 0,001; p **** < 0,0001.

4.5 Produção de Radicais de Oxigênio (ROS)

Outro ponto avaliado foi a produção de ROS, outro mecanismo microbicida, onde os resultados mostram que em relação aos macrófagos felinos houve uma diminuição de 0,73x na produção de ROS basal nas células tratadas com GXM. Na presença de LPS houve um aumento de 1,24x na produção de ROS em relação aos macrófagos felinos controles. Nos

macrófagos infectados com *L. amazonensis* não foi observado diferença significativa em relação aos macrófagos felinos controles.

Em comparação às células estimuladas com LPS, a presença de GXM, ou do parasita *L. amazonensis* ou ainda de GXM e *L. amazonensis* levou há uma redução na produção de ROS pelos macrófagos felinos Fcwf-4 de 0,66x; 0,75x; e 0,61x, respectivamente (Figura 14).

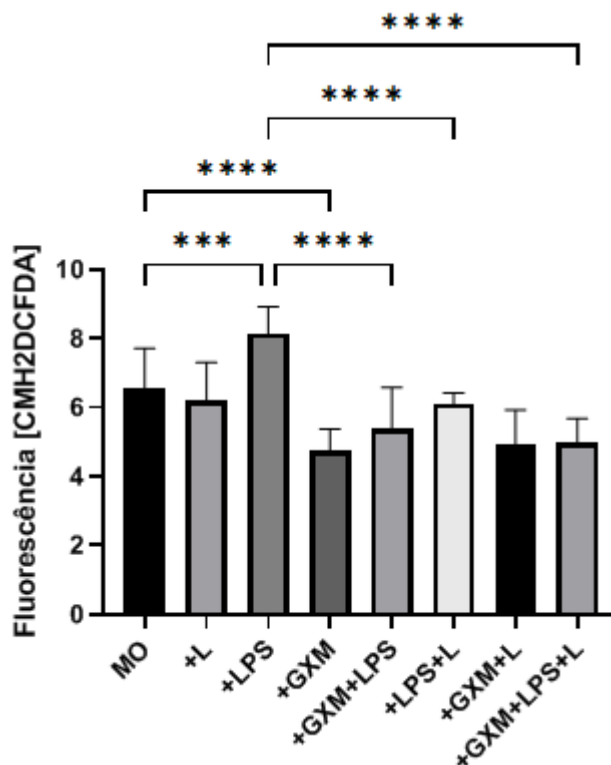


Figura 14. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio por Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM [100 µg/mL] por 24 horas a 37°C/5% CO₂. Em seguida, as células foram infectadas ou não com *L. amazonensis* (10 p:1 Mo). Após 2 horas de infecção, foi adicionado ou não LPS [400ng/mL]. As culturas foram mantidas por mais 24 horas a 37°C/5% de CO₂. Ao final da incubação, as células foram incubadas com a sonda fluorescente por 60 minutos no escuro a 37°C. Posteriormente, a intensidade média de fluorescência foi determinada em fluorímetro, utilizando excitação a 493 nm e emissão a 522 nm. Dados = Média + SEM de três experimentos em triplicata. p*** < 0,001; p **** < 0,0001.

4.6 Expressão Gênica

A ativação dos macrófagos confere a essas células propriedades que podem influenciar a modulação da resposta imunológica. Dessa forma, avaliou-se a resposta de macrófagos felinos Fcwf-4 infectados por *L. amazonensis* e submetidos ao tratamento com GXM através da expressão de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), que são importantes mediadores da resposta imune inata e de receptor semelhante ao

Toll (TLR-4), utilizando PCR em tempo real (Figura 15).

Os dados preliminares da análise da expressão de TGF- β mostram que embora haja uma tendência de aumento da expressão em macrófagos felinos estimulados com LPS e GXM, não houve diferença significativa entre macrófagos felinos Fcwf-4 controle, estimulados com LPS, tratados com GXM ou infectados com *L. amazonensis*. Quando comparamos a expressão de TGF- β em macrófagos felinos tratados com GXM e macrófagos tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis*, há um aumento de 2,8 vezes da expressão de TGF- β em macrófagos felinos tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis*.

A análise dos dados de expressão de IL-10 mostra um aumento de 2,9x na expressão de IL-10 em macrófagos felinos Fcwf-4 estimulados com LPS em relação às células controle. Os macrófagos felinos infectados com *L. amazonensis* têm uma tendência de redução da expressão de IL-10 em relação à célula controle. Ao comparamos a expressão de IL-10 entre macrófagos felinos tratados com GXM e tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis* há uma redução significativa na expressão de IL-10.

Já em relação à expressão de citocinas inflamatórias, observamos uma tendência de redução da expressão de IFN- γ em macrófagos felinos estimulados com LPS, tratados com GXM e/ou infectados com *L. amazonensis* comparado aos macrófagos felinos controle.

Em relação a expressão de TNF- α , outra citocina inflamatória, observamos uma redução significativa da expressão de TNF- α ao comparamos macrófagos felinos controle e macrófagos estimulados com LPS ou tratados com GXM ou infectados com *L. amazonensis* quando comparadas aos macrófagos felinos controle de 3,2; 97,9; 448,3 vezes respectivamente. Observamos também uma redução significativa ao comparamos a expressão entre macrófagos felinos tratados com GXM e tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis* de 4,5 vezes.

Por fim, avaliamos a expressão do receptor TLR-4, onde curiosamente observamos uma diminuição da expressão de TLR-4 em macrófagos felinos estimulados com LPS e um aumento na expressão em células tratadas com GXM em relação aos macrófagos felinos controle de 1,8x; 5,9x, respectivamente. Ao comparamos macrófagos felinos tratados com GXM e tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis* observamos uma redução significativa de 6x da expressão de TLR-4.

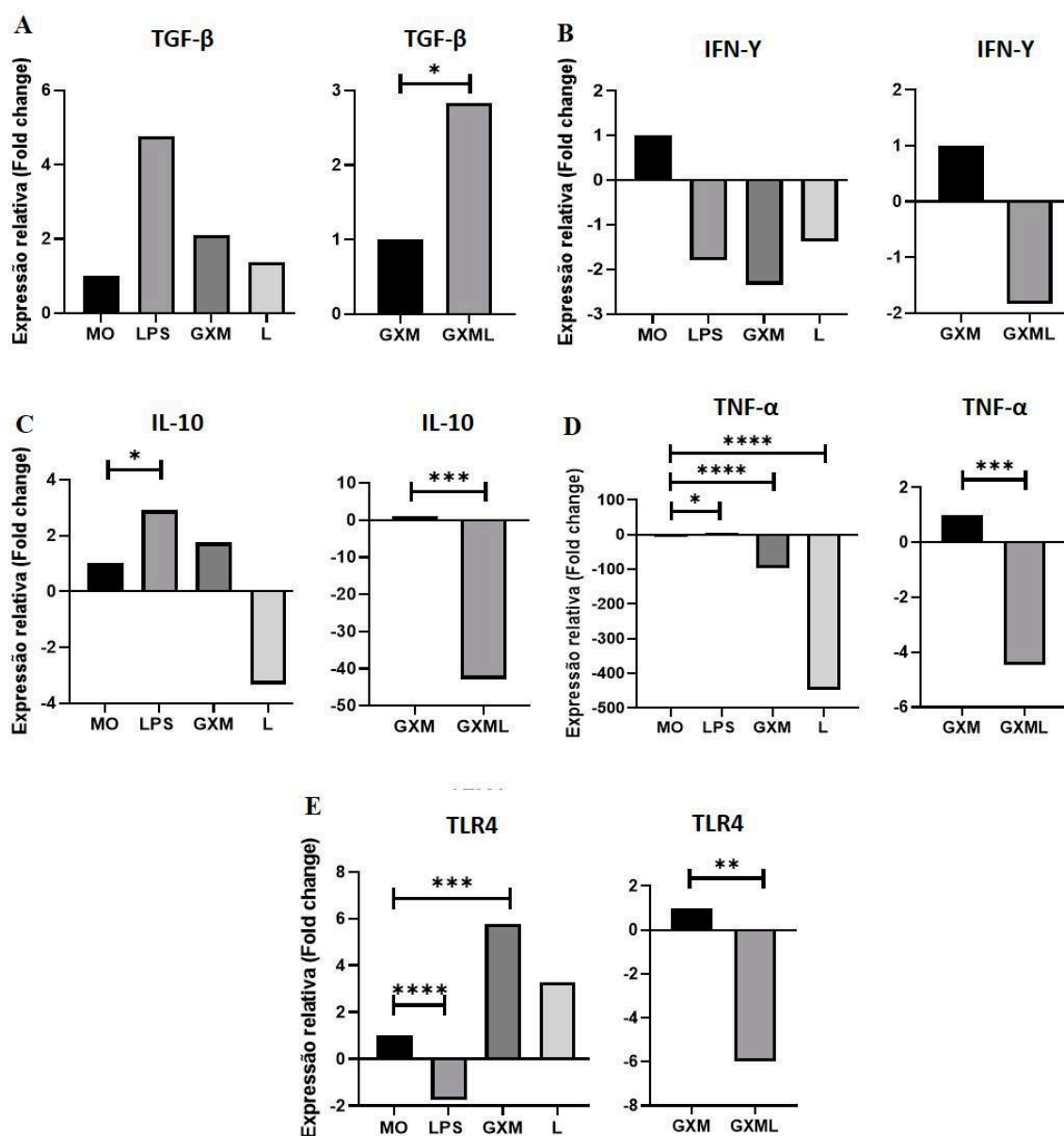


Figura 15. Perfil de Citocinas dos Macrófagos Felinos Fcwf-4. Macrófagos felinos foram tratados ou não com GXM, infectados ou não com *L. amazonensis* ou estimuladas com LPS [400ng/mL]. Após 24 horas, as células foram lisadas e submetidas à extração de RNA, síntese de cDNA e quantificação por PCR em tempo real da expressão de citocinas e receptores de reconhecimento padrão. Dados = um experimento em sextuplicata **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Os estudos sobre a resposta imune de felinos frente à infecção por *Leishmania* ainda são escassos, e essa lacuna de conhecimento limita a compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos, bem como o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção,

diagnóstico e tratamento. A padronização de um modelo experimental baseado na linhagem Fcwf-4 nos permite estudar de forma controlada aspectos iniciais relevantes dessa interação, mimetizando condições naturais de infecção e torna possível a avaliação de processos de imunomodulação.

O uso de modelos celulares em infecções *in vitro* é uma ferramenta importante para explorar os aspectos da biologia da *Leishmania*. Estudos mostram que linhagem de macrófagos de diferentes espécies são permissivas à infecção por esse parasita, então, dentro deste cenário utilizamos a linhagem Fcwf-4 que possui características semelhantes às dos macrófagos felinos, permitindo dessa forma a investigação dos aspectos relacionados à infecção pela espécie *L. amazonensis*. Nossos resultados mostram que as células Fcwf-4 foram capazes de interagir com *L. amazonensis* em todos os tempos de infecção (2, 24 e 48 horas), também é observado uma tendência a diminuição da porcentagem de macrófagos infectados nos tempos de 24 e 48 horas quando comparados ao tempo de 2 horas, sugerindo que apesar de não eliminar o parasita, existe um possível controle da infecção. Assim como a Fcwf-4 é capaz de interagir, outros estudos também mostram essa interação, como macrófagos derivados de monócitos humanos (Silva et al., 2015), macrófagos peritoneais de camundongos (Teles et al., 2015) e macrófagos de linhagem canina DH82 e murina RAW264.7 (Nades et al., 2020). Trabalhos recentes mostram que macrófagos felinos derivados de monócitos de sangue tem a capacidade de permanecerem infectados por *L. infantum*, espécie majoritariamente encontrada nesses animais e *L. tarentolae*, espécie encontrada em répteis (Mendonza-Roldan et al., 2025). Na presença de GXM observamos um índice de infecção maior comparado a células infectadas sem a presença de GXM. Segundo Ferreira-dos-Santos et al. (2025) há aumento significativo em macrófagos murinos infectados por *L. major* tratados com GXM em relação aos não tratados, esse resultado corrobora com o índice de infecção no período de 24 e 48 horas encontrado neste estudo, demonstrando que o GXM pode influenciar no aumento da infecção por *L. amazonensis* em macrófagos felinos. Segundo Decote-Ricardo et al. (2019), um dos mecanismos observados no polissacarídeo é sua capacidade de contribuir para uma supressão imunológica, reduzindo a resposta imune do hospedeiro através da secreção de IL-10 que é um potente supressor de citocinas pró-inflamatórias, interferindo na imunidade inata da célula.

Foi observada alta viabilidade celular em todas as condições [infectadas por *L. amazonensis* (L), tratadas com o polissacarídeo (GXM) e células infectadas com *L. amazonensis* e tratadas (GXM+L)] nos tempos de 24 e 48 horas. Esse resultado indica que o tratamento com o polissacarídeo e a infecção pelo parasita não são citotóxicos para os

macrófagos Fcwf-4, pois uma redução no número de células viáveis estaria relacionada a morte celular induzida pelo tratamento com GXM ou pela infecção com *L. amazonensis*. Esse resultado se mostra altamente relevante, uma vez que, alterações na viabilidade poderiam influenciar diretamente a interpretação dos resultados das outras análises realizadas durante este estudo. Em um estudo realizado por Ferreira-dos-Santos et al. (2025) os autores demonstraram que o GXM não é tóxico para macrófagos peritoneais murinos quando tratados com dosagens ≤ 300 $\mu\text{g/mL}$ no tempo de 24 horas. Apesar de não apresentar dados específicos de viabilidade em macrófagos de linhagem infectados por *Leishmania* spp., é possível encontrar na literatura vários trabalhos usando modelos *in vitro* de macrófagos de linhagem para estudos com esse hospedeiro, como macrófagos murinos RAW 264.7 (Kolodziej & Kiderlen., 2005; Maity et al., 2023; Banerjee et al., 2022) e macrófagos caninos DH82 (Mas et al., 2022; Buffi et al., 2022).

Os parasitos internalizados conseguem ou não se manter no ambiente intracelular dependendo dos mecanismos efetores exercidos pelos macrófagos, podendo contribuir para o controle da infecção. Desta forma, é importante avaliar a carga parasitária para observar se há uma eliminação efetiva do parasita ou se estes permanecem viáveis e são capazes de proliferar. Em relação ao número de parasitos viáveis recuperados dos macrófagos felinos tratados ou não com GXM, em todos os tempos (3, 5 e 7 dias), não foi observada diferença significativa, porém, os resultados indicam uma tendência ao aumento do número de parasitos ao longo dos dias, indicando viabilidade e capacidade expansão destes parasitos. A carga parasitária de *L. amazonensis* em macrófagos murinos RAW 264.7 foi relatada 4,3x menor em comparação a infecção em macrófagos caninos DH82 no período de 48 horas, evidenciado uma diferença espécie específica da atividade dos macrófagos. Já resultados com GXM, Ferreira-dos-Santos et al. (2025) demonstram uma maior carga parasitária de *L. major* em macrófagos peritoneais murinos com 12 dias na presença de GXM, sugerindo comprometimento na eliminação do parasita causada por este polissacarídeo

Os macrófagos produzem ROS e NO como resposta a ativação por estímulos inflamatórios, eles atuam principalmente como mecanismos microbicidas no controle dos patógenos intracelulares, dentro deste contexto, ROS e NO representam um dos principais mecanismos de eliminação da *Leishmania* spp., sendo frequentemente utilizado o LPS em experimentos para induzir essa resposta pró-inflamatória e estimular a produção dessas moléculas (Yunna et al., 2020). Segundo Ponti et al. (2001) linfócitos felinos ativados podem expressar L-arginina CAT-2, que é responsável pelo transporte de L-arginina (o precursor biossintético de NO) para o interior das células. Os resultados preliminares indicaram um

aumento da produção de nitrito em células estimuladas com LPS em comparação com as células controle e uma redução em comparação às células estimuladas com LPS e infectadas por *L. amazonensis* (LPS+L), tratadas com GXM (GXM+LPS) e infectadas e tratadas (GXM+LPS+L), o que sugere que durante a infecção por *L. amazonensis* e o tratamento com o polissacarídeo existe uma interferência na ativação induzida por LPS nos macrófagos, onde ocorre uma redução da capacidade microbicida da célula e favorece mecanismos de evasão do parasita, resultando em um ambiente intracelular mais permissivo para a sua sobrevivência. Assim como apresentado por Balestieri et al. (2002), onde células de linhagem murina J774-G8 estimuladas por LPS tiveram um aumento da produção de nitrito, já as células estimuladas por LPS e infectadas por *L. amazonensis* apresentaram uma redução acentuada. Macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. major* e tratados com GXM não apresentaram aumento significativo da produção de NO (Ferreira-dos-Santos et al., 2025).

Na avaliação de ROS foram observados um aumento na produção em células estimuladas com LPS e uma redução em células tratadas com GXM, em relação às células controle. Células de linhagem canina DH82 estimuladas com LPS e IFN- γ apresentaram aumento da produção de ROS, enquanto células nas mesmas condições, porém tratadas GXM, foram capazes de induzir uma diminuição significativa da produção de ROS (LaRocque-de-Freitas et al., 2024), o que sugere que o polissacarídeo promove uma imunomodulação negativa nas células. Além disso, a produção de ROS foi reduzida em células estimuladas com LPS e infectadas por *L. amazonensis* (LPS+L), tratadas com GXM (GXM+LPS) e infectadas e tratadas (GXM+LPS+L), em comparação com as células estimuladas com LPS. Não houve diferença significativa das células infectadas por *L. amazonensis* em comparação ao controle, dados esses diferentes aos achados por Nadaes et al. (2020), em células murinas RAW264.7, onde as células apresentaram um aumento de 5 vezes na produção de ROS em células infectadas por *L. amazonensis* em relação ao controle. Desta forma, os dados encontrados neste estudo sugerem que o LPS estimula a produção de ROS como parte da resposta imune inata, porém, a presença da *L. amazonensis* e do polissacarídeo GXM podem reduzir essa resposta, supostamente por meio de mecanismos de imunomodulação limitando a ativação microbicida dos macrófagos.

A *Leishmania* dispõe de estratégias para inverter os mecanismos microbicidas ativados pelas células, onde são capazes de promover a indução de citocinas imunossupressoras, como TGF- β e IL-10 citocinas relacionadas a desativação das funções dos macrófagos (Costa-da-Silva et al., 2022). Observou-se uma diferença significativa em células tratadas com GXM que mostrou uma redução na expressão de TGF- β em comparação a

células tratadas e infectadas por *L. amazonensis* (GXM+L). Resultados obtidos na expressão TGF- β em macrófagos murinos RAW264.7 aumentaram 2 vezes a expressão em comparação com células controle não infectadas (Nadaes et al., 2020). Em macrófagos caninos DH82, o TGF- β aumentou 1,8 vezes em células tratadas com GXM em relação a células não tratadas (LaRocque-de-Freitas et al., 2024) e em macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. major* e tratados com GXM também houve um aumento da expressão (Ferreira-dos-Santos et al., 2025).

A análise da expressão de IL-10 é fundamental, uma vez que esta citocina está ligada a progressão das leishmanioses, pois níveis elevados de IL-10 contribuem para a replicação do parasita nos macrófagos inibindo mediadores pró-inflamatórios, como IFN- γ e NO (Silva et al., 2022). O resultado mostrou um aumento significativo das células estimuladas com LPS em relação às células controle e uma redução em células tratadas com GXM e tratados com GXM e infectados com *L. amazonensis*. A infecção por *L. donovani* e *L. major* e o estímulo de LPS+IFN- γ induziram a expressão de IL-10 em células murinas RAW264.7 (Kolodziej & Kiderlen, 2005), em concordância com o resultado, Nadaes et al.(2020) mostraram que células murinas RAW264.7 e caninas DH82 infectadas por *L. amazonensis* e *L. infantum* estimuladas por LPS aumentaram a expressão de IL-10. Os dados desse estudo não apontam diferença estatística entre as células controle e células tratadas com GXM, diferindo dos dados encontrados por Ferreira-dos-Santos et al.(2025), que mostram que em macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. major* e tratados com GXM houve um aumento da expressão. A diferença observada entre a resposta das células murinas RAW264.7 e caninas DH82 para a resposta da célula felina Fcwf-4 pode estar associada as condições do estímulo utilizado no modelo experimental, nas variações do tipo celular e/ou na espécie de origem. Além disto, é possível sugerir que a infecção das células Fcwf-4 pelo parasita sem outro estímulo, como o LPS, pode não ser suficiente para induzir uma ativação celular significativa.

A expressão de IFN- γ é fundamental para a eliminação dos parasitos pelos macrófagos, pois promovem a ativação do perfil M1, aumentando a produção de NO e assim, favorecendo a morte do parasita (Abdoli et al., 2017). O resultado obtido da expressão de IFN- γ não apresentou nenhuma diferença significativa. A interação entre macrófagos e *Leishmania*, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ) é feita através da diferenciação de macrófagos em M1, onde possui um aumento de ROS resultando em morte do parasita *Leishmania* (Almeida et al., 2023). Um estudo feito com macrófagos felinos Fcwf-4 com interação de cepas bacterianas isoladas de felinos (*Lactobacillus rhamnosus* e *Bifido bacterium animalis* subsp. *lactis*), mostra que essa célula reduziu a expressão de IFN- γ

em ambos os tratamentos (Jang et al., 2024). Essa divergência no resultado pode estar associada ao estímulo.

Resultados preliminares deste estudo mostraram uma redução na expressão de TNF- α em todas as condições. Essa citocina é produzida principalmente após a ativação dos macrófagos e possui funções como citotoxicidade, inflamação, remodelamento tecidual e defesa contra microrganismos (Da-Cruz et al., 1996). Os dados apresentados por Souza et al. (2010), mostram que LPS+ IFN- γ é capaz de estimular a expressão de TNF- α em macrófagos humanos infectados por *L. braziliensis*; e Takano et al. (2007), onde células mononucleares do sangue periférico felino (PBMC) expressaram significativamente TNF- α em culturas infectadas pelo vírus da peritonite infecciosa felina. Em macrófagos peritoneais murinos infectados por *L. major* e tratados com GXM não foi observada diferença na expressão (Ferreira-dos-Santos et al., 2025). A infecção por *L. donovani* e *L. major* com ou sem o estímulo de LPS+IFN- γ induziram a expressão de TNF- α em células murinas RAW264.7 (Kolodziej & Kiderlen, 2005). Em macrófagos felinos Fcwf-4, com interação da cepa bacteriana *Lactobacillus rhamnosus*, mostraram uma redução significativa da expressão de TNF- α (Jang et al., 2024). Desse modo, os dados apontam que o TNF- α tem uma menor expressão em células de linhagem felina Fcwf-4, diferente dos macrófagos humanos, das células RAW264.7 ou de macrófagos peritoneais murinos podendo ser relacionado às variações do tipo celular, da espécie ou do estímulo realizado.

O TLR-4 é descrito como um receptor importante para a ativação da imunidade inata e na modulação da resposta adaptativa durante a leishmaniose. Esse receptor reconhece padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) da *Leishmania* que contribui para o controle da infecção (Rasouli et al., 2012). No estudo foi observado uma redução da expressão de TLR-4 em macrófagos felinos estimulados com LPS e um aumento na expressão em células tratadas com GXM, quando comparados com o controle, e uma diminuição das células tratadas com GXM e infectados com *L. amazonensis* em comparação as células tratadas com GXM. Segundo Chandel et al.(2014), observaram que a expressão de receptores Toll-like sob estímulo de CD40 em macrófagos murinos, derivados de BALB/c infectados por *L. major*, que apenas TLR-9 teve sua expressão aumentada em relação ao grupo não infectado. A molécula CD40 é importante para a ativação de APCs, e desempenha papel na resposta contra *Leishmania*, promovendo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de células Th1, que são essenciais para a eliminação do parasita. A ativação de CD40 aumenta a expressão de TLR-9, formando um mecanismo que reforça a resposta imune protetora (Chandel et al. 2014). Em relação aos resultados obtidos, de expressão de TLR-4, não foram

encontrados dados na literatura que pudessem contribuir com a discussão, mas infere-se que a supressão de TLR-4 pode contribuir para a evasão imune de *Leishmania*.

Os nossos resultados demonstram pela primeira vez a interação entre *L. amazonensis* e macrófagos de linhagem felina Fcwf-4e apontam para uma dinâmica em que o parasita é capaz de modular a célula hospedeira. O tratamento com o polissacarídeo GXM sugere a persistência intracelular do protozoário, comprometendo mecanismos celulares para o controle da infecção, como a produção de ROS e NO. Não existem estudos que mostrem a interação desta linhagem celular com *Leishmania* e poucos são os estudos envolvendo características desta célula. Assim, é de suma importância que esses dados mostrem a capacidade deste modelo celular para novas pesquisas.

6. CONCLUSÃO

Este estudo demonstra pela primeira vez que os macrófagos felinos Fcwf-4 são capazes de interagir com promastigotas de *L. amazonensis* e os parasitos permanecem viáveis por pelo menos 48 horas no interior desses macrófagos. Os dados também mostram que na presença do polissacarídeo GXM de *C. neoformans* há uma imunomodulação da resposta, favorecendo a sobrevivência intracelular do parasita. A presença do polissacarídeo GXM altera os mecanismos microbicidas, como a produção de NO e ROS, e reduz a ativação pró-inflamatória dos macrófagos. Esses achados destacam o modelo Fcwf-4 como relevante para o estudo das interações hospedeiro-parasita e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas bem como se apresenta como uma excelente ferramenta para aprofundar estudos sobre a leishmaniose felina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, C. et al. The potential use of exosomes in anti-cancer effect induced by polarized macrophages. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 3, p. 1024, 22 mar.2023. DOI: 10.3390/pharmaceutics15031024.

ABDOLI, A. et al. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: a double edged sword of IL-10 and TGF- β . **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 51, p. 15–26, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2017.02.001>

ALAZAWY, A. et al. Ultrastructure of *Felis catus* whole fetus (Fcwf-4) cell culture following

infection with feline coronavirus. **Journal of Electron Microscopy (Tokyo)**, v. 60, n. 4, p. 275-282, 2011. DOI: 10.1093/jmicro/dfr031.

ALMEIDA, F. S. et al. Leishmaniasis: immune cells crosstalk in macrophage polarization. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 276, 15 mai. 2023. DOI: 10.3390/tropicalmed8050276.

ANSARI, Z. et al. Comprehensive insights into leishmaniasis: from etiopathogenesis to a novel therapeutic approach. **Microbial Pathogenesis**, v. 204, p. 107535, jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107535>.

ASSIS, L. H. C. et al. Cell cycle, telomeres, and telomerase in *Leishmania* spp.: what do we know so far? **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3195, 16 nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113195>.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Fcwf-4 [Fcwf] — CRL-2787. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/crl-2787>. Acesso em: 01 dez. 2025.

ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1801, 19 jun. 2018. DOI: 10.3390/ijms19061801.

BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania*(*L.*)*amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 1, p. 23-29, jan. 2002. DOI: 10.1016/s1286-4579(01)01505-2.

BÁLINT, Á. et al. Molecular characterization of feline infectious peritonitis virus strain DF-2 and studies of the role of ORF3abc in viral cell tropism. **Journal of Virology**, v. 86, n. 11, p. 6258-6267, jun. 2012. DOI: 10.1128/JVI.00189-12.

BANERJEE, S. et al. *Leishmania donovani* infection induce extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ (ERK $\frac{1}{2}$) mediated lipid droplet generation in macrophages. **Molecular Immunology**, v. 141, p. 328-337, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.molimm.2021.12.008.

BANETH, G. et al. Leishmania infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, p. 115, 20 mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-020-3989-3>.

BOUTILIER, A. J.; ELSAWA, S. F. Macrophage polarization states in the tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 13, p. 6995, 29 jun. 2021. DOI: 10.3390/ijms22136995.

BUFFI, G. et al. The host micro-RNA cfa-miR-346 is induced in canine leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 18, n. 1, p. 247, 27 jun. 2022. DOI: 10.1186/s12917-022-03359-5.

CERNA, P. et al. Comparison of antiviral immune responses in healthy cats induced by two immune therapeutics. **Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 602, 22 jul. 2024. DOI: 10.3390/pathogens13070602.

CHANDEL, H. S. et al. Toll-like receptors and CD40 modulate each other's expression affecting *Leishmania major* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 2, p. 283-290, mai. 2014. DOI: 10.1111/cei.12264.

CHOI, H. L. et al. The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 2, e0009181, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009181>.

COELHO, W. M. et al. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. **Parasitology Research**, v. 109, n. 4, p. 1009-1013, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2461-x>.

COOK, S. et al. Serotype I and II feline coronavirus replication and gene expression patterns of feline cells—building a better understanding of serotype I FIPV biology. **Viruses**, v. 14, n. 7, p. 1356, 22 jun. 2022. DOI: 10.3390/v14071356.

CRAWFORD, C. J. et al. Semisynthetic glycoconjugate vaccine candidates against

Cryptococcus neoformans. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 2089-2100, 14 jun. 2024. DOI: 10.1021/acsinfecdis.4c00094.

CRMV-SP - CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Série Zoonoses: leishmaniose visceral. São Paulo, CRMV-SP, 01 fev. 2016. Disponível em: <https://crmvsp.gov.br/serie-zoonoses-leishmaniose-visceral/>. Acesso em: 5 fev. 2026.

CRUVINEL, W. M. et al. Sistema Imunitário – Parte I: Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DA-CRUZ, A. M. et al. Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, v. 91, n. 2, p. 225–229, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761996000200019>

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, nov./dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>.

DECOTE-RICARDO, D. et al. Immunomodulatory role of capsular polysaccharides constituents of *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers in Medicine**, v. 6, p. 129, 19 jun. 2019. DOI: 10.3389/fmed.2019.00129.

DIJKGRAAF, E. M. et al. Chemotherapy alters monocyte differentiation to favor generation of cancer-supporting M2 macrophages in the tumor microenvironment. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2480-2492, 15 abr. 2013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3542.

EPELMAN, S.; LAVINE, K. J.; RANDOLPH, G. J. Origin and functions of tissue macrophages. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 21-35, 17 jul. 2014. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.013.

FERREIRA-DOS-SANTOS, I. M. et al. The capsular polysaccharides GXM and GXMGal from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophages infected with *Leishmania major*.

Microorganisms, v. 13, n. 10, p. 2272, 28 set. 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13102272.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Leishmaniose. Disponível em: <https://fiocruz.br/taxonomia-geral-05-doencas/leishmaniose>. Acesso em: 04 fev. 2026.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Leishmanioses. Belo Horizonte: Fiocruz Minas, [s.d.]. Disponível em: <https://minas.fiocruz.br/leishmanioses>. Acesso em: 04 fev. 2026.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets Inflammation & Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, jun. 2005. DOI: 10.2174/1568010054022024.

FUNES, S. C. et al. Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology**, v. 154, n. 2, p. 186-195, jun. 2018. DOI: 10.1111/imm.12910.

GALATI, E. A. B. Morfologia e taxonomia: morfologia, terminologia de adultos e identificação dos táxons da América. In: RANGEL, E. F.; LAINSON, R. (Org.). **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003. p. 53–175.

GONDIM, N. M.; LIMA, T. S. N. S. **Leishmaniose felina: revisão de literatura**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) — Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, Juazeiro do Norte-CE, 2023. Disponível em: <https://sis.unileao.edu.br/uploads/3/MEDICINA-VETERINARIA/MV70.pdf>.

GUIMARÃES-DE-OLIVEIRA, J. C. et al. Immunomodulatory effects of *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharides on macrophage infected with *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 271, p. 107849, nov. 2025. DOI: 10.1016/j.actatropica.2025.107849.

IATTA, R. et al. A nationwide survey of *Leishmania infantum* infection in cats and associated risk factors in Italy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, e0007594, 15 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007594>.

JACOBSE-GEELS, H. E.; HORZINEK, M. C. Expression of feline infectious peritonitis coronavirus antigens on the surface of feline macrophage-like cells. **Journal of General**

Virology, v. 64, n. 9, p. 1859-1866, set. 1983. DOI: 10.1099/0022-1317-64-9-1859.

JANG, H. J.; KIM, J. A.; KIM, Y. Characterization of feline-originated probiotics *Lactobacillus rhamnosus* CACC612 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CACC789 and evaluation of their host response. **BMC Veterinary Research**, v. 20, n. 1, p. 128, 1 abr. 2024. DOI: 10.1186/s12917-024-03975-3.

KIDA, K. et al. Neutralization of feline infectious peritonitis virus: preparation of monoclonal antibody that shows cell tropism in neutralizing activity after viral absorption into the cells. **Archives of Virology**, v. 145, n. 1, p. 1-12, 2000. DOI: 10.1007/s007050050001.

KMETIUUK, L. B. et al. *Leishmania* spp. in indigenous populations: A mini-review. **Frontiers in Public Health**, Lausanne, v. 10, e1033803, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1033803>.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2056-2071, set. 2005. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.01.011.

LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of *trypanosomatids*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 115, n. 1, p. 1–17, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00262-6](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00262-6).

LAROCQUE-DE-FREITAS I. F. et al. Inhibition of Microbicidal Activity of Canine Macrophages DH82 Cell Line by Capsular Polysaccharides from *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 5, p. 339, 8 mai. 2024. DOI: 10.3390/jof10050339.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2238, p. 1376, 21 nov. 1903. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2238.1376-a>.

LEISHVET. Abrief for the practicing veterinarian: feline leishmaniosis. 6. ed., Special ALIVE 2 Edition. [S.l.], mar. 2024. 15 p.

LI, M. et al. Metabolism, metabolites, and macrophages in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 16, n. 1, p. 80, 25 jul. 2023. DOI: 10.1186/s13045-023-01478-6.

LINSE, K. P.; BOGDAN, C.; HAENSSLE, H. A.; TOBERER, F. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* infection. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 102, eadv00748, 2022. DOI: <https://doi.org/10.2340/actadv.v102.2321>.

LODE, J. V. L. et al. IL-12 and IFN- γ in response to *Leishmania infantum* antigens in felines from an endemic area for visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 47, n. 8, e70021, ago. 2025. DOI: 10.1111/pim.70021.

LUIZ, A. L. G.; ARAÚJO, M. L. B.; CUNHA, P. R. S. **Leishmaniose em Felinos: Revisão de Literatura**. 2022. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Brasileiro, Recife, PE, 2022. Disponível em: <https://www.grupounibra.com/repositorio/MVETI/2022/leishmaniose-em-felinos-revisao-de-literatura58.pdf?utm>.

LUO, M. et al. Macrophage polarization: an important role in inflammatory diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1352946, 10 abr. 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1352946.

MAEKAWA, N. et al. Molecular characterization of feline immune checkpoint molecules and establishment of PD-L1 immunohistochemistry for feline tumors. **PLoS One**, v. 18, n. 1, p. e0281143, 26 jan. 2023. DOI: 10.1371/journal.pone.0281143.

MAITY, S.; SENGUPTA, S.; SEN, M. Therapeutic potential of rWnt5A in curbing *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 91, n. 10, e00267-23, 19 set. 2023. DOI: 10.1128/iai.00267-23.

MAS, A. et al. Transcriptomic profile of canine DH82 macrophages infected by *Leishmania infantum* promastigotes with different virulence behavior. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1466, 27 jan. 2022. DOI: 10.3390/ijms23031466.

MCFADDEN, D. C.; DE JESUS, M.; CASADEVALL, A. The physical properties of the capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* suggest features for capsule construction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 4, p. 1868-1875, 27 jan. 2006. DOI: 10.1074/jbc.M509465200.

MENDONÇA, I. L. et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 280, p. 109058, abr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109058>.

MENDOZA-ROLDAN, J. A. et al. *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* in outdoor cats and report of infection in feline-derived peripheral blood mononuclear cells. **Parasites & Vectors**, v. 18, p. 361, 26 ago. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-025-06983-w>.

Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: volume 56, nº 17. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2025/boletim-epidemiologico-volume-56-no-17.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2026.

Ministério da Saúde. Saúdelança painéis para monitorar leishmanioses no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/setembro/saude-lanca-paineis-para-monitorar-leishmanioses-no-brasil>. Acesso em: 04 fev. 2026.

Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral. Brasília, DF: Ministério da Saúde, [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 04 fev. 2026.

MHADHBI, M.; SASSI, A. Infection of the equine population by *Leishmania parasites*. **Equine Veterinary Journal**, v. 52, n. 1, p. 28–33, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/evj.13178>.

MORAIS, C. S. M. 2014. **Revisão de literatura: Leishmaniose Felina**. 2014. 25 f.

Monografia- Fundação educacional Jayme de Altavila de Maceió, no programa de Pósgraduação de especialização em clínica médica de felinos, São Paulo, 2014.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, set. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(02)02347-4)

NADAES, N. R. et al. DH82 canine and RAW264.7 murine macrophage cell lines display distinct activation profiles upon interaction with *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 247, 12 jun. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00247.

NASCIMENTO, L. F. J. et al. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology Research**, v. 121, n. 1, p. 21-34, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07372-9>

NASCIMENTO, L. F. J. et al. Feline leishmaniasis in an animal shelter in northeastern Brazil: clinical aspects, coinfections, molecular detection, and serological study of a new recombinant protein. **Research in Veterinary Science**, v. 172, p. 105256, jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105256>

NGAMBENJAWONG, C.; GUSTAFSON, H. H.; PUN, S. H. Progress in tumor-associated macrophage (TAM)-targeted therapeutics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 114, p. 206-221, 15 mai. 2017. DOI: 10.1016/j.addr.2017.04.010

OLIVEIRA, I. N. **Estudo soroepidemiológico e parasitológico da leishmaniose felina atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal da Paraíba**. 2019. 25 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/14978?locale=pt_BR.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniose visceral. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose/leishmaniose-visceral>. Acesso em: 4 fev. 2026.

OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmaniose. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose>. Acesso em: 07 jan. 2026.

ORECCHIONI, M. et al. Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1084, 24 mai. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01084.

PENG, Y. et al. Regulatory mechanism of M1/M2 macrophage polarization in the development of autoimmune diseases. **Mediators of Inflammation**, v. 2023, art. 8821610, 8 jun. 2023. DOI: 10.1155/2023/8821610.

PENNISI, M. G. et al. Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 611-618, jul. 2013. DOI: 10.1177/1098612X13489224.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: is the cat a small dog? **Veterinary Parasitology**, v. 251, p. 131-137, 15 fev. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.01.012>

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 8, p. 302, 4 jun. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0909-z>

PEREIRA, A.; MAIA, C. *Leishmania infection* in cats and feline leishmaniosis: an updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 1, p. 100035, 2 jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100035>

PEREIRA, M. A. M. **Neutrophil-Leishmania interaction during the initial phase of Leishmania infantum infection in dogs**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Biomédicas – especialização em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa, 2016. Disponível em: <https://share.google/DBw0nmRGXO5GPIZsp>. Acesso em: 4 fev. 2026.

PERFECT, J. R.; CASADEVALL, A. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 16, n. 4, p. 837-874, v-vi, dez. 2002. DOI: 10.1016/s0891-5520(02)00036-3.

PINELLI, E. et al. Leishmania infantum-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 6, p. 1594-1600, jun. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.1830250619>

PIRAJÁ, G. V. et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 2, p. 203-216, jun. 2013. ISSN 0102-5716 (impresso), ISSN 2178-3764 (eletrônico). Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/ec18e558-df0b-4c4e-b07c-92c6269843a0/content>

PONTI, W.; RUBINO, T.; BARDOTTI, M.; POLI, G.; PAROLARO, D. Cannabinoids inhibit nitric oxide production in bone marrow derived feline macrophages. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 82, n. 3-4, p. 203-214, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00357-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00357-9)

PRIOLO, V. et al. Association between feline immunodeficiency virus and *Leishmania infantum* infections in cats: a retrospective matched case-control study. **Parasites & Vectors**, v. 15, n. 1, p. 107, 10 maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05230-w>

PRIOLO, V. et al. Leishmania infantum-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniosis is endemic. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 133, 26 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3386-y>

RASOULI, M. et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) polymorphisms in Iranian patients with visceral leishmaniasis. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 12, p. 10795-10802, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1973-5>

ROBERT-TISSOT, C. et al. Induction of a systemic antiviral state in vivo in the domestic cat with a class A CpG oligonucleotide. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.

150, n. 1-2, p. 1-9, 15 nov. 2012. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.07.015.

ROCHA, M. N. **Desenvolvimento de uma metodologia semi-automatizada para busca de novas drogas utilizando *Leishmania amazonensis* fluorescente**. 2013. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde área de concentração Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2013. Acesso em: 4 fev. 2026.

RODRIGUES, C. A. et al. Peripheral blood mononuclear cell supernatants from asymptomatic dogs immunized and experimentally challenged with *Leishmania chagasi* stimulate canine macrophages to reduce infection in vitro. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 197-205, 28 fev. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.09.003>.

RODRIGUES, M. L. et al. Fungal polysaccharides: biological activity beyond the usual structural properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 171, 15 ago. 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00171.

RODRIGUES, M. L. et al. The still obscure attributes of cryptococcal glucuronoxylomannan. **Medical Mycology**, v. 47, n. 8, p. 783-788, dez. 2009. DOI: 10.3109/13693780902788621.

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, dez. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>.

RÖSZER, T. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 816460, 18 maio 2015. DOI: 10.1155/2015/816460.

SÁNCHEZ, C. I. S.; RODRÍGUEZ P. E.; CABANÁS VEGA, R. Lingual mucocutaneous leishmaniasis (Leishmaniasis mucocutánea lingual). **Acta Otorrinolaringologica**, v. 72, n. 6, p. 403-404, nov./dez. 2021. DOI: 10.1016/j.otoeng.2021.02.001.

SANCHEZ, M. A. et al. Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. **American**

Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 70, n. 6, p. 618-624, jun. 2004.

SANTOS, N. S. et al. Feline leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*: parasite sequencing, seropositivity, and clinical characterization in an endemic area from Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 734916, 25 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.734916>

SANTOS, R. L.; DE OLIVEIRA, A. R. Leishmaniasis in non-human primates: clinical and pathological manifestations and potential as reservoirs. **Journal of Medical Primatology**, v. 49, n. 1, p. 34-39, fev. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jmp.12441>.

SASIDHARAN, S.; SAUDAGAR, P. Leishmaniasis: where are we and where are we heading? **Parasitology Research**, v. 120, n. 5, p. 1541–1554, maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07139-2>.

SAVANI, E. S. et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229-233, 25 mar. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.008>.

SILVA, D T. **Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***. 2019. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2019. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-31102019-163848/publico/Diogo_Tiago_da_Silva_original.pdf. Acesso em: 4 fev. 2026.

SILVA, G. A. et al. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 1, p. 81-84, jan./fev. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100013>.

SILVA, I. A. JR. et al. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology,

complement resistance, and infectivity to human macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 393049, 2015. DOI: 10.1155/2015/393049

SILVA, R. R. et al. Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 12, p. 11136, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15377-2>

SILVA-MOREIRA, A. L. et al. New insights into the life cycle, host cell tropism, and infection amplification of *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 93, n. 7, e0012325, 8 jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00123-25>

SILVEIRA, F. T. et al. Revendo a trajetória da leishmaniose visceral americana na Amazônia, Brasil: de Evandro Chagas aos dias atuais. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v. 7, n. esp., dez. 2016. DOI: <https://doi.org/10.5123/s2176-62232016000500003>

SOARES, C. S.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What do we know about feline leishmaniosis? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 6, p. 435-442, jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1177/1098612X15589358>

SOARES, W. M. S. **Frequência de leishmaniose em felinos domésticos (*Felis catus*) atendidos no Hospital Universitário Veterinário da Universidade Federal da Paraíba (HUV-UFPB)**. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/30657/1/WMSS11072024%20-%20MV482.pdf#:~:text=uma%20crian%C3%A7a%20e%20um%20c%C3%A3o%2C%20portadores%20da,o%20qual%20identificou%20o%20parasita%20Leishmania%20sp>. Acesso em: 06.jan. 2026.

SOBRINHO, L. S. et al. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 302-306, 8 jun. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.010>

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. Erratum in: *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 459, 22 ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1598-y>

SOUZA, A. S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 10, p. 209, 15 jul. 2010. DOI: 10.1186/1471-2334-10-209.

SOUZA, M. R. et al. **Clínica Médica de Pequenos Animais**. 1. ed. Salvador, BA: Editora Sanar, 2020. (Coleção Manuais de Medicina Veterinária, v. 1), pp. 45-49.

SPADA, E. et al. Prevalence of *Leishmania infantum* and co-infections in stray cats in northern Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p. 53-58, abr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.03.001>

STEVEDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

SUNTER, J.; GULL, K.. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TANAKA, Y. et al. Suppression of feline coronavirus replication in vitro by cyclosporin A. **Veterinary Research**, v. 43, n. 1, p. 41, 30 abr. 2012. DOI: 10.1186/1297-9716-43-41

TAKANO, T. et al. TNF-alpha, produced by feline infectious peritonitis virus (FIPV)-infected macrophages, upregulates expression of type II FIPV receptor feline aminopeptidase N in feline macrophages. **Virology**, New York, v. 364, n. 1, p. 64-72, 20 jul. 2007. DOI: 10.1016/j.virol.2007.02.006

TELES, C. B. et al. A lupane-triterpene isolated from *Combretum leprosum* Mart. fruit extracts that interferes with the intracellular development of *Leishmania (L.) amazonensis* in vitro. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 165, 6 jun. 2015. DOI: 10.1186/s12906-015-0681-9

TELES, J. S. et al. Análise espacial da redução de casos novos de leishmaniose visceral no Brasil no primeiro ano da pandemia de COVID-19. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, supl. 1, XXIII Congresso Brasileiro de Infectologia, out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2023.103510>

TIRADO, T. C. et al. A comparative approach on the activation of the three complement system pathways in different hosts of Visceral Leishmaniasis after stimulation with *Leishmania infantum*. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 120, p. 104061, 2021. DOI: 10.1016/j.dci.2021.104061.

VERAS, P. S. T.; CASTRO-GOMES, T.; PERRONE DE MENEZES, J. Elucidating the complex interrelationship on early interactions between *Leishmania* and macrophages. **IntechOpen**. 2022. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.105468>

VIOLA, A. et al. The metabolic signature of macrophage responses. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1462, 3 jul. 2019. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01462

WALLER, R. F.; MCCONVILLE, M. J. Developmental changes in lysosome morphology and function in *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1435–1445, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00140-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00140-6)

WANG, L. X. et al. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 106, n. 2, p. 345-358, ago. 2019. DOI: 10.1002/JLB.3RU1018-378RR

WEERARATHNE, P. et al. The establishment of a novel in vitro system for culturing *Cytauxzoon felis*. **Pathogens**, v. 13, n. 7, p. 565, 4 jul. 2024. DOI: 10.3390/pathogens13070565.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 7 jan. 2026.

YUNNA, C. et al. Macrophage M1/M2 polarization. **European Journal of Pharmacology**, v.

877, p. 173090, 15 jun. 2020. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173090

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. 3-4, p. 353-359, 15 jun. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.02.022>

ZABIEGALA, A.; KIM, Y.; CHANG, K. O. Differential induction of PD-L1 expression in cells infected with feline infectious peritonitis virus and feline enteric coronavirus. **Virology**, v. 614, p. 110734, fev. 2026. DOI: 10.1016/j.virol.2025.110734.

ZARAGOZA, O. et al. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Advances in Applied Microbiology**, London, v. 68, p. 133-216, 2009. DOI: 10.1016/S0065-2164(09)01204-0.