

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE BIOCÊNCIAS

INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL
NAS INFECÇÕES POR *Leishmania* spp.

Aluna: Andressa Ândria Martins Ribeiro

Orientadora: Nadjar Nitz Silva Lociks De Araújo

Coorientadora: Dra. Mariana Machado Hecht

Brasília, 20 de janeiro de 2022

BRASÍLIA

2022



INFLUÊNCIA DA MICROBIOTA INTESTINAL
NAS INFECÇÕES POR *Leishmania* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.



Este trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências. Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: CAPES



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
LABORATÓRIO INTERDISCIPLINAR DE BIOCIÊNCIAS

Dissertação de Mestrado

Andressa Ândria Martins Ribeiro

Título:

Influência da microbiota intestinal nas infecções por *Leishmania* spp.

Banca examinadora:

Nadjar Nitz Silva Lociks De Araújo
Presidente/Orientadora PPGCM/UnB

Profa. Dra. Carla Nunes de Araújo

Membro Titular
PPGCM/UnB

Profa. Dra Tamires Emanuele Vital Silva

Membro Titular
Externo

Profa. Dra Tatiana Karla Borges
Membro suplente
PPGMT/UnB

Brasília, 20 de janeiro de 2022.

BRASÍLIA

2022

"Feliz o homem que encontrou a sabedoria, o homem que alcançou o entendimento! Ganhá-la vale mais que a prata, e o seu lucro mais que o ouro." (Provérbios 3:13-14)

"Só ele fez grandes maravilhas, porque eterno é o seu amor!" (Salmos 136(135):4)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Maria,

A minhas irmãs Ana Paula e
Amanda,

Aos meus sobrinhos Marcos e
Catarina,

E ao meu noivo Iuri.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e sabedoria que me levou até aqui.

À toda a minha família em especial a minha mãe Maria de Jesus que sempre me apoiou, ao meu pai João e minhas irmãs Ana Paula e Amanda, ao meu afilhado Marcos Antônio e minha sobrinha Catarina por sonharem comigo e sempre compreenderem com amor minhas ausências durante o processo, torcendo sempre pela minha realização.

Ao meu noivo Iuri, por ser meu amigo, companheiro e amor.

À minha orientadora, Nadjar Nitz por acreditar no meu potencial durante todo o processo, sempre com dedicação, paciência e atenção, sendo pra mim um exemplo de pesquisadora.

À minha coorientadora, Mariana Hecht, por toda a oportunidade e paciência, sempre enriquecendo o trabalho.

Aos professores, Ana de Cássia Rosa, Bruno Dallago, Luciana Hagström, Juliana Lott e Rosa Uenishi por todo conhecimento e tempo dedicado para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos que me acompanharam por toda a graduação e que continuaram na pós graduação, nos momentos felizes e nos mais difíceis, em especial a Gislaine Ribeiro, Nayra Suélen, Nélio Gomes e Thais Barros nos quais compartilhamos risos e desesperos.

Ao meu estagiário Carlito Junior por me ajudar, sendo sempre atencioso e eficiente, mesmo com tantas amostras e siglas.

Aos meus amigos, que mesmo sem entender o meu trabalho, sempre me escutaram e torceram por mim.

À todos da comunidade 08 do Caminho Neocatecumenal da Paróquia São Pio de Pietrelcina, por todas as orações e torcida por mim.

À todos do Laboratório: Aline, Bruna, Dani, Emanuella, Ester, Geysa, Isabella, Maria Clara, Marina, Marcelle, Moisés, Tamires, Tayane e Zenilda pelas risadas, os bons momentos, companhia e ajuda.

Enfim a todos do Laboratório Interdisciplinar de Biociências.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada representada por um amplo e complexo espectro clínico. A patogênese ainda não está plenamente compreendida, mas sabe-se que está associada a fatores do parasito e do hospedeiro. Nesse contexto, a resposta imune do hospedeiro atua de forma decisiva para o desfecho clínico da infecção. Desta forma, é muito importante conhecer os fatores que influenciam na resposta imune durante a leishmaniose. Sabe-se que a microbiota pode modular a resposta imunológica e influenciar o curso de diversas infecções, entretanto, o papel da microbiota sobre as leishmanioses ainda não foi amplamente investigado. Diante do exposto, o objetivo principal do nosso trabalho foi avaliar o papel da microbiota nas infecções causadas por diversas espécies de *Leishmania*. Para isso, nós realizamos uma revisão sistemática sobre a importância da microbiota da pele em camundongos na leishmaniose cutânea. Adicionalmente, realizamos ensaios *in vitro* com objetivo de avaliar a importância da microbiota intestinal nas infecções causadas por diversas espécies de *Leishmania*. Os resultados da nossa revisão sistemática demonstraram a lacuna no conhecimento sobre a influência da microbiota intestinal na leishmaniose cutânea, evidenciando a ausência de padronização dos modelos experimentais e dos métodos utilizados, o que levou a grandes diferenças nos resultados apresentados pelos estudos selecionados. De interesse, os experimentos *in vitro* mostraram que a presença de bactérias intestinais não alterou a carga parasitária nas culturas, entretanto, influenciaram na ativação dos macrófagos, alterando a produção de óxido nítrico e citocinas, dependendo da espécie de *Leishmania*. Assim, nossos achados reforçam a necessidade de expandir as investigações para melhor compreender o papel da microbiota na resposta imune do hospedeiro e no curso clínico da patologia, visando melhorar o tratamento e o acompanhamento de pacientes com leishmaniose.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease represented by a broad and complex clinical spectrum. The pathogenesis is not fully understood, but it is known that is associated with both parasite and host-related factors. In this context, the host immune response acts decisively for the clinical outcome of the infection. Thus, it is very important to identify the factors that influence the balance between the immune response against leishmaniasis. It is known that the microbiota can modulate the immune response and influence the clinical course of several infections, however, the role of the microbiota in leishmaniasis has not been widely investigated. Given the above, the main objective of our work was to evaluate the role of the intestinal microbiota in infections caused by different species of *Leishmania*. First, we revised systematically the importance of murine host microbiota during cutaneous leishmaniasis. Additionally, we carried out in vitro assays to evaluate the importance of the intestinal microbiota in infections caused by different species of *Leishmania*. The results of our systematic review demonstrated the gap in knowledge about the influence of the intestinal microbiota on cutaneous leishmaniasis, evidencing the lack of standardization of the experimental models and methods used, which led to great differences in the results presented by the selected studies. Of interest, the in vitro experiments showed that the presence of intestinal bacteria did not change the parasite load in the cultures, however, influenced the activation of macrophages, changing the production of NO and cytokines, depending on the species of *Leishmania*. Thus, our findings reinforce the need to expand investigations to better understand the role of the microbiota in the host's immune response and in the clinical course of the pathology, aiming to improve the treatment and follow-up of patients with leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Indicador Daly's - taxas padronizadas de anos de vida perdidos (YLL) para Leishmaniose visceral (A) e anos vividos com deficiência (YLD) para Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea (B) por 100.000 habitantes em 1990, 2000 e 2016 no Brasil.

Figura 02- Número de casos reportados de leishmaniose cutânea, no ano de 2019, segundo a OMS.

Figura 03- Número de casos de leishmaniose visceral reportados, no ano de 2019, segundo a OMS.

Figura 04- Representação morfológica das duas formas de vida da *Leishmania* spp.

Figura 05- Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

Figura 06- Ativação da resposta imunológica contra a *Leishmania* spp.

Figura 07- Manifestações clínicas da Leishmaniose.

Capítulo I

Figure 01- *Flowchart of study selection.*

Figure 02- *Level of the risk of bias of each included study according to the SYRCLE methodology.*

Capítulo II

Figura 08- Desenho representativo do co-cultivo dos macrófagos, bactérias e parasitos.

Figura 09- Curva Padrão da espécie de *Leishmania braziliensis*.

Figura 10- Curva Padrão de concentração de Nitrato.

Figura 11- Determinação da viabilidade celular frente as infecções por *Leishmania* spp. e co-cultivo com diferentes bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 12- Determinação da viabilidade celular frente as infecções por *Leishmania* spp. e co-cultivo com diferentes bactérias intestinais após 72 horas

Figura 13- Determinação da carga parasitaria em macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivo de bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 14- Determinação da carga parasitaria em macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivo de bactérias intestinais após 72 horas.

Figura 15- Produção de Óxido Nítrico por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 16- Produção de Óxido Nítrico por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72horas.

Figura 17- Produção de TNF α por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 18- Produção de TNF α por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas.

Figura 19- Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 20- Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas.

Figura 21- Produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas.

Figura 22- Produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 01- *Table 1- Characteristics of the included studies.*

Tabela 02- *Table 2- Main conclusions of the selected studies.*

Tabela 03- *Supplementary Table 1 - key words used for the search strategy, based on the PRISMA guidelines.*

Tabela 04- *Supplementary table 02 - Articles excluded and the reasons for exclusion (n= 8)*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ON- Oxido Nítrico

IFN γ - Interferon γ

LC- Leishmaniose Cutânea

LV-Leishmaniose Visceral

OMS-Organização Mundial da Saúde

CP_s- Cisteína Proteinase

dsRNA- RNA de dupla fita

TLR3- Toll Like 3

NF- κ B- Factor Nuclear Kappa β

LRV1- *Leishmania* RNA Vírus 1

LRV2- *Leishmania* RNA Vírus 2

KDNA- DNA do cinetoplasto

IL- Interleucinas

FC γ R- Receptor da porção Fc da imunoglobulina G

GLP- Lipofosfoglicano

GP63- Metaloprotease

Nets- Neutrófilos extracelulares

iNOs- Oxido Nítrico Sintase

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular-1

TH1- *T helper* 1

TH2- *T helper* 2

Células NK- Células *Natural Killer*

Células T reg- Células T reguladoras
TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta
IgG- Imunoglobulina G
IgA- Imunoglobulina A
C5b-9- Enzima do sistema complemento
MMP-9- Metaloprotease da matriz celular
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
IFI- Imunofluorescência indireta
ELISA- Ensaio imunoenzimático
IRM- Intradermorreação de Montenegro
ATP- Adenosina trifosfato
Sb⁺⁵- Antimoniais pentavalentes
SCFAS- Ácidos graxos de cadeia curta
IEL- Linfócitos intraepiteliais
SFB- Soro Fetal Bovino
DMEM- Meio Dulbecco MEM
RPMI- Meio Roswell Park Memorial Institute
NNN- Meio Novy, Macneil, Nicolle
MRS- Meio de Man, Rogosa e Sharpe
PBS- Tampão Fosfato-Salino
CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute
qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

Sumário

Introdução	1
1. Leishmaniose	1
1.1 Histórico	1
1.2 Epidemiologia	2
1.3 Agente Etiológico	7
1.4 Ciclo de Vida.....	8
1.5 Resposta Imunológica.....	10
1.6 Manifestações Clínicas.....	15
1.7 Diagnóstico.....	18
1.8 Tratamento.....	20
2. Microbiota	21
1.9 Microbiota e o Metabolismo	23
1.10 Microbiota e a Imunidade	24
II. JUSTIFICATIVA	28
III. OBJETIVOS	29
Objetivos específicos	29
Capítulo I	31
The role of host microbiota in cutaneous leishmaniasis: A systematic review	31
1. Introduction.....	32
2. Methodology	33
2.1 Eligibility criteria	34
2.2 Information sources.....	34
2.3 Search strategy.....	34
2.4 Selection process.....	35
2.5 Data collection process and data items.....	35
2.6 Study risk of bias assessment.....	36
3. Results	36
3.1 Study selection and characteristics.	36
3.2 Risk of bias.....	37
3.3. Methodology variations	38
4. Discussion.....	47
5. Conclusion	52
Support.....	53
Competing interests.....	53
Author Contributions.....	53

References	54
Supplementary material	60
Capítulo II.....	67
IV. Materiais e Métodos	67
Estudo <i>in vitro</i>	67
Cultura de Macrófagos:	67
Cultivo dos Parasitos:	67
Linhagens bacterianas e condições de co-cultivo.....	67
Infecção dos macrófagos J744.A1	68
Ensaio de Viabilidade Celular por CytoSmart®.....	68
Extração de DNA e Determinação da Carga Parasitária	69
Dosagem de Citocinas.....	71
Dosagem de óxido nítrico	70
Análise estatística	71
V. RESULTADOS	72
5.1 Viabilidade celular frente a infecções por <i>Leishmania</i> spp. e co-cultivo com bactérias intestinais.....	72
5.2 Carga parasitaria frente a infecções por <i>Leishmania</i> spp e co-cultivo com bactérias intestinais.....	75
5.3 Determinação da produção de Óxido Nítrico por macrófagos J744.A1 infectados com diferentes espécies de <i>Leishmania</i> e co-cultivados com bactérias intestinais.....	76
5.4 Avaliação da produção de citocinas nas culturas de macrófagos J744.A1 infectados com diferentes espécies de <i>Leishmania</i> e co-cultivados com bactérias intestinais	78
VI. DISCUSSÃO	87
VII. CONCLUSÕES.....	91
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

Introdução

1. Leishmaniose

1.1 Histórico

A leishmaniose tem sido documentada desde a pré-história em fósseis, indicando que evolução das espécies do gênero *Leishmania* iniciada antes da ruptura dos continentes, na Era Mesozóica, não havendo assim um país de origem específica. O primeiro relato do parasita ocorreu em 1900, quando o médico patologista William Boog Leishman, servindo o exército britânico na Índia, observou corpos ovóides em esfregaços feitos post-mortem do baço de um soldado falecido. Igualmente nesse período, o médico e pesquisador Irlandês Charles Donovan descobria uma nova forma de tripanossomíase. Mais tarde, em 1922, Henrique de Beurepaire Rohan Aragão sugeriu a mosca areia como vetor da Leishmaniose na América do Sul, sendo mais tarde catalogada como *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (AKHOUNDI *et al.*, 2016; STEVERDING, 2017).

A leishmaniose cutânea (LC) dispõe de evidências arqueológicas na América do Sul anterior à chegada dos europeus, existindo evidências do parasita em artefato dos povos Incas e pré-Incas. Além disso há relatos de lesões cutâneas correlacionados à LC anteriores a 1.000 A.E.C (Antes da Era Comum), denominada como “doença do vale” e “doença andina”, adicionalmente durante os séculos XV e XVI, foram retratadas deformidades faciais vinculadas a forma clínica mucosa da LC (SERENO *et al.*, 2017; SOUSA; PEARSON, 2009).

Os primeiros registros no Brasil ocorreram no ano de 1895, quando o médico e pesquisador Juliano Moreira observou em missionários advindos da região amazônica sintomas sugestivos da LC (BRASIL. , 2006).

Posteriormente, em 1909, Lindenberg, identificou formas do parasita em úlceras cutâneas e nasofaríngeas de indivíduos infectados. Mais tarde Gaspar Vianna descreveu a espécie *Leishmania braziliensis*, além de introduzir o uso de tártaro emético, antimonial trivalente, na terapêutica de LC. Em 1926, Montenegro desenvolveu o teste de intradermorreação para o diagnóstico (ALTAMIRANO-ENCISO *et al.*, 2003; BRASIL., 2006, 2017; COSTA, 1992; SOUSA; PEARSON, 2009).

Em 1972, Laison e Shaw propuseram uma nova classificação, com a adoção dos subgêneros *Leishmania* (1982) e *Viannia* (1997), o que proporcionou maior entendimento na avaliação clínica da doença (BRASIL. , 2006; 2017). Marzochi, Sabroza e

colaboradores (1980) descreveram a importância da transmissão peridomiciliar em diversas regiões do país. Em 1980 eram registrados 3.000 casos havendo progressão, chegando a ser registrado 35.748 casos em 1995. Devido ao aumento expressivo de casos foi implementada vigilância epidemiológica e aumento de pesquisas realizadas. Posteriormente, foi demonstrada a disseminação da *L. braziliensis*, da região amazônica para outras regiões do país (PIRES., *et al.*, 2015; SOUSA; PEARSON, 2009).

A Leishmaniose Visceral (LV) não possui relatos sólidos antes do século XIX (STEVERDING. , 2017). Entretanto, com o advento dos estudos moleculares em múmias pré-colombianas, foi possível verificar a presença de LV nas populações humanas através do tempo. Assim, estima-se que na América do Sul, a espécie *L. Infantum* foi introduzida pelos colonizadores ibéricos, possivelmente a partir da chegada de pessoas assintomáticas, cães infectados ou outros hospedeiros mamíferos. Porém, outra hipótese sugere a existência de uma espécie endêmica causadora da LV na América do Sul bem antes das conquistas ibéricas (BOITÉ *et al.*, 2020; SERENO *et al.*, 2017).

No Brasil, o primeiro relato de LV ocorreu em 1913, quando o médico paraguaio Migone identificou o parasita causador da LV em necrópsias de pacientes oriundos do Mato Grosso. A espécie *L. infantum* também foi detectada em amostras de cães infectados na região nordeste (PASQUALI *et al.*, 2019), entretanto, apenas a partir de 1930, os pesquisadores conseguiram isolar os primeiros parasitos e analisar seu perfil, como já tinha sido realizado fora do país. Em 1934, Penna, durante uma pesquisa sobre febre amarela observou 41 casos de coinfeção com LV em pacientes provenientes das regiões nordeste e norte (PENNA, 1934). A descrição da patologia foi evoluindo com o passar do tempo, passando inicialmente de um perfil rural para uma doença com característica urbana, nos dias atuais. Tornando-se endêmica em todo o país, e se alastrando para o interior, atingindo por último a região sul em 2006 (BRASIL., 2014; FERREIRA *et al.*, 2015; PASQUALI *et al.*, 2019; STEVERDING, 2017).

1.2Epidemiologia

As leishmanioses são protozoonoses endêmicas em 92 países e reportadas em 83 territórios. Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), são detectados mais de 1 milhão de novos casos de LC e 30.000 novos casos de LV anualmente em todo o mundo (WHO, 2020). A transmissão é causada por pelo menos 20 espécies do gênero *Leishmania*, com disseminação correlacionada a distribuição dos vetores, seus reservatórios, as condições precárias de sobrevivência, geografia, alterações climáticas e o tráfico

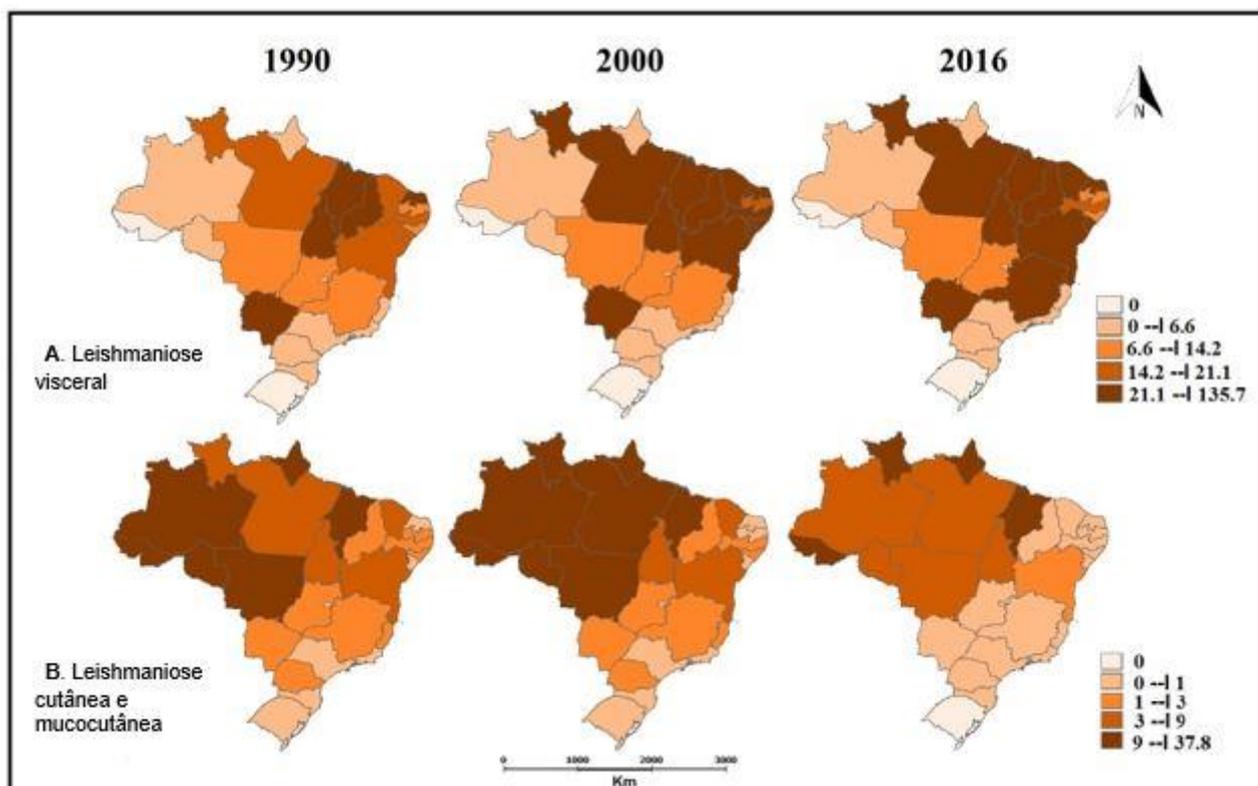
internacional de produtos hemoderivados (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CASTELLI *et al.*, 2014).

Estima-se que existam aproximadamente 120 milhões de casos assintomáticos e cerca de 1 bilhão de pessoas em risco de contrair a infecção nas suas diversas formas clínicas. Assim, a OMS classifica a leishmaniose como uma doença tropical negligenciada relacionada a desigualdade social, disponibilidade de opções de tratamento e manejo clínico, o que colabora para o aumento das transmissões. Logo, devido à sua epidemiologia complexa, se faz necessário a conscientização da população a respeito das estratégias de controle da doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CANTANHÊDE *et al.*, 2018; CARDIM *et al.*, 2016; SUNDAR; SINGH, 2018).

No Brasil, a epidemiologia da leishmaniose está relacionada com as espécies e as suas características clínicas (ANVERSA *et al.*, 2018). Considerando os fatores de qualidade de vida, ao analisarmos o indicador *Daly's (Disability Adjusted Life Years)*, sua elevação dos índices nos anos 1999 para 2016 reforça que a leishmaniose impacta na qualidade de vida da população em áreas endêmicas, estando correlacionada a dificuldades de controle da propagação da infecção e a sua urbanização, como demonstrado na Figura 01 (BEZERRA *et al.*, 2018). Sabemos, que o programa de vigilância e controle atual tem se mostrado ineficiente, já que o número de casos de leishmaniose visceral tem aumentado no decorrer do tempo (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

As espécies mais encontradas no Brasil são *L. infantum* e *L. braziliensis*, e podem coinfetar o mesmo hospedeiro. Assim, existe a possibilidade de infecção de duas espécies diferentes com manifestações clínicas diversas nas áreas endêmicas. Esse fator demonstra a complexidade da epidemiologia na América do Sul, devido à sobreposição de ciclos (CARDIM *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2015).

Figura 1- Indicador Daly's - Taxas padronizadas de anos de vida perdidos (YLL) para Leishmaniose visceral (A) e anos vividos com deficiência (YLD) para Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea (B) por 100.000 habitantes em 1990, 2000 e 2016 no Brasil.



Fonte: GBD 2016 (BEZERRA *et al.*, 2018).

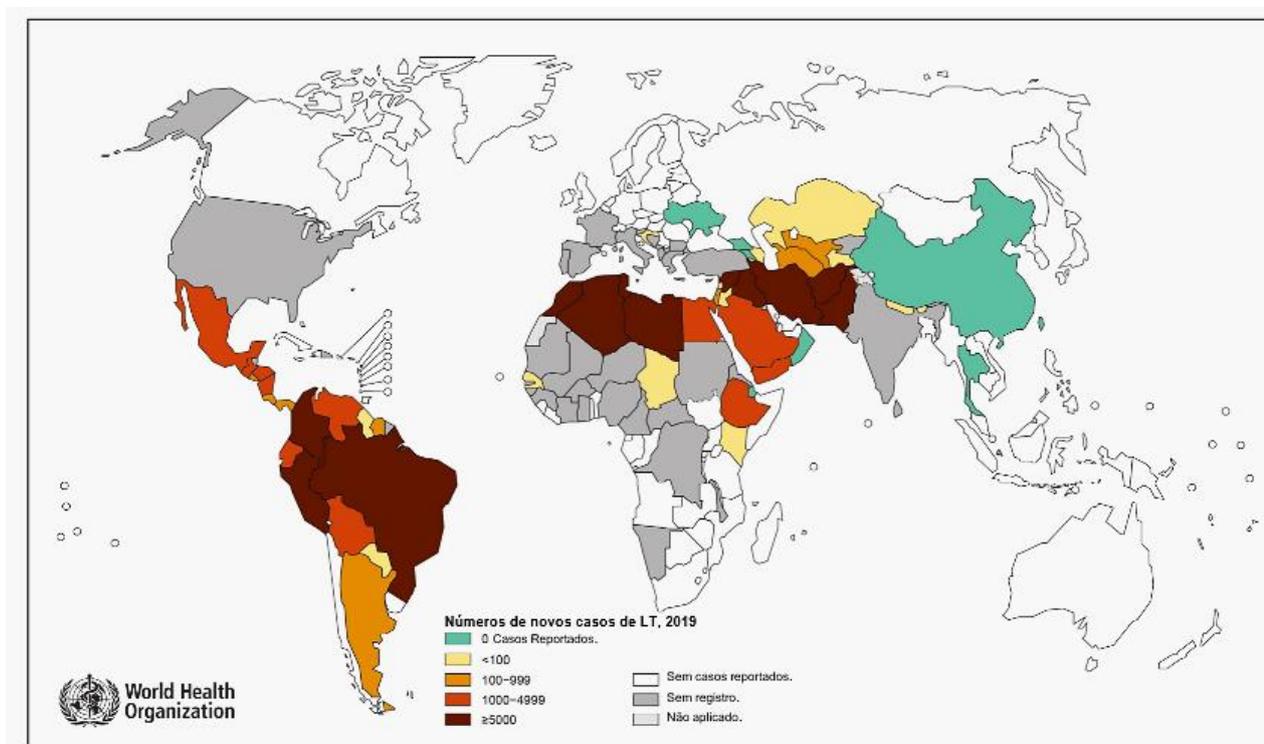
A epidemiologia da leishmaniose é multifacetada e pode ser afetada por fatores ambientais, como a elevação do nível do mar, precipitação pluviométrica, umidade, índice de vegetação e temperatura. As características epidemiológicas também estão relacionadas com a migração populacional, além de outros fatores que afetam o meio ambiente como os referentes à infraestrutura, as condições precárias de saneamento, que favorecem a exposição de reservatórios, e de mamíferos infectados, os quais facilitam a adaptação e proliferação dos vetores. Logo, o impacto da migração geralmente é desencadeado por questões socioeconômicas, que são apontadas como disseminadoras do vetor e responsáveis pela propagação da doença (CARDIM *et al.*, 2016; DOS REIS *et al.*, 2019; EL HAMOUCHI *et al.*, 2018; TOLEDO *et al.*, 2017).

Diante do exposto, há grande possibilidade de surgimento novas áreas epidêmicas. Assim, se faz necessário uma vigilância bem delimitada com viabilidade estratégica e organização de serviços de saúde para a prevenção de futuras infecções. Os resultados do estudo de Barbosa e colaboradores (2016) demonstraram que, no Brasil, a vigilância epidemiológica se encontra insuficiente e precária. Logo, para que haja efetividade nas ações de prevenção e controle, é importante intervir em localidades onde a leishmaniose é

endêmica, respeitando a área afetada, e promovendo o sistema de maneira organizada e dinâmica para a intervenção e análise, com ênfase nas ações e serviços (BARBOSA; GUIMARÃES; LUZ, 2016; CARDIM *et al.*, 2016; DOS REIS *et al.*, 2019; EL HAMOUCHI *et al.*, 2018; TOLEDO *et al.*, 2017).

A LC é considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas do mundo, devido sua complexidade e sua capacidade de produzir deformidades, que acarretam um grande impacto na vida social. Considerada endêmica em 18 países, segundo a OMS afeta milhares de pessoas por ano com mais de 250.000 casos registrados no ano 2019 (Figura 02) (BRASIL., 2017; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; QUARESMA *et al.*, 2018).

Figura 2- Número de casos reportados de leishmaniose cutânea no ano de 2019, segundo a OMS.



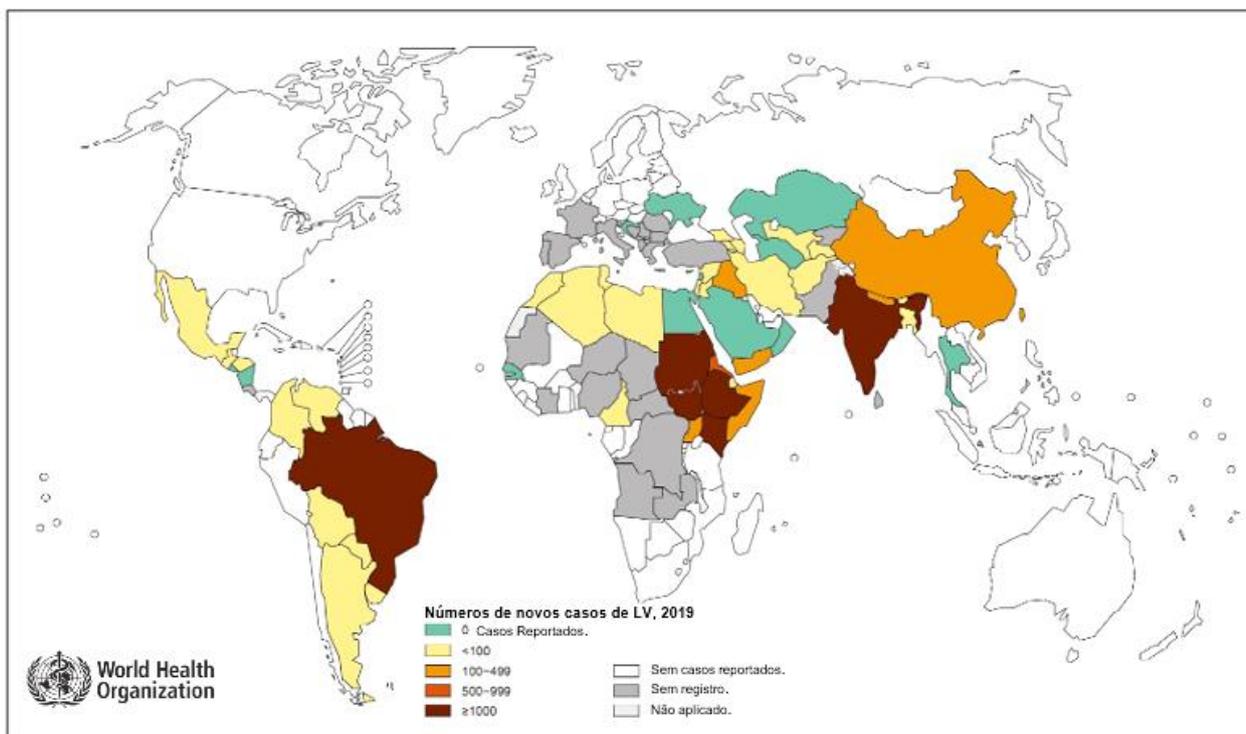
Fonte: OMS-adaptado (WHO, 2020)

O Brasil, em pouco tempo, se tornou o país responsável pela maioria dos casos na América do Sul, com incidência média estimada de 20.000 casos por ano, registrando incidência de 10,3/ 100.000 habitantes nos últimos 5 anos (BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; FERREIRA *et al.*, 2015; WHO, 2020). Segundo o Ministério da Saúde, a faixa etária de maior incidência no Brasil é de pessoas maiores de 10 anos do sexo masculino (BRASIL. , 2017). Em todo o território existem diferenças nos perfis das infecções, a depender da distribuição geográfica das espécies. Assim, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é reportada principalmente na região do Amazonas, Pará, Rondônia,

Tocantins, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná. Enquanto que a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é reportada em todos os estados, e a *Leishmania (Viannia) guyanensis* tem casos relatados na região norte como Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará. Dessa forma, as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são consideradas epidemiologicamente mais relevantes devido a sua ampla distribuição geográfica (BRASIL. , 2017; CHRISTENSEN *et al.*, 2018).

A LV é uma doença de distribuição mundial, entretanto, mais de 90% dos casos mundiais ocorrem em apenas 10 países, a saber: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do sul, Etiópia, China, Quênia, Nepal, Somália, e no Brasil. Segundo a OMS, mais de 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de adquirir a doença e 300 mil novos casos são notificados anualmente. Adicionalmente, a LV é considerada a terceira infecção parasitária oportunista mais frequente na Europa (Figura 03). Apenas 10% dos indivíduos infectados desenvolvem sintomas. Entretanto, quadros sintomáticos sem tratamento adequado podem evoluir clinicamente para formas graves, acarretando milhares de óbitos. Segundo a OMS, a LV é responsável de 20 a 40 mil óbitos por ano (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CIPRIANO *et al.*, 2017; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; SUNDAR; SINGH, 2018).

Figura 3- Número de casos de leishmaniose visceral reportados, no ano de 2019, segundo a OMS.



Fonte: OMS- adaptado (WHO, 2020).

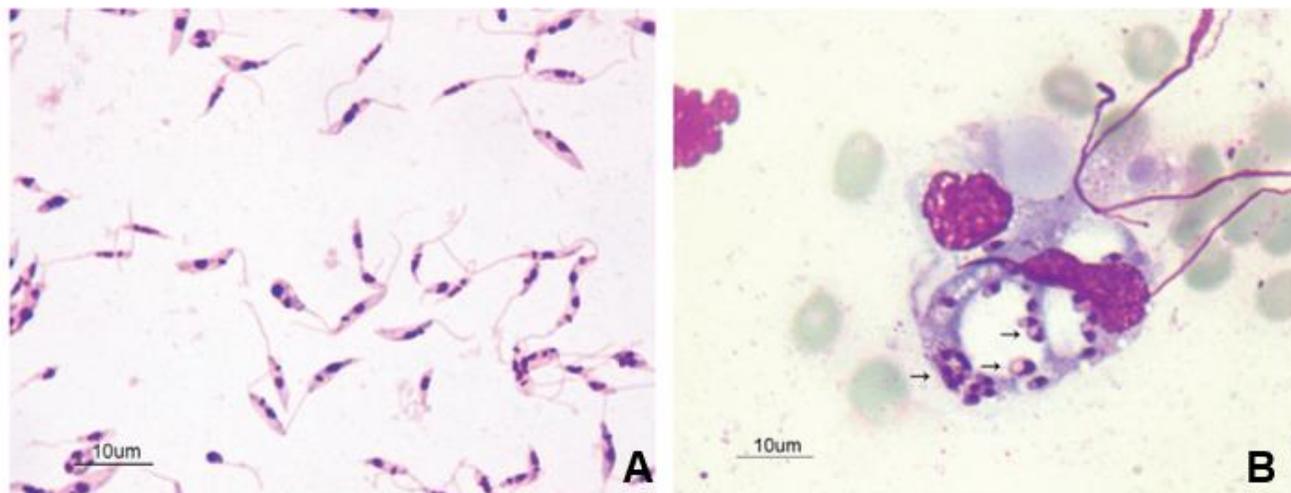
O Brasil é um dos países mais afetados pela LV e concentra mais de 96% casos relatados na América Latina, segundo a OMS. Seu perfil epidemiológico apresenta como característica importante, as mudanças genéticas ocorridas no parasita, o que favorece a disseminação da *Leishmania (Leishmania) infantum*, por todo o país, especialmente na região nordeste e sudeste (BOITÉ *et al.*, 2020; BRASIL., 2014; DOS REIS *et al.*, 2019).

1.3 Agente Etiológico

A leishmaniose é causada por diversas espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, pertencentes a família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania/Viannia*. O parasita possui 53 espécies catalogadas, sendo que 20 delas possuem a capacidade de desenvolver infecções em humanos. Devido à grande variabilidade genética, podemos encontrar um amplo espectro de apresentações clínicas. Sendo que a maioria das espécies são dermatrópicas (80%), que estão relacionadas à produção de lesões ulcerativas na pele, entretanto, algumas espécies estão relacionadas à apresentação visceral da doença (ANVERSA *et al.*, 2018; BRASIL. , 2017; CANTANHÊDE *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; PIRES. , *et al.*, 2015; SILVEIRA *et al.*, 2009; STAMPER *et al.*, 2019).

São parasitas intracelulares obrigatórios, que infectam preferencialmente as células do sistema fagocítico mononuclear de diversas espécies de mamíferos. Durante o ciclo biológico, o protozoário apresenta duas formas de vida, a forma amastigota, de formato arredondado ou oval, com flagelo curto intracelular, resistentes mudanças metabólicas, realizadas no interior dos macrófagos, com diâmetro de 2 e 5 μm , encontradas nos hospedeiros vertebrados. Além da forma promastigota, forma flagelada, de formato alongado, com flagelo na parte anterior do parasito, com diâmetro de 15 a 20 μm , encontrada no inseto vetor (Figura 04) (DEY *et al.*, 2010; NEVES, 2005). A transição de fase promastigota para amastigota se realiza no interior de fagolisossomos de macrófagos, necessitando de condições específicas para a replicação do parasito, como pH baixo e temperatura elevada (KHAN.YOUSUF A, ANDREWS.NORMA W, 2018).

Figura 4- Representação morfológica das duas formas de vida da *Leishmania* spp.: Em **A**, estão representadas as formas promastigotas flageladas e em **B**, as formas intracelulares amastigotas



Fonte: Fiocruz, Brasil, (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2019) adaptado.

1.4 Ciclo de Vida

O ciclo biológico da *Leishmania* spp. é heteróxico envolvendo o parasito, vetores e diversos hospedeiros vertebrados. Os hospedeiros vertebrados abrangem várias espécies de mamíferos silvestres e domésticos, como roedores, cachorros, marsupiais e primatas, inclusive os humanos. O cão é considerado o principal reservatório do parasita em ambientes urbanos (MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; PAIXÃO-MARQUES *et al.*, 2019). Dessa forma, o ciclo de vida digenético é complexo, pois a dinâmica do parasita entre os seus hospedeiros é volátil a qualquer alteração do ambiente (ANVERSA *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; STAMPER *et al.*, 2019).

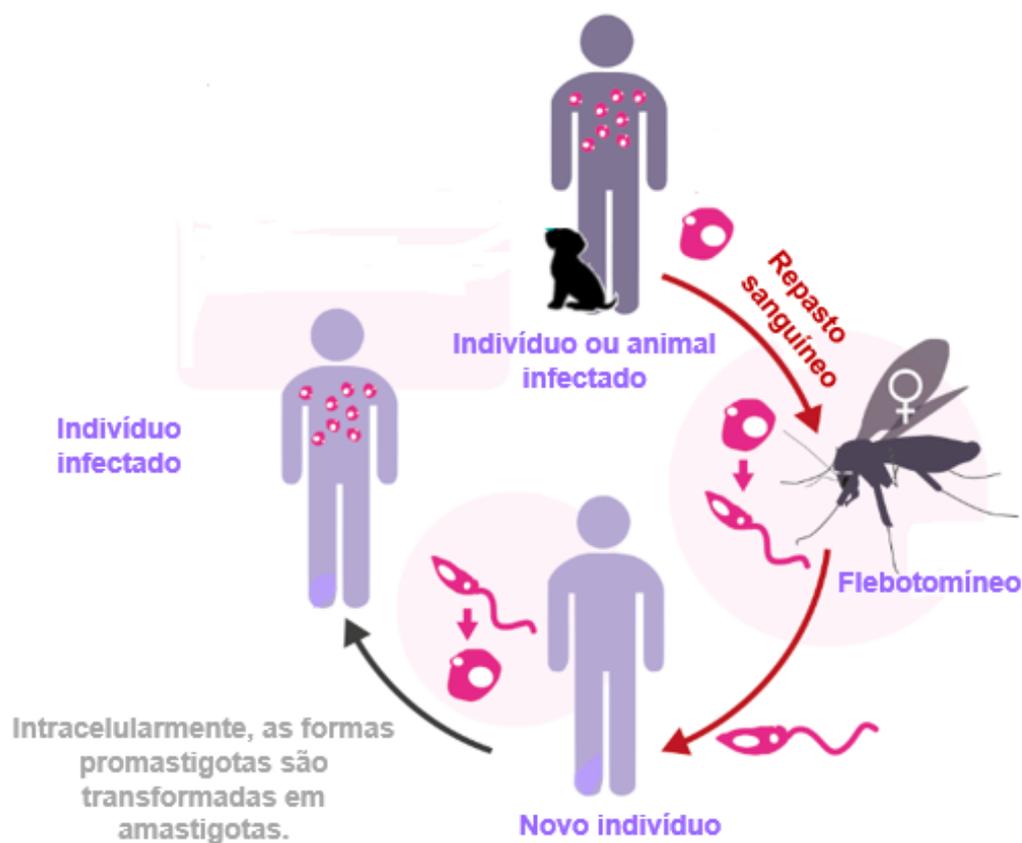
Os vetores abrangem as fêmeas dos insetos denominados flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha ou birigui. São insetos pequenos e facilmente reconhecidos pelo seu comportamento sazonal. No Brasil, a distribuição geográfica é vasta e expansiva, pois esses insetos apresentam grande adaptabilidade nos ambientes em que vivem podendo ser encontrados frequentemente na área rural e no ambiente periurbano. As espécies de flebotomíneos encontradas no Brasil, são: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia migonei*, *Lutzomyia whitmani*, encontrada em todas as regiões brasileiras, e *Lutzomyia longipalpis*, encontrada no continente americano (AKSOY, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BRASIL. , 2014, 2017; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; KARAKUŞ *et al.*, 2017; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; PIRES, A. *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2009).

O ciclo se inicia no intestino do inseto (Figura 05), quando as formas amastigotas são ingeridas pela fêmea do flebotômíneo durante o repasto sanguíneo. Uma vez no intestino, o parasito altera o comportamento de alimentação do flebotômíneo reduzindo a eficiência da entrada de sangue pela alimentação e aumentando a eficácia da transmissão. Além disso, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas que iniciam vários ciclos de reprodução assexuada por divisão binária (AKSOY, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; DEY *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; KARAKUŞ *et al.*, 2017; MURASE *et al.*, 2018; ROGERS, M. E. *et al.*, 2004).

Após a divisão, as formas promastigotas migram para a faringe do inseto sofrendo o processo de metaciclogênese, gerando a forma estacionária infectante denominada promastigota metacíclica que migra para as partes bucais do inseto sendo transferida junto com a saliva para o hospedeiro durante um novo repasto sanguíneo do vetor (podendo ser liberado entre cem a mil parasitos, por repasto). Uma vez na pele, a saliva do inseto promove o recrutamento de neutrófilos e os parasitos são posteriormente fagocitados pelas células do sistema Imunitário do mamífero (AKSOY, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; DEY *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; KARAKUŞ *et al.*, 2017; MURASE *et al.*, 2018; WARBURG; SCHLEIN, 1986).

No fagolisossoma do macrófago, a forma promastigota se transforma em amastigota, que após vários ciclos de divisão binária provoca o citoplasma abarrotado, culminando no rompimento da membrana citoplasmática. As formas amastigotas liberadas iniciam então novos ciclos de infecção celular infectando as células adjacentes ou através da circulação, podendo promover a infecção parasitária em diferentes órgãos do hospedeiro. Quando a fêmea do flebotômíneo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, ela ingere as formas amastigotas do protozoário, reiniciando o ciclo biológico (Figura 05) (AKSOY, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; DEY *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; KARAKUŞ *et al.*, 2017; KAUFER *et al.*, 2017; MURASE *et al.*, 2018).

Figura 5- Ciclo de Vida da *Leishmania* spp.



Fonte: Figura adaptada de (WHO, 2020).

1.5 Resposta Imunológica

A infecção por *Leishmania* spp induz uma cascata de respostas fisiológicas do hospedeiro, incluindo alterações metabólicas e imunológicas. A ativação da resposta imune adaptativa humoral e celular (Th1 e Th2) é caracterizada principalmente pela ativação de linfócitos T auxiliares e pela ativação de macrófagos, que uma vez ativados, aumentam a produção de Óxido nítrico (NO) e interferon γ (IFN- γ) (BRASIL, 2017; SINGH *et al.*, 2018; TERRAZAS *et al.*, 2017). A depender da resposta imune o indivíduo irá apresentar espectro clínico diferente. Desta forma, a resposta imune será eficaz quando a mesma conter a infecção evitando os sintomas, ou poderá ser ineficaz caso o indivíduo possua imunodeficiências ou caso responda de forma exagerada; nestes casos, os sintomas poderão ser de leves a graves. (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Inicialmente, a imunidade inata, que apresenta entre os principais componentes celulares os macrófagos, que por meio da fagocitose e da apresentação de antígenos possuem papel essencial no combate às infecções causadas por *Leishmania* spp. Os macrófagos respondem à presença de leishmanias de duas formas: ou ele reconhece em sua membrana externa (parasitos liberados por saída dos macrófagos pós-replicação ou

por ruptura da célula) por receptores TOLL. Contudo, a ligação das *Leishmanias* aos receptores de complemento também ativa os macrófagos, sendo essa uma ativação importante. Já internamente, as amastigotas podem ter proteínas liberadas dos vacúolos parasitóforos que podem ser reconhecidos por receptores citosólicos como os receptores NOD. (BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; LOPES *et al.*, 2016; TERRAZAS *et al.*, 2017).

Assim, devido à necessidade de adaptação da função imunológica, o macrófago inicia a polarização de sua ativação pelas vias M1 e M2, denominadas via clássica ou alternativa, respectivamente. Desse modo, a via M1 tem como característica a capacidade microbicida através da secreção de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo NO, além de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , sendo correlacionada a resposta a parasitos intracelulares. Enquanto a via M2 produz citocinas que inibem e modulam a resposta M1, sua ativação está relacionada a resposta imune contra parasitos extracelulares (LOPES *et al.*, 2016; TERRAZAS *et al.*, 2017; TY *et al.*, 2019).

Na leishmaniose ocorre inicialmente inibição da Th1, mediante a secreção de citocinas tais como IL-10, TGF-beta, IL-4, etc pelos macrófagos ativados pela via M2, o que provoca progressão da infecção, já que a resposta Th1 é necessária para eliminação de agentes intracelulares. Entretanto, os macrófagos dependendo do estímulo externo iniciado pela secreção de IL-4, polariza a resposta M2 para via M1, que induz uma resposta pró-inflamatória, favorecendo a eliminação do parasita intracelular. Todo o processo se daria nos macrófagos M2, que exibem altas reservas glicolíticas que se transforma em alta glicólise depois da produção de ATP mitocondrial é bloqueada. Assim, o metabolismo oxidativo mitocondrial suporta a polarização induzida por IL-4. A alteração, da polarização macrofágica, pode ser desencadeada a qualquer momento, a depender do estímulo. Também a modulação da via M1 em decorrência da elevada produção de IFN- γ e TNF- α , que são essenciais para a expressão de Oxido Nítrico Sintase (iNOs) e ativação dos macrófagos (BOSSCHE *et al.*, 2016; LOPES *et al.*, 2016; SUMAN *et al.*, 2018; TY *et al.*, 2019).

A resposta imunitária adaptativa depende primordialmente da atuação das células T auxiliares, que exercem função sobre quase todos os componentes da resposta imunitária. Quando ativadas, na maioria das vezes, em decorrência do processo de apresentação de antígenos realizado pelas células dendríticas, as células T auxiliares virgens se dividem e podem se diferenciar em linfócitos Th1, Th2, Th17 dentre outras (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; GONÇALVES-DE-

ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016; PALIĆ *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2009; SUELEN *et al.*, 2018; SUMAN *et al.*, 2018; WANDERLEY *et al.*, 2019).

As células Th1 são responsáveis pela ativação da resposta imune celular, caracterizada pela secreção de citocinas com perfil pró-inflamatório, como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, IL-27, TNF α e linfotóxina, além da secreção de moléculas de adesão ICAM-1, apresentando atividade correlacionada a eliminação de parasitas intracelulares. Já as células com perfil Th2 estão relacionadas com o desenvolvimento da imunidade humoral e secretam as citocinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, e estão envolvidas na eliminação de parasitos extracelulares e no desenvolvimento de alergias (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; G. REED; PHILLIPSCOTT, 1993; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016; PALIĆ *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2009; SUELEN *et al.*, 2018; SUMAN *et al.*, 2018; WANDERLEY *et al.*, 2019).

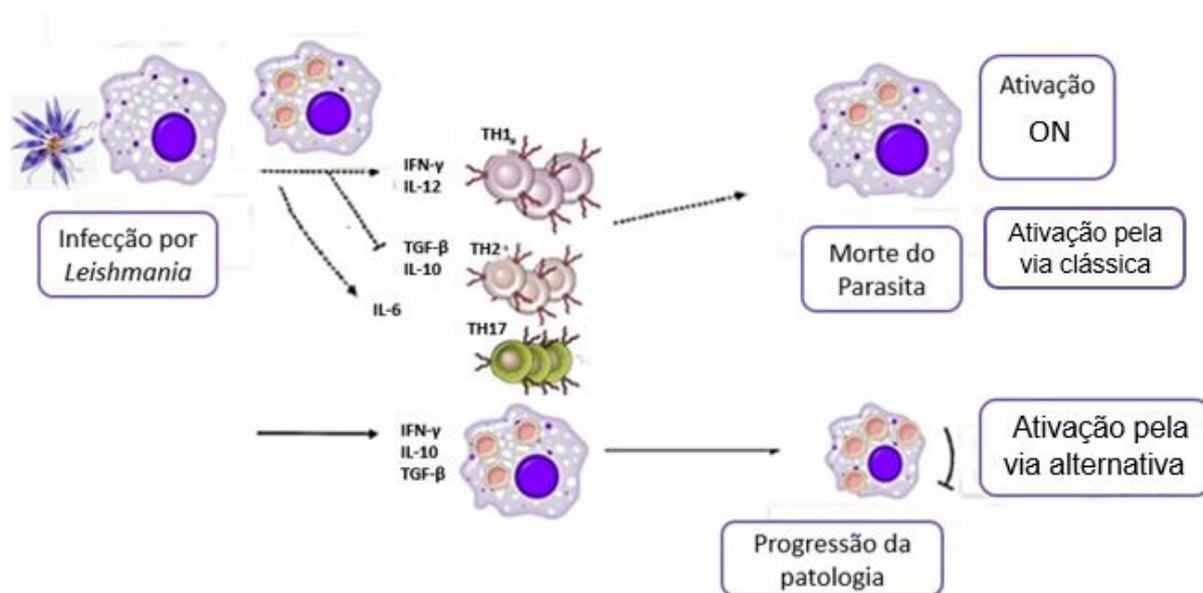
Dessa forma, o equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é essencial para o controle da leishmaniose, mas também está implicado nos processos que levam ao desenvolvimento da patologia. Quando a resposta inflamatória está inibida, ocorre o aumento da carga parasitária, o que promove a sobrevivência do parasito, e está correlacionada com a inibição de iNOS e de ON por IL-4, e de TNF- α pelo aumento de IL-12, IL-10, PGE2 e TGF- β . Assim, a relação entre as respostas Th1/Th2 define o curso clínico da infecção, pois a exacerbação da resposta Th1 pode causar dano ao tecido, ocasionando o aparecimento das manifestações clínicas, contudo, a predominância do perfil Th2, pode ocasionar a persistência parasitária (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; LOPES *et al.*, 2016; PALIĆ *et al.*, 2019; SILVEIRA *et al.*, 2009; SUELEN *et al.*, 2018; SUMAN *et al.*, 2018; WANDERLEY *et al.*, 2019).

A resposta imune com perfil Th17, é crucial na modulação da resposta imune adaptativa contra patógenos intracelulares. As células Th17 produzem a citocina IL-17 que promove o recrutamento de neutrófilos e atuam na regulação do processo de homeostase de citocinas do ramo Th1 e Th2. Sua ativação é mediada pela secreção de citocinas IL-6 e TGF- β , induzindo um perfil inflamatório, e funcionando como suporte da resposta Th1, na ativação de iNOs, IFN γ e inibição de IL-10 (BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017; STOCKINGER; VELDHOEN, 2007).

O efeito da ativação da via Th1 e a subsequente ativação dos macrófagos está associada a uma restrição da replicação parasitária. A secreção de IFN γ é de extrema importância para ativação da resposta Th1, tendo papel no equilíbrio da resposta Th1 e

Th2. O equilíbrio das respostas Th1 e Th2, está relacionado ao momento de ativação da resposta, sendo crucial para o desfecho clínico da infecção. Assim, a leishmaniose apresenta manifestações clínicas complexas e progressivas, relacionadas diretamente a resposta imunológica do hospedeiro (Figura 6) (ANVERSA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2007; CHRISTENSEN *et al.*, 2018; PALIĆ *et al.*, 2019; ROGERS, K. A. *et al.*, 2002; SUMAN *et al.*, 2018).

Figura 6- Ativação resposta imunológica contra a *Leishmania* spp. Na imagem podemos observar o desenvolvimento da resposta imunitária, com a ativação dos macrófagos na forma clássica e alternativa. Logo, observamos que a resposta depende do conjunto de citocinas produzidas, capazes de modular uma resposta protetiva ou prejudicial.



Fonte: Adaptado (MURASE *et al.*, 2018).

1.5.1 Papel do *Leishmania* RNA Vírus

A presença do *Leishmania* RNA Vírus (LRV), confere ao protozoário características genéticas relacionadas a manifestações clínicas mais graves. A presença do vírus de dupla fita de RNA (5,3Kb) parece estimular uma resposta imunitária exacerbada, que leva ao desenvolvimento de lesões características da forma clínica mucosa, e aumenta o risco de falha terapêutica. O vírus é transmitido intracelularmente durante a divisão celular, podendo ser encontrado nas duas espécies de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Estudos sugerem a existência do vírus desde a época da inclusão dos vertebrados no ciclo de vida do parasita, ou ainda antes da divergência de espécies, sendo altamente variável entre as leishmanias. O vírus LRV1 é encontrado apenas em espécies do subgênero *Vianna*, nas espécies do subgênero *Leishmania* é encontrado o LRV2. Os estudos demonstram a prevalência de

espécies infectadas pelo LRV está restrita a regiões geográficas determinadas possivelmente resultante de um processo de evolução conjunta do vírus com a espécie do parasita (BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; CANTANHÊDE *et al.*, 2018; FIGUEIREDO DE SÁ *et al.*, 2019; ITO *et al.*, 2015; KARIYAWASAM *et al.*, 2019).

Sabe-se que o LRV aumenta a produção de citocinas como a IL- 6 e TNF α , promovendo uma inflamação destrutiva, mediante ativação da resposta imune inata pelo reconhecimento da dupla fita de RNA viral pelos receptores TLR3. Os parasitos que possuem o LRV também se replicam mais rapidamente, favorecendo a dispersão do protozoário por via hematogênica. Ademais, há pesquisas que relacionam a presença do LRV à casos de resistência terapêutica (CANTANHÊDE *et al.*, 2018; ITO *et al.*, 2015; KARIYAWASAM *et al.*, 2019).

1.5.2 Escape imunológico do parasito

A *Leishmania* spp. apresenta uma complexa membrana celular, a qual interage com o meio extracelular e define os mecanismos de evolução e adaptação do parasito (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Dentre eles, há os mecanismos de evasão da resposta imunitária do hospedeiro, como os fatores de virulência, o lipofosfoglicano (LPG) é um glicopeptídeo abundante na superfície da forma promastigota, o que protege o parasito dos danos oxidativos, ajudando no estabelecimento eficaz do fagolisossoma, modificando seletivamente o recrutamento de diversos fatores e no reconhecimento imunitário (CUNNINGHAM, 2002; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Sua estrutura e expressão, varia entre espécies, e se modifica no decorrer do ciclo de vida do parasito, sendo fator essencial no processo de evolução do protozoário (ASSIS *et al.*, 2012; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; PIMENTA; SARAIVA; SACKS, 1991).

Deste modo, a glicoproteína de superfície GP63 do protozoário é considerada um fator crucial para o escape imunológico. Uma vez dentro do macrófago, a GP63 cliva proteínas do hospedeiro, influenciando a ativação e desregulação das citocinas pró-inflamatórias e produção de ON. Assim, é capaz de inibir a ativação do sistema complemento, modulando a expressão do gene do fator nuclear kappa β (NF- κ B), retendo ferro na célula, promovendo a autofagia e a geração de produtos celulares, que modificam a funcionalidade das células, expandindo a disponibilidade de nutrientes, contribuindo para a sobrevivência do parasito no vacúolo parasitóforo (MURASE *et al.*, 2018; OLIVIER; HASSANI, 2010; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; REBELLO *et al.*, 2010).

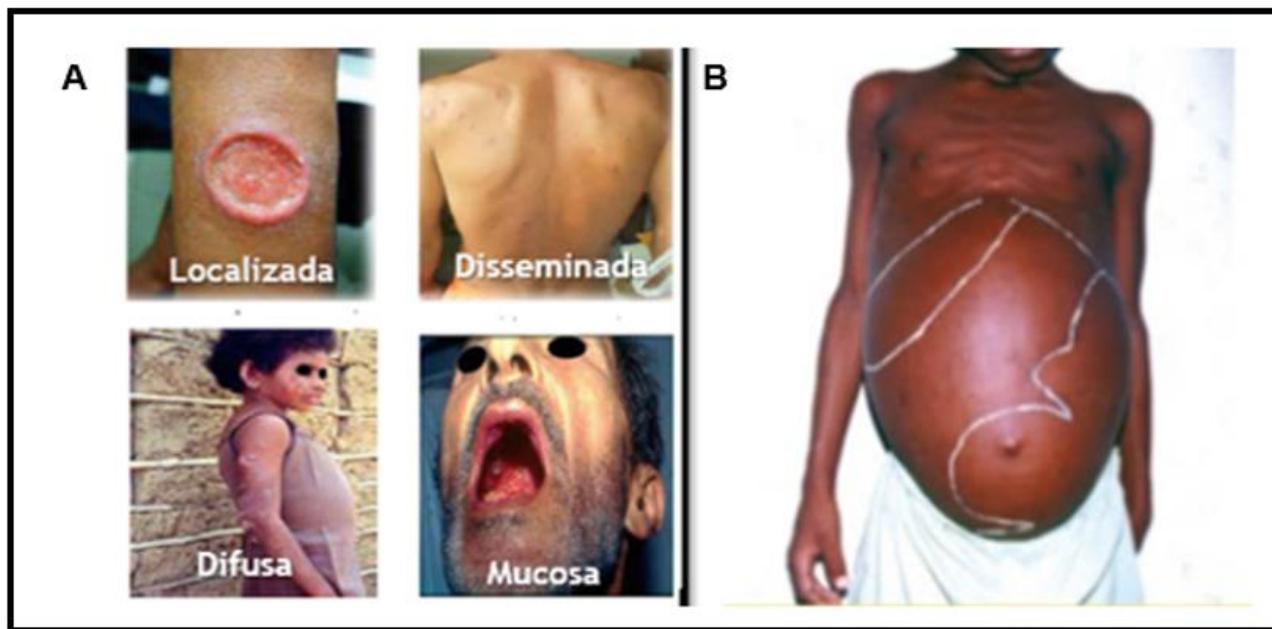
As estratégias de evasão ao sistema imune do hospedeiro inclui a inibição da apresentação de antígenos do parasito mediante interferência nas moléculas MHC de classe II, a inibição da produção de citocinas pro-inflamatórias como: IL-1, TNF- α , IL-6 e inibição da ativação de linfócitos T, além da indução de moléculas imunossupressoras como prostaglandinas: TGF- β , IL-10, IL-11 e IL-18 (ANVERSA *et al.*, 2018; ITO *et al.*, 2015; LEAO *et al.*, 1995). Outro fator de escape do parasito relaciona-se a elevação da expressão do gene da arginase, assim, uma baixa concentração de arginina pode reduzir a produção de ON, e afetando a capacidade fagocítica dos macrófagos de eliminar os parasitas intracelulares, contribuindo para o crescimento e disseminação dos mesmos (ANVERSA *et al.*, 2018; CUNNINGHAM, 2002; WANDERLEY *et al.*, 2019).

1.6 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da leishmaniose são de etiologia complexa e multifatorial. Genericamente podemos dividi-las em LC e LV. A LC é caracterizada pela presença de lesões na pele, e é subdividida em difusa, localizada, disseminada e mucosa, por outro lado, a LV tem como principal manifestação clínica a hepatoesplenomegalia (Figura 07). O amplo espectro de manifestações clínicas observado na leishmaniose está relacionado com as diferenças genéticas das espécies, o número de parasitos inoculados, o sítio da inoculação, a resposta imunológica do hospedeiro, o estado nutricional e emocional em que se encontra o paciente (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BRASIL., 2017; MAIA; CAMPINO, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Como descrito anteriormente, a depender da resposta imunológica do hospedeiro o indivíduo infectado pode ser assintomático ou sintomático, logo, o hospedeiro poderá apresentar mutações e polimorfismos ocasionando resistência natural ou vulnerabilidade a infecção. Além disso, esses fatores também influenciam na resposta ao tratamento e no surgimento de cepas do parasito resistentes aos fármacos (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BRASIL., 2017; MAIA; CAMPINO, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Figura 7- Manifestações clínicas da Leishmaniose. Em **A** são visualizadas lesões típicas da LC que é subdividida em difusa, localizada, disseminada e mucosa. Em **B** a imagem de um paciente com hepatoesplenomegalia, principal achado clínico da LV



Fonte: Adaptado (BRASIL., 2014; 2017)

A LC localizada tem como manifestação clínica mais frequentemente a presença de lesão exclusivamente no local da picada do flebotomíneo, geralmente localizadas nas partes mais expostas da pele, como mãos, rosto e pernas. A lesão começa com vermelhidão e inchaço e pode aumentar progressivamente após um período de incubação variável, de dez dias a quatro meses. A úlcera típica apresenta formato arredondado ou oval, tecido eritematoso na base, possuindo infiltrado de consistência firme e bem delimitado. A lesão é habitualmente indolor, no entanto, pode ocorrer dor se houver infecção bacteriana associada (ANVERSA *et al.*, 2018; BOUSSOFFARA *et al.*, 2019; BRASIL., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

Na maioria das vezes, o paciente apresenta poucos parasitos no local das lesões, e dependendo do perfil de resposta imune do hospedeiro, a lesão pode cicatrizar espontaneamente ou progredir, podendo originar lesões secundárias em outras partes do corpo, inclusive progredir para forma mucosa. A resposta imunológica predominante é do tipo Th1, resultando em um aumento de IFN- γ nas lesões e a ativação da via clássica dos macrófagos (ANVERSA *et al.*, 2018; BOUSSOFFARA *et al.*, 2019; BRASIL., 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A LC disseminada é uma forma rara que ocorre devido a disseminação linfática ou hematogênica do parasito. A principal manifestação clínica é o aparecimento de lesões

cutâneas, pequenas e ulceradas, em diversas partes do corpo. Os parasitos são poucos ou ausentes nas lesões e há predominância de resposta imune do tipo Th1 com hipossensibilidade de células T. A resposta disseminada, embora tenha uma resposta Th1, ela é dificultada porque ocorre uma baixa responsividade de células T, isso pode ocorrer em função de imunodeficiências e comorbidade (ANVERSA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A forma mucosa é clinicamente expressa por lesões destrutivas localizadas na mucosa das vias aéreas superiores, devido a disseminação de parasitas ou devido a falha terapêutica da forma cutânea localizada. Em geral, ocorre obstrução nasal, aumento do fluxo sanguíneo, formação de crostas por mucosa na região nasal ou bucal. A mucosa nasal está envolvida em quase todos os casos, podendo afetar o palato, língua, lábios, faringe e laringe, acarretando mutilação significativa da face (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; ITO *et al.*, 2015; SILVA, S. C. *et al.*, 2019).

O tratamento da forma mucosa é difícil e pode ocorrer resistência aos fármacos disponíveis, caso não haja tratamento efetivo, podem ocorrer complicações, com a presença de infecções secundárias, com possibilidade do óbito. Mesmo nos casos em que o tratamento foi efetivo, pode ocorrer sequelas permanentes no paciente. Imunologicamente o paciente apresenta ativação duradoura das respostas do tipo Th1 e do tipo Th2, o que explica a evolução para um quadro crônico. Além disso, alguns autores associam a presença do vírus LRV1 com o agravamento das lesões, como referido anteriormente (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; ITO *et al.*, 2015; SILVA, S. C. *et al.*, 2019).

A forma cutânea difusa, inicialmente, pode se apresentar com apenas uma lesão, mas, depois, progride para várias nodulações não ulceradas e disseminadas. Diferente das outras formas de LC, na leishmaniose difusa são observadas grandes quantidades de parasitos nas lesões e o perfil imunitário predominante é do tipo Th2. O tratamento é bastante dificultoso e, na maioria dos casos, ocorre resistência dificilmente evoluindo para a cura espontânea (ANVERSA *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2009).

A LV, também conhecida como Calazar, afeta cronicamente alguns órgãos como: linfonodos, baço, fígado e medula óssea, sendo menos comum nos rins, intestino, pulmões e pele. O período de incubação varia entre dez dias e vinte e quatro meses, estando a média entre dois a seis meses para o início das manifestações clínicas. Inicialmente, a doença tem como principal sintoma a febre e podem aparecer outros sintomas como perda de peso, diarreia, anemia, trombopenia, leucopenia, hepatoesplenomegalia, erimatoze, máculas hipopigmentadas, nódulos e emplatós (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT;

BOELAERT, 2018; CIPRIANO *et al.*, 2017; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; MARSHALL *et al.*, 2018; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; PALIĆ *et al.*, 2019; PIRES, M. *et al.*, 2019).

Em pacientes imunodeprimidos, como indivíduos HIV positivos, os sintomas podem ser mais exacerbados, entretanto, a esplenomegalia pode ser menos pronunciada. Embora a inflamação do fígado e do baço seja o quadro clínico mais bem documentado, também foi descrita a inflamação do sistema nervoso e manifestações neurológicas, com disfunção dos nervos periféricos e cranianos, tremores, meningite, convulsões e paresia como derrame hemorrágico. Os estudos apontam que há ligação entre a infecção, a neuroinflamação e o aparecimento de distúrbios da saúde mental, como demonstram os marcadores inflamatórios em pacientes deprimidos (ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CIPRIANO *et al.*, 2017; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; MARSHALL *et al.*, 2018; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; PALIĆ *et al.*, 2019; PIRES, M. *et al.*, 2019).

Na LV, há predomínio da ativação da resposta Th2, com mecanismos complexos de regulação, ainda não totalmente elucidados. Adicionalmente, a falta de tratamento e a associação com outras comorbidades, como infecções bacterianas e sangramentos, pode ocasionar a morte de 10 a 20% dos pacientes (ANVERSA *et al.*, 2018; BRASIL., 2014; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Adicionalmente, pode ocorrer recidiva dos sintomas devido a falha terapêutica, com a detecção do parasita após seis à doze meses do tratamento, sendo necessário um acompanhamento de até doze meses após a intervenção (MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

Logo, a literatura sugere que qualquer paciente que resida em área endêmica e que apresente histórico de febre por mais de 2 semanas de duração, sem resposta a antibióticos e antimaláricos, deve ser investigado a LV (SUNDAR; SINGH, 2018). A alta letalidade da LV está associada aos casos de desnutrição severa ou aos pacientes imunossuprimidos, sendo considerada uma infecção oportunista para os indivíduos infectados pelo vírus HIV (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

1.7 Diagnóstico

O diagnóstico envolve a associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Além disso, a escolha do método de diagnóstico pode variar de acordo com as formas clínicas, o tempo de evolução das lesões e as diferentes espécies dos parasitos envolvida (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018). De interesse, alguns autores não reconhecem um método padrão ouro de diagnóstico, entretanto, outros pesquisadores

consideram como padrão ouro, os exames parasitológicos ou histopatológicos, que demonstram a presença dos parasitos nas biópsias, aspirados das lesões ou da medula óssea (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; CASTELLI *et al.*, 2014).

O diagnóstico parasitológico também pode ser realizado pelo cultivo *in vitro* ou pelo inóculo dos materiais obtidos a partir das amostras clínicas dos pacientes em animais. Entretanto, esses métodos não são comumente usados devido à demora e por serem muito laboriosos (AL-JAWABREH *et al.*, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; BRASIL. , 2017; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

Portanto, os testes moleculares baseados na identificação do material genético do parasito têm sido amplamente utilizados no diagnóstico da leishmaniose. Devido à alta sensibilidade e especificidade, podem ser aplicados em diversos tipos de amostras e possibilitam a caracterização das espécies envolvidas, além de ser o único método possível para a detecção do vírus LRV1. Entretanto, esses testes também apresentam limitações, pois são métodos caros e exigem padronização, infraestrutura e rigor técnico (AL-JAWABREH *et al.*, 2018; ANVERSA *et al.*, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; ITO *et al.*, 2015; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; SUNDAR; SINGH, 2018).

As técnicas sorológicas também são recomendadas para o diagnóstico da leishmaniose, tais como imunofluorescência indireta (IFI), aglutinação direta, ensaio imunoenzimático (ELISA) e intradermorreação de Montenegro (IRM). Entretanto, para a realização dos testes imunológicos é necessário que haja uma resposta humoral proeminente, que em alguns casos de LT, os pacientes podem apresentar baixos títulos de anticorpos, levando a uma baixa sensibilidade desses métodos. Isso também se aplica para os indivíduos infectados pelo HIV, que frequentemente podem gerar resultados falso-negativos (ANVERSA *et al.*, 2018; CASTELLI *et al.*, 2014; SUNDAR; SINGH, 2018). Diante disso, a OMS indica o uso de testes imunocromatográficos rápidos, que possuem boa sensibilidade e especificidade, porém, esses testes não são indicados para áreas não-endêmicas e para pacientes imunocomprometidos (BRASIL. , 2006, 2014, 2017; SUNDAR; SINGH, 2018).

Dessa forma, o diagnóstico oportuno é essencial para a eficácia, manejo clínico e cura sintomatológica do paciente, podendo prevenir as possíveis complicações da doença. Vale lembrar que, mesmo após o tratamento, os testes sorológicos podem gerar resultados positivos, sendo recomendado o uso do diagnóstico molecular para acompanhar a evolução do tratamento (CIPRIANO *et al.*, 2017; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

1.8 Tratamento

O recurso terapêutico bem-sucedido se dá quando o indivíduo infectado é diagnosticado de forma oportuna para assim, iniciar o tratamento com o fármaco mais adequado, e deste modo, concluir a sua terapia de forma segura. Entretanto, não é apenas o uso de fármacos que contribui para a cura. A genética do hospedeiro está associada a variação da suscetibilidade ao parasito, dependendo da maneira com a qual o sistema imune reage contra a infecção, e de como o organismo se relaciona com o fármaco. As características genéticas do parasito também influenciam e podem conferir ao mesmo maior resistência ao medicamento (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; MAIA; CAMPINO, 2018; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018).

Os medicamentos de primeira escolha abrangem todas as manifestações clínicas da doença, e são denominados antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}). Foram os primeiros fármacos a serem desenvolvidos para combater as leishmanioses, sendo usados desde 1920. Possuem estreita janela terapêutica, e atuam nas formas amastigotas, inibindo a atividade glicolítica e oxidativa da via de ácidos graxos, que leva a redução da produção de ATP. Se mostra efetivo em 90% dos casos, porém, apresentam muitos efeitos colaterais no sistema cardiovascular, renal e hepático. No Brasil o Ministério da Saúde distribui gratuitamente o fármaco antimoniato N-metilglucamina (Glucantime®), e a OMS prevê seu esquema terapêutico de 20 mg/Kg/dia por no mínimo de 20 dias (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; BRASIL. , 2014, 2017; COSTA, C. H.; VIEIRA, 2001; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; SILVA, S. C. *et al.*, 2019).

Se não houver resposta satisfatória, ou se o paciente for impossibilitado de realizar a quimioterapia com antimoniato, como por exemplo, grávidas e cardiopatas, o medicamento de segunda escolha é a Anfotericina B. Esse fármaco apresenta taxa de cura superior a 97%, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, e atua sobre as formas amastigotas e promastigotas, agindo na membrana plasmática do parasito, além de induzir a síntese de óxido nítrico pelo macrófago. Entretanto, também são reportados graves efeitos adversos no uso desse medicamento. Assim, formas de se melhorar a tecnologia são usadas como o uso da forma lipossomal, em que diminui o risco de toxicidade, além de aumentar a meia vida do fármaco nos macrófagos. De interesse, como meio de frear a transmissão, a OMS distribui gratuitamente a anfotericina B lipossomal, em áreas estrategicamente importantes, e busca a redução de preços em outros países (ANVERSA

et al., 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; MIRÓ; LÓPEZ-VÉLEZ, 2018; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; WHO, 2020).

Outro fármaco utilizado é a Pentamidina, que age se ligando ao DNA e inibindo a replicação dos organismos sensíveis ao fármaco, sendo sua aplicação via intravenosa ou intramuscular. Entretanto, esse fármaco também possui muitos efeitos adversos, como insuficiência renal em 25% dos pacientes, além de alterar o metabolismo da glicose, podendo acarretar diabetes. Adicionalmente, algumas cepas do parasito apresentam resistência ao medicamento e a taxa de cura é abaixo de 70%. Outros estudos observaram eficácia semelhante ao antimoniato, com efeitos adversos menores (ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017).

Diante do exposto, fica evidente a escassez e limitações dos fármacos atualmente utilizados para o tratamento da leishmaniose. Assim, é urgente compreender melhor os processos que medeiam a interação parasito-hospedeiro para o desenvolvimento de terapias mais eficientes para o tratamento das leishmanioses (ABENGÓZAR *et al.*, 2017; ANVERSA *et al.*, 2018; BORGES; GOMES; RIBEIRO-DIAS, 2018; DA SILVA, G. A. V. *et al.*, 2019; DE MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO; AGUIAR, 2019; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017; STAMPER *et al.*, 2019).

2. Microbiota

A microbiota é definida como uma comunidade de microrganismos que se comportam de modo comensal, simbiótico, ou potencialmente patogênico (CLEMENTE *et al.*, 2012; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; VAN DER MEULEN *et al.*, 2016). No corpo humano, a microbiota é composta por bactérias, Arqueas, vírus, fungos e protozoários. Uma vez constituída a microbiota, os microrganismos estabelecem o hospedeiro como seu habitat, fornecendo suporte e apoio a diversos sistemas, como imunidade e metabolismo (ALLEN, 2016; BÄR *et al.*, 2015; CLARKE *et al.*, 2014; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOPES *et al.*, 2016; LOZUPONE *et al.*, 2012; MISRA; SINGH, 2019).

A microbiota participa do metabolismo humano e do desenvolvimento do sistema imunitário (KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017). Sua atuação ocorre pela produção de metabólitos que modulam e degradam pequenas moléculas, facilitando as comunicações intercelulares (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016). Assim, a microbiota através de seus metabólitos estimula o sistema imunitário favorecendo um estado pró-inflamatório. A presença dos autoanticorpos na circulação são consequências desse estado que frente a uma infecção

pode colaborar para a resistência do organismo (KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOZUPONE *et al.*, 2012; MEULEN *et al.*, 2016; MISRA; SINGH, 2019).

Uma vez formada, a microbiota é moldada durante o decorrer da vida do indivíduo, se modificando, de acordo, com fatores ambientais como dieta, estilo de vida, infecções, gravidez, doenças e o uso de medicamentos (KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; VAN DER MEULEN *et al.*, 2016). Logo, através do tempo cada hospedeiro forma o seu núcleo microbiano funcional. Estudos demonstram que existem estados de equilíbrio estáveis para a microbiota, para a qual mesmo com algumas perturbações não mudam o cerne central, ocorrendo um fenótipo imunitário regulador para a proteção de patologias. Assim, o desequilíbrio no núcleo microbiano funcional e a baixa diversidade dos mesmos pode ocasionar estágios de inflamação e disfunções (BÄR *et al.*, 2015; CLARKE *et al.*, 2014; D'AMELIO; SASSI, 2018; GAO *et al.*, 2018; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOZUPONE *et al.*, 2012; MISRA; SINGH, 2019; VAN DER MEULEN *et al.*, 2016).

O maior reservatório de microrganismos no corpo humano é o trato gastrointestinal. A microbiota intestinal é constituída tipicamente por mais de 1.000 espécies de bactérias (KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017), que vivem no intestino, e que, através de interações complexas, contribuem para o amadurecimento e modulação do sistema imunitário do hospedeiro (BÄR *et al.*, 2015; LOZUPONE, GORDON, 2012; CLARKE *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2018; LEVY; THAISS; ELINAV, 2016; LOPES *et al.*, 2016). A disbiose da microbiota intestinal pode ocasionar efeitos de grande alcance na saúde do hospedeiro (GAO *et al.*, 2018), acarretando inflamações e aumento da permeabilidade intestinal, que por sua vez, aumenta a exposição dos antígenos e aumento da produção de autoanticorpos (KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOZUPONE *et al.*, 2012; MEULEN *et al.*, 2016; MISRA; SINGH, 2019).

Outro sistema a ser observado é a pele. O maior órgão do corpo humano, em sua composição possui células queratinizadas, imunitárias e microrganismos, funcionando como barreira física para a proteção e habitat de diversos microrganismos, de maneira mutualística (BELKAID; SEGRE, 2014; EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017).

Assim, a pele se torna um ecossistema complexo e dinâmico com uma microbiota bem característica, fundamental para a fisiologia e imunidade da pele (CHEN; FISCHBACH; BELKAID, 2018). Logo, a colonização de microrganismos patogênicos na pele é prejudicada por diversos fatores, como a temperatura relativamente baixa da pele (29-34°C), o pH ácido de cerca de 4,5 a 5,5, e a competição com as bactérias residentes. Adicionalmente, várias pesquisas sugerem o uso terapêutico de probióticos, para a

eliminação microrganismos patogênicos ou como uma forma de manter a microbiota já residente, se beneficiando de suas vantagens (EGERT; SIMMERING; RIEDEL, 2017).

Outros estudos demonstram que a microbiota influencia significante o curso clínico de várias infecções. Assim, o processo em que o indivíduo não possui microrganismos considerados probióticos, ou a elevação de organismos considerados patogênicos, denominado disbiose, pode estar associado a exacerbação de infecções por patógenos. Logo, sabe-se que uma microbiota bem estabelecida frente a uma infecção, tende a se restabelecer a voltar ao seu estágio de homeostase, ocasionando uma resposta protetora a infecção. Por sua vez, um indivíduo, com baixa diversidade bacteriana, é considerado propenso ao desenvolvimento de diversas patologias. Assim, o uso de estirpes melhoradas de probióticos podem ajudar na prevenção ou no tratamento de infecções parasitárias, podendo ser uma alternativa para pacientes com imunodepressão ou em casos de tratamento muito agressivo (BÄR *et al.*, 2015; COHNSTAEDT; ALFONSO-PARRA, 2019; D'AMELIO; SASSI, 2018; HAJAVI *et al.*, 2019).

1.9 Microbiota e o Metabolismo

Devido a composição da microbiota, diversas espécies de microrganismos, do hospedeiro teve sua evolução metabólica atrelada a essas espécies (GAO *et al.*, 2018; LEVY; THAISS; ELINAV, 2016). Assim, os microrganismos influenciam na secreção de diversos metabolitos, produtos da fermentação de alimentos, mais precisamente das fibras, auxiliam no metabolismo dos lipídios, glicose e dos colesteróis, formando os SCFAS (ácidos graxos de cadeia curta), que são de extrema importância para a saúde do hospedeiro. A elevada concentração de SCFAS inibe o crescimento de bactérias patogênicas, além de regular a expressão gênica, diminuindo a virulência de alguns patógenos (CLARKE *et al.*, 2014; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOPES *et al.*, 2016).

Além disso, a microbiota participa da produção de metabolitos derivados das poliamidas dos alimentos, através de aminoácidos como triptofano e arginina, ajudam na manutenção da integridade da mucosa enteral e na defesa contra patógenos, mediante a produção de peptídeos antimicrobianos. Esse processo melhora o desenvolvimento e a manutenção da mucosa intestinal e de células imunitárias residentes, afetando indiretamente a função imunológica (D'AMELIO; SASSI, 2018).

Outro processo importante que correlaciona a microbiota ao metabolismo do triptofano é o equilíbrio entre a resposta imunitária e sua tolerância (GAO *et al.*, 2018). Como exemplo, a bactéria *Lactobacillus* utiliza o triptofano como fonte de energia para produzir ligantes para os receptores das células linfoides (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016).

Adicionalmente a manipulação desse aminoácido está relacionada ao aumento de serotonina, neurotransmissor com ação importante para o sistema nervoso central e entérico. Finalmente, a desregulação do equilíbrio metabólico, ocasionada por fatores como envelhecimento, *stress*, probióticos e doenças crônicas, pode influenciar na imunidade (GAO *et al.*, 2018).

1.10 Microbiota e a Imunidade

O sistema imunitário, por meio de seus componentes, colabora na constituição, localização, e modulação de metabolitos produzidos pela microbiota intestinal, ao passo que a microbiota influencia na ativação de alguns componentes do sistema imunitário de forma mútua (GAO *et al.*, 2018; MISRA; SINGH, 2019). Exemplificando, o intestino humano contém quase 80% de todas as células plasmáticas que produzem os anticorpos IgA, que participam da captura e fagocitose de bactérias patogênicas, evitando a ligação de toxinas aos receptores epiteliais. Assim a microbiota intestinal modula e influencia a expressão de receptores de imunoglobulinas (VAN DER MEULEN *et al.*, 2016).

Um dos sinais da interação da microbiota intestinal e o sistema imunitário está na produção de moléculas de hidratos de carbono (butirato, propionato e acetato de etila) pelas bactérias do intestino (CLARKE *et al.*, 2014; D'AMELIO; SASSI, 2018; LEVY; THAISS; ELINAV, 2016). Deste modo, a degradação de hidratos de carbono indigeríveis no intestino humano é realizada pela microbiota através de enzimas digestivas. Logo, os produtos secretados por bactérias anaeróbicas são convertidos por enzimas e utilizados como fonte de energia para a produção de vitaminas, que uma vez convertidas participam e influenciam o sistema imunitário (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016; VAN DER MEULEN *et al.*, 2016). Como exemplo as bactérias do gênero *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, estes são probióticos que convertem componentes dietéticos em vitamina K e em vitamina B hidrossolúveis (HAJAVI *et al.*, 2019; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017).

A ação da microbiota na imunidade abrange todos os sistemas do corpo. Os metabolitos secretados por microrganismos comensais podem levar a desregulação dos mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, IL-12 e ON (LOPES *et al.*, 2016), e atua na diferenciação das células T, alterando a regulação imunológica e o desenvolvendo da resposta das células T e B (LOPES *et al.*, 2016; VAN DER MEULEN *et al.*, 2016).

Pesquisas com camundongos *germfree* demonstraram que a microbiota possui papel no desenvolvimento e manutenção do sistema imunitário do hospedeiro (CLARKE *et al.*, 2014; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017; LOPES *et al.*, 2016). Adicionalmente, outras

pesquisas sugerem que o processo de disbiose pode desencadear uma resposta inflamatória de maneira que abrangem todo o sistema (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016). Esse processo se daria principalmente devido ao desequilíbrio prolongado e persistente de microrganismos no intestino, acarretando um estado inflamatório de baixo grau na mucosa, alterando a permeabilidade do epitélio intestinal e levando a um estado inflamatório crônico, afetando o sistema imunitário sistêmico (VAN DER MEULEN *et al.*, 2016). Por essa razão, os fatores ambientais estão correlacionados à distúrbios sistêmicos, como asma ou diabetes (CLARKE *et al.*, 2014; D'AMELIO; SASSI, 2018; KIM; ZENG; NÚÑEZ, 2017).

Logo, é de grande importância compreender melhor os mecanismos que medeiam a interação entre a microbiota e hospedeiro uma vez que a microbiota pode contribuir na progressão da patologia (exacerbando a resposta imunitária), ou atuar como fator protetor do hospedeiro pela modulação da resposta imunitária (LEVY; THAISS; ELINAV, 2016; MISRA; SINGH, 2019).

1.11 Microbiota e a Leishmaniose

Pesquisas demonstraram uma íntima relação entre a microbiota intestinal do hospedeiro e possíveis infecções (LAPPAN *et al.*, 2019; VILLARINO *et al.*, 2016). Metabolitos produzidos pela microbiota modulam a resposta imune do hospedeiro, interferindo no curso da infecção (DEY *et al.*, 2018; SCHARSCHMIDT, 2017). No caso da leishmaniose, há poucos artigos relacionados ao tema. Estudos sobre a microbiota do flebotomíneo foram bem documentados e constituem a maioria dos artigos publicados. As pesquisas demonstram que a microbiota do vetor influencia a produção de moléculas que são secretadas no momento do repasto sanguíneo. Essas moléculas atuam sobre o recrutamento de neutrófilos, promovendo o sucesso da infecção. Os artrópodes abrigam uma microbiota rica, que participa da digestão do inseto e está associada a gravidade de infecções ligadas a vetores, atuando na sobrevivência e amadurecimento do parasito no inseto (DEY *et al.*, 2018; PIRES, *et al.*, 2017).

Desse modo, Lamour e colaboradores em 2014, determinaram a importância da microbiota nas infecções por *Leishmania*. Os autores mostraram que diferentes linhagens de camundongos demonstraram diferentes perfis de microbiota, assim, dependendo cada espécie de microbiota contribuiu para a resposta frente a infecção (LAMOUR *et al.*, 2015). Estudos confirmam, que animais *germfree* apresentam diminuição da produção de IFN- γ , TNF- α e NO, apresentando níveis superiores de IL-10, sugerindo que a microbiota modula a formação do sistema imune e induz o curso clínico da infecção (LOPES *et al.*, 2016).

Outros autores se dedicaram ao estudo da microbiota da pele, buscando avaliar o porquê de alguns indivíduos serem resistentes ou em outros casos susceptíveis para as formas crônicas da leishmaniose tegumentar (FONTES *et al.*, 2005; MISRA; SINGH, 2019). Estudos em modelo animal demonstraram que a microbiota residente na pele tem um papel autônomo no controle do processo inflamatório, regulando a função linfocitária de células T (NAIK *et al.*, 2013). Como também, Oliveira e colaboradores investigaram a importância da microbiota hospedeira na diferenciação dos subconjuntos de células T em resposta a infecção, mostrando que camundongos *germfree* apresentam uma parasitemia mais elevada, e demoram mais tempo para a cicatrização das lesões (OLIVEIRA, *et al.*, 2005). Entretanto, os resultados dos estudos são divergentes, com trabalhos que apontam que os animais *germfree*, proporcionaram uma cicatrização melhor, com diminuição significativa do recrutamento de neutrófilos, ocasionando o aumento de macrófagos ativados e a secreção de citocinas IL-10 (CANESSO *et al.*, 2014).

De interesse, outras pesquisas sugerem que peptídeos antimicrobianos podem sinalizar a microbiota do corpo sobre o desequilíbrio local, levando a um nível sistêmico, visto que algumas bactérias encontradas na pele lesionada, podem ser transferidas para outros pontos em que até então estavam saudáveis (GIMBLET *et al.*, 2017; MISRA; SINGH, 2019; NAIK *et al.*, 2012; SCHARSCHMIDT, 2017). Além disso, LOPES (2018) mostrou que animais *germfree* reduziram a produção de IFN- γ , TNF- α e NO, com níveis mais altos de IL-10, sugerindo que a microbiota modula o sistema imunológico do hospedeiro e atua no curso clínico da infecção (LOPES, 2018).

Vários estudos estabeleceram uma correlação entre a mudança da microbiota cutânea e perturbações associadas a pele (MISRA *et al.*, 2019), sua composição bacteriana existente demonstra que as comunidades bacterianas nas lesões de LC, são diferentes das encontradas em uma pele saudável, levando a redução da diversidade microbiana (SALGADO *et al.*, 2016). Adicionalmente, Gimblet e colaboradores, (2017) demonstraram semelhanças entre a disbiose da microbiota de camundongos e humanos infectados por *Leishmania* spp. Essa disbiose contribuiria para a exacerbação da resposta imune e o aparecimento de lesões tegumentares (GIMBLET *et al.*, 2017). Corroborando com estes dados, Borbón *et al.* (2019) verificaram em animais co-infectados com *S. aureus* apresentaram uma exacerbação das lesões cutâneas. Nesse cenário, as lesões tiveram susceptibilidade ao crescimento de bactérias e leveduras patogênicas transitórias, iniciando infecções secundárias, logo, essas infecções influenciam na cicatrização (FONTES *et al.*, 2005).

Dessa forma, sugere-se o uso de antibióticos na terapêutica da LC para ajudar na cicatrização e diminuir as cicatrizes deixadas pelas lesões (MISRA; SINGH, 2019). Scharschmidt, 2017, afirma que deve haver um *timing* para influenciar a evolução da disbiose da microbiota, sendo possível modular e controlar a progressão da patologia. Assim, cada bactéria poderá promover um impacto diferenciado na infecção com disbiose, podendo ter mono colonizações diversas em cada hospedeiro (GIMBLET *et al.*, 2017; MISRA; SINGH, 2019; NAIK *et al.*, 2012; SCHARSCHMIDT, 2017).

A influência da microbiota na manifestação clínica de LV, os estudos abordam a vulnerabilidade do indivíduo infectado para outras doenças tropicais negligenciadas como por exemplo, infecções por helmintos. As pesquisas avaliaram a coinfeção por *L. donovani* com helmintos, demonstrando a ativação descontrolada da resposta imunológica, com alta carga parasitária no fígado e no baço, na presença de disbiose (LAPPAN *et al.*, 2019). Lewis e colaboradores mostraram que a disbiose intestinal seria consequência da alteração da microbiota intestinal, influenciada no curso clínico da infecção. Esses dados reforçam a importância do uso de antibióticos para a profilaxia contra infecções bacterianas secundárias, sendo considerada como terapia adjuvante (LEWIS *et al.*, 2020). Recentemente, Passos e colaboradores demonstraram que as bactérias intestinais influenciam a carga parasitária da espécie de *L. Infantum* e ou na progressão das lesões do cólon (PASSOS *et al.*, 2020).

II. JUSTIFICATIVA

Diante do exposto, é muito importante ampliar o conhecimento sobre as interações entre os microrganismos que formam a microbiota intestinal e os mecanismos de resposta imunológica do hospedeiro frente às infecções por *Leishmania* spp. Diversas pesquisas já demonstram que a microbiota influencia o estabelecimento e a progressão de doenças infecciosas, entretanto, há poucos trabalhos dedicados ao estudo da importância da microbiota intestinal na leishmaniose.

III. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da microbiota intestinal nas infecções causadas por diversas espécies de *Leishmania*. Logo, esperamos que o nosso estudo possa contribuir na construção do conhecimento sobre como as bactérias que compõem a microbiota intestinal influenciam os mecanismos envolvidos na progressão ou na resolução da leishmaniose.

Objetivos específicos

- Revisar sistematicamente a importância da microbiota sobre camundongos infectados por espécies de *Leishmania* causadoras de LC;
- Avaliar a influência de diferentes espécies de bactérias que compõem a microbiota intestinal na carga parasitária em cultura de macrófagos infectados por *Leishmania* spp.;
- Estudar a influência das bactérias intestinais na ativação de macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania*.

Para melhor organização e entendimento, a dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro referente a revisão sistemática e o segundo, alusivo ao estudo experimental *in vitro*. Assim, os dois capítulos apresentam a metodologia, os resultados e a discussão de forma independente.

Capítulo I

The role of host microbiota in cutaneous leishmaniasis: A systematic review

Andressa Ândria Ribeiro¹, Nayra Suélen Gomes Dias Alves ¹, Rosa Harumi Uenishi¹,
Luciana Hagström¹, Juliana Lott de Carvalho¹, Mariana Machado Hecht¹, Nadjar Nitz¹ *

¹Interdisciplinary Laboratory of Biosciences, Faculty of Medicine, University of Brasília,
Brasília, Brazil.

* Correspondence:

Nadjar Nitz: nadjarnitz@gmail.com; Interdisciplinary Laboratory of Biosciences, Faculty of
Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília, Brazil. Zip code: 70.910-
900.

Abstract

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by dozens of *Leishmania* species. The mechanisms underlying the pathogenesis of such a disease are not fully elucidated at this point, but it is known that the disease manifestation is influenced by different host- and parasite-related factors, including the host microbiota. Nevertheless, limited studies have systematically revised the influence of the host microbiota in the clinical course of cutaneous leishmaniasis. Therefore, the main objective of the present review is to understand how the immune system of model organisms reacts to changes in the microbiota as a result of infection with cutaneous leishmaniasis. Literature search was carried out in PubMed,

28 EMBASE, Scopus, Web of Science, Livivo, LILACS, and in grey literature, following the
29 guidelines of PRISMA-2020. The study was registered in the International Prospective
30 Registry of Systematic Reviews (PROSPERO). Nine out of 4,402 publications were selected
31 according to the eligibility criteria, which included the inclusion of articles that were
32 performed in animal models (mammals) infected with *Leishmania* ssp. The risk of bias was
33 evaluated through the SYRCLE tool, which indicated that six studies had low risk of bias.
34 The studies suggested that the clinical outcome in susceptible and resistant models
35 depended on the variation of the microbiota composition. Additionally, a dysbiotic microbiota
36 was associated with local inflammation and worsening of skin injuries, without consensus.
37 In conclusion, this systematic review pointed out the main experimental data covering the
38 influence of the microbiota in the host immune system and reinforced the need to expand
39 the research in this field.

40 **Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, *Leishmania*, microbiota, pathogenesis,
41 experimental models, systematic review.

42

43 **1. Introduction**

44

45 Leishmaniasis is a vector-borne neglected tropical disease caused by several
46 *Leishmania* species. It is estimated that 1.3 million people are annually infected with such
47 parasites worldwide and one billion people live in endemic areas at risk of infection (WHO,
48 2020). The disease presents a broad clinical spectrum that can be classified as cutaneous
49 (CL) or visceral leishmaniasis (VL). CL is characterized by injuries on the skin and/or
50 mucous membranes, ranging from localized ulcers to disfiguring lesions. VL is the more
51 severe form of leishmaniasis and can lead to death when not treated on time (ANVERSA
52 et al., 2018; STAMPER et al., 2019).

53 The mechanisms underlying the leishmaniasis pathogenesis are not fully elucidated
54 so far, but it is known that the disease manifestations are multifactorial and involve host
55 and parasite-related factors, including the parasite genetic diversity and the host immune
56 response (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; SCOTT; NOVAIS, 2016). It is well
57 established that *Leishmania* infection triggers a complex activation of the host innate and
58 adaptive immune response, which can result in parasite elimination or persistence. The
59 Th1 response is predominant and involves the activation of lymphocytes TCD4 and
60 macrophages leading an increase of the production of nitric oxide (NO) and pro-
61 inflammatory cytokines (NOVAIS et al., 2014; SCOTT; NOVAIS, 2016; TERRAZAS et al.,
62 2017).

63 Studies demonstrated the role of the intestinal microbiota in modulating the host's
64 immune response and altering the course of leishmaniasis infection (DEY et al., 2018;
65 LAPPAN et al., 2019; SCHARSCHMIDT, 2017; VILLARINO et al., 2016). Nevertheless,
66 few reports describe the influence of the host microbiota on dermatropic *Leishmania*
67 infection (BORBÓN et al., 2019; GIMBLET et al., 2017a; LAMOUR et al., 2015; OLIVEIRA
68 et al., 2005).

69 Thus, the lack of knowledge on this issue is evident and reinforces the need to expand
70 the research to better understand how the host gut microbiota might influence
71 leishmaniasis pathogenesis. In order to summarize current knowledge in the theme and
72 build ground for future research, we performed a systematic review of the influence of the
73 intestinal microbiota on the host's immune response in experimental models of CL.

74

75 **2. Methodology**

76

77 This systematic review was carried out following the guidelines of Systematic
78 Reviews and Meta-Analyses (PRISMA-2020) and was recorded in the International

79 Prospective Registry of Systematic Reviews (PROSPERO) with registration number
80 CRD42021229326 (MOHER et al., 2009).

81

82 **2.1 Eligibility criteria**

83

84 The inclusion and exclusion criteria were based on the question of how the immune
85 system reacts to changes in the host intestinal microbiota in experimental models of
86 cutaneous leishmaniasis. PICOS was used as a guide. Since the theme was poorly
87 investigated in humans, with only three published articles including one research focused
88 on visceral leishmaniasis, we decided to limit the search to studies performed in rodents and
89 other mammals infected with *Leishmania* spp. The exclusion criteria were articles that did
90 not address aspects of the host microbiota, studies conducted in humans, studies focused
91 on that performed analyses involving the vector microbiota, reviews, case studies and
92 editorials were excluded.

93

94 **2.2 Information sources**

95

96 The search was carried out without restriction of year or language on November 04,
97 2020 in the PubMed, EMBASE, Scopus, Web of Science, Livivo and LILACS (Scientific and
98 technic information and evidence of Latin-american and Caribbean Countries; LILACS)
99 databases. We also searched OpenGrey, ProQuest Dissertation & Theses Global and
100 Google Scholar. All duplicate articles were removed using EndNote web and Rayyan QCRI.

101

102 **2.3 Search strategy**

103

104 The search strategy was based on the use of keywords, chosen following the
105 PRISMA guidelines (MOHER et al., 2009; Page et al., 2021). Initially, a preliminary search
106 was performed in the PubMed database. Then, terms from Medical Subject Headings

107 (Mesh), Health Science Descriptors (DECS), and Emtree were used according to the search
108 strategy table in all the selected databases (Supplementary Table 1). A PhD thesis has been
109 actively added, as it conforms to the eligibility criteria. This approach was applied when the
110 document was not found in the database search.

111

112 **2.4 Selection process**

113

114 The selection phase was performed by two independent reviewers [R1(AR) and
115 R2(NA)] who selected articles in two distinct phases: First (phase-1), the two reviewers
116 evaluated the titles and abstracts according the eligibility criteria, using the Rayyan QCRI
117 software; second (phase-2) they viewed full-texts and selected articles that met the same
118 criteria as phase-1. The list of excluded studies and the reasons for their exclusion are
119 described in Supplementary Table 2. The selected articles were cross checked with all the
120 information found between R1 and R2. In case of disagreements between R1 and R2, a
121 third reviewer [R3 (NN)] was consulted before a final decision was made in both phases.

122

123 **2.5 Data collection process and data items**

124

125 Reviewers R1 and R2 independently collected data from the selected articles. Three
126 studies were selected through active search. The collected information was organized in a
127 Microsoft Excel (2010) table with the following data: author; type of study; year of publication;
128 country; model organism characteristics and sample size (species, sex, age, sample size),
129 methodology used to determine the parasitemia, microbiota alterations, cytokine dosage,
130 histology analysis and clinical outcome. The outcome measured was an evaluation of the
131 alteration in the profile of the host immune system, and the relationship between the
132 alteration of the microbiota at the site of infection, and how it affected the pathology. In cases
133 in which such data were missing or unclear, an attempt was made to contact the

134 corresponding author of the study by e-mail to clarify the missing/unclear information (one
135 email was sent every 15 days if necessary).

136

137 **2.6 Study risk of bias assessment**

138

139 The risk of bias was independently evaluated by two reviewers (R1 and R2) using the
140 SYRCLE tool. Divergent points were discussed in order to achieve an agreement. Figure 1
141 was generated using the Robvis software (visualization tool for risk of bias assessment in a
142 systematic review) (HOOIJMANS et al., 2014).

143

144 **3. Results**

145

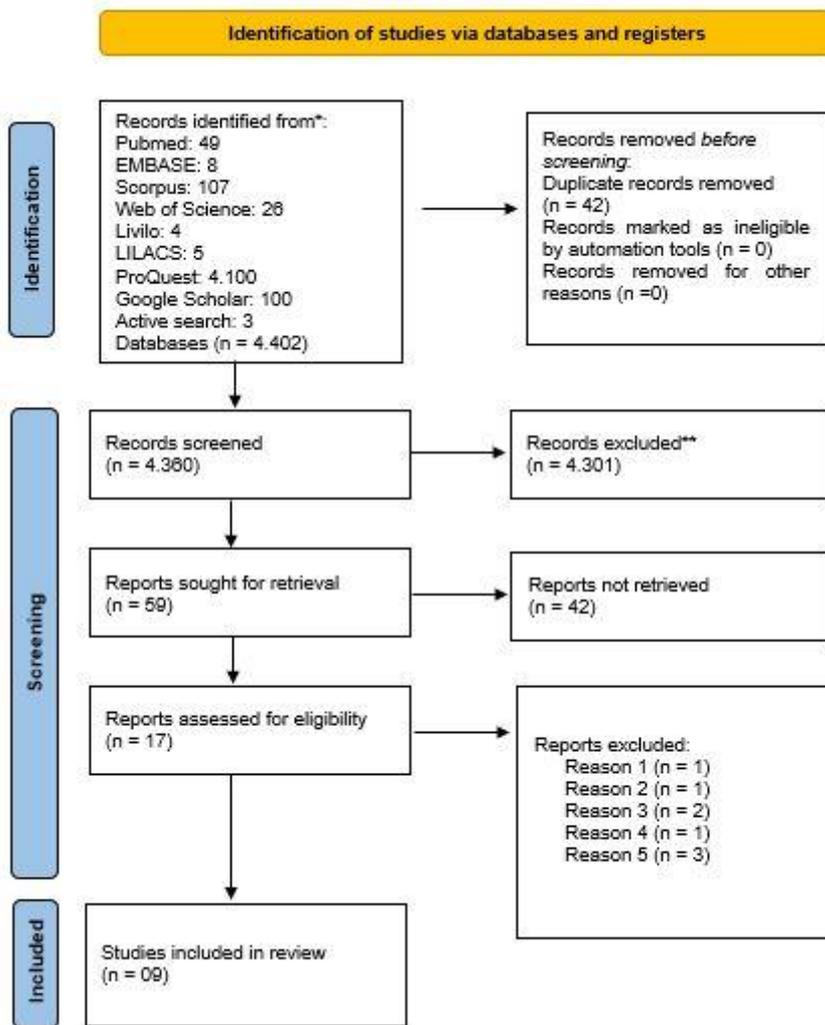
146 **3.1 Study selection and characteristics.**

147

148 Initially, the aforementioned search strategies resulted in 4,402 papers and/or
149 abstracts. After the removal of duplicate studies (selection phase-1), 4,360 papers were
150 retained. Of these, 4,301 articles were excluded because they failed to address the theme
151 of interest, leaving 59 articles, from which 42 were excluded because they did not investigate
152 the host intestinal microbiota or consisted of review studies. Of note, the ProQuest
153 Dissertation & Theses Global search was not effective, with only one manuscript out of more
154 than four thousand found. In selection phase-2, 17 publications were selected for complete
155 reading. Eight of them were excluded because: I) failed to investigate cutaneous
156 leishmaniasis; II) focused on the vector microbiota; III) consisted in a review, IV) consisted
157 in a thesis that had already been published; V) the complete manuscript was not available.
158 Three studies were included by active search through the experts (1) and the reference list
159 (2). Finally, nine publications were selected for data extraction and qualitative synthesis.
160 Study selection flow is shown in Figure 1, and the excluded articles and the reasons for
161 exclusion are summarized in Supplementary Table 2. The studies were published between

162 1987 and 2019, only in four countries: the United States (3), Brazil, with contributions from
 163 groups from the USA (4), the United Kingdom (1), and France (1).

164



165

166 **Figure 1-** Flowchart of study selection. The image represents the steps of the systematic review and selection
 167 criteria. Reports excluded: Reason 1 - the study did not involve cutaneous leishmaniasis infection; Reason 2
 168 - the study focused on the vector microbiota; Reason 3 - the study consisted in a review; Reason 4 - the study
 169 consisted in a thesis that had already been published; Reason 5 - the complete manuscript was not available.
 170

171

172 3.2 Risk of bias

173

174 The evaluation of publication bias demonstrated that 66% (6/9) of the studies had their
 175 planning and attributions well established at random (BORBÓN et al., 2019; DE OLIVEIRA
 176 et al., 1999; LAMOUR et al., 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA, et al., 2005, NAIK et al., 2012).
 177 However, 33% (3/9) of the articles were classified as having a high risk of bias (GIMBLET

178 et al., 2017; JULIA et al., 2000; VIEIRA et al., 1987), and one study did not provide statistical
 179 analysis (JULIA et al., 2000). In addition, we verified that most studies did not explain how
 180 the animals were blindly allocated, either by the caregiver or the investigator, in addition to
 181 randomness (Figure 2).

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	Overall
Borbón et al, 2019	+	+	?	?	?	+	+	+	+
De Oliveira et al, 2009	+	+	?	?	?	+	+	+	+
De Oliveira et al, 2005	+	+	?	?	?	+	+	+	+
Gimblet et al, 2017	+	×	?	+	×	+	+	+	×
Lamour et al, 2015	+	+	?	+	?	+	+	+	+
Lopes, 2018	+	+	?	?	?	+	+	+	+
Julia et al, 2000	+	+	?	?	?	+	×	×	×
Naik et al, 2012	+	+	?	?	?	+	+	+	+
Vieira et al, 1987	×	×	?	?	×	+	+	+	×

D1: Was the allocation sequence adequately generated and applied?
 D2: Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?
 D3: Was the allocation adequately concealed?
 D4: Were the animals randomly housed during the experiment?
 D5: Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?
 D6: Were animals selected at random for outcome assessment?
 D7: Was the outcome assessor blinded?
 D8: Were incomplete outcome data adequately addressed?

Judgement	
×	High
+	Low
?	No information

182
 183 **Figure 2-** Level of the risk of bias of each included study according to the SYRCLE methodology. By the
 184 software Robvis.

185 **3.3. Methodology variations**
 186

187 The selected articles presented various methodologies, from the choice of the animal
 188 model to the techniques used to evaluate the different experimental parameters
 189 (quantification of parasitemia, determination of cytokines, histological analysis, and
 190 microbiota evaluation).

191
 192 **3.3.1. Experimental model and *Leishmania* spp.**
 193

194 The majority (5/9) of the studies used the C57BL/6 mice as experimental model
195 (BORBÓN et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 1999; GIMBLET et al., 2017; LAMOUR et al.,
196 2015; NAIK et al., 2012). The mouse strain Swiss and Balb/C animals were used in 4 out 9
197 studies each (GIMBLET et al., 2017b; LAMOUR et al., 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA, et
198 al., 2005; VIEIRA et al., 1987). Of interest, 33% (3/9) of the studies used more than one
199 animal strain to perform the experiments (DE OLIVEIRA et al., 1999; GIMBLET et al., 2017;
200 LAMOUR et al., 2015).

201 The number of animals per experimental group had a great variation, between 3 and
202 10 per group and the duration of the experiments varied between 3 and 15 weeks.
203 Importantly, regarding the status of the microbiota, the studies used germ-free (GF) (DE
204 OLIVEIRA, et al., 1999; JULIA et al., 2000; LOPES, 2018; NAIK et al., 2012; OLIVEIRA, et
205 al., 2005; VIEIRA et al., 1987), conventional (BORBÓN et al., 2019; DE OLIVEIRA, et al.,
206 1999; GIMBLET et al., 2017; JULIA et al., 2000; LOPES, 2018; LAMOUR et al., 2015; NAIK
207 et al., 2012), or conventionalized mice (DE OLIVEIRA, et al., 1999; LOPES, 2018;
208 OLIVEIRA, et al., 2005, VIEIRA et al., 1987). Conventional animals were raised from GF
209 mice, after two generations, creating their own microbiota, while conventionalized mice had
210 the microbiota reconstituted by contact with feces (DE OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA et
211 al., 2005).

212

213 **3.3.2. Detection of parasitemia, cytokine dosage, histological analysis and microbiota** 214 **evaluation**

215

216 Parasitemia was determined either by qPCR (BORBÓN, et al., 2019; and LAMOUR
217 et al., 2015) or microscopy (OLIVEIRA et al., 2005; LOPES, 2018 and JULIA et al., 2000).
218 Regarding the immune response evaluation, 88,9% (8/9) of studies performed cytokines
219 quantification by ELISA or flow cytometry. Only Vieira et al (1987) did not include this
220 investigation. Histological analyses were carried out in 66.7% (6/9) of the studies using the

221 hematoxylin and eosin staining of several tissue samples (BORBÓN et al., 2019; DE
222 OLIVEIRA et al., 1999; GIMBLET et al., 2017; NAIK et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2005;
223 VIEIRA et al., 1987). The evaluation of the microbiota was performed by 16S rRNA
224 (GIMBLET et al., 2017; NAIK et al., 2012) or next generation sequencing, discriminating the
225 distinct groups of bacteria (LAMOUR et al., 2015). The objectives and methodologies
226 performed in the select studies are summarized in Table 1.

228 Tabela 1- Characteristics of the included studies.

Studies	Aim of each study	Experimental model <i>Leishmania</i> spp.	<i>Leishmania</i> spp.	Parasitemia evaluation	Cytokine dosage	Evaluated cytokines	Histology Analyses (Hematoxylin and eosin)	Microbiota analysis
Borbón et al., 2019	Evaluate the influence of <i>Staphylococcus aureus</i> coinfection in host immune response. C57BL/6	C57BL/6	<i>L. major</i>	qPCR	Multiplex fluorescent bead arrays, and ELISA, and Flow cytometry	IL-2, IL-17A + IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, TNF- α IFN γ , IL-1 β	Ear Tissue	Evaluated by comparing the profiles of each group
De Oliveira et al., 1999	Analyze the role of Th1 and Th2 immune response in mice with absence or normal microbiota.	C57; BalB/C; Swiss, and Swiss germ-free	<i>L. major</i>	Not performed	ELISA	IL-4, IFN γ	Footpad Tissue	Evaluated by comparing the profiles of each group
Gimblet et al., 2017	To investigate the role of the skin microbiota in cutaneous leishmaniasis	C57 and BalB/C	<i>L. major</i> .	Not performed	Flow cytometry	IL-1 β , IL-17, IFN- γ	Ear Tissue	16S rRNA gene analysis
Julia et al., 2000	To evaluate the importance of the microbiota in T cells activation	Balb/C	<i>L. major</i>	Microscopy	PCR and Flow cytometry	IL-2, IFN γ , CD44, IL-4 (m RNA), IL-10 (m RNA),	Not performed	Evaluated by comparing the profiles of each group
Lamour et al., 2015	To characterize the host immune response, metabolic status and microbiota in resistant and susceptible experimental models.	C57 and BalB/C	<i>L. major</i>	qPCR	NMR spectroscopy	IFN γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, CXCL1, IL-10, IL-12, TNF- α	Not performed	NGS Sequencing
Lopes, 2018	Analyze the influence of microbiota in macrophage function	<i>L. major</i> Swiss/NIH germ free	<i>L. major</i>	Microscopy	ELISA	IFN γ , TNF, IL-12p40	Not performed	Evaluated by comparing the profiles of each group

Naik et al., 2012	To investigate the role of gut and skin microbiota in host immune response	C57BL/6	<i>L. major</i>	Not performed	Flow cytometry	IL-17 A, IFN γ , IL-1 TNF- α	Ear Tissue	16S rRNA gene sequence
Oliveira et al., 2005	To investigate the importance of the host microbiota on differentiation of T cells.	Swiss/NIH germ free	<i>L. major</i>	Microscopy, culture	ELISA	IL-12, IL-4, IFN γ	Footpad Tissue	Evaluated by comparing the profiles of each group
Vieira et al., 1987	To Study the host immune response modulation by microbiota	Swiss CFW	<i>L. amazonensis</i>	Not performed	Not applied	Not performed	Tail Tissue	Evaluated by comparing the profiles of each group

229

230

231

232

233

234 **3.3.3. Clinical outcome**

235

236 Lesion size was the most frequently investigated outcome of infection, being
237 analyzed in 88% (8/9) of the included studies. Most of the articles (8/9) chose *L. major*
238 to perform the experiments, with the exception of VIEIRA et al., (1987), which used
239 *L. amazonensis*. The parasite inoculation sites, for the most part (5/9), varied between
240 the paws (44.4%; 5/9) (BORBÓN et al., 2019; DE OLIVEIRA et al., 1999; JULIA et
241 al., 2000; LOPES, 2018; OLIVEIRA, M R et al., 2005), ears (22.2%; 2/9) (GIMBLET
242 et al., 2017a; NAIK et al., 2012), subcutaneous area near the tail (11.1%; 1/9) (VIEIRA
243 et al., 1987), and subcutaneous application without a determined site (11.1%; 1/9)
244 (LAMOURE et al., 2015).

245 The study conducted by De Oliveira et al., (1999) showed that Swiss and
246 C57BL/6 animals were self-healing, while Balb/c mice were susceptible to infection,
247 with persistent lesions. In one study, germ-free animals that were inoculated and had
248 their microbiota replaced after a few days did not show lesion metastasis, but showed
249 larger lesions than animals with wild- type microbiota. Conflicting observations were
250 made regarding the lesion size of germ-free animals. While Oliveira et al (2005) and
251 Lopes., (2018) showed that germ-free animals had larger lesions (LOPES, 2018;
252 OLIVEIRA et al., 2005), Naik et al., (2012) and Vieira et al., (1987) demonstrated that
253 these animals presented minor lesions with smaller edema and necrosis (NAIK et al.,
254 2012; VIEIRA et al., 1987).

255 Recent studies have evaluated in more detail the influence of the intestinal
256 microbiota. Using susceptible and resistant models of cutaneous leishmaniasis,

257 Lamour et al., (2015) demonstrated that the clinical outcome was influenced by the
258 intestinal microbiota composition. Borbón et al., (2019) showed that C57BL/6 infected
259 with *L. major* and co-infected with *Staphylococcus aureus* presented larger lesions
260 than animals without co-infection with *S. aureus*. The presence of such bacteria was
261 associated with higher inflammation, without, however, being associated with higher
262 parasitic load. Finally, Gimblet et al., (2017) demonstrated the occurrence of
263 dysbiosis in the skin lesions of C57BL/6 mice infected with *L. major*. The increase of
264 *Streptococcus* spp in infected Balb/C was correlated with the increase of
265 *Staphylococcus xylosus* during the persistence of the lesion, the bacterial load being
266 normalized after the resolution of the lesions.

267

268 **3.3.4. Microbiota influence on Leishmania infectivity**

269

270 Commonly, the studies showed that germ-free animals presented a higher
271 parasitic load, with higher concentration of parasites in the spleen and lymphoid
272 tissue (JULIA et al., 2000, LOPES, 2018; OLIVEIRA et al., 2005). Borbón et al.,
273 (2019) demonstrated that the co-infection with *S. aureus* did not alter the parasitic
274 load in C57BL/6 animals, resistant to *L. major* infection, but they observed an
275 increase in the size of the lesions. In addition, Lamour et al., (2015) correlated the
276 parasitic load with the production of metabolites and with immunity and microbial
277 markers. In this study, susceptible mice showed increased plasma glucose and
278 circulating triglyceride levels in the blood, in addition to a pro-inflammatory immune
279 profile, higher parasite load, and more abundant Clostridia class representatives in
280 the microbiota composition, compared to the resistant model (LAMOUR et al., 2015).

281

282 **3.3.5. The role of microbiota in the host immune response**

283

284 Studies suggested that the lack of a well-established microbiota is related to
285 an infection resistance status (DE OLIVEIRA et al., 1999; NAIK et al., 2012; VIEIRA
286 et al., 1987). In this sense, additional findings suggest that the absence of the natural
287 microbiota is a factor of susceptibility to infection (JULIA et al., 2000; LAMOUR et al.,
288 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA et al., 2005).

289 The exacerbation of skin lesions in the absence of a natural, well-established
290 microbiota seems to be associated with an increased recruitment of neutrophils to
291 the lesion site, accompanied with the loss of their microbicidal function, due to a lower
292 production of NO (BORBÓN et al., 2019; LOPES, 2018; OLIVEIRA et al., 2005).

293 Moreover, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ and IL-12 were the main cytokines involved in
294 the immune response in cutaneous leishmaniasis; however, it is not well established
295 which plays a protective or harmful role (BORBÓN et al., 2019; GIMBLET et al., 2017;
296 JULIA et al., 2000; LAMOUR et al., 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA, et al., 2005).
297 According to Lamour et al., (2015), the protective profile was related with the increase
298 of IL-12 production, while the IL-1 β release was associated with a susceptible profile.
299 Nevertheless, according to Naik et al. (2012) the reduction of IFN- γ supported a
300 susceptible status, while IL-1 β release acted as a protective factor, favoring the
301 healing of lesions, corroborating with other authors (BORBÓN et al., 2019; GIMBLET
302 et al., 2017; LAMOUR et al., 2015). Lopes (2018) observed that germ-free animals
303 did not alter the production of IL-12, IFN- γ and TNF- α compared to wild type
304 counterparts in the context of cutaneous leishmaniasis (LOPES, 2018). Finally, Julia

305 et al., (2000) showed that bacterial antigens stimulate the production of IFN- γ in a
306 protective way (JULIA et al., 2000).

307

308 **3.3.6 Dysbiosis is determinant for the development of an inflammatory** 309 **immune response**

310

311 The histological analyses indicated the dysbiotic profile as a determining factor
312 for the development of an inflammatory immune response in mice infected with
313 *Leishmania* spp. For instance, Oliveira et al. (2005) showed that the germ-free
314 animals presented a more intense and diffuse inflammation associated with necrosis
315 with exudates containing macrophages, lymphocytes and plasma cells, suggesting
316 that the severe granulomatous inflammatory response is related with the absence of
317 the microbiota (OLIVEIRA, et al., 2005). In contrast, Vieira et al., (1987) and Naik et
318 al., (2012) demonstrated that the absence of the microbiota may result in a resistant
319 profile to *Leishmania* spp. infection, showing minor lesions with reduced edema.
320 Additionally, a dysbiotic microbiota was correlated with local inflammation,
321 characterized by the presence of macrophages filled with amastigotes, apoptotic
322 neutrophils, and tissue degeneration (DE OLIVEIRA et al., 1999; GIMBLET et al.,
323 2017). Finally, Borbón et al. (2019) showed that dysbiosis caused by the increase of
324 *S. aureus* is associated with the recruitment of inactivated neutrophils, which sustain
325 inflammation without promoting parasite elimination (BORBÓN et al., 2019). A brief
326 statement of the main findings of the selected studies is presented in Table 2.

327

328 Tabela 2- Main conclusions of the selected studies

Studies	Main conclusions
---------	------------------

Borbón, et al, 2019	The <i>S. aureus</i> co-infection did not alter the parasite load but provoked a proinflammatory immune response and neutrophil recruitment, leading to an increase in the size of the lesion.
De Oliveira et al, 1999	The Swiss animals showed a self-controlled lesion like that observed in C57/BL6 resistant mice. The resistance status was associated with the Th1 immune response. The germ-free animals were susceptible to <i>L. major</i> infection, reinforcing the role of microbiota in clinical outcome.
Gimblet et al, 2017	<i>L. major</i> infection causes a skin dysbiosis, characterized by lower bacterial diversity, with the predominance of <i>Staphylococcus</i> spp. and <i>Streptococcus</i> spp. The dysbiosis is associated with an exacerbated inflammatory response and disease severity.
Julia et al, 2000	Germ-free mice were susceptible to <i>L. major</i> , developing progressive lesions <i>major</i> even when they are treated with anti-IL-4. The authors suggest that bacterial antigen may influence cytokine production and T-cells activation.
Lamour et al, 2015	The study demonstrated differences in metabolism, immune phenotype, and microbiota composition between the susceptible and resistant models of <i>L. major</i> infection. The authors suggested the association between the metabolism, innate immune system and gut microbiome is important for a successful host response during Leishmania infection
Lopes, 2018	Germ-free mice had difficulty to control the <i>L. Major</i> infection, showing an impairment of components of the innate inflammatory response and developed larger lesions.
Naik et al, 2012	Germ-free mice infected with mono associated <i>S. epidermidis</i> showed larger lesions than the animals with intact skin microbiota. The results indicated that skin resident commensals are important to control the local immune response, independently of the gut microbiota
Oliveira et al, 2005	Germ-free mice fail to resolve lesions caused by <i>L. Major</i> infection, and the microbiota seems to modulate the inflammatory process, and macrophage activation.
Vieira et al, 1987	Mice with microbiota showed larger lesion sizes and necrosis, compared to germ-free group. The authors suggest that the lack of microbiota is a protective factor.

329

330 4. Discussion

331

332 The present review highlights the scarcity of studies published which investigated the
333 role of the host microbiota in *Leishmania* spp. infection, as only nine articles were
334 included in our study. Moreover, we verified the lack of standardization of in vivo
335 experiments. Divergences in the amount of inoculum and in the composition of
336 experimental groups - recurrent factors in animal studies - caused important
337 heterogeneity in the observed results and permitted only a qualitative synthesis of
338 results.

339 Most studies used *L. major*, although there are several species that can cause
340 cutaneous leishmaniasis. According to the literature, each species has its own
341 characteristics and differentially activates the host's immune system. Some species
342 are related with an exacerbation in the pathology in mice models, while others may
343 exhibit a resistance profile using the same animal lineage (BORGES; GOMES;
344 RIBEIRO-DIAS., 2018; BOUSSOFFARA et al., 2019). For instance, C57BL/6 mice
345 infected by *L. major* are considered resistant to infection, but may be susceptible to
346 *L. amazonensis* (COSTA; VALLE., 2014). Of interest, only one study was conducted
347 with *L. amazonensis* (VIEIRA et al., 1987). Our findings endorse one of the main
348 problems that affect most studies on *Leishmania*, the generalization of one species
349 for the others (COSTA; VALLE, 2014; SCOTT; NOVAIS., 2016) and emphasizes the
350 need for further research using other *Leishmania* species.

351 Of interest, the selected studies established parameters for the germ-free
352 profile analysis, which were similar for those treated with antibiotics (LOPES, 2018;
353 NAIK et al., 2012). However, Naik et al. pointed out that the use of the antibiotic
354 cocktail did not alter the microbiota of the skin, and is not a suitable model for
355 analyzing the microbiota of lesions (NAIK et al., 2012). Other authors used germ-free
356 mice or compared of the same animals at different times, originally without microbiota,
357 before the infection, and then, after the microbiota reconstitution and the infection
358 (DE OLIVEIRA et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2005; VIEIRA et al., 1987). Also, other
359 studies monitored the natural microbiota during the course of the infection (BORBÓN
360 et al., 2019; GIMBLET et al., 2017; LAMOUR et al., 2015).

361 Furthermore, the authors demonstrated that mice who owned a conserved
362 microbiota showed an efficient immune response, able to the cure of lesions, while
363 the susceptible model presented an exacerbated Th1 response with increased skin
364 lesions, and a defective expression of important molecules involved in immune
365 response activation (LAMOURE *et al.*, 2015). Also, LOPES (2018) showed that germ-
366 free animals decreased the production of IFN- γ , TNF- α and NO, with higher levels of
367 IL-10, suggesting that the microbiota modulates the host immune system and
368 influences the clinical course of infection.

369 Several studies have established the correlation between changes in the
370 cutaneous microbiota and skin-associated disorders (MISRA *et al.*, 2019). Regarding
371 the composition of bacteria resident in the skin, the literature demonstrated that
372 bacterial communities in cutaneous leishmaniasis lesions are different from those
373 found in healthy skin, with a reduction of microbial diversity (SALGADO *et al.*, 2016).
374 Corroborating such an observation, Borbón *et al.*, (2019) verified, in animals co-
375 infected with *S. aureus*, an exacerbation of the skin lesions caused by CL (BORBÓN
376 *et al.*, 2019). Additionally, Gimblet *et al.*, (2017) demonstrated that dysbiosis
377 contributed to the exacerbation of the immune response and the appearance of
378 cutaneous lesions, similar to human leishmaniasis infection (GIMBLET *et al.*, 2017).

379 In this context, studies in humans have correlated the susceptibility of the
380 lesions with the growth of transitory pathogenic bacteria and yeasts, initiating
381 secondary infections (FONTES *et al.*, 2005; SALGADO *et al.*, 2016). Thus, the results
382 suggest that the disruption in CL lesions is associated with an opportunistic
383 contamination by commensal bacteria, which could resist the underlying inflammation

384 promoted by the parasite, developing an environment against less adaptable bacteria
385 species and favoring the environment more adaptable species. In this way, the
386 parasite demonstrates a parasite-pathogen synergism with some bacterial species.
387 Furthermore, this condition could provide pathogenic colonization from different
388 etiologies. FONTES et al., 2005, showed a higher concentration of *Staphylococcus*
389 *aureus*, which is an important secondary bacterial pathogen in lesions. Nevertheless,
390 the authors conclude that such a higher abundance of *S. aureus* might be due to the
391 low level of personal hygiene and the lack of infrastructure in the domestic
392 environment, conditions found in the region where the study was conducted, instead
393 of a synergistic relation between species. SALGADO et al., 2016, suggests that the
394 synergistic effect of the *Streptococcus*, *Staphylococcus*, and *Fusobacterium*, in high
395 concentrations provide resistance to treatment. The present results provide
396 information about the influence of specific bacteria on the healing time of CL lesions,
397 as these are factors to be taken into account in the diagnosis and treatment of such
398 lesions (FONTES et al., 2005; SALGADO et al., 2016).

399 Therefore, it seems that the resident skin microbiota plays a role in the control
400 of the inflammation, regulating the function of resident immune cells, including
401 neutrophils and macrophages, as discussed, but also including T-lymphocytes (NAIK
402 et al., 2012). In 2005, Oliveira et al. the importance of the host microbiota in the
403 differentiation of T cell subsets in *Leishmania* infection was determined. The authors
404 observed that germ-free mice presented high proliferation of parasites and the lesions
405 took longer for healing (OLIVEIRA, et al., 2005). In contrast, in another study, germ-
406 free animals provided better healing in parasite-free lesions with a significant

407 decrease in neutrophil recruitment, leading to an increase in activated macrophages
408 and IL-10 release (CANESSO et al., 2014).

409 Antimicrobial peptides constitute another component of the immune system
410 might also be influenced by the unbalance of the skin microbiota, leading to systemic
411 alterations. For instance, bacteria present on injured skin can be transferred to other
412 initially healthy sites (GIMBLET et al., 2017; MISRA et al., 2019; NAIK et al., 2012).
413 Besides, this change of environment contributes to the progression of the infection.
414 (SCHARSCHMIDT, 2017).

415 The knowledge regarding how the microbiota can modulate the host immune
416 response may contribute to developing a palliative or preventive treatment for
417 cutaneous leishmaniasis. Studies suggest that the use of antibiotics to control
418 dysbiosis at the lesion sites can be included in the parasitic therapy to support
419 scarless tissue regeneration (MISRA., 2019). In humans, it has already been
420 demonstrated that the use of antibiotics in the treatment of lesions caused by
421 leishmaniasis associated with secondary infections was effective. Possibly, such a
422 strategy may also be useful in the treatment of visceral leishmaniasis, since the
423 antibiotic prophylaxis against secondary bacterial infections has been proven to be
424 effective in hamsters (LEWIS et al., 2020). In this sense, the use of probiotic therapy
425 might support an optimal host immune response, being already recognized as a
426 protector tool to improve the treatment of various diseases (HOSEINIFAR et al.,
427 2018), such as acne and other chronic inflammatory diseases on the skin
428 (GOODARZI et al., 2020). Therefore, the microbiota modulation may be considered
429 an alternative for the treatment of lesions in cutaneous leishmaniasis, associated with

430 the leishmanicidal drug or in a prophylactic way (BURZA; CROFT; BOELAERT,
431 2018).

432 Finally, the influence of the gut microbiota has been already documented in
433 the context of parasitic infections. Previous studies in mice infected with
434 *Trypanosoma cruzi* demonstrated the importance of microbiota to modulate the host
435 immune response (DUARTE, 2005; MCCALL, 2018; SILVA et al., 1987). Additionally,
436 Teotônio et al., (2019) revised how the microbiota interacts with the triad *T. cruzi*-
437 vector-host. Nevertheless, there are few studies on the influence of the intestinal
438 microbiota in infections caused by *Leishmania* spp.

439

440 4.1 Study limitations

441

442 This systematic review study focused on animal studies (mammals) because
443 we didn't find enough studies involving humans. In addition, we did qualitative
444 analysis of studies limited by the nature of study's aim, which didn't focus on effective
445 measures that could result in quantitative analysis (meta-analysis). Other crucial
446 limitations were heterogeneity of cytokine dosage, histology analyses and microbiota
447 analysis methods. Nevertheless, we analyzed the risk of bias for each included study
448 in this systematic review to support our conclusion.

449 5. Conclusion

450

451 In conclusion, our systematic review contributed to the identification of a lack
452 of appropriate evidence and consensus regarding the possible influence of the
453 microbiota in the clinical course of cutaneous leishmaniasis. We systematically

454 revised the main experimental methods involved in such research and identified
455 limitations and inconsistencies between the few published studies. In summary, our
456 systematic review reinforces the need to expand the investigations to better
457 understand the role of microbiota in host immune response, aiming to improve the
458 treatment and the follow-up of patients with leishmaniasis.

459

460 **Support**

461

462 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
463 de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 and by Foundation for
464 Advancement of Science (FAPDF).

465

466 **Competing interests**

467

468 The authors declare that the research was conducted in the absence of any
469 commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of
470 interest.

471

472 **Author Contributions**

473

474 Systematic review: First reviewer: AR; Second Reviewer: NA; Third Reviewer: NN;
475 Expert: MH, LH, JC; Coordinator: RU. Wrote the paper: AR, NA, MH, NN. All authors
476 read and approved the final manuscript

477

478 **References**

479

480 ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Rev Assoc Med Bras**,
481 [s. l.], v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018. Available at: [https://doi.org/10.1590/1806-](https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281)
482 9282.64.03.281.

483 BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Front.**
484 **Cell. Infect. Microbiol.**, [s. l.], v. 8, n. June, p. 1–8, 2018. Available at:
485 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>.

486 BORBÓN, T. Y. *et al.* Coinfection with leishmania major and staphylococcus aureus
487 enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A.
488 **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1–27, 2019. Available at:
489 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007247>.

490 BORGES, A. F.; GOMES, R. S.; RIBEIRO-DIAS, F. Leishmania (Viannia) guyanensis in
491 tegumentary leishmaniasis. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1–10, 2018.
492 Available at: <https://doi.org/10.1093/femspd/fty025>.

493 BOUSSOFFARA, T. *et al.* Histological and immunological differences between zoonotic
494 cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major and sporadic cutaneous leishmaniasis due
495 to Leishmania infantum. **Parasite**, [s. l.], v. 26, p. 1–11, 2019. Available at:
496 <https://doi.org/10.1051/parasite/2019007>.

497 BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n.
498 10151, p. 951–970, 2018. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2).

499 CANESSO, M. C. C. *et al.* Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence
500 of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 193, n. 10, p. 5171–5180,
501 2014. Available at: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>.

502 COSTA, S. C. G. da; VALLE, T. Z. do. Modelos Experimentais na Leishmaniose Tegumentar
503 Americana. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. Leishmanioses do
504 continente americano [online]. **Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ**, 2014, 511 p. ISBN 978-
505 85-7541-568-9. Available at: [https://doi.org/https://doi.org/10.7476/9788575415689.0018](https://doi.org/10.7476/9788575415689.0018).

506 DE OLIVEIRA, M R *et al.* Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in
507 swiss MICE. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 1999 Mar-Apr;41(2):87-94., 1999. Available at:
508 <https://doi.org/10.1590/s0036-46651999000200005>.

509 DEY, R. *et al.* Gut Microbes Egested During Bites of Infected Sand flies Augment Severity of
510 Leishmaniasis Via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host Microbe.**, [s. l.], v. 10, n. 23, p.
511 134–143, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.002>.

512 DUARTE, R. *et al.* Trypanosoma cruzi: Influence of predominant bacteria from indigenous
513 digestive microbiota on experimental infection in mice. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v.
514 111, n. 2, p. 87–96, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.06.002>.

515 FONTES, C. O. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms
516 recovered from cutaneous lesions of human American tegumentary leishmaniasis in Minas
517 Gerais, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 11, p. 1071–1076, 2005.
518 Available at: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46070-0>.

519 GIMBLET, C. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis Induces a Transmissible Dysbiotic Skin
520 Microbiota that Promotes Skin Inflammation. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 13-
521 24.e4, 2017b. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.006>.

522 GOODARZI, A. *et al.* The potential of probiotics for treating acne vulgaris: A review of
523 literature on acne and microbiota. **Dermatologic Therapy**, [s. l.], v. 33, n. 3, 2020. Available
524 at: <https://doi.org/10.1111/dth.13279>.

525 HOOIJMANS, C. R. *et al.* SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical**
526 **Research Methodology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–9, 2014. Available at:
527 <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.

528 HOSEINIFAR, S. H. *et al.* Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review
529 of current knowledge and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 1–
530 18, 2018. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429>.

531 JULIA, V. *et al.* Priming by Microbial Antigens from the Intestinal Flora Determines the Ability
532 of CD4 + T Cells to Rapidly Secrete IL-4 in BALB/c Mice Infected with *Leishmania major* .
533 **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 165, n. 10, p. 5637–5645, 2000. Available at:
534 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5637>.

535 LAMOUR, S. D. *et al.* Metabolic, immune, and gut microbial signals mount a systems
536 response to *Leishmania major* infection. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 14, n. 1,
537 p. 318–329, 2015. Available at: <https://doi.org/10.1021/pr5008202>.

538 LAPPAN, R. *et al.* Meta-taxonomic analysis of prokaryotic and eukaryotic gut flora in stool
539 samples from visceral leishmaniasis cases and endemic controls in Bihar State India. **PLoS**
540 **Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1–28, 2019. Available at:
541 <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007444>.

542 LEWIS, M. D. *et al.* Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated
543 with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by
544 antibiotic prophylaxis. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1–23, 2020. Available at:
545 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008456>.

546 LOPES, M. E. de M. A microbiota tem papel essencial na ativação de macrófagos e na
547 resposta imune durante infecção cutânea por *Leishmania major*. 2018, 74f. Dissertação
548 (Mestre em Bioquímica e Imunologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

549 Horizonte, Minas Gerais, 2018. Available at: <http://hdl.handle.net/1843/34453>.

550 MCCALL, L. I. et al. Experimental Chagas disease-induced perturbations of the fecal
551 microbiome and metabolome. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 1–
552 15, 2018. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006344>.

553 MISRA, P.; SINGH, S. Site specific microbiome of Leishmania parasite and its cross-talk with
554 immune milieu. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 216, n. October, p. 79–88, 2019. Available at:
555 <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.004>.

556 MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The
557 PRISMA statement. **PLoS Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 7, 2009. Available at:
558 <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.

559 NAIK, S. et al. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals.
560 **Science**, [s. l.], v. 337, n. 6098, p. 1115–1119, 2012. Available at:
561 <https://doi.org/10.1126/science.1225152>.

562 NOVAIS, F. O. et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of leishmania
563 braziliensis by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 209, n. 8,
564 p. 1288–1296, 2014. Available at: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu013>.

565 OLIVEIRA, M R et al. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response
566 to infection with Leishmania major but fail to heal lesions. **Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. Pt4,
567 p. 477–488, 2005. Available at: <https://doi.org/10.1017/S0031182005008073>.

568 PAGE, J M et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic
569 reviews. **BMJ**, [s. l.], v. 372, n. 71, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.

570 SALGADO, V. R. et al. The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis
571 lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memorias do**

572 **Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 241–251, 2016. Available at:
573 <https://doi.org/10.1590/0074-02760150436>.

574 SCHARSCHMIDT, T. C. Skin Dysbiosis Goes “Off-Leish”. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v.
575 22, n. 1, p. 1–3, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.017>.

576 SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and
577 pathogenesis. **Nature Publishing Group**, [s. l.], 2016. Available at:
578 <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>.

579 SILVA, M. E. *et al.* American trypanosomiasis (Chagas’ disease) in conventional and
580 germfree rats and mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v.
581 29, n. 5, p. 284–288, 1987. Available at: [https://doi.org/10.1590/S0036-](https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000500004)
582 [46651987000500004](https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000500004).

583 STAMPER, B. D. *et al.* Model-based Evaluation of Gene Expression Changes in Response
584 to Leishmania Infection . **Gene Regulation and Systems Biology**, [s. l.], v. 13, p.
585 117762501982835, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1177/1177625019828350>.

586 TEOTÔNIO, I.M.S.N. *et al.* Intestinal microbiota – A modulator of the *Trypanosoma cruzi*-
587 vector-host triad. **Microbial Pathogenesis**, v. 137, 2019. Available at:
588 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103711>.

589 TERRAZAS, C. *et al.* Ly6C hi inflammatory monocytes promote susceptibility to Leishmania
590 donovani infection. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 1–10, 2017. Available at:
591 <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14935-3>.

592 VIEIRA, E. C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in germfree, gnotobiotic, and conventional mice.
593 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 385–387,
594 1987. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651987000600009>.

595 VILLARINO, N. F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria.
596 **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.
597 *l.*], v. 113, n. 8, p. 2235–2240, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1504887113>.
598 WHO. **Leishmaniasis**. [S. *l.*], 2020. Available at: [https://www.who.int/health-](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab)
599 [topics/leishmaniasis#tab=tab](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab)>. Accessed, May 19, 2021.

600

Supplementary material

Tabela 3-Supplementary Table 1 - key words used for the search strategy, based on the PRISMA guidelines.

<i>Database</i>	<i>Search strategy</i> <i>November 04, 2020</i>
<i>PUBMED</i>	("Mice"[Mesh] OR Mouse OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR "Swiss Mouse" OR "Swiss Mice") AND ("Leishmaniasis"[Mesh] OR Leishmaniasis OR "Leishmania Infection" OR "Leishmania Infections" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR "Visceral Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR. "Diseases Category" OR "Publication Type Category" OR "Leishmaniasis Cutaneous"[Mesh:NoExp] OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Old World Leishmaniasis" OR "New World Leishmaniasis" OR "American Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Publication Type Category" OR "Leishmaniasis, Visceral"[Mesh] OR "Visceral Leishmaniasis" OR "Black Fever" OR "Kala-Azar" OR "Kala Azar") AND ("Microbiota"[Mesh] OR Microbiotas OR "Microbial Community" OR "Microbial Communities" OR "Microbial Community Composition" OR "Microbial Community Compositions" OR "Microbial Community Structure" OR "Microbial Community Structures" OR Microbiome OR Microbiomes OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobiome OR Periphyton)
<i>Embase</i>	('mice'/exp OR 'mice' OR 'mouse'/exp OR 'mouse' OR 'laboratory mice'/exp OR 'laboratory mice' OR 'laboratory mouse'/exp OR 'laboratory mouse' OR 'swiss mouse'/exp OR 'swiss mouse' OR 'swiss mice' OR 'camundogos' OR 'ratazones' OR 'souris' OR 'camundongos' OR 'rats'/exp OR 'rats' OR 'ratón' OR 'rates' OR 'mus' OR 'murine'/exp OR 'murine' OR 'experimental mouse'/exp OR 'experimental mouse' OR 'mus musculus'/exp OR 'mus musculus') AND ('leishmaniasis'/exp OR 'leishmaniasis' OR 'leishmaniasis'/exp OR 'leishmaniasis' OR 'leishmania infection'/exp OR 'leishmania infection' OR 'leishmania infections' OR 'cutaneous leishmaniasis'/exp OR 'cutaneous leishmaniasis' OR 'diffuse cutaneous leishmaniasis'/exp OR 'diffuse cutaneous leishmaniasis' OR 'mucocutaneous leishmaniasis'/exp OR 'mucocutaneous leishmaniasis' OR 'leishmanioses' OR 'infección por leishmania' OR 'leishmaniasis visceral'/exp OR 'leishmaniasis visceral' OR 'trypanosomiasis'/exp OR 'trypanosomiasis' OR 'infecção por leishmania' OR 'leishmanioses visceral' OR 'tripanossomíase' OR 'leishmanioses viscérale' OR 'trypanosomiasis' OR 'experimental leishmaniasis'/exp OR 'experimental leishmaniasis' OR 'skin leishmaniasis'/exp OR 'skin leishmaniasis' OR 'leishmania donovani infection'/exp OR 'leishmania donovani infection' OR 'leishmania major infection'/exp OR 'leishmania major infection' OR 'leishmaniosis'/exp OR 'leishmaniosis' OR 'cutaneou leishmaniasis' OR 'cutaneous leishmaniasis' OR 'old world leishmaniasis'/exp OR 'old world leishmaniasis' OR 'new world leishmaniasis'/exp OR 'new world leishmaniasis' OR

'american leishmaniasis'/exp OR 'american leishmaniasis' OR 'leishmanioses cutânea' OR 'leishmaniasis cutânea' OR 'leishmanioses cutané' OR 'botão oriental' OR 'botão do oriente' OR 'leishmanioses americana' OR 'leishmanioses tegumentar americana' OR 'leishmanioses do novo mundo' OR 'leishmanioses do velho mundo' OR 'úlceras de bauru' OR 'oriental sore'/exp OR 'oriental sore' OR 'botón de oriente' OR 'leishmaniasis americana' OR 'leishmaniasis del nuevo mundo' OR 'leishmaniasis del viejo mundo' OR 'úlceras orientales' OR 'leishmaniasis cutánea difusa' OR 'leishmaniasis mucocutánea' OR 'leishmanioses mucocutánea' OR 'leishmanioses tegumentar difusa') AND ('microbiotas' OR 'microbial community'/exp OR 'microbial community' OR 'microbial communities'/exp OR 'microbial communities' OR 'microbial community composition' OR 'microbial community compositions' OR 'microbial community structure' OR 'microbial community structures' OR 'microbiome'/exp OR 'microbiome' OR 'microbiomes'/exp OR 'microbiomes' OR 'gastrointestinal microbiome'/exp OR 'gastrointestinal microbiome' OR 'microbial consortia'/exp OR 'microbial consortia' OR 'mycobiome'/exp OR 'mycobiome' OR 'microbiota'/exp OR 'microbiota' OR 'composição da comunidade microbiana' OR 'composições das comunidades microbianas' OR 'comunidade microbiana' OR 'comunidades microbianas' OR 'estrutura da comunidad microbiana' OR 'microbial drug resistance'/exp OR 'microbial drug resistance' OR 'germ free life'/exp OR 'germ free life' OR 'host microbial interactions'/exp OR 'host microbial interactions' OR 'host pathogen interactions'/exp OR 'host pathogen interactions' OR 'microbial interactions'/exp OR 'microbial interactions' OR 'microbial viability'/exp OR 'microbial viability' OR 'microbiological phenomena'/exp OR 'microbiological phenomena' OR 'bacterial physiological phenomena'/exp OR 'bacterial physiological phenomena' OR 'composiciones de la comunidad microbiana' OR 'composiciones de las comunidades microbianas' OR 'composición de la comunidad microbiana' OR 'composición de las comunidades microbianas' OR 'comunidade microbiana' OR 'estrutura de la comunidad microbiana' OR 'estructura de las comunidades microbianas' OR 'estructuras de las comunidades microbianas' OR 'microbioma' OR 'fenómenos microbiológicos' OR 'fenómenos fisiológicos bacterianos' OR 'vida libre de gérmenes' OR 'interacciones microbiota huésped' OR 'interacciones microbianas' OR 'viabilidad microbiana' OR 'microbioma gastrointestinal' OR 'consorcios microbianos' OR 'fenómenos microbiológicos' OR 'fenómenos fisiológicos bacterianos' OR 'resistência microbiana a medicamentos' OR 'interações entre hospedeiro e microrganismos' OR 'interações hospedeiro patógeno' OR 'interações microbianas' OR 'viabilidade microbiana' OR 'consórcios microbianos' OR 'microbioma' OR 'communauté microbienne' OR 'composition de la communauté microbienne' OR 'structure de la communauté microbienne' OR 'phénomènes microbiologiques' OR 'phénomènes physiologiques bactériens' OR 'résistance microbienne aux médicaments' OR 'axénie' OR 'interactions hôte microbes' OR 'interactions hôte pathogène' OR 'interactions microbiennes' OR 'viabilité microbienne' OR 'microbiome gastro intestinal' OR 'consortiums microbiens' OR 'microbial flora'/exp OR 'microbial flora' OR 'bacterial flora'/exp OR 'bacterial flora' OR 'feces microflora'/exp OR 'feces microflora' OR 'intestine flora'/exp OR 'intestine flora' OR 'skin flora'/exp OR 'skin flora' OR 'comunidade fúngica' OR 'comunidade de fungos' OR 'comunidades fúngicas' OR 'microbioma fúngico' OR 'microbiota fúngica' OR 'communauté fongique' OR 'microbiome fongique' OR 'fungal communities'/exp OR 'fungal communities' OR 'fungal community'/exp OR 'fungal community' OR 'fungal microbiome'/exp OR 'fungal microbiome' OR 'fungal microbiomes' OR 'fungal microbiota' OR 'fungal microbiotas' OR 'microflora'/exp OR 'microflora') AND [animal model]/lim AND [animals]/lim AND [embase]/lim

SCOPUS

TITLE-ABS-KEY(Mice OR Mouse OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR "Swiss Mouse" OR "Swiss Mice" OR camundogos OR razones OR Souris OR camundongos OR rates OR Rats OR Ratón OR rates OR Mus OR Rats OR Murine OR "Experimental mouse" OR "Mus musculus") AND TITLE-ABS-KEY(leishmaniasis OR Leishmaniasis OR "Leishmania Infection" OR "Leishmania Infections" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR leishmanioses OR Trypanosomiasis OR "Infección por

Leishmania" OR "Leishmaniasis Cutânea" OR "Leishmaniasis Visceral" OR trypanosomiasis OR "Infecção por Leishmania" OR "leishmanioses Cutânea" OR "leishmanioses Visceral" OR Tripanossomiase OR "leishmanioses cutanée" OR "leishmanioses viscérale" OR "trypanosomiasés" OR "experimental leishmaniasis" OR "skin leishmaniasis" OR "Leishmania donovani infection" OR "Leishmania major infection" OR "leishmaniosis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasés" OR "Old World Leishmaniasis" OR "New World Leishmaniasis" OR "American Leishmaniasis" OR "leishmanioses Cutânea" OR "Leishmaniasis Cutânea" OR "leishmanioses cutanée" OR "Botão Oriental" OR "Botão do Oriente" OR "leishmanioses Americana" OR "leishmanioses Tegumentar Americana" OR "leishmanioses do Novo Mundo" OR "leishmanioses do Velho Mundo" OR "Úlcera de Bauru" OR "New World Leishmaniasis" OR "Oriental Sore" OR "Botón de Oriente" OR "Leishmaniasis Americana" OR "Leishmaniasis del Nuevo Mundo" OR "Leishmaniasis del Viejo Mundo" OR "Úlcera Oriental" OR "Leishmaniasis Cutânea Difusa" OR "Leishmaniasis Mucocutânea" OR "leishmanioses Mucocutânea" OR "leishmanioses Tegumentar Difusa" OR "Bouton d'Orient" OR "leishmanioses cutanée de l'Ancien Monde" OR "leishmanioses cutanée du Nouveau Monde" OR "leishmanioses cutanée diffuse" OR "leishmanioses cutanéomuqueuse") AND TITLE-ABS-KEY(Microbiotas OR "Microbial Community" OR "Microbial Communities" OR "Microbial Community Composition" OR "Microbial Community Compositions" OR "Microbial Community Structure" OR "Microbial Community Structures" OR Microbiome OR Microbiomes OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobioime OR Microbiota OR microbiota OR "Composição da Comunidade Microbiana" OR "Composições das Comunidades Microbianas" OR "Comunidade Microbiana" OR "Comunidades Microbianas" OR "Estrutura da Comunid" OR "Microbial Drug Resistance" OR "Germ Free Life" OR "Host Microbial Interactions" OR "Host Pathogen Interactions" OR "Microbial Interactions" OR "Microbial Viability" OR "Microbiological Phenomena" OR "Bacterial Physiological Phenomena" OR "Composiciones de la Comunidad Microbiana" OR "Composiciones de las Comunidades Microbianas" OR "Composición de la Comunidad Microbiana" OR "Composición de las Comunidades Microbianas" OR "Comunidad Microbiana" OR "Estructura de la Comunidad Microbiana" OR "Estructura de las Comunidades Microbianas" OR "Estructuras de las Comunidades Microbianas" OR Microbioma OR "Fenómenos Microbiológicos" OR "Fenómenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Vida Libre de Gérmenes" OR "Interacciones Microbiota Huesped" OR "Interacciones Microbianas" OR "Viabilidad Microbiana" OR "Microbioma Gastrointestinal" OR "Consortios Microbianos" OR "Fenômenos Microbiológicos" OR "Fenômenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Resistência Microbiana a Medicamentos" OR "Interações entre Hospedeiro e Microrganismos" OR "Interações Hospedeiro Patógeno" OR "Interações Microbianas" OR "Viabilidade Microbiana" OR "Consortios Microbianos" OR microbioma OR "Communauté microbienne" OR "Composition de la communauté microbienne" OR "Structure de la communauté microbienne" OR "Phénomènes microbiologiques" OR "Phénomènes physiologiques bactériens" OR "Résistance microbienne aux médicaments" OR Axénie OR "Interactions hôte microbes" OR "Interactions hôte pathogène" OR "Interactions microbiennes" OR "Viabilité microbienne" OR "Microbiome gastro intestinal" OR "Consortiums microbiens" OR "microbial flora" OR "microflora" OR "bacterial flora" OR "feces microflora" OR "intestine flora" OR "skin flora" OR "Comunidade Fúngica" OR "Comunidade de Fungos" OR "Comunidades Fúngicas" OR "Microbioma Fúngico" OR "Microbiota Fúngica" OR "Communauté fongique" OR "Microbiome fongique" OR "Fungal Communities" OR "Fungal Community" OR "Fungal Microbiome" OR "Fungal Microbiomes" OR "Fungal Microbiota" OR "Fungal Microbiotas" OR microflora)

lilacs

tw:(Mice OR Mouse OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR "Swiss Mouse" OR "Swiss Mice" OR Camundongos OR Ratonés OR Souris OR Camundongo OR Ratos OR Rats OR Ratón OR Ratas OR Mus OR Rats)) AND (tw:(Leishmaniasés OR "Leishmania Infection" OR "Leishmania Infections" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse

Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR Leishmaniose OR Leishmaniasis OR Leishmaniose OR "Leishmania Infection" OR Leishmaniasis OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR Trypanosomiasis OR "Infección por Leishmania" OR "Leishmaniasis Cutánea" OR "Leishmaniasis Visceral" OR Tripanosomiasis OR "Infecção por Leishmania" OR "Leishmaniose Cutânea" OR Tripanossomíase OR "Leishmaniose cutanée" OR "Leishmaniose viscérale" OR "Trypanosomiase" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Old World Leishmaniasis" OR "New World Leishmaniasis" OR "American Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Leishmaniose Cutânea" OR "Leishmaniasis Cutánea" OR "Leishmaniose cutanée" OR "Botão Oriental" OR "Botão do Oriente" OR "Leishmaniose Americana" OR "Leishmaniose Tegumentar Americana" OR "Leishmaniose do Novo Mundo" OR "Leishmaniose do Velho Mundo" OR "Úlcera de Bauru" OR "American Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "New World Leishmaniasis" OR "Old World Leishmaniasis" OR "Oriental Sore" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR "Botón de Oriente" OR "Leishmaniasis Americana" OR "Leishmaniasis del Nuevo Mundo" OR "Leishmaniasis del Viejo Mundo" OR "Úlcera Oriental" OR "Leishmaniasis Cutánea Difusa" OR "Leishmaniasis Mucocutánea" OR "Leishmaniose Mucocutânea" OR "Leishmaniose Tegumentar Difusa" OR "Bouton d'Orient" OR "Leishmaniose cutanée de l'Ancien Monde" OR "Leishmaniose cutanée du Nouveau Monde" OR "Leishmaniose cutanée diffuse" OR "Leishmaniose cutanéomuqueuse")) AND (tw:(Microbiotas OR "Microbial Community" OR "Microbial Communities" OR "Microbial Community Composition" OR "Microbial Community Compositions" OR "Microbial Community Structure" OR "Microbial Community Structures" OR Microbiome OR Microbiomes OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobioime OR Periphyton OR Microbiota OR Microbiote OR "Composição da Comunidade Microbiana" OR "Composições das Comunidades Microbianas" OR "Comunidade Microbiana" OR "Comunidades Microbianas" OR "Estrutura da Comunidade Microbiana" OR "Estruturas das Comunidades Microbianas" OR Microbioma OR Microbiome OR Microbiomes OR Microbiotas OR "Microbial Drug Resistance" OR "Germ Free Life" OR "Host Microbial Interactions" OR "Host Pathogen Interactions" OR "Microbial Interactions" OR "Microbial Viability" OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobioime OR Periphyton OR "Microbiological Phenomena" OR "Bacterial Physiological Phenomena" OR "Composiciones de la Comunidad Microbiana" OR "Composiciones de las Comunidades Microbianas" OR "Composición de la Comunidad Microbiana" OR "Composición de las Comunidades Microbianas" OR "Comunidad Microbiana" OR "Comunidades Microbianas" OR "Estructura de la Comunidad Microbiana" OR "Estructura de las Comunidades Microbianas" OR "Estructuras de las Comunidades Microbianas" OR Microbioma OR "Fenómenos Microbiológicos" OR "Fenómenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Vida Libre de Gérmenes" OR "Interacciones Microbiota Huesped" OR "Interacciones Microbianas" OR "Viabilidad Microbiana" OR "Microbioma Gastrointestinal" OR "Consortios Microbianos" OR Perifiton OR "Fenômenos Microbiológicos" OR "Fenômenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Resistência Microbiana a Medicamentos" OR "Vida Livre de Germes" OR "Interações entre Hospedeiro e Microrganismos" OR "Interações Hospedeiro Patógeno" OR "Interações Microbianas" OR "Viabilidade Microbiana" OR "Microbioma Gastrointestinal" OR "Consórcios Microbianos" OR Micobioma OR Perifiton OR "Communauté microbienne" OR "Composition de la communauté microbienne" OR Microbiome OR "Microbiome humain" OR "Structure de la communauté microbienne" OR "Phénomènes microbiologiques" OR "Phénomènes physiologiques bactériens" OR "Résistance microbienne aux médicaments" OR Axénie OR "Interactions hôte microbes" OR "Interactions hôte pathogène" OR "Interactions microbiennes" OR "Viabilité microbienne" OR "Microbiome gastro intestinal" OR "Consortiums microbiens" OR Mycobioime OR Périphyton))

web of science

TS=(Mice OR Mouse OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR "Swiss Mouse" OR "Swiss Mice" OR camundogos OR razones OR Souris OR camundongos OR rates OR Rats OR Ratón OR rates OR Mus OR

Rats OR Murine OR "Experimental mouse" OR "Mus musculus") AND TS=(leishmaniasis OR Leishmaniasis OR "Leishmania Infection" OR "Leishmania Infections" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR leishmanioses OR Trypanosomiasis OR "Infección por Leishmania" OR "Leishmaniasis Cutánea" OR "Leishmaniasis Visceral" OR trypanosomiasis OR "Infecção por Leishmania" OR "leishmanioses Cutânea" OR "leishmanioses Visceral" OR Tripanossomíase OR "leishmanioses cutanée" OR "leishmanioses viscérale" OR "trypanosomiasis" OR "experimental leishmaniasis" OR "skin leishmaniasis" OR "Leishmania donovani infection" OR "Leishmania major infection" OR "leishmaniosis" OR "Cutaneou Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Old World Leishmaniasis" OR "New World Leishmaniasis" OR "American Leishmaniasis" OR "leishmanioses Cutânea" OR "Leishmaniasis Cutánea" OR "leishmanioses cutanée" OR "Botão Oriental" OR "Botão do Oriente" OR "leishmanioses Americana" OR "leishmanioses Tegumentar Americana" OR "leishmanioses do Novo Mundo" OR "leishmanioses do Velho Mundo" OR "Úlcera de Bauru" OR "New World Leishmaniasis" OR "Oriental Sore" OR "Botón de Oriente" OR "Leishmaniasis Americana" OR "Leishmaniasis del Nuevo Mundo" OR "Leishmaniasis del Viejo Mundo" OR "Úlcera Oriental" OR "Leishmaniasis Cutánea Difusa" OR "Leishmaniasis Mucocutánea" OR "leishmanioses Mucocutânea" OR "leishmanioses Tegumentar Difusa" OR "Bouton d'Orient" OR "leishmanioses cutanée de l'Ancien Monde" OR "leishmanioses cutanée du Nouveau Monde" OR "leishmanioses cutanée diffuse" OR "leishmanioses cutanéomuqueuse") AND TS=(Microbiotas OR "Microbial Community" OR "Microbial Communities" OR "Microbial Community Composition" OR "Microbial Community Compositions" OR "Microbial Community Structure" OR "Microbial Community Structures" OR Microbiome OR Microbiomes OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobiome OR Microbiota OR microbiota OR "Composição da Comunidade Microbiana" OR "Composições das Comunidades Microbianas" OR "Comunidade Microbiana" OR "Comunidades Microbianas" OR "Estrutura da Comunid" OR "Microbial Drug Resistance" OR "Germ Free Life" OR "Host Microbial Interactions" OR "Host Pathogen Interactions" OR "Microbial Interactions" OR "Microbial Viability" OR "Microbiological Phenomena" OR "Bacterial Physiological Phenomena" OR "Composiciones de la Comunidad Microbiana" OR "Composiciones de las Comunidades Microbianas" OR "Composición de la Comunidad Microbiana" OR "Composición de las Comunidades Microbianas" OR "Comunidad Microbiana" OR "Estructura de la Comunidad Microbiana" OR "Estructura de las Comunidades Microbianas" OR "Estructuras de las Comunidades Microbianas" OR Microbioma OR "Fenómenos Microbiológicos" OR "Fenómenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Vida Libre de Gérmenes" OR "Interacciones Microbiota Huesped" OR "Interacciones Microbianas" OR "Viabilidad Microbiana" OR "Microbioma Gastrointestinal" OR "Consortios Microbianos" OR "Fenômenos Microbiológicos" OR "Fenômenos Fisiológicos Bacterianos" OR "Resistência Microbiana a Medicamentos" OR "Interações entre Hospedeiro e Microrganismos" OR "Interações Hospedeiro Patógeno" OR "Interações Microbianas" OR "Viabilidade Microbiana" OR "Consórcios Microbianos" OR microbioma OR "Communauté microbienne" OR "Composition de la communauté microbienne" OR "Structure de la communauté microbienne" OR "Phénomènes microbiologiques" OR "Phénomènes physiologiques bactériens" OR "Résistance microbienne aux médicaments" OR Axénie OR "Interactions hôte microbes" OR "Interactions hôte pathogène" OR "Interactions microbiennes" OR "Viabilité microbienne" OR "Microbiome gastro intestinal" OR "Consortiums

microbiens" OR "microbial flora" OR "microflora" OR "bacterial flora" OR "feces microflora" OR "intestine flora" OR "skin flora" OR "Comunidade Fúngica" OR "Comunidade de Fungos" OR "Comunidades Fúngicas" OR "Microbioma Fúngico" OR "Microbiota Fúngica" OR "Communauté fongique" OR "Microbiome fongique" OR "Fungal Communities" OR "Fungal Community" OR "Fungal Microbiome" OR "Fungal Microbiomes" OR "Fungal Microbiota" OR "Fungal Microbiotas" OR microflora)

livivo

((Mice OR Mouse OR "Laboratory Mice" OR "Laboratory Mouse" OR "Swiss Mouse" OR "Swiss Mice" AND Leishmaniasis OR "Leishmania Infection" OR "Leishmania Infections" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis" OR "Cutaneous Leishmaniasis" OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis" OR "Mucocutaneous Leishmaniasis") AND (Microbiotas OR "Microbial Community" OR "Microbial Communities" OR "Microbial Community Composition" OR "Microbial Community Compositions" OR "Microbial Community Structure" OR "Microbial Community Structures" OR Microbiome OR Microbiomes OR "Gastrointestinal Microbiome" OR "Microbial Consortia" OR Mycobiome OR Periphyton))

Grey Literature

Google Scholar
Proquest
Dissertation &
Theses Global
OpenGrey

(Mice) AND (Leishmaniasis OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis") AND (Microbiotas)
(Mice) AND (Leishmaniasis OR "Diffuse Cutaneous Leishmaniasis") AND (Microbiotas)
Mice AND Leishmaniasis AND Microbiotas

Tabela 4-Supplementary table 02 - Articles excluded and the reasons for exclusion (n= 8): 1) Animals without cutaneous leishmaniasis infection, 2) Analyzed the vector microbiota, 3) It was a review, 4) Thesis that had already been published, 5) complete article was not available.

Reference	Authors	Reasons for Exclusion*
1.	Ashour, Dalia S et al	3
2.	Borbón, T et al	5
3.	Dey, R et al	2
4.	Dobrzanskaia, R. S et al	5
5.	Gimblet, C, et al	5
6.	Lewis DM, et al	1
7.	Naik S.	4
8.	Scharschmidt, T C et al	3

Reference of Supplementary table 2

1. Ashour DS. Parasite – bacteria interrelationship. 2020;
2. Borbon; Clay, G; Sutterwala, F; Wilson. bacterial co-infection in murine cutaneous leishmaniasis. In: Amer soc trop med & hygiene, 8000 westpark dr, ste 130, mclean v 22101 u, editor. 65th Annual Meeting of the American-Society-of-Tropical-Medicine-and-Hygiene (astmh). Atlanta, ga: American Journal of Tropical Medicine and Hygiene; 2016. p. 549–50.
3. Dey R, Joshi AB, Oliveira F, Pereira L. Gut Microbes Egested During Bites of Infected Sand flies Augment Severity of Leishmaniasis Via Inflammasome Derived IL-1 β . Cell Host Microbe. 2018;10(23):134–43
4. Dobrzanskaia, RS. Bakterial'naia flora, soprovozhdaiushchaia techenie privivnogo kozhnogo leishmanioza u mysheĭ [Bacterial flora in the course of inoculation cutaneous leishmaniasis in mice]. Med Parazitol (Mosk). 1977;46(3):363-6.
5. Gimblet, C; Loesche, MA; Grice, EA; Scott, P. *Leishmania major* infection induces transmissible alterations in the skin microbiome. In: Amer Soc Trop med & Hygiene, 8000 westpark dr, ste 130, mclean v 22101 u, editor. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2015. p. 565–565.
6. Lewis MD, Paun A, Romano A, Langston H, Langner CA, Moore IN, et al. Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria and is delayed by antibiotic prophylaxis. PLoS Pathog [Internet]. 2020;16(4):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008456>
7. Naik S. HOST-COMMENSAL CROSS TALK AT THE CUTANEOUS INTERFACE [Internet]. Partial Fu. Pennsylvania: Publicly Accessible Penn Dissertations.; 2012. 676 p. Available from: <http://repository.upenn.edu/edissertations/676>
8. Scharschmidt TC. Skin Dysbiosis Goes “Off-Leish.” Cell Host Microbe [Internet]. 2017;22(1):1–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.017>

Capítulo II

IV. Materiais e Métodos

Estudo *in vitro*

Cultura de Macrófagos: Macrófagos murinos J774.A1 (ATCC TIB-67) foram cultivados e mantidos em meio DMEM (Meio Dulbecco MEM) com 5% de SFB (soro fetal bovino), 100 IU/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, e 250 nM L-glutamina, em 5% CO², a 37 °C, pH 7.2.

Cultivo dos Parasitos: As formas promastigotas de *Leishmania spp*: *Leishmania braziliensis* (IOC 2483), *Leishmania infantum* (IOC 6445), *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *Leishmania guyanensis* (UNB M44142) e *Leishmania guyanensis* (UNB M1398), foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com o antibiótico gentamicina (0,04 mg/ml) e 10% SFB a 27 °C. Semanalmente as culturas foram avaliadas em microscopia ótica invertida. As formas promastigotas utilizadas nos experimentos foram colhidas na fase exponencial de crescimento e uma alíquota era reservada para realização de repique em meio RPMI axênico. Quando foram utilizadas alíquotas congeladas dos parasitos, o descongelamento foi feito utilizando o meio NNN (*Novy-MacNeil-Nicolle*) em medida proporcional com o volume da cultura (1/1) a 27 °C, sendo realizado o acompanhamento por até quatro semanas (BRASIL. , 2017).

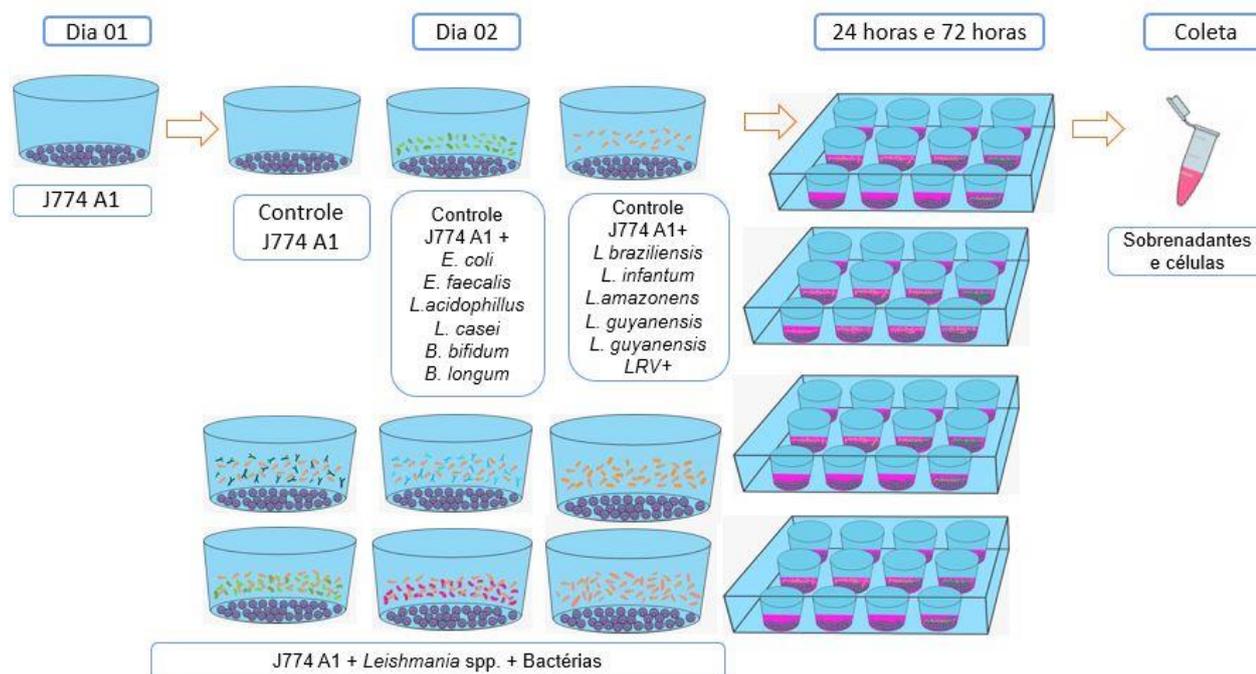
Linhagens bacterianas e condições de co-cultivo: As bactérias utilizadas no estudo foram a gram-negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922) e as gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* (catalase-negativos), *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*. A cepa de *E. coli* foi cultivada em meio Caldo nutriente líquido em condições aeróbicas por 24 horas, as bactérias dos gêneros *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. longum* e *E. faecalis* foram cultivadas em meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) líquido e incubadas a 37°C sob condições anaeróbicas, durante 24 hs (PALMA et al., 2010).

Para o co-cultivo das bactérias com os macrófagos J774.A1, foi preparado a suspensão de bactérias na fase estacionária, após 24 hs de crescimento. As culturas foram centrifugadas (6000 g for 15 min) para a separação de frações (sobrenadante e células).

As células bacterianas foram lavadas 2 vezes com PBS pH 7,4 e ressuspensas em solução salina com a turbidez ajustada para a escala 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL), seguida de leitura espectrofotométrica na faixa de leitura de 625nm, conforme as normas de padronização do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Posteriormente, a cultura de 10^8 bactérias foi diluída em solução salina para uma concentração de 10^6 células, após 20 min as mesmas foram co-cultivadas com os macrófagos, já aderidos na placa de cultivo em meio DMEM 2% (DUARTE *et al.*, 2018).

Infecção dos macrófagos J744-A1: Após o co-cultivo dos macrófagos J744.A1 com as linhagens bacterianas, foi realizada a infecção das células com 10^7 formas promastigotas de *Leishmania* spp, em meio DMEM 2%. Assim, o co-cultivo, com a infecção, foram coletados, o sobrenadante e o raspado celular, em tubos Falcon separados para a análise, após 24 hs e 72 hs. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. A Figura 8 mostra o desenho esquemático do processo de co-cultivo dos macrófagos, bactérias e parasitos.

Figura 8- Desenho representativo do co-cultivo dos macrófagos, bactérias e parasitos.



Ensaio de Viabilidade Celular por CytoSmart®- As células foram tripsinizadas, e ressuspensas em azul de *Trypan* (1:1). A análise da viabilidade celular foi realizada por contagem das células pelo programa *Corning Cell Counter- CytoSmart®*. O software reconhece parâmetros celulares como tamanho, espessura da borda celular e circularidade, fornecendo, uma visão geral da cultura como: sua concentração celular, tamanho e

viabilidade celular (CORNING CELL COUNTER, 2020). Logo, utilizamos o software para observar a relação das bactérias com os macrófagos, e para avaliar se os macrófagos continuaram viáveis após o co-cultivo com as bactérias.

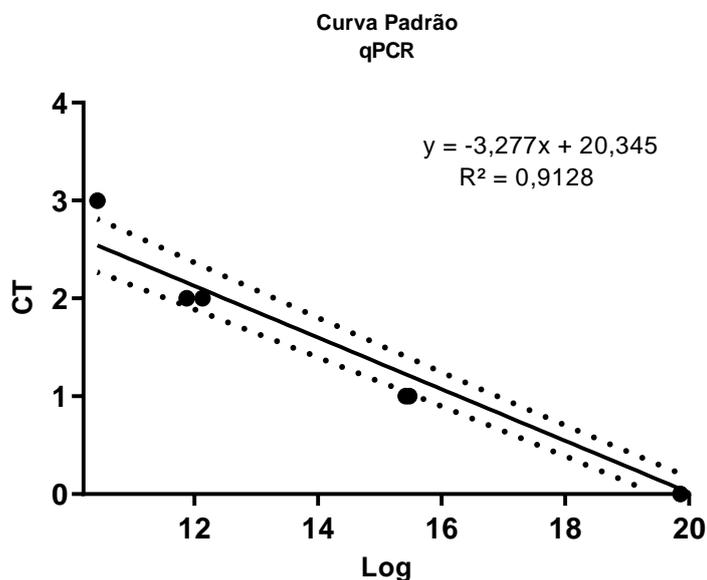
Extração de DNA e Determinação da Carga Parasitária: As amostras advindas do raspado das células foram submetidas à extração de DNA utilizando kit de purificação de DNA da marca *Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit*, seguindo as orientações do fabricante. A determinação da carga parasitária absoluta foi realizada através da qPCR utilizando *primers* direcionados a região conservada do minicírculo de DNA mitocondrial (kDNA) do parasito, conforme descrição de PITA-PEREIRA e colaboradores (2012).

O método de qPCR foi utilizado para determinar a carga parasitária nas culturas, mediante amplificação da região de kDNA do parasito. Como molde para a qPCR foi usado 100ng de DNA, 0,2 μ M de cada iniciador, 10 μ L de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA), em um volume final de 20 μ L. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (*Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®*), em triplicata, no termociclador 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA), nas seguintes condições de amplificação:

50 °C/2 min	
94 °C/12 min	
94 °C/30 seg	} X 40
55 °C/30 seg	
72 °C/30 seg	

Os resultados foram alcançados através do método de regressão linear, com base na curva padrão da espécie de *Leishmania braziliensis* nas concentrações 100 ng/ μ L, 10 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 10^{-1} ng/ μ L, 10^{-2} ng/ μ L e 10^{-3} ng/ μ L. Assim, através do software Excel® se obteve a curva analítica do padrão: $y = -3,277x + 20,345$, $R^2 = 0,918$, *slope* de $-3,277$ e eficiência de 101,914% (Figura 09). Posteriormente, foi aplicado o teste ANOVA/ *The GLIMM, Scheffe IX* para amostras não paramétricas utilizando o programa SAS (v9.4, Cary, North Carolina).

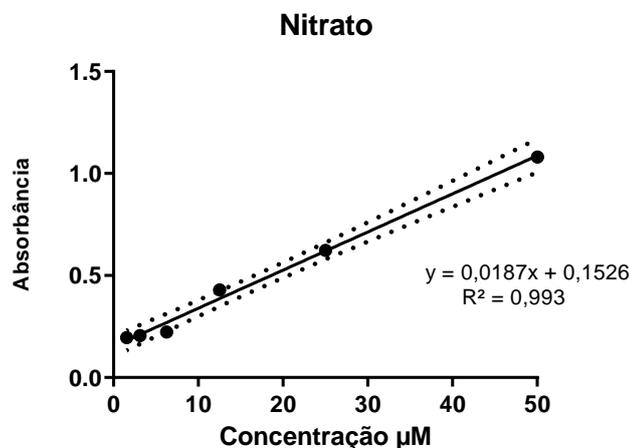
Figura 09 - Curva Padrão da espécie de *Leishmania braziliensis*. No gráfico, Y é o CT (ciclo de quantificação) da amostra; X representa a quantidade em log da carga parasitaria referente ao produto amplificado; O coeficiente angular da reta: -3,27 e o coeficiente linear 20,345.



Dosagem de óxido nítrico: A dosagem do óxido nítrico foi realizada mediante a reação colorimétrica de Griess, seguindo o protocolo de Souza *et al.*,2013. Para isso, 50 µL do sobrenadante da cultura de células foram colocados em placa de ELISA 96 poços, e posteriormente foi acrescentado 50 µL do reagente de Griess (solução Need 0,1% e solução sulfanilamida 1% em H₃PO₄ 5%), preparada no dia do experimento em proporções iguais. A curva padrão foi obtida pela utilização de solução de nitrato de sódio em diferentes concentrações (1,56 µM, 3,12 µM,6,25 µM,12,5 µM,25 µM,50 µM,100 µM). As amostras foram deixadas em repouso por dez minutos à temperatura ambiente em um local protegido da luz, e depois foi realizada a determinação da concentração de óxido nítrico utilizando o leitor de microplaca *TP-Reader da Thermo Plate*[®] com um filtro 450 nanômetros, os resultados forma fornecido como micromolar de nitrito. (SOUZA *et al.*, 2013).

Para se determinar as concentrações de ON produzido pelas amostras testadas, foi necessário construir uma curva padrão com concentrações determinadas de NaNO₂: 1,56 µM, 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM. No *software Excel*[®] se obteve a curva analítica com a respectiva equação da reta $y = 0,0187X + 0,1526$, $R^2 = 0,993$ (Figura 10). A partir dos valores obtidos foi aplicado o teste *ANOVA/ The GLIMMIX, Scheffe* para amostras não paramétricas utilizando o programa SAS (v9.4, Cary, North Carolina).

Figura 10- Curva Padrão de concentração de Nitrato. No gráfico, Y é a absorbância na faixa de 450 nanômetros da amostra; X é a concentração em μM referente a absorbância da amostra; Reação colorimétrica de Griess.



Dosagem de Citocinas: As concentrações de citocinas: interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10) e fator de necrose tumoral (TNF) foram determinadas mediante o uso do kit *Cytometric Bead Array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante. Foi realizado a utilização de todos as beads, entretanto a análise foi realizada apenas nas citocinas produzidas por macrófagos. A dosagem das citocinas foi feita em uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo Fortessa LSR II (BD Biosciences), utilizando o programa Diva para aquisição dos dados. Para a obtenção dos valores, uma curva de concentração foi inserida ao experimento a partir da diluição seriada 1/2 de um padrão de 5.000 pg/mL de cada citocina. Os resultados foram dados como pg/mL. Os dados foram analisados no software FCAP 3.0 (BD Biosciences®, USA).

Análise estatística: A análise estatística foi realizada utilizando os testes ANOVA/ The GLIMMIX, Scheffe para amostras não paramétricas, no programa SAS (v9.4, Cary, North Carolina).

V. RESULTADOS

5.1 Viabilidade celular frente a infecções por *Leishmania* spp. e co-cultivo com bactérias intestinais

A análise de viabilidade das células J774.A1 foi realizada mediante a utilização do corante azul de Trypan, utilizando o software *Corning Cell Counter* (STROBER, 2015). As amostras foram consideradas não paramétricas, posteriormente foi aplicado o teste ANOVA/ The GLIMMIX, Scheffe utilizando o programa SAS (v9.4, Cary, North Carolina).

Os resultados mostraram que mais de 90% de células permaneceram viáveis em todas as condições testadas, nos horários de 24 hs e 72 hs após a infecção (Figuras 11 e 12). Os dados mostraram que após 24hs e 72hs, nem as espécies de *Leishmania* ou o co-cultivo com as bactérias intestinais afetaram a viabilidade dos macrófagos J774.A1.

Exceto em relação ao macrófago infectado apenas com a *L. guyanensis*, que após 72hs de infecção apresentou um decréscimo de 42% na viabilidade celular. Porém o co-cultivo com as bactérias *B. longum*, *E. feacalis* e *E. coli* restauraram a viabilidade celular (Figura 12 C).

Infelizmente não foi possível analisar a viabilidade celular em relação a espécie *Leishmania braziliensis*, contudo, os resultados obtidos nos experimentos com as outras espécies de *Leishmania* sugerem que o cultivo com o protozoário e com as bactérias não interfere na viabilidade celular dos macrófagos J774.A1 nos períodos analisados.

Figura 11- Determinação da viabilidade celular frente as infecções por *Leishmania* spp. e co-cultivo com diferentes bactérias intestinais após 24 horas. (A) Porcentagem de células viáveis, apenas com o co-cultivo de bactérias. (B; C; D; E) Porcentagem de células viáveis, após a infecção com diferentes espécies de *Leishmania* e com o cocultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis* ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a média das triplicatas ± intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas.

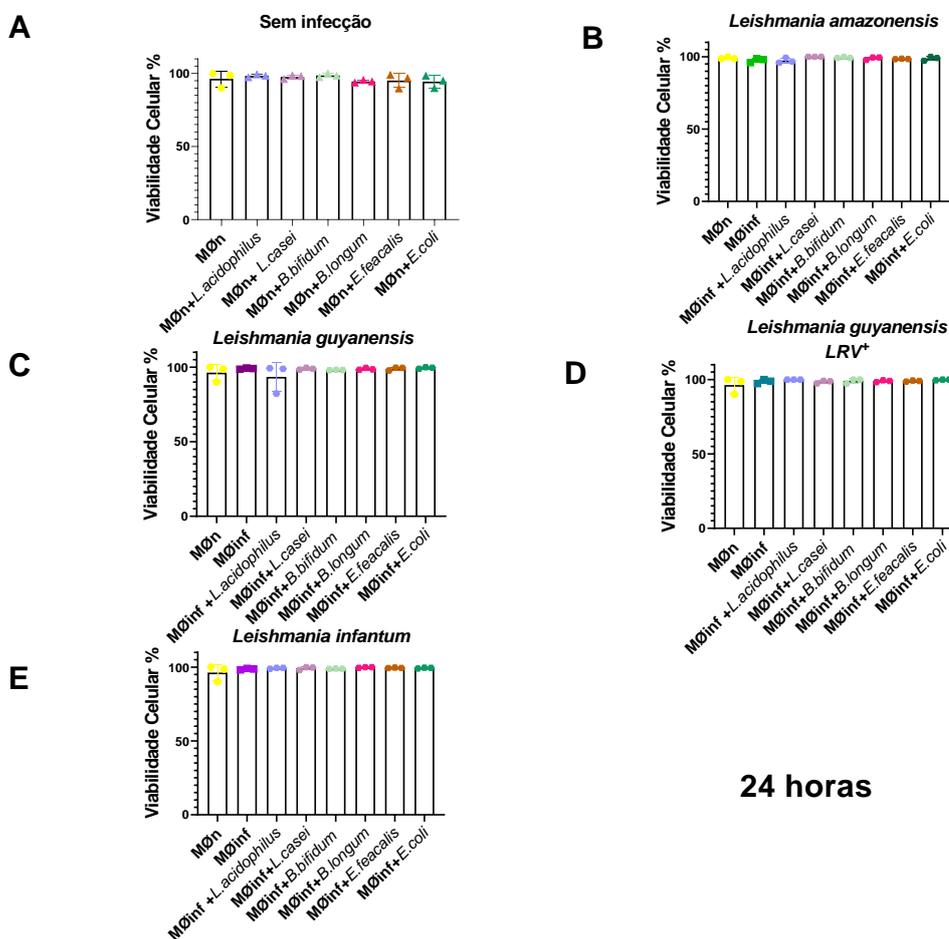
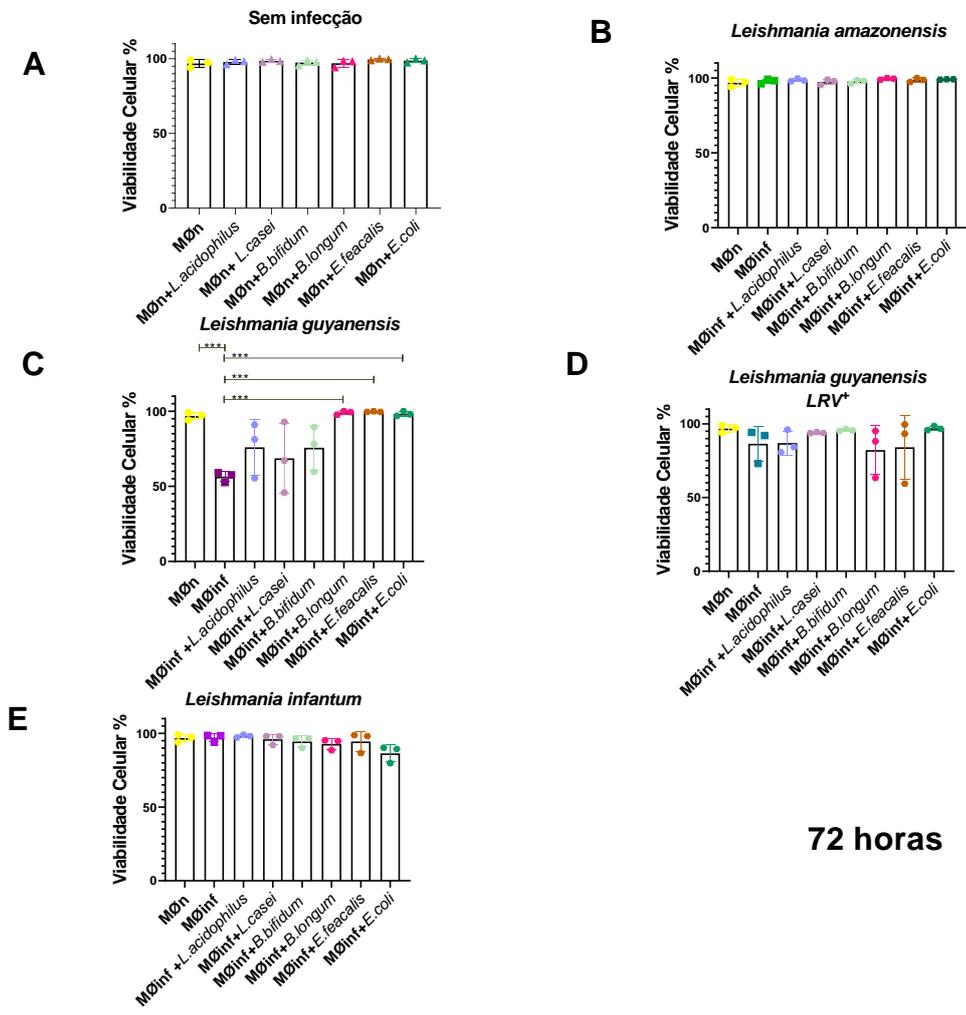


Figura 12- Determinação da viabilidade celular frente as infecções por *Leishmania* spp. e co-cultivo com diferentes bactérias intestinais após 72 horas. (A) Porcentagem de células viáveis, apenas com o co-cultivo de bactérias. (B; C; D; E) Porcentagem de células viáveis, frente a infecção pela espécie de

Leishmania correspondente e com o co cultivo de bactérias. ● MØn:J774.A1; ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a média das triplicatas ± intervalo interquartis. Foram detectadas diferenças significativas (***) $p < 0,0005$ entre as amostras analisadas nas infecções por *L. guyanensis*.



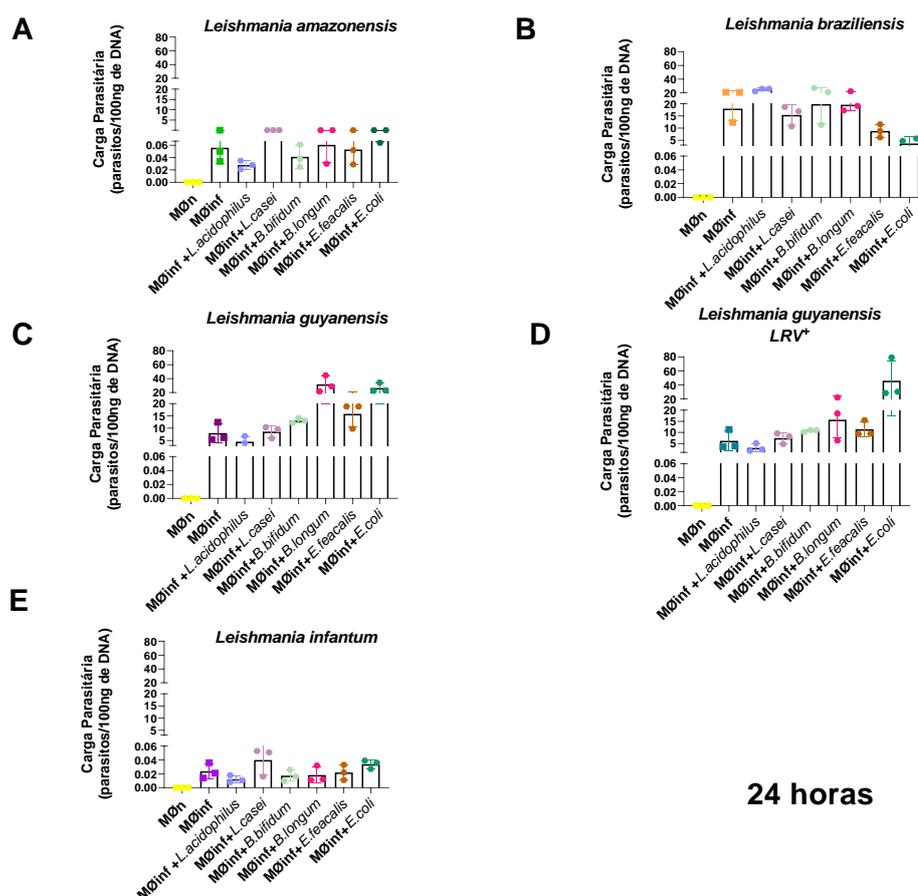
72 horas

5.2 Carga parasitaria frente a infecções por *Leishmania* spp e co-cultivo com bactérias intestinais

Os resultados mostraram que a coinfeção com as diferentes espécies de bactérias intestinais não alterou a carga parasitária das culturas infectadas por *Leishmania* spp. Adicionalmente, algumas espécies de *Leishmania* mostraram diferenças na capacidade de infectar o macrófago J774.A1, sendo que a *L. amazonensis* e *L. infantum* apresentaram as cargas parasitárias mais baixas no período de 24hs (Figura 13).

Figura 13- Determinação da carga parasitaria em macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivo de bactérias intestinais após 24 horas. (A; B; C; D; E) Carga parasitaria referente a infecção pela espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias.

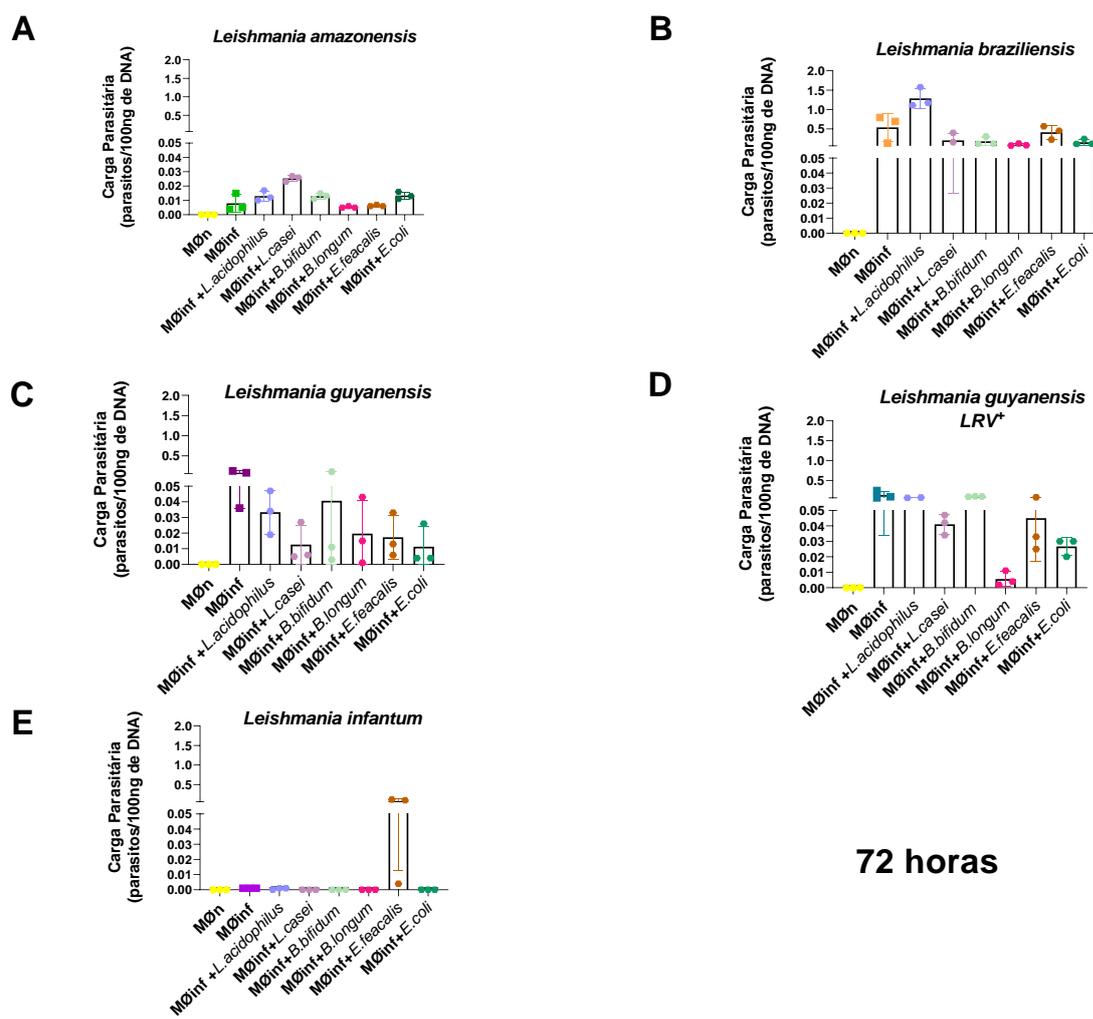
● MØn: J774.A1; ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a média das triplicatas ± intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas.



De forma geral, após 72h houve decaimento significativo da carga parasitária em todas as condições analisadas, possivelmente devido a eliminação do parasito pelo macrófago. De interesse, o macrófago infectado com *L. Infantum* e co-cultivado com *E.*

faecalis mostrou discreto aumento da carga parasitária, contudo não houve diferenças estatísticas nas amostras analisadas (figura 14).

Figura 14- Determinação da carga parasitaria em macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivo de bactérias intestinais após 72 horas. (A; B; C; D; E) Carga parasitaria referente a infecção pela espécie de *leishmania* correspondente e com o co cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas



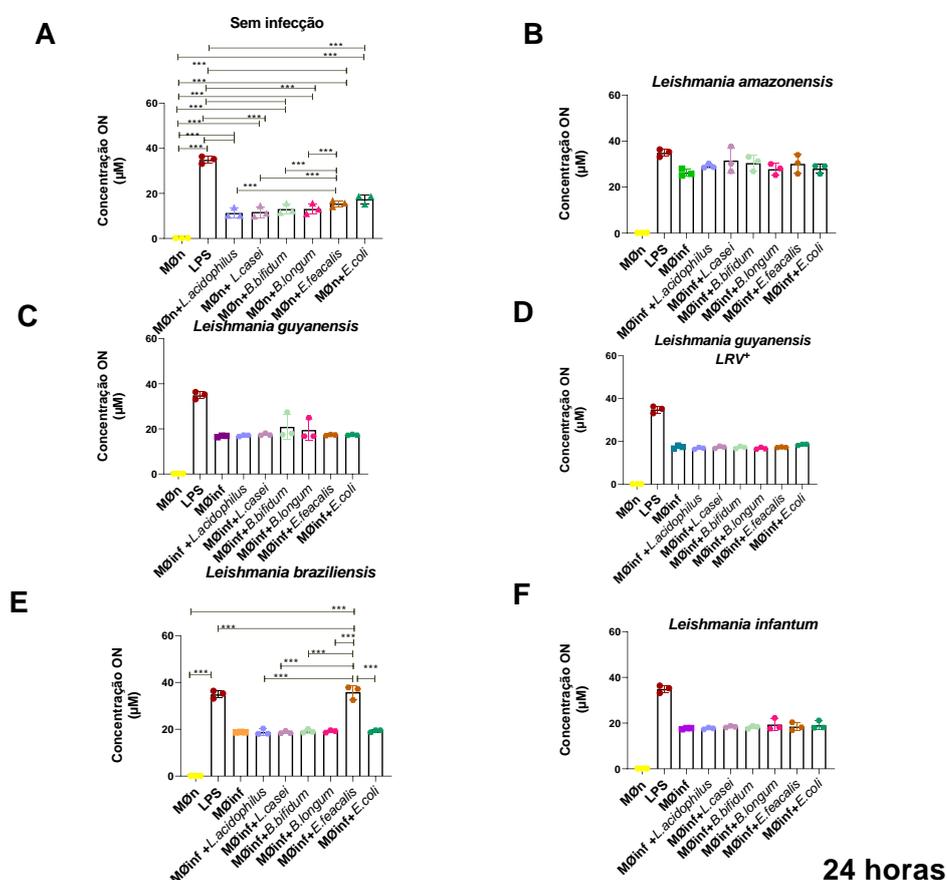
5.3 Determinação da produção de Óxido Nítrico por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais

Os resultados mostraram que o cultivo do macrófago J774.A1 apenas com as bactérias intestinais foi suficiente para ativar a produção de ON, contudo, a produção de ON em decorrência das infecções pelas espécies de *Leishmania*, gerou o dobro da

concentração de ON pelo macrófago, com um perfil de produção semelhante entre as espécies avaliadas nos tempos de 24h e 72h, independente da carga parasitária detectada Figuras 15 e 16.

De interesse, o macrófago infectado com *L. braziliensis* e co-cultivado com *E. faecalis* apresentou elevação significativa da produção de ON em 24hs (Figura 15 E).

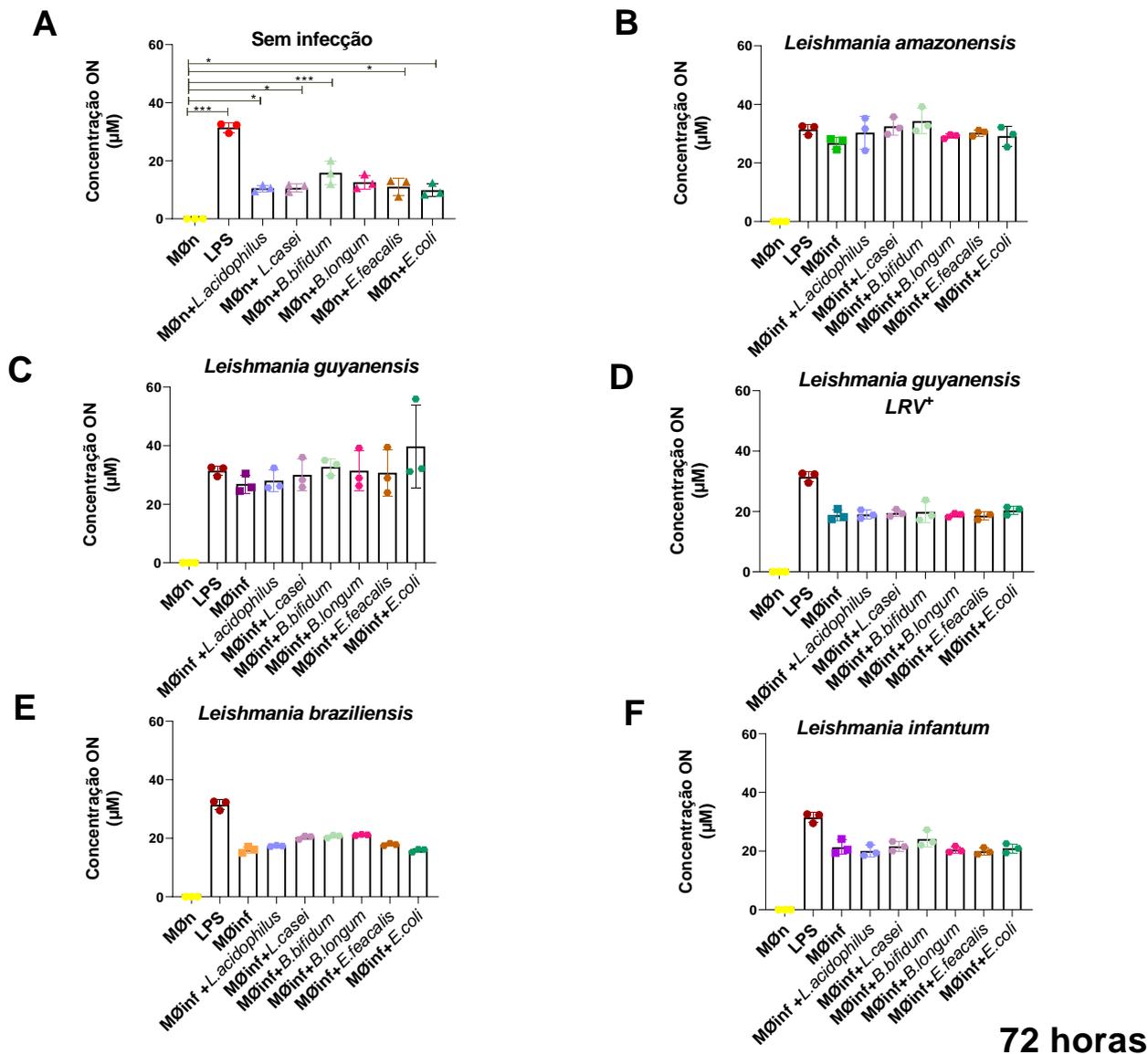
Figura 15- Produção de Óxido Nítrico por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas. (A) Macrófago J774.A1 co-cultivado apenas com as bactérias intestinais. (B; C; D; E; F) macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo com as bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 Infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonenses*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. ***Diferenças significativas (p < 0,0005) entre as amostras analisadas.



Após 72h, os valores se mantiveram estáveis, mas o macrófago infectado com *L. braziliensis*, co-cultivado com *E. faecalis*, sofreu decaimento importante, reduzindo a sua produção de ON pela metade (figura 16 E).

Figura 16- Produção de Óxido Nítrico por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas. (A) Macrófago J774.A1 co-cultivado apenas com as bactérias intestinais. (B; C; D; E; F) macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo com as bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*;

▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ *Møinf* J774.A1 Infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonenses*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. ***Diferenças significativas (p < 0,0005) entre as amostras analisadas.



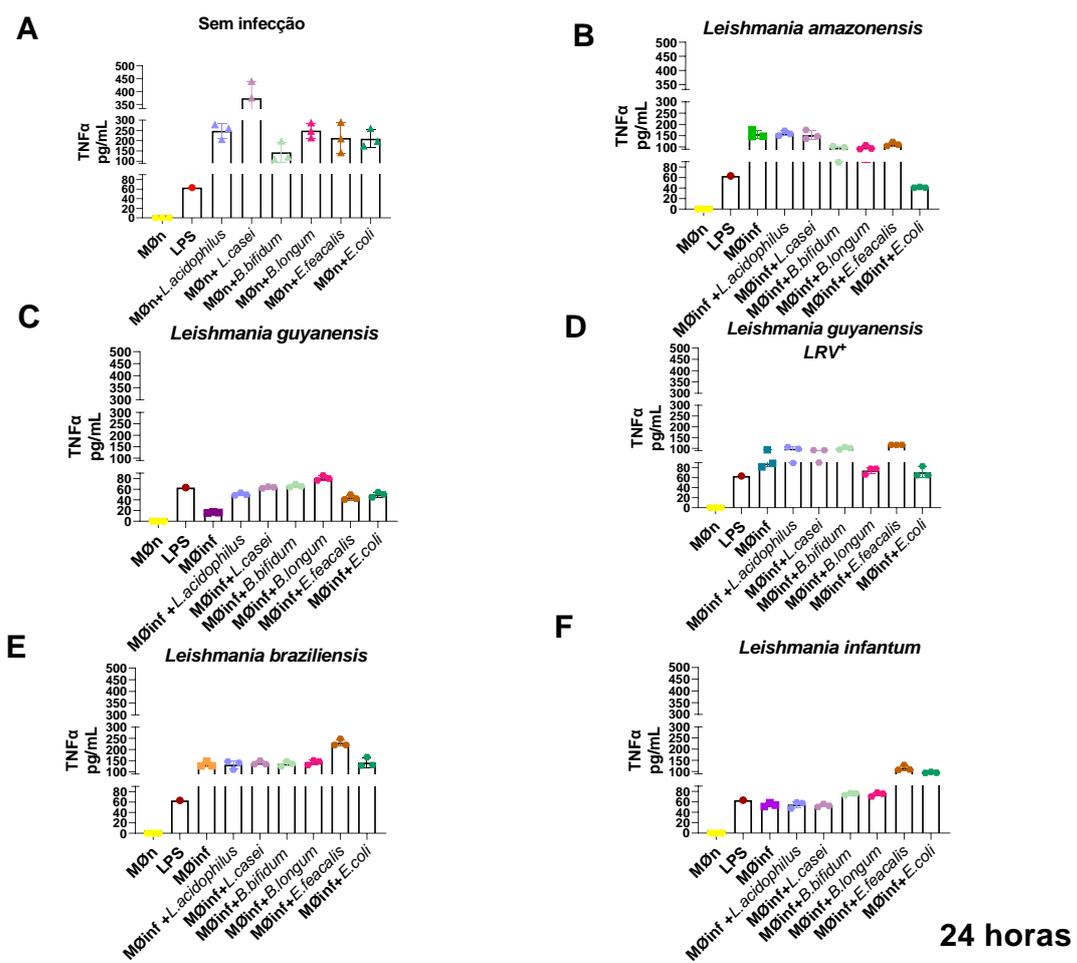
5.4 Avaliação da produção de citocinas nas culturas de macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais

A avaliação da produção de citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, TNF, foram determinadas mediante o uso do kit *Cytometric Bead Array* (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 *Cytokine Kit* (BD Bioscience). Foi realizado a utilização de todos as beads, entretanto a análise foi realizada apenas nas citocinas produzidas por macrófagos IL-6, TNF α e IL-10 nas culturas foi

realizada por citometria de fluxo, e analisada pelo programa FCAP 3.0 (BD Biosciences®, USA). Semelhante ao que foi observado em relação a produção de ON, ficou demonstrado que as bactérias intestinais e as diferentes espécies de *Leishmania* foram capazes de ativar a produção de citocinas IL-6, TNF α e IL-10 pelo macrófago J774.A1 (Figuras 17 a 22).

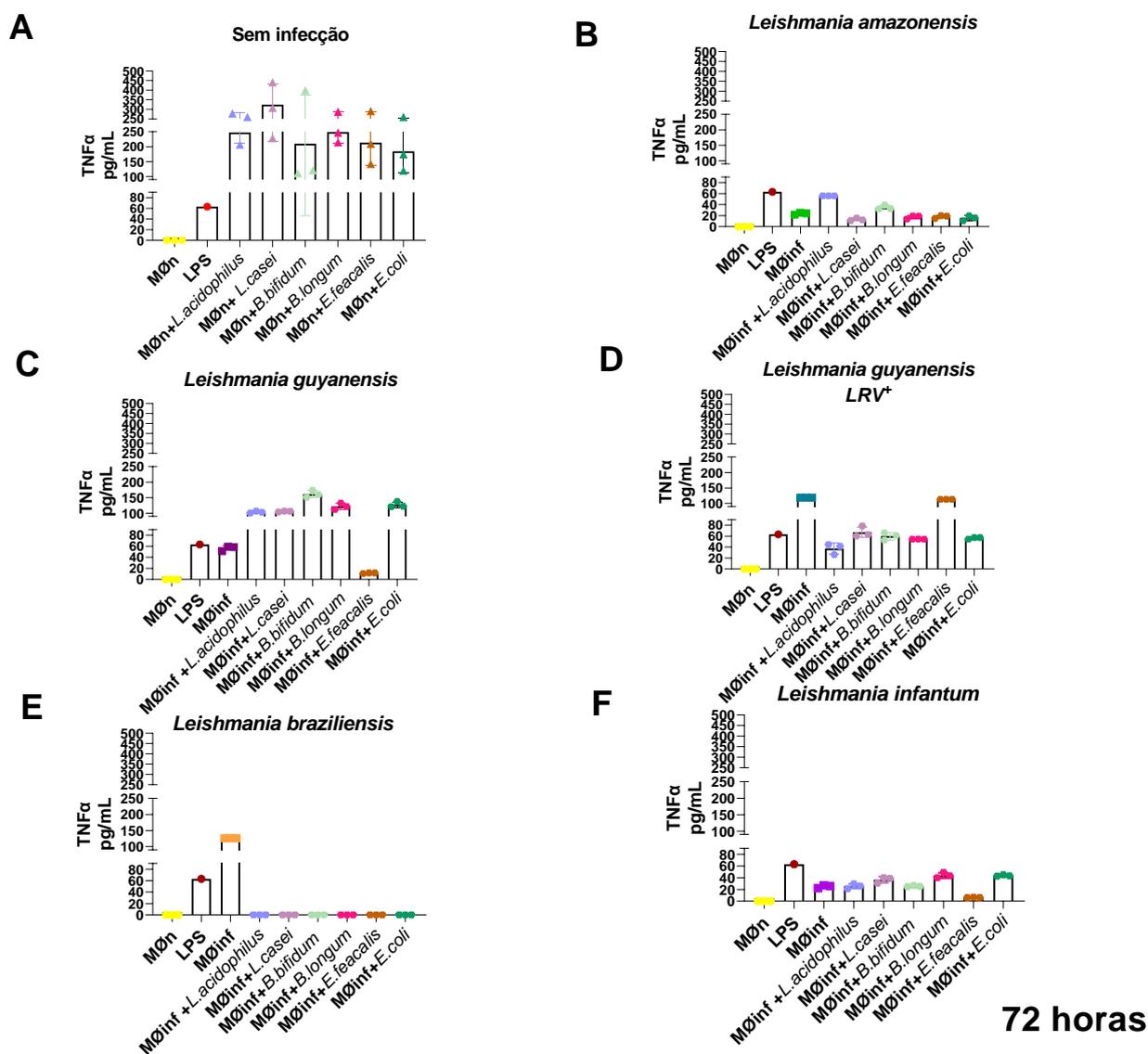
Em relação a produção de TNF α , nossos resultados mostraram que houve produção pelos macrófagos em todas as condições de cultivo avaliadas, não sendo observada diferença estatística no período de 24h (Figura 17). Assim, a presença de bactérias sem infecção já influencia a produção. De interesse, cada espécie de *Leishmania* demonstrou um perfil de produção de TNF α diferenciado, e a presença do LRV influenciou positivamente na produção desta citocina.

Figura 17- Produção de TNF α por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas. (A) macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias. (B; C; D; E; F) Macrófagos J774.A1 infectados espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B.bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a média das triplicatas \pm intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas



Após 72 h, a produção de TNF α se manteve estável nas espécies de *Leishmania*, com exceção da *L. braziliensis*, que apresentou redução estatisticamente relevante no co-cultivo com bactérias intestinais (Figura 18 E).

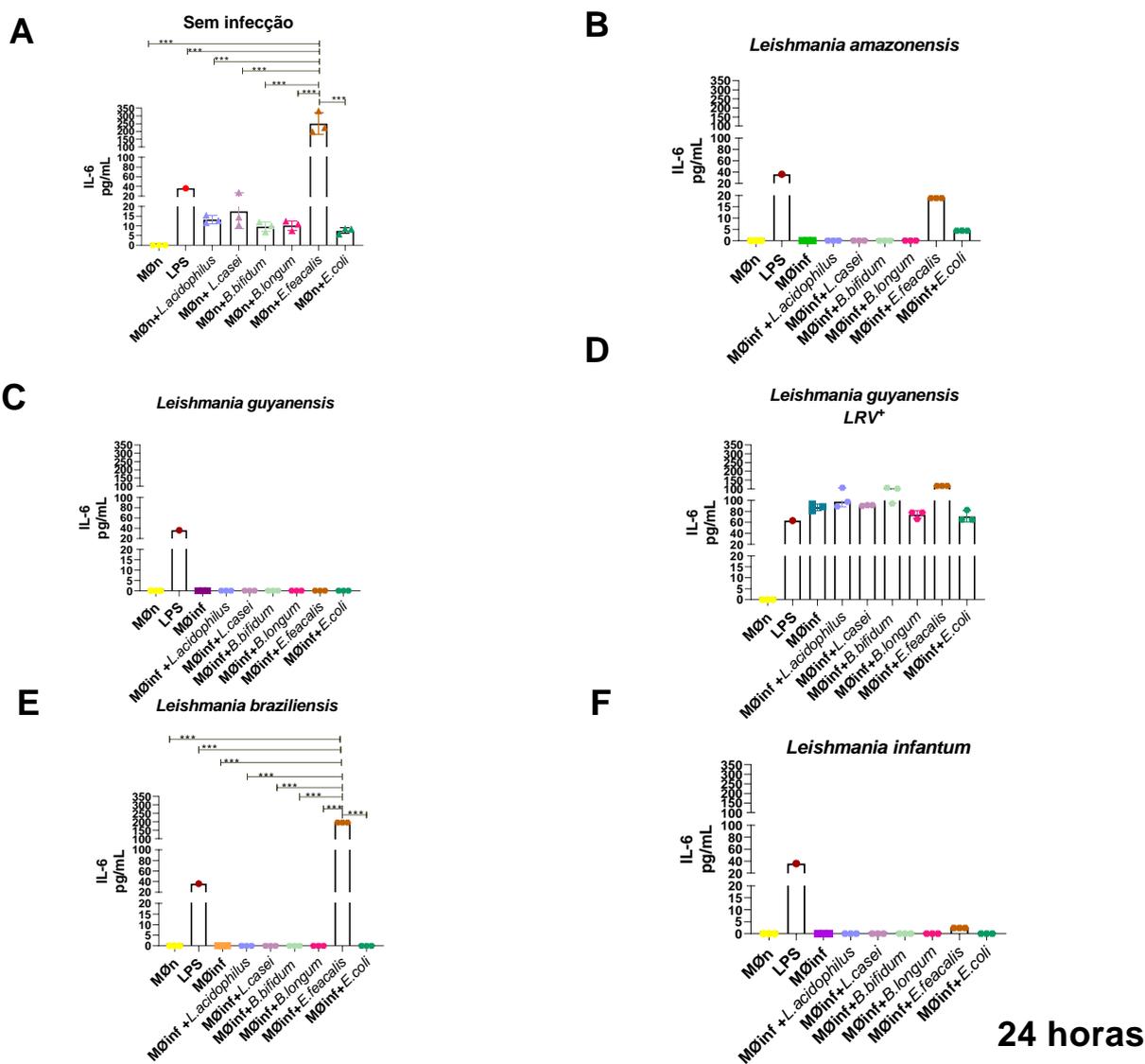
Figura 18- Produção de TNF α por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas. (A) Macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias (B; C; D; E; F) Macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas \pm intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas.



A produção de IL-6 foi diferenciada entre as espécies de *Leishmania* após 24 h. Adicionalmente, o co-cultivo dos macrófagos J774.A1 com as bactérias também levaram a produção de IL-6, sendo estatisticamente relevante no grupo de co-cultivo com *E. faecalis*

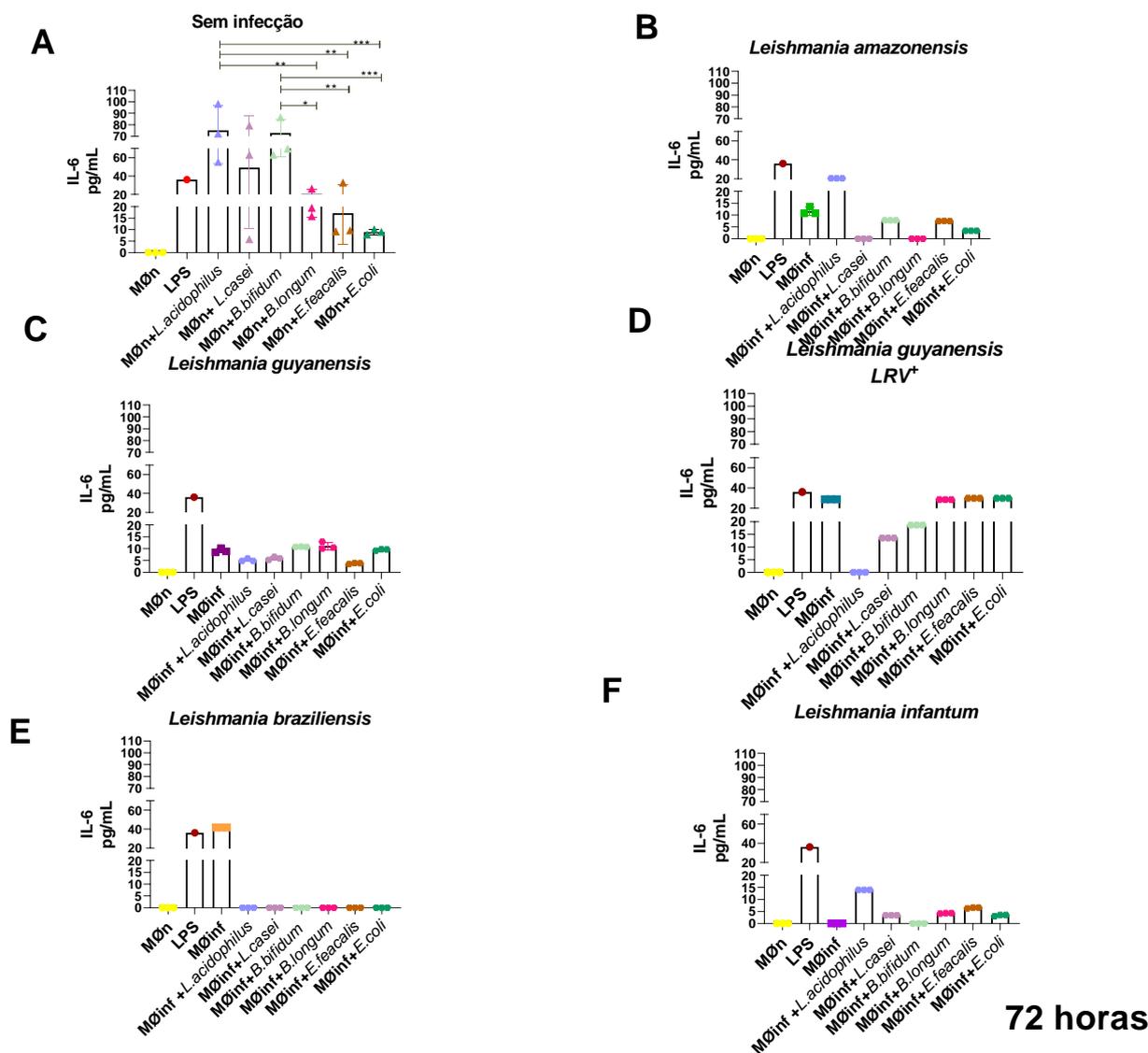
(Figura 19 A). Interessantemente, a produção de IL-6 na presença do protozoário foi inferior a produção dos macrófagos ativados pelas bactérias, exceto para *L. guyanensis* LRV⁺, indicando mais uma vez, a importância do LRV na ativação do macrófago (Figura 19 D). Destacamos que a amostra referente ao macrófago infectado com *L. braziliensis* e co-cultivado com *E. faecalis* aumentou de forma significativa a produção de IL-6 em 24hs (Figura 19 E).

Figura 19- Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas. (A) Macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias **(B; C; D; E; F)** Macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas.



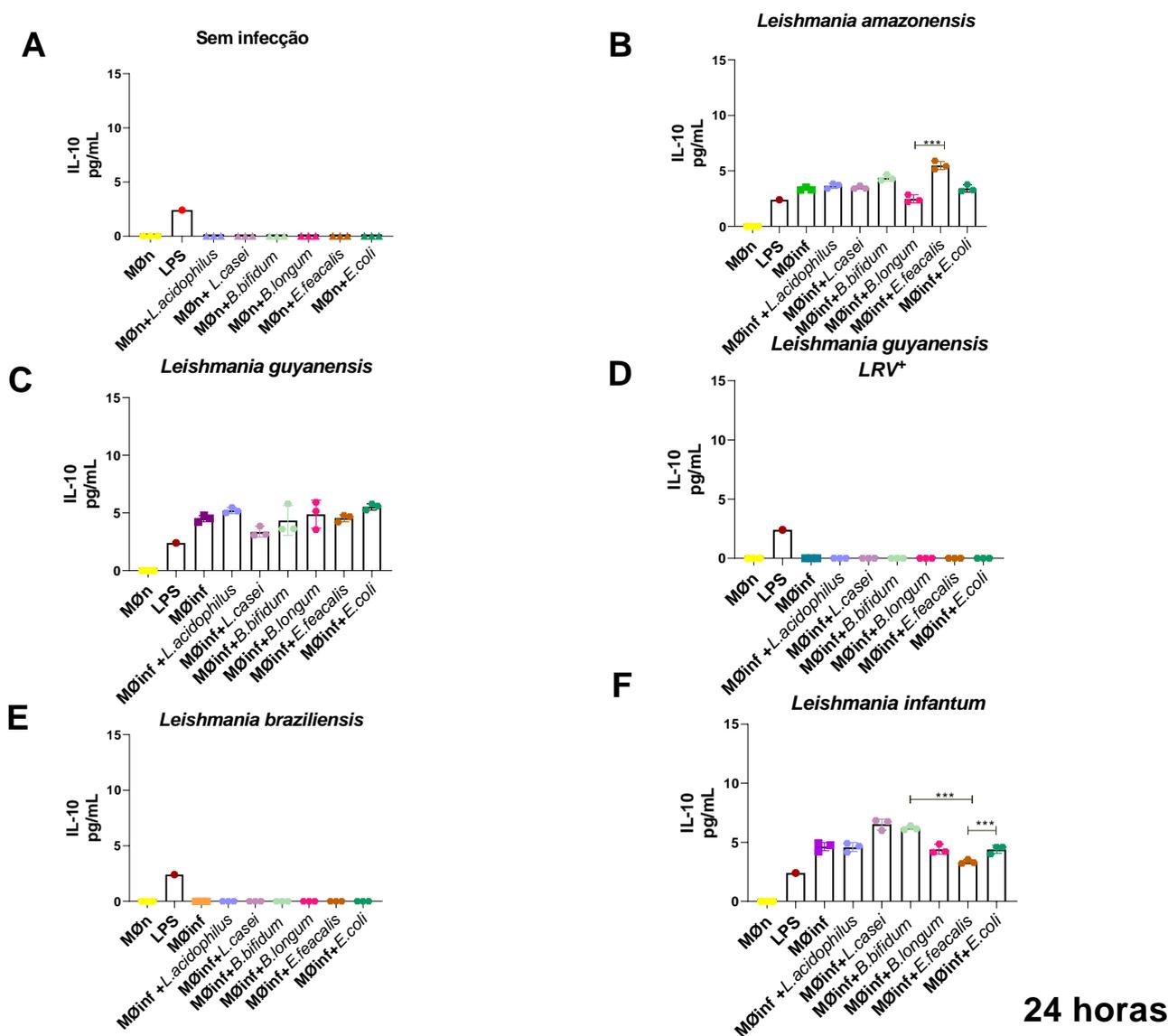
Após 72 h, a produção de IL-6 continuou elevada nos macrófagos co-cultivados com *L. acidophilus* e *B. bifidum*. Em contrapartida, foi observada a redução da produção desta citocina no co-cultivo com *E. faecalis* (Figura 20 A). Já os macrófagos infectados com as diferentes espécies de *Leishmania* apresentaram elevação na produção de IL-6 (Figura 20). De interesse, a amostra referente ao macrófago infectado com *L. braziliensis* e co-cultivada com *E. faecalis* apresentou brusca redução na produção de IL-6, semelhante aos outros grupos (Figura 20 E).

Figura 20- Produção de IL-6 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas. (A) Macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias (B; C; D; E; F) Macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas.



Diferente do que foi visto anteriormente, o co-cultivo dos macrófagos J774.A1 com as bactérias não levou a produção de IL-10 após 24h (Figura 21 A). Entretanto, as espécies de *Leishmania* foram capazes de ativar a produção de IL-10, exceto a *L. guyanensis* LRV⁺ e *L. braziliensis* (Figura 21).

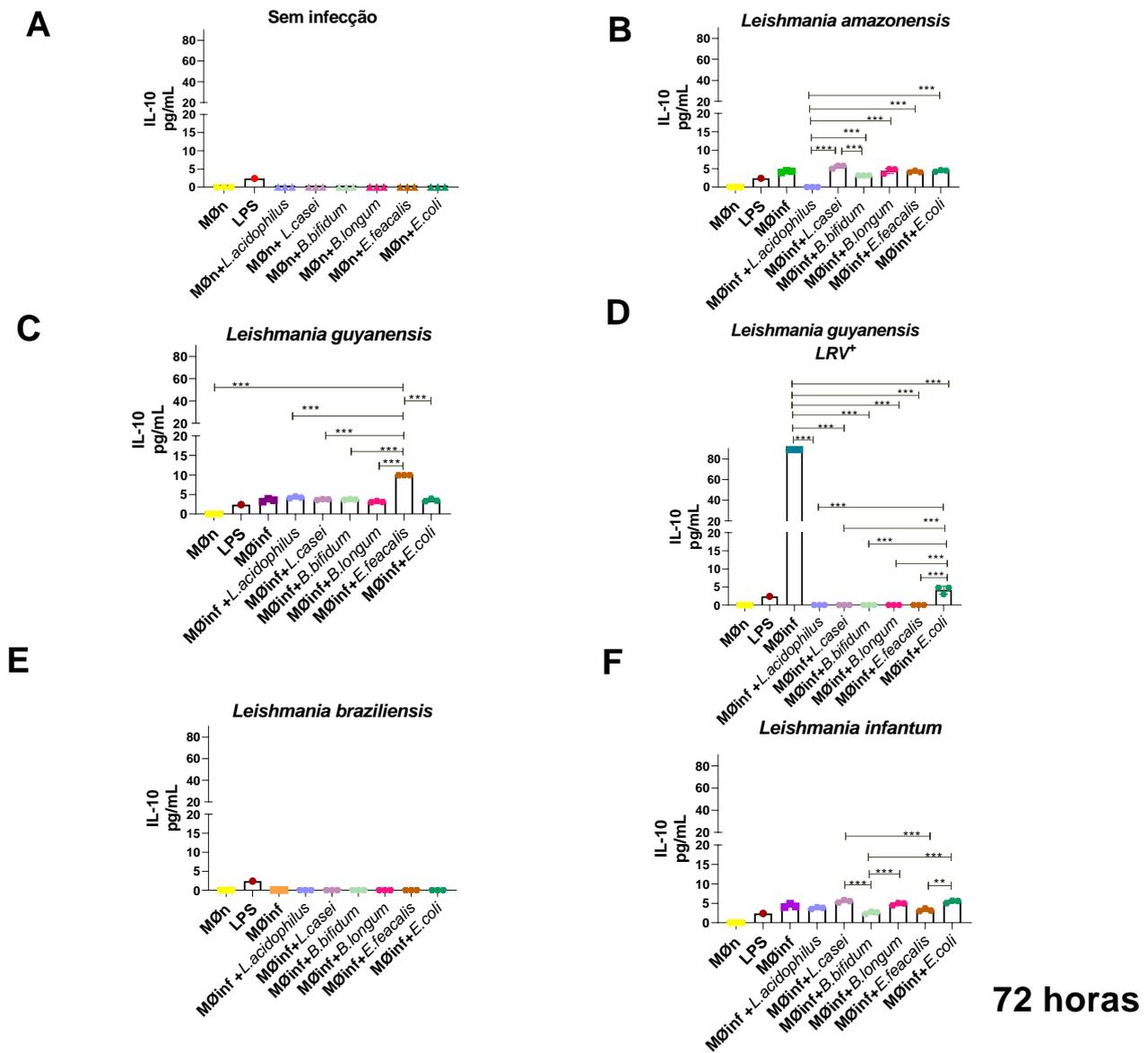
Figura 21- Produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 24 horas. (A) Macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias **(B; C; D; E; F)** Macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. feacalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas



Após 72 h, as concentrações de IL-10 foram mantidas entre os grupos de macrófagos infectados com as espécies de *Leishmania* e a *L. braziliensis* permaneceu sem produção desta citocina (Figura 22). Interessantemente, o co-cultivo com algumas bactérias pareceu influenciar a produção de IL-10 pelos macrófagos infectados. A saber, macrófagos infectados com *L. amazonensis* e co-cultivados com *L. acidophilus* diminuí significativamente a produção de IL-10. Já o co-cultivo de *L. casei*, foi estatisticamente diferente ao co-cultivo com *B. bifidum* (Figura 22 B).

Em relação aos macrófagos infectados com *L. guyanensis*, o grupo co-cultivados com *E. faecalis* apresentou produção de IL-10 aumentada em comparação aos outros grupos (Figura 22 C). Mais uma vez a presença do LRV estimulou a produção de IL-10. Contudo, o co-cultivo com as bactérias reduziu significativamente a produção desta citocina (Figura 22 D). Os grupos de macrófagos infectados com *L. infantum*, mantiveram a produção de IL-10 após 72 hs, os co-cultivos com as bactérias influenciaram significativamente a produção desta citocina. Por exemplo, o co-cultivo com *B. bifidum* e *E. faecalis* reduziu a produção de IL-10, sendo estatisticamente diferente do co-cultivo de *L. casei* e *E. coli* (Figura 22 F).

Figura 22- Produção de IL-10 por macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e co-cultivados com bactérias intestinais após 72 horas. (A) Macrófagos J774.A1 co-cultivados apenas com bactérias (B; C; D; E; F) Macrófagos J774.A1 infectados com a espécie de *Leishmania* correspondente e com o co-cultivo de bactérias. ● MØn: J774.A1; ● LPS ▲ *L. acidophilus*; ▲ *L. casei*; ▲ *B. bifidum*; ▲ *B. longum*; ▲ *E. faecalis*; ▲ *E. coli*; □ MØinf: J774.A1 infectado por *Leishmania* spp.: ■ *L. amazonensis*; ■ *L. guyanensis*; ■ *L. guyanensis* LRV⁺; ■ *L. braziliensis*; ■ *L. infantum*. Os gráficos representam a médias das triplicatas ± intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas (*p < 0,05) entre as amostras analisadas



Dessa forma, nossos resultados demonstraram que o co-cultivo com as bactérias não interferiu na viabilidade celular e na infectividade. Entretanto, nossos experimentos mostraram que a ativação dos macrófagos infectados por *Leishmania* spp foi alterada pelo co-cultivo com as bactérias intestinais, especialmente pela modificação na produção de citocinas.

VI. DISCUSSÃO

Uma vez estabelecida a infecção por *Leishmania* spp., sabe-se que o parasito induz uma cascata de resposta imunológica do hospedeiro, incluindo alterações metabólicas e imunológicas (TERRAZAS *et al.*, 2017). A resposta imunológica frente a infecção é caracterizada pelo equilíbrio dos perfis Th1/Th2, determinante para o desfecho clínico da infecção (ANVERSA *et al.*, 2018). Estudos visando a identificação e caracterização dos mecanismos que influenciam o equilíbrio entre a resposta imunológica à infecção são de extrema importância. Dentre eles, podemos citar as investigações sobre o papel da microbiota nas leishmanioses, as quais revelam a importância da população microbiana para a geração, manutenção e controle do sistema imunitário, de uma forma local e sistêmica (DEY *et al.*, 2018).

Nossa revisão sistemática sobre a influência da microbiota na leishmaniose cutânea mostrou a necessidade de ampliação desta área de conhecimento, tendo em vista que apenas 9 artigos foram selecionados. Algumas pesquisas sugerem, que a falta de uma microbiota bem estabelecida está relacionada a um perfil de resistência à infecção (DE OLIVEIRA, *et al.*, 1999; NAIK *et al.*, 2012; VIEIRA *et al.*, 1987), contudo, outros trabalhos (JULIA *et al.*, 2000; LAMOUR *et al.*, 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA, M. R. *et al.*, 2005) mostram que a ausência da microbiota natural é um fator de suscetibilidade da infecção. Embora os estudos apresentem divergência nos resultados em sua maioria, sugerem que a exacerbação das lesões cutâneas é advinda do aumento do recrutamento de neutrófilos, com perda da função microbicida, para o local da lesão (BORBÓN *et al.*, 2019; LOPES, 2018; OLIVEIRA, M R *et al.*, 2005). Os estudos sugerem que IL-1 β , TNF α , IFN γ e IL-12 como principais citocinas participantes da via de ativação imunológica, entretanto, ainda não é de entendimento se as mesmas possuem caráter protetivo ou suscetível a infecção (BORBÓN *et al.*, 2019). Logo, há um consenso que considera a microbiota um fator chave na resposta imunológica (LAMOUR *et al.*, 2015; LOPES, 2018; OLIVEIRA, *et al.*, 2005), entretanto não foi elucidado os mecanismos e quais fatores que são influenciados.

Adicionalmente, realizamos estudos para avaliar a influência de bactérias intestinais na cultura de macrófagos J774.A1 infectados com diferentes espécies de *Leishmania*. Nossos resultados demonstraram que o co-cultivo de bactérias intestinais não altera a viabilidade dos macrófagos infectados, e mesmo a infecção por *Leishmania* não afeta de maneira importante a integridade celular após 72 h, ocasionando a lise gradual dos macrófagos, corroborando com a literatura (CHANG, K.-P. *et al.*, 2003).

De interesse, nossos dados não mostraram diferenças significativas nas cargas parasitárias, sendo observada a redução da parasitemia em todos os grupos experimentais após 72h. Esses achados já foram referidos na literatura. Estudos mostraram dificuldades de algumas espécies de elevar os valores da carga parasitaria em decorrência da ativação dos macrófagos frente a infecção (CUPOLILLO *et al.*, 2001; CUPOLILLO; JR; MOMEN, 1994; MACHADO, 2014; MORGADO *et al.*, 2008). Além disso, a baixa parasitemia pode ter sido influenciada pela manutenção da linhagem do parasito por longo período de tempo em cultura celular (MACHADO, 2014). Entretanto, mesmo com a baixa carga parasitária para alguns grupos analisados, os experimentos confirmaram a infecção do macrófago J774-A1 para todas as espécies testadas. Dessa forma, em função do delineamento experimental que foi realizado (havendo o co cultivo juntamente com a infecção), os dados não demonstraram a influência das bactérias intestinais estudadas na carga parasitária, colaborando com resultados já referidos em modelos em animais (BORBÓN *et al.*, 2019), e se opondo a outros estudos em que demonstraram influência das bactérias na carga parasitária (JULIA *et al.*, 2000; LOPES, 2018; OLIVEIRA, *et al.*, 2005; PASSOS *et al.*, 2020). Assim, fica evidente a necessidade de ampliar os estudos para que seja compreendido com mais profundidade o papel da microbiota intestinal sobre a capacidade de invasão e proliferação intracelular da *Leishmania* spp.

De importância, os nossos resultados mostraram que os macrófagos foram ativados na presença das bactérias intestinais e/ou *Leishmania* spp., e que promoveram a produção de ON e de citocinas inflamatórias, como observado em outros estudos em culturas de células RAW (CHANG, *et al.*, 2015). Além disso, as culturas com as bactérias apresentaram resultados semelhantes a outros trabalhos realizados com *E. faecalis*, *E. coli*, *L. casei* e *L. acidophilus* (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2014; VAN BAARLEN *et al.*, 2011). Ainda, nossos dados demonstraram que a ativação do macrófago foi alterada dependendo da espécie de *Leishmania* e do tipo de bactéria co-cultivada.

A produção de ON pelo macrófago infectado não foi afetada de maneira significativa pelo co-cultivo com as bactérias intestinais, contudo a presença de *E. faecalis* na cultura de J774.A1 infectada com *L. braziliensis* levou ao aumento das concentrações de ON, sem correlação com o aumento da carga parasitária. Esses dados se contrapõem ao estudo de Reza e colaboradores, que demonstraram o controle da parasitemia relacionado com a produção de ON (REZA *et al.*, 2019). No nosso estudo, todos os grupos experimentais tiveram a sua carga parasitária reduzida a próximo de zero, ao passo que os níveis de ON permaneceram estáveis após 72hs, corroborando com o estudo de MORGADO *et al.*, 2008.

Interessantemente, a produção de citocinas pelo macrófago J774.A1 infectado por *Leishmania* spp. foi alterada pela presença das bactérias intestinais em situações específicas. A produção de TNF- α foi significativamente diminuída quando o macrófago infectado com *L. braziliensis* foi co-cultivado com as bactérias intestinais. Sabemos que a produção de TNF- α está relacionada ao controle da parasitemia, entretanto, também pode levar ao agravamento das manifestações clínicas (LEONARDIS *et al.*, 2009). Os achados sugerem que as bactérias intestinais poderiam atuar diminuindo as lesões tegumentares, como no estudo de Julia e colaboradores em que demonstram que os antígenos produzidos pelas bactérias estimulam a produção de citocinas de forma protetiva (JULIA *et al.*, 2000).

Em contrapartida, a produção de IL-6 foi bastante aumentada quando os macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram co-cultivados com *E. faecalis*. O achado corrobora com o estudo de Christoffersen que mostrou a influência de *E. faecalis* na ativação dos macrófagos, desenvolvendo altos níveis de citocinas pro-inflamatórias (CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2014). A produção de IL-6 e TNF α também foi aumentada na presença do LRV⁺ como anteriormente referido na literatura (IVES *et al.*, 2011).

Por último, nossos dados mostraram que as bactérias intestinais sozinhas não foram capazes de estimular a produção IL-10 pelos macrófagos não infectados, assim como em relação aos macrófagos infectados com *L. braziliensis*. Entretanto, os demais grupos experimentais tiveram a produção de IL-10 alterada dependendo da espécie de *Leishmania* e da bactéria presente na cultura. De interesse, a cultura celular infectada por *L. infantum* teve a produção de IL-10 reduzida na presença de *E. faecalis*, e *B. bifidum*. De forma semelhante, macrófagos infectados por *L. amazonensis* apresentaram redução da produção de IL-10 quando co-cultivados com *B. longum* e *L. acidophilus*. Em contrapartida, macrófagos infectados com *L. guyanensis* apresentaram aumento da produção de IL-10 na presença de *E. faecalis*, e a *L. guyanensis* LRV⁺ apresentou aumento na produção desta citocina nas amostras co-cultivadas com *E. coli*.

Sabemos que a IL-10, citocina anti-inflamatória, atua como fator supressor da ação microbicida dos macrófagos, favorecendo o estabelecimento do protozoário no hospedeiro. Além disso, o aumento de IL-10 também foi associado a falha terapêutica, devido a presença de IL-10 em um meio ambiente com TNF ou IL-6 pode contribuir para uma falha na capacidade de ação dos fagócitos, pois ao mesmo tempo que há sinais que estimulam sua ativação e há sinais que inibem sua ativação. Isso gera uma célula que está constantemente ativada, mas que não tem resolutividade eficiente nos mecanismos microbicidas, e em outras situações pode manter um estado crônico de ativação. (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; BHATTACHARYYA *et al.*, 2001). Entretanto, a relação IL-6/IL-

10 está relacionada com o controle da resposta imune a infecção, evidenciando a necessidade de compreender melhor o papel da desta citocina na progressão da leishmaniose (CUNHA-JÚNIOR *et al.*, 2017).

Como limitações do nosso estudo, o número escasso de trabalhos envolvendo o papel da microbiota em modelos experimentais impossibilitou a análise estatística dos dados da nossa revisão sistemática. Além disso, a heterogeneidade dos métodos de análise levou a grandes diferenças nos resultados encontrados, que não permitiu definir papel da microbiota intestinal nas infecções por *Leishmania*. Adicionalmente, o estudo *in vitro*, utilizando apenas um tipo celular, o macrófago, não permitiu avaliar de forma aprofundada o processo de interação parasito-hospedeiro-microbiota, sendo necessário para melhor entendimento dos mecanismos de influência da microbiota sobre a leishmaniose a realização de estudos *in vivo*. Outro fator limitante foi a pandemia da COVID-19, que levou a suspensão das atividades do laboratório, não sendo possível realizar as passagens das linhagens do protozoário em camundongos, visando aumentar a infectividade dos parasitas e concluir os ensaios de viabilidade celular dos grupos infectados por *L. braziliensis*.

VII. CONCLUSÕES

O nosso estudo permitiu concluir que:

1. A revisão sistemática demonstrou uma grande lacuna no conhecimento sobre a influência da microbiota intestinal na leishmaniose cutânea, evidenciando a ausência de padronização dos modelos experimentais e dos métodos utilizados, o que levou a grandes diferenças nos resultados apresentados pelos estudos selecionados;

2. Os experimentos em cultura de macrófagos J774.A1 infectados por *Leishmania* spp mostraram que a presença de bactérias que compõem a microbiota intestinal não influenciou significativamente a carga parasitária nas culturas;

3. Nossos dados mostraram que algumas bactérias intestinais influenciaram a ativação dos macrófagos, alterando a produção de ON e citocinas dependendo da espécie de *Leishmania*.

Dessa forma, nossos resultados reforçam a necessidade de expandir as investigações para melhor compreender o papel da microbiota intestinal na resposta imune do hospedeiro e no curso clínico da patologia, visando melhorar o tratamento e o acompanhamento de pacientes com leishmaniose.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABENGÓZAR, María Ángeles *et al.* Enterocin AS-48 as evidence for the use of bacteriocins as new leishmanicidal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.02288-16>
- AKHOUNDI, Mohammad *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- AKSOY, Serap. Insect Gut Microbiota: Accessories to the Bite. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 8–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.016>
- AL-JAWABREH, Authors Amer *et al.* A Comparison of the Efficiency of Three Sampling Methods for use in the Molecular and Conventional Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Acta Tropica**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.03.001>
- ALLEN, J. E. Microbiota, parasites and immunity. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 3–4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12298>
- ALTAMIRANO-ENCISO, Alfredo J. *et al.* On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. **História, ciências, saúde--Manguinhos**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 852–882, 2003. Disponível em: <https://doi.org/doi.org/10.1590/S0104-59702003000300004>.
- ANSARI, Nasim Akhtar; SALUJA, Sumita; SALOTRA, Poonam. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin Immunol**, [s. l.], v. 119, n. 3, p. 339–345, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.017>
- ANVERSA, Laís *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Rev assoc med BRas**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>
- ASSIS, Rafael Ramiro de *et al.* Glycoconjugates in New World species of Leishmania: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**, [s. l.], v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.001>.
- BAHRAMI, Fariborz; HARANDI, Ali M; RAFATI, Sima. Biomarkers of Cutaneous Leishmaniasis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [s. l.], v. 8, n. June, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>
- BÄR, Ann-katrein *et al.* The Interplay of Host Microbiota and Parasitic Protozoans at Mucosal Interfaces : Implications for the Outcomes of Infections and Diseases. **PLoS Negl Trop Dis**, [s. l.],

v. 9, n. 12, p. 1–12, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004176>

BARBOSA, Miriam Nogueira; GUIMARÃES, Eliete Albano de Azevedo; LUZ, Zélia Maria Profeta da. Avaliação de estratégia de organização de serviços de saúde para prevenção e controle da leishmaniose visceral. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, [s. l.], v. 25, n. 3, p. 563–574, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000300012>

BELKAID, Yasmine; SEGRE, Julia A. Dialogue between skin microbiota and immunity. **Science**, [s. l.], v. 346, n. 6212, p. 954–959, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1260144>

BEZERRA, Juliana Maria Trindade *et al.* Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990–2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. 1–19, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006697>

BHATTACHARYYA, Sandip *et al.* Immunomodulatory Role of Interleukin-10 in Visceral Leishmaniasis: Defective Activation of Protein Kinase C-Mediated Signal Transduction Events. **Infect Immun**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 1499–1507, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1499-1507.2001>

BOITÉ, Mariana C. *et al.* Trans-atlantic spill over: Deconstructing the ecological adaptation of leishmania infantum in the americas. **Genes**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes11010004>

BORBÓN, Tiffany Y. *et al.* Coinfection with leishmania major and staphylococcus aureus enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 1–27, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007247>

BORGES, Arissa Felipe; GOMES, Rodrigo Saar; RIBEIRO-DIAS, Fátima. Leishmania (Viannia) guyanensis in tegumentary leishmaniasis. **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 76, n. 4, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/fty025>

BOUSSOFFARA, Thouraya *et al.* Histological and immunological differences between zoonotic cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major and sporadic cutaneous leishmaniasis due to Leishmania infantum. **Parasite**, [s. l.], v. 26, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/2019007>

BRASIL. **Atlas de Leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: [s. n.], 2006. ISSN 01044230.v. 52 Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302006000600015>

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância e Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças .**

Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.

BRYAN, Nathan S.; GRISHAM, Matthew B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 645–657, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026>

BURZA, Sakib; CROFT, Simon L.; BOELAERT, Marleen. Leishmaniasis. **The Lancet**, [s. l.], v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

BOSSCHE, Jan Van den. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. **Cell Rep.** 2016; 17 (3):684–96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.008> PMID: 27732846.

C. A. LOZUPONE, STOMBAUGH I. J, GORDON.I.J, Jansson.K.J. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature.**, [s. l.], v. 489, n. 7415, p. 220–230, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11550>.

CANESSO, Maria C. C. *et al.* Skin Wound Healing Is Accelerated and Scarless in the Absence of Commensal Microbiota. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 193, n. 10, p. 5171–5180, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400625>

CANTANHÊDE, Lilian Motta *et al.* New insights into the genetic diversity of Leishmania RNA Virus 1 and its species-specific relationship with Leishmania parasites. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–16, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198727>

CARDIM, Marisa Furtado Mozini *et al.* Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: Spatial and space-time analysis. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 50, p. 1–12, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1518-8787.2016050005965>

CARVALHO, L. P. *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 251–258, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2007.00940.x>

CASTELLI, Germano *et al.* Evaluation of Two Modified Culture Media for Leishmania infantum Cultivation Versus Different Culture Media . **Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 100, n. 2, p. 228–230, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1645/13-253.1>

CHANG, Chen Kai *et al.* Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 281–286, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30346-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30346-4)

CHANG, Kwang-Poo *et al.* Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Trop**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 375–390, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(02)00238-3)

CHRISTENSEN, Stephen M. *et al.* Host and parasite responses in human diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *L. amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 1–23, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007152>

CHRISTOFFERSEN, Trine Eker *et al.* In Vitro Comparison of the Effects of Probiotic, Commensal and Pathogenic Strains on Macrophage Polarization. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9152-0>

CIPRIANO, Patrícia *et al.* Leishmaniose Visceral em Doentes com Infecção VIH: O Desafio da Recaída e Falência Terapêutica. **Acta Médica Portuguesa**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 443, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.20344/amp.8291>

CLARKE, Gerard *et al.* Minireview: Gut microbiota: The neglected endocrine organ. **Molecular Endocrinology**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1221–1238, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2014-1108>

CLEMENTE, Jose C. *et al.* The impact of the gut microbiota on human health: An integrative view. **Cell**, [s. l.], v. 148, n. 6, p. 1258–1270, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.035>

COHNSTAEDT, Lee W.; ALFONSO-PARRA, Catalina. 2018 Highlights of mosquito and vector biology and control in Latin America. **Journal of the American Mosquito Control Association**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 40–46, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2987/18-6769.1>

CONCEIÇÃO-SILVA, Fátima (org); ALVES, Carlos Roberto. **Leishmanioses do continente americano**. EDITORA Fled. Rio de Janeiro: [s. n.], 2014.

CORNING CELL COUNTER. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.cytosmart.com/products/corning-cell-counter>. Acesso em: 27 maio 2020.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 223–228, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822001000200013>

COSTA, Jackson Maurício Lopes. Leishmaniose Tegumentar Americana: Origens E Histórico No Brasil. **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 71–77, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1809-43921992221077>

CUNHA-JÚNIOR, Edézio Ferreira *et al.* Cyclobenzaprime Raises ROS Levels in *Leishmania infantum* and Reduces Parasite Burden in Infected Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005281>

CUNNINGHAM, Anna C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by Leishmania. **Exp Mol Pathol**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 132–141, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>

CUPOLILLO, E *et al.* Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. **Med Microbiol Immunol**, [s. l.], v. 190, n. 1–2, p. 57–60, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s004300100080>.

CUPOLILLO, E; JR, G Grimaldi; MOMEN, H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. **Am J Trop Med Hyg**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 296–311, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.296>

D'AMELIO, P.; SASSI, F. Gut Microbiota, Immune System, and Bone. **Calcified Tissue International**, [s. l.], v. 102, n. 4, p. 415–425, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>

DA SILVA, George Allan Villarouco *et al.* A polymorphism in the IL1B gene (rs16944 T/C) is associated with cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania guyanensis and plasma cytokine interleukin receptor antagonist. **Cytokine**, [s. l.], v. 123, n. July, p. 154788, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154788>

DE ASSIS SOUZA, Marina *et al.* Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 57, p. 27–32, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2013.02.004>

DE MORAIS-TEIXEIRA, Eliane; RABELLO, Ana; AGUIAR, Marta Marques Gontijo. In vitro activity and in vivo efficacy of fexinidazole against New World Leishmania species. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [s. l.], v. 74, n. 8, p. 2318–2325, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkz172>

DE OLIVEIRA, Marcia Rosa *et al.* **Influence of microbiota in experimental cutaneous leishmaniasis in swiss MICE**. [S. l.: s. n.], 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46651999000200005>

DE PALMA, G. *et al.* Pivotal Advance: Bifidobacteria and Gram-negative bacteria differentially influence immune responses in the proinflammatory milieu of celiac disease. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 87, n. 5, p. 765–778, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1189/jlb.0709471>

DEY, Ranadhir *et al.* Characterization of a Leishmania stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 77, n. 2, p. 399–414, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07214.x>

DEY, Ranadhir *et al.* Gut Microbes Egested During Bites of Infected Sand flies Augment Severity of

Leishmaniasis Via Inflammasome-Derived IL-1 β . **Cell Host Microbe.**, [s. l.], v. 10, n. 23, p. 134–143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.002>.

DOS REIS, Lisiane Lappe *et al.* Visceral leishmaniasis and its relationship with climate and environmental factors in the state of Tocantins, Brazil, from 2007 to 2014. **Cadernos de Saude Publica**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 1–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311x00047018>

EGERT, M.; SIMMERING, R.; RIEDEL, C. U. The Association of the Skin Microbiota With Health, Immunity, and Disease. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 102, n. 1, p. 62–69, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cpt.698>

EL HAMOUCHI, Adil *et al.* Genetic polymorphism in *Leishmania infantum* isolates from human and animals determined by nagt PCR-RFLP. **Infectious Diseases of Poverty**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0439-y>

FERNANDEZ-DUARTE, Karem Prunella *et al.* *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) and *Lactobacillus casei* (Lafti L26-DSL): Probiotics Able to Block the In Vitro Adherence of Rotavirus in MA104 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 56–63, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9277-7>

FERREIRA, Eduardo de Castro *et al.* Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0392-y>

FIGUEIREDO DE SÁ, Bruna S.L. *et al.* Identification of divergent leishmania (*Viannia*) *braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–23, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007382>

FONTES, Cláudia O. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility of micro-organisms recovered from cutaneous lesions of human American tegumentary leishmaniasis in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 11, p. 1071–1076, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46070-0>

G.REED, Steven; PHILLIPSCOTT. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. **Curr Opin Immunol**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 524–531, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90033-o](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90033-o).

GAO, Jing *et al.* Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism. **Front. Cell. Infect. Microbiol**, [s. l.], v. 8, n. February, p. 1–22, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00013>

GIMBLET, Ciara *et al.* Cutaneous leishmaniasis induces a transmissible dysbiotic skin microbiota

that promotes skin inflammation. **Cell Host Microbe.**, [s. l.], v. 12, n. 22, p. 13–24, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.006>

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, Suênia da C. *et al.* The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 8, n. OCT, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01437>

HAJAVI, Jafar *et al.* The immunomodulatory role of probiotics in allergy therapy. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 234, n. 3, p. 2386–2398, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.27263>

ITO, Marcos Massayuki *et al.* Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, [s. l.], v. 81, n. 5, p. 533–540, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.07.014>

IVES, Annette *et al.* Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6018, p. 775–778, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1199326>. Leishmania

JULIA, Valérie *et al.* Priming by Microbial Antigens from the Intestinal Flora Determines the Ability of CD4 + T Cells to Rapidly Secrete IL-4 in BALB/c Mice Infected with Leishmania major. **The Journal of Immunology**, [s. l.], v. 165, n. 10, p. 5637–5645, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.10.5637>

KARAKUŞ, Mehmet *et al.* Midgut Bacterial Diversity of Wild Populations of Phlebotomus (P .) papatasi , the Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis (ZCL) in Turkey. **Scientific Reports**, [s. l.], n. July, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13948-2>

KARIYAWASAM, Ruwandi *et al.* Virulence factor RNA transcript expression in the Leishmania Viannia subgenus: influence of species, isolate source, and Leishmania RNA virus-1. **Trop Med Health**, [s. l.], v. 47, p. 25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s41182-019-0153-x>

KAUFER, Alexa *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>

KHAN.YOUSUF A, ANDREWS.NORMA W, and Mittra.Bidyottam. ROS regulate differentiation of visceralizing Leishmania species into the virulent amastigote form. **Parasitol Open.**, [s. l.], n. 4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/doi:10.1017/pao.2018.15>

KIM, Donghyun; ZENG, Melody Y; NÚÑEZ, Gabriel. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases. **Experimental & Molecular Medicine**, [s. l.], v. 49, n. December 2016, p. e339, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/emm.2017.24>

LAMOUR, Sabrina D. *et al.* Metabolic, immune, and gut microbial signals mount a systems response to Leishmania major infection. **Journal of Proteome Research**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 318–329, 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr5008202>

LAPPAN, Rachael *et al.* Meta-taxonomic analysis of prokaryotic and eukaryotic gut flora in stool samples from visceral leishmaniasis cases and endemic controls in Bihar State India. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 1–28, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007444>

LEAO, Selma De Souza *et al.* Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. **J Cell Sci**, [s. l.], v. 108, n. 10, p. 3219–3231, 1995. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1242/jcs.108.10.3219>

LEONARDIS, F De *et al.* Visceral leishmaniasis and anti-TNF-alpha therapy: case report and review of the literature. **Clin Exp Rheumatol**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 503–506, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10067-007-0775-yM>

LEVY, Maayan; THAISS, Christoph A.; ELINAV, Eran. Metabolites: Messengers between the microbiota and the immune system. **Genes and Development**, [s. l.], v. 30, n. 14, p. 1589–1597, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.284091.116>

LEWIS, Michael D. *et al.* Fatal progression of experimental visceral leishmaniasis is associated with intestinal parasitism and secondary infection by commensal bacteria, and is delayed by antibiotic prophylaxis. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 1–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008456>

LOPES, Mateus Eustáquio de Moura. **A microbiota tem papel essencial na ativação de macrófagos e na resposta imune durante infecção cutânea por *Leishmania major***. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2018.

LOPES, M. E. M. *et al.* Indigenous microbiota and Leishmaniasis INFLUENCE OF MICROBIOTA ON THE HOST. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 38, p. 37–44, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12279>

LOZUPONE, Catherine A. *et al.* Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, [s. l.], v. 489, n. 7415, p. 220–230, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11550>

MACHADO, MICHELLE MENEZES. **ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* E *Leishmania (Viannia) braziliensis* QUANTO A INFECTIVIDADE/VIRULÊNCIA E PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS MURINOS- Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária)**. Rio de Janeiro/RJ: INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2014. *E-book*.

MAIA, Carla; CAMPINO, Lenea. Biomarkers Associated with *Leishmania infantum* Exposure,

Infection, and Disease in Dogs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00302>

MARSHALL, Skye *et al.* Extracellular release of virulence factor major surface protease via exosomes in *Leishmania infantum* promastigotes. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2937-y>

MEULEN, T A Van Der *et al.* The microbiome – systemic diseases connection. [s. l.], n. February, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/odi.12472>

MIRÓ, Guadalupe; LÓPEZ-VÉLEZ, Rogelio. Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: putting «One Health» principles into practice. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.03.002>

MISRA, Pragma; SINGH, Shailza. Site specific microbiome of *Leishmania* parasite and its cross-talk with immune milieu. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 216, n. October, p. 79–88, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2019.10.004>

MORGADO, F N *et al.* Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br J Dermatol.**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 50–58, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08255.x>

MURASE, Letícia Sayuri *et al.* The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. **Parasitology**, [s. l.], v. 63, p. 1–11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0031182018000367>

NAIK, Shruti *et al.* Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. **NIH Public Access**, [s. l.], v. 337, n. 6098, p. 1115–1119, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1225152>.

NAIK, Shruti *et al.* Compartmentalized Control of Skin Immunity by Resident Commensals. **Science.**, [s. l.], v. 337, n. 6098, p. 1115–1119, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1225152>.Compartmentalized

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11^a eded. São Paulo: Atheneu, 2005.

OLIVEIRA, M. R. *et al.* Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. 4, p. 477–488, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182005008073>

OLIVEIRA, M R *et al.* Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with *Leishmania major* but fail to heal lesions. **Parasitology**, [s. l.], v. 131, n. Pt4, p. 477–488, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182005008073>

OLIVIER, Martin; GREGORY, David J; FORGET, Geneviève. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin**

Microbiol Rev, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 293–305, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.293-305.2005>

OLIVIER, Martin; HASSANI, Kasra. Protease inhibitors as prophylaxis against leishmaniasis: new hope from the major surface protease gp63. **Future Med Chem**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 539–542, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.10.17>.

PAIXÃO-MARQUES, Mirian dos Santos *et al.* First isolation of *Leishmania infantum* by blood culture in bovines from endemic area for canine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, [s. l.], v. 146, n. 7, p. 911–913, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182019000088>

PALIĆ, Semra *et al.* Systematic review of host-mediated activity of miltefosine in leishmaniasis through immunomodulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 63, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.02507-18>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Manual of procedures for surveillance and control of leishmaniasis in the Americas**. Washington, D.C.: [s. n.], 2019.

PASQUALI, Aline Kuhn Sbruzzi *et al.* Dispersion of *Leishmania (Leishmania) infantum* in central-southern Brazil: Evidence from an integrative approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 8, p. 1–20, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007639>

PASSOS, Fabine Correia *et al.* Investigating associations between intestinal alterations and parasite load according to *Bifidobacterium* spp . and *Lactobacillus* spp . abundance in the gut microbiota of hamsters infected by *Leishmania infantum*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 115, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760200377>

PENNA, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brasil-Médico*. **Brasil Médico**, [s. l.], v. 48, p. 949–950, 1934.

PIMENTA, P F; SARAIVA, E M; SACKS, D L. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. **Exp Parasitol**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 191–204, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(91\)90137-l](https://doi.org/10.1016/0014-4894(91)90137-l).

PIRES, AL *et al.* Bacterial diversity of wild-caught *Lutzomyia longipalpis* (a vector of zoonotic visceral leishmaniasis in Brazil) under distinct physiological conditions by metagenomics analysis. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 627, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2593-7>

PIRES, Alause Da Silva *et al.* Identification and Biological Characterization of *Leishmania (Viannia) guyanensis* Isolated from a Patient with Tegumentary Leishmaniasis in Goiás, a Nonendemic Area for This Species in Brazil. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, n. C1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/350764>

PIRES, Malini *et al.* The impact of leishmaniasis on mental health and psychosocial well-being: A

systematic review. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 1–21, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223313>

PODINOVSKAIA, Maria; DESCOTEAUX, Albert. Leishmania and the macrophage : a multifaceted interaction. **Future Microbiol**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>.

PONTE-SUCRE, Alicia *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

QUARESMA, Patrícia Flávia *et al.* Distinct genetic profiles of Leishmania (Viannia) braziliensis associate with clinical variations in cutaneous-leishmaniasis patients from an endemic area in Brazil. **Parasitology**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0031182018000276>

REBELLO, Karina Mastropasqua *et al.* Leishmania (Viannia) braziliensis: Influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 126, n. 4, p. 570–576, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.06.009>

REZA, Shafiei *et al.* Cytokine profile and nitric oxide levels in macrophages exposed to Leishmania infantum FML. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 203, n. May, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.004>

ROGERS, Kathleen A *et al.* Type 1 and type 2 responses to Leishmania major. **FEMS Microbiol Lett**, [s. l.], v. 209, n. 1, p. 1–7, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11101.x>

ROGERS, Matthew E *et al.* Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, [s. l.], v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature02675>.

SALGADO, Vanessa R. *et al.* The microbiological signature of human cutaneous leishmaniasis lesions exhibits restricted bacterial diversity compared to healthy skin. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 111, n. 4, p. 241–251, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150436>

SCHARSCHMIDT, Tiffany C. Skin Dysbiosis Goes “Off-Leish”. **Cell Host and Microbe**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–3, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.017>

SERENO, Denis *et al.* What pre-Columbian mummies could teach us about South American leishmaniasis? **Pathogens and Disease**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx019>

SILVA, Silvana C *et al.* Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that Leishmania

braziliensis strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. **Acta Trop**, [s. l.], v. 178, p. 34–39, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.10.010>.

SILVEIRA, F. T. *et al.* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x>

SINGH, Toolika *et al.* Epitope-Binding Characteristics for Risk versus Protective DRB1 Alleles for Visceral Leishmaniasis. [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701764>

SOUSA, Anastácio Q.; PEARSON, Richard. Drought, smallpox, and emergence of *Leishmania braziliensis* in northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 916–921, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1506.071331>

STAMPER, Brendan D *et al.* Model-based Evaluation of Gene Expression Changes in Response to *Leishmania* Infection. **Gene Regulation and Systems Biology**, [s. l.], v. 13, p. 117762501982835, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1177625019828350>

STEVERDING, Dietmar. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

STOCKINGER, Brigitta; VELDHOFEN, Marc. Differentiation and function of Th17 T cells. **Curr Opin Immunol**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 281–286, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.005>

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

SUELEN, S *et al.* Glucantime reduces mechanical hyperalgesia in cutaneous leishmaniasis and complete Freund's adjuvant models of chronic inflammatory pain. [s. l.], n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jphp.12896>

SUMAN, Shashi Shekhar *et al.* Cytosolic trypan redoxin of *Leishmania donovani* modulates host immune response in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, [s. l.], v. 108, n. October 2017, p. 1–8, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.010>

SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash. Molecular Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. **Molecular Diagnosis and Therapy**, [s. l.], v. 22, n. 4, p. 443–457, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0343-y>

TERRAZAS, Cesar *et al.* Ly6C^{hi} inflammatory monocytes promote susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **Scientific Reports**, [s. l.], p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14935-3>

- TOLEDO, Celina Roma Sánchez de *et al.* Vulnerability to the transmission of human visceral leishmaniasis in a Brazilian urban area. **Revista de saude publica**, [s. l.], v. 51, p. 49, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1518-8787.2017051006532>
- TY, Maureen C. *et al.* Immuno-metabolic profile of human macrophages after Leishmania and Trypanosoma cruzi infection. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225588>
- VAN BAARLEN, Peter *et al.* Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 108, n. SUPPL. 1, p. 4562–4569, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1000079107>
- VAN DER MEULEN, T. A. *et al.* The microbiome–systemic diseases connection. **Oral Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 719–734, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/odi.12472>
- VIEIRA, E. C. *et al.* Cutaneous leishmaniasis in germfree, gnotobiotic, and conventional mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 385–387, 1987. Disponível em: <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651987000600009>.
- VILLARINO, Nicolas F. *et al.* Composition of the gut microbiota modulates the severity of malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 113, n. 8, p. 2235–2240, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1504887113>
- WANDERLEY, Joao Luiz Mendes *et al.* CD4+ T cell-dependent macrophage activation modulates sustained ps exposure on intracellular amastigotes of leishmania amazonensis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. APR, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00105>
- WARBURG, A; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of Phlebotomus papatasi on the transmission of Leishmania major. **Am J Trop Med Hyg.**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 926–930, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1986.35.926>.
- WHO. **Leishmaniasis**. [S. l.], 2020. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_. Acesso em: 19 maio 2021.
- Y. ERIN CHEN; FISCHBACH, Michael A; BELKAID, Yasmine. Skin microbiota–host interactions. **Nature**, [s. l.], v. 553, n. 7689, p. 427–436, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature25177>
- ZAHEDI ASL, Saleh; GHASEMI, Asghar; AZIZI, Fereidoun. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. **Clinical Biochemistry**, [s. l.], v. 41, n. 16–17, p. 1342–1347, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.076>

