

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNA DIAS DAS CHAGAS

Resposta Imunopatológica de Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Submetidos à Infecção Mista por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) naiffi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Dr. Renato Porrozi de Almeida
Dr^a Elisa Cupolillo

RIO DE JANEIRO

2018

Chagas, Bruna Dias das.

Resposta Imunopatológica de Hamsters (*Mesocricetus auratus*)
Submetidos à Infecção Mista por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) naiffi* / Bruna Dias das Chagas. - Rio de Janeiro, 2018.
66 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2018.

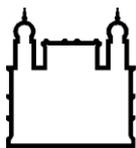
Orientador: Renato Porrozzi de Almeida.

Co-orientadora: Elisa Cupolillo.

Bibliografia: f. 50-66

1. Leishmaniose. 2. Coinfecção. 3. Imunopatologia. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: BRUNA DIAS DAS CHAGAS

**RESPOSTA IMUNOPATOLÓGICA DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*)
SUBMETIDOS À INFECCÃO MISTA POR *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (V.) naiffi***

**ORIENTADORES: Dr. Renato Porrozi de Almeida
Dr^a Elisa Cupolillo**

Aprovada em: 25 de abril de 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Flávia Lima Ribeiro Gomes – Revisora e Presidente (IOC – Fiocruz)
Prof. Dr. Eduardo Fonseca Pinto – Titular (IOC – Fiocruz)
Prof. Dr. Lúcia Helena Pinto da Silva – Titular (IV – UFRRJ)
Prof. Dr. Katia da Silva Calabrese – Suplente (IOC – Fiocruz)
Prof. Dr. Adriano Gomes da Silva – Suplente (INI – Fiocruz)

Rio de Janeiro, 25 de abril de 2018

Dedicatória

A minha querida e amada mãe Dileusa, por todo o amor e empenho de uma vida inteira, dedicados a mim e a minha formação. Ao meu amado esposo Michael, por toda amizade, amor, apoio, parceria e companheirismo diário. E, a minha querida vizinha Maria, por sempre acreditar em mim e dizer que eu alcançaria grandes coisas.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Renato Porrozzi e Elisa Cupolillo, digo que mais do que aqui está escrito é o que tenho para agradecer, mas em resumo fica a minha gratidão pela oportunidade concedida, pelo apoio constante e ensinamentos. Deixo registrada minha grande admiração por vocês no âmbito profissional e pessoal.

A Luiza Pereira, pela importantíssima ajuda nos ensaios de PCR, pela transmissão de conhecimento diariamente, pela confiança e amizade desenvolvida.

A Fernanda Morgado, por toda sua contribuição com a histopatologia e por ser sempre tão gentil e amável.

A Mariana Côrtes, por 4 anos atrás ter me recebido no laboratório como sua aluna de iniciação científica, e dessa forma ter aberto as portas do lugar a qual viria a ser aquele em que eu daria importantes passos na minha vida profissional.

A Raquel Romão pela gentileza em ceder amostras em um momento crucial dos meus experimentos.

A Monique Lima pela indispensável participação nos procedimentos com os hamsters.

Ao Otacílio Moreira pela boa vontade em me receber para o esclarecimento de protocolos e dúvidas sempre que o solicitei.

A todos os amigos do LPL, em especial Bárbara, Camila, Caroline, Erika, Hellen, Nathália, Tainã e Virgínia, pela ótima convivência, pelo conhecimento compartilhado e por serem sempre tão solícitos.

A todos os meus queridos amigos, presentes que a vida me deu, minha gratidão a vocês pelo companheirismo e presença nos momentos mais importantes da minha vida. Em especial, Yasmin, Thaynara, Caroline, Thais, Rafael e Luiz Antônio.

Aos meus familiares, que de perto ou de longe torcem por mim. Em especial, minhas avós Maria e Nininha, meus primos Raquel e Marcos Vinícius e minhas tias Darlene, Isabel e Zenir.

A minha mãe por estar sempre ao meu lado, com seus ensinamentos, correções, carinho, cuidado e amor. E por ter me dado um lindo presente, minha irmãzinha Louyse, que trouxe ainda mais alegria e amor para minha vida.

Ao meu esposo Michael, por tornar a vida leve e divertida todos os dias com a sua alegria, brincadeiras, positivismo e principalmente amor. Também por me dar forças e me incentivar constantemente, principalmente nos dias mais estressantes e difíceis.

Ao meu Deus, pelo seu grande amor, cuidado e sustento. Sendo em todos os momentos da minha vida, a minha base.

*“Sendo assim, tudo quanto vier à mão para realizar,
faze-o com o melhor das tuas forças.”
Eclesiastes 9:10a*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Panorama da endemicidade de Leishmaniose Visceral no mundo em 2015.

As regiões estão representadas por cores. Marrom: mais de 1000 casos novos, vermelho: entre 500 e 999 casos novos, laranja: entre 100 e 499 casos novos, rosa: menos de 100 casos novos, branco: nenhum novo caso, verde: nenhum caso autóctone reportado, cinza: nenhum dado obtido. Fonte: WHO

(http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1), obtido em 02/03/2018.....2

Figura 1.2: Panorama da endemicidade de Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015.

As regiões estão representadas por cores. Marrom: mais de 5000 casos novos, vermelho: entre 1000 e 4999 casos novos, laranja: entre 100 e 999 casos novos, rosa: menos de 100 casos novos, branco: nenhum novo caso, verde: nenhum caso autóctone reportado, cinza: nenhum dado obtido. Fonte: WHO

(http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1), obtido em 02/03/2018.....3

Figura 1.3: Ciclo biológico do parasito *Leishmania*.

1: Os parasitos, em sua forma promastigota, são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada de um inseto flebotômíneo fêmea infectado quando este realiza o repasto sanguíneo; 2: As formas promastigotas, na pele, são fagocitadas por macrófagos e outras células fagocíticas; 3: Dentro dos macrófagos, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas; 4: As formas amastigotas multiplicam-se e com o rompimento da célula hospedeira, disseminam-se para outras células e tecidos; 5: Quando flebotômíneos realizam um repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ingerem células infectadas com amastigotas; 6: Os macrófagos ingeridos pelos flebotômíneos são rompidos e as amastigotas liberadas; 7: No intestino médio dos flebotômíneos, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas; 8: As formas promastigotas se dividem e migram para a probóscide. (Adaptado de Hailu A. *et al.*, 2005 (2); ilustração: CDC/ Alexander J da Silva/Melanie Moser).....6

Figura 1.4: Vias imunológicas na leishmaniose cutânea.

As diferentes vias dependem da diferenciação das células TCD4⁺ nos subconjuntos Th1, Th2, Th17 e Treg. Após a entrada do parasito, macrófagos e células dendríticas são estimulados a produzirem citocinas inflamatórias como IL-12. Esta citocina por sua vez, promove a diferenciação ao perfil Th1 e estimula células NK a produzirem IFN- γ , que leva a ativação de macrófagos e morte de parasitos por produção de NO. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 promovem a diferenciação ao perfil Th2, que inibe a atividade dos macrófagos e leva a sobrevivência do parasito. Uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias, entretanto, resulta em uma imunopatologia grave, que pode levar a destruição tecidual. As citocinas TGF- β e IL-27 secretadas por macrófagos e células dendríticas estimulam as células Treg a produzirem IL-10, que atua reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios, levando ao equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, a fim de controlar a doença, eliminando os parasitos sem destruir os tecidos. (Adaptado de Maspi N. *et al.*, 2016).....10

Figura 1.5: Exemplos de manifestações clínicas de LTA.

A: Forma cutânea localizada na mão; B: Forma mucosa na região da boca e do nariz; C: Forma cutânea difusa presente em diversas regiões do corpo. Fonte: adaptado de Mcgwire B. & Satoskar A., 2014.....12

Figura 1.6: Regulação imunológica em diferentes formas de LTA.

Macrófagos parasitados por *Leishmania* são regulados por citocinas presentes no microambiente do sítio de infecção. Em um ambiente regulatório (à esquerda) há baixos níveis de citocinas Th1. Citocinas Th2, IL-10, TGF- β antagonizam os efeitos de IFN- γ e TNF- α , resultando na proliferação dos parasitos, como no caso do extremo relacionado à forma LC difusa. Citocinas do perfil Th1 (à direita) podem induzir a produção de ROS, levando a inibição da replicação dos parasitos. No extremo relacionado às formas LM e LMC ocorre aumento de células Th17, intensa produção de citocinas do perfil Th1, que leva à destruição do parasito e à destruição tecidual (Adaptado de Scorza B. *et al.*, 2017).....13

Figura 3.1: Desenho experimental do presente estudo.....21

Figura 4.1: Evolução da lesão nos grupos *Ln*, $\frac{1}{2}Lb$, *Lb* e Mista durante o período de 10 semanas pós-infecção.

Experimento realizado com um total de 28 animais (7 animais por grupo), referentes ao ensaio de infecção 1. (A) Edema das patas medido através da diferença entre a pata infectada e a pata contra-lateral não infectada. (B) Área da lesão sobre a pata infectada. A significância está demonstrada entre os grupos Mista e $\frac{1}{2} L. braziliensis$ por 2way ANOVA: *(P<0,05), **(P<0,01), ***(P<0,001).....28

Figura 4.2: Características macroscópicas do curso da lesão nos grupos *Ln*, $\frac{1}{2} Lb$, *Lb* e Mista, em três momentos distintos de observação.

Imagens representativas dos grupos. A: 3ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; B: 6ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; C: 9ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; D: 3ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2} Lb$; E: 6ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2} Lb$; F: 9ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2} Lb$; G: 3ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; H: 6ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; I: 9ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; J: 3ª semana pós-infecção do grupo Mista; K: 6ª semana pós-infecção do grupo Mista; L: 9ª semana pós-infecção do grupo Mista.....29

Figura 4.3: Gel de poliacrilamida a 6% apresentando perfis obtidos para amostras de lesão de diferentes animais infectados com uma única espécie ou com infecção mista por *L. braziliensis* e *L. naiffi*.

Gel representativo dos ensaios de digestão por *Bst*UI do produto de PCR para região do gene *hsp70*. O experimento foi realizado ao final do acompanhamento clínico de 10 semanas e executado por 2 vezes, com um total de 28 animais referentes ao primeiro ensaio de infecção e 16 animais referentes ao segundo ensaio de infecção. 1- Marcador de peso molecular DNA Leader 100 bp; 2- Amostra de animal infectado com *L. braziliensis*; 3 e 6- Cepa de referência de *L. naiffi*; 4- Amostra de animal infectado com *L. naiffi*; 5 e 7- Amostra de animal com infecção mista por *L. braziliensis* + *L. naiffi*; 8- Controle (produto não digerido).....30

Figura 4.4: Perfil eletroforético, para as enzimas 6PGDH e G6PDH, observado para parasitos isolados e cultivados a partir de fragmento de lesões de animais experimentalmente infectados.

Géis representativos dos ensaios de isoenzimas realizados ao final do acompanhamento clínico de 10 semanas, executados por 2 vezes, com um total de 28 animais referentes ao primeiro ensaio de infecção e 16 animais referentes ao segundo ensaio de infecção. (A) 6PGDH, (B) G6PDH: 1- *L. braziliensis* cepa de referência, 2- cultura de animal infectado com *L. braziliensis*, 3 e 12- *L. naiffi* cepa de referência, 4 e 7- cultura de animal infectado com *L. naiffi*, 5- cultura de animal com infecção mista (*L. naiffi* +*L. braziliensis*), após 15 dias de

cultivo, 6, 8-11- cultura de animal com infecção mista (*L. naiffi* +*L. braziliensis*), 7- cultura de animal infectado com *L. naiffi*.....31

Figura 4.5: Aspectos histopatológicos observados nas lesões de hamsters experimentalmente infectados com *L. braziliensis*, *L. naiffi* ou infecção mista por estas espécies de *Leishmania*.

Coloração de Hematoxilina-Eosina. Imagens representativas de áreas de lesão dos grupos experimentais, obtidas após 10 semanas de infecção. Os experimentos foram executados por 2 vezes, com um total de 9 animais do grupo *Ln*, 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 10 animais do grupos *Lb* e 8 animais do grupo *Mista*. A-C: área de lesão de animais do grupo *Ln*; D-F: área de lesão de animais do grupo *Lb*; G-I: área de lesão de animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*; J-L: área de lesão de animais do grupo *Mista*. Os símbolos presentes nas imagens significam: CS: Corpúsculo de Schaumann; Seta (→): amastigotas; Asterisco (*): vacuolização.....32

Figura 4.6: Intensidade das alterações teciduais observadas na análise histopatológica das lesões cutâneas em hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania* spp.

A avaliação das alterações teciduais foi realizada após 10 semanas de infecção. Foram avaliados e comparados: 4 animais do grupo Controle, 9 animais do grupo *Ln*, 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 10 animais do grupos *Lb* e 8 animais do grupo *Mista*, que correspondem aos ensaios de infecção 1 e 2, realizados em momentos distintos. A: Infiltrado inflamatório; B: Células vacuoladas, C: Corpúsculos de Schaumann; D: Fibrose; E: Necrose. Cada ponto representa um animal. Foi feita uma análise semiquantitativa em que cada característica inflamatória recebeu uma pontuação de acordo com sua intensidade na lesão (ausente= 0 ponto, discreta= 1 ponto, média= 2 pontos e intensa= 3 pontos). One-way ANOVA/ pós-teste por Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$34

Figura 4.7: Escore histopatológico observado nas lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania* spp.

O valor do escore foi obtido por meio do somatório das pontuações referentes à análise semiquantitativa das alterações histopatológicas (intensidade de infiltrado inflamatório, células vacuoladas, corpúsculos de Schaumann, fibrose e de necrose da área de lesão de cada animal) após 10 semanas de infecção. Foram avaliados e comparados: 4 animais do grupo Controle, 9 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 10 animais do grupos *Lb* (*L. braziliensis*) e 8 animais do grupo *Mista*, que correspondem aos ensaios de infecção 1 e 2, realizados em momentos distintos. Cada ponto representa um animal. O valor de escore. One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$ / pós-teste por Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$35

Figura 4.8: Análise semi-quantitativa de amastigotas nas lesões dos hamster experimentalmente infectados.

Foram avaliados 20 campos da área de lesão. Os campos foram considerados positivos quando no mínimo uma amastigota foi visualizada e somatório final dos campos positivos para amastigotas foi expresso em porcentagem. Os ensaios foram realizados após 10 semanas de infecção e foram utilizados: 4 animais do grupo Controle, 9 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 10 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 8 animais do grupo *Mista*, que correspondem aos ensaios de infecção 1 e 2, realizados em momentos distintos. Cada ponto representa um animal. Kruskal-Wallis test: * $p < 0,05$ / pós teste por Dunn: * $p < 0,05$36

Figura 4.9: Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real.

A carga parasitária foi estimada após 10 semanas de infecção a partir de DNA extraído da área de lesão ou do linfonodo poplíteo de animais infectados, correspondentes aos ensaios de

infecção 2 e 3, realizados em momentos distintos. Nos ensaios realizados a partir da área de lesão (A) foram utilizados: 7 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 7 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 7 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 6 animais do grupo *Mista*. Nos ensaios realizados a partir do linfonodo poplíteo (B) foram utilizados: 6 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 5 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 7 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 7 animais do grupo *Mista*. Cada ponto representa um animal (one-way ANOVA: **p< 0,001/ pós teste por Bonferroni: *p<0,05).....37

Figura 4.10: Expressão gênica, determinada por PCR em tempo real, de citocinas na área de lesão na pata de animais experimentalmente infectados.

A expressão gênica de citocinas foi determinada após 10 semanas de infecção em animais pertencentes aos ensaios 2 e 3, realizado em momentos distintos. Foram avaliados: 3 animais do grupo Controle, 4 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 3 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 3 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 4 animais do grupo *Mista*. Cada ponto representa um animal. A: expressão relativa de IL-4; B: expressão relativa de IL-10; C: expressão relativa de IFN- γ ; D: expressão relativa de TNF- α . Testes estatísticos realizados por One-way ANOVA/ pós teste por Bonferroni: *p<0,05; **p<0,005).....38

Figura 4.11: Expressão gênica, determinada por PCR em tempo real, de citocinas inflamatórias no linfonodo poplíteo de animais experimentalmente infectados.

A expressão gênica de citocinas foi determinada após 10 semanas de infecção em animais pertencentes aos ensaios 2 e 3, realizados em momentos distintos. Foram avaliados: 3 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 4 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 4 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 3 animais do grupo *Mista*. Cada ponto representa um animal. A: expressão relativa de IL-4; B: expressão relativa de IL-10; C: expressão relativa de IFN- γ ; D: expressão relativa de TNF- α . Testes estatísticos realizados por Kruskal-Wallis/ pós teste por Dunn: *p<0,05).....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Sequência dos *primers* utilizados na avaliação da carga parasitária.....25

Tabela 3.2: Sequência dos *primers* utilizados na avaliação da expressão gênica de citocinas.....26

LISTA DE ABREVIATURAS

- $\frac{1}{2}$ **Lb**: Grupo experimental de hamsters deste estudo infectados com $2,5 \times 10^6$ parasitos de *L. braziliensis*.
- 6PGDH**: 6-Fosfogliconato Desidrogenase
- C57BL/6**: *C57 Black 6*
- CD (4, 40)**: *Cluster of Differentiation 4* ou Grupo de Diferenciação 4
- cDNA**: DNA complementar
- CEUA**: Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLIOC**: Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz
- CT**: *Cycle Threshold* ou Ciclo Limiar
- DNA**: *Deoxyribonucleic Acid* ou Ácido Desoxirribonucleico
- dNTPs**: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDTA**: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid* ou Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
- G6PDH**: Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
- GAPDH**: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
- GP63**: Glicoproteína 63
- HE**: Hematoxilina-Eosina
- HIV**: *Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana
- ICTB**: Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos
- IFN- γ** : Interferon gama
- IL (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 22, 27)**: Interleucina
- iNOS**: *Inducible Nitric Oxide Synthase* ou Óxido Nítrico Sintase Induzível
- L**: *Leishmania*
- Lb**: Grupo experimental de hamsters deste estudo infectados com 5×10^6 parasitos de *L. braziliensis*.
- LC**: Leishmaniose Cutânea
- LCI**: Leishmaniose Cutânea Inaparente
- LG**: Leishmaniose Glandular
- LM**: Leishmaniose Mucosa
- LMC**: Leishmaniose Mucocutânea
- Ln**: Grupo experimental de hamsters deste estudo infectados com 5×10^6 parasitos de *L. naiffi*.
- LPG**: Lipofosfolipano
- LTA**: Leishmaniose Tegumentar Americana
- Lu**: *Lutzomyia*
- LV**: Leishmaniose Visceral
- NETs**: *Neutrophil Extracellular Traps* ou Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos
- NK**: *Natural Killer Cells* ou Células Assassinas Naturais
- NNN**: Neal, Novy, Nicolle
- PAF**: Platelet-Activating Factor ou Fator de Agregação Plaquetária
- pb**: pares de bases
- PBMC**: *Peripheral Blood Mononuclear Cell* ou Células Mononucleares de Sangue Periférico
- PBS**: *Phosphate-Buffered Saline* ou Solução Salina Tamponada com Fosfato
- PCR**: *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em cadeia da polimerase
- RFLP**: *Restriction Fragment Length Polimorfism* ou Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
- PGE 2**: Prostaglandina E2
- RNA**: *Ribonucleic Acid* ou Ácido Ribonucleico
- RNA_m**: RNA mensageiro
- RT-PCR**: Reação da Transcriptase Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase
- SFB**: Soro Fetal Bovino
- TCD4⁺**: Linfócito T CD4 positivo

TGF- β : *Transforming Growth Factor beta* ou Fator de Transformação do Crescimento beta

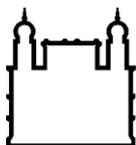
TNF- α : *Tumor Necrosis Factor* ou Fator de Necrose Tumoral alfa

V: *Viannia*

VAMP 8: *Vesicle Associated Membrane Protein 8* ou Proteína de Membrana Associada a Vesícula 8

WHO ou OMS: *World Health Organization* ou Organização Mundial de Saúde

μ L: microlitros



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

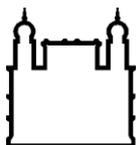
RESPOSTA IMUNOPATOLÓGICA DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (V.) naiffi*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Dias das Chagas

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* envolvidos com o desenvolvimento de diversas manifestações clínicas. Nas Américas, as formas clínicas cutâneas podem ser causadas por diversas espécies desse parasito e já foram identificadas ocorrendo em simpatria em algumas regiões do Brasil. As espécies *L. braziliensis* e *L. naiffi*, ocorrem em simpatria na Amazônia e foram demonstradas ocorrendo também simultaneamente em um mesmo indivíduo. Infecções mistas por espécies de *Leishmania* podem parecer eventos raros, contudo a falta de métodos de diagnóstico disponíveis, capazes de detectar eventos desse tipo, pode subestimar a ocorrência desses casos. Apesar disso, há registros na natureza de infecções mistas por espécies de *Leishmania* em vetores, em reservatórios e em humanos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo comparar o perfil imunopatológico de infecções mistas por *L. braziliensis* e *L. naiffi* com infecções únicas causadas pelas mesmas espécies. O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) foi o modelo utilizado, por ser mais suscetível a infecções experimentais por parasitos do subgênero *Viannia*, apresentando características clínicas e histopatológicas similares às observadas em humanos. O curso clínico das infecções mistas foi semelhante ao curso clínico de infecções únicas com o dobro da quantidade de parasitos de *L. braziliensis*. Infecções mistas não foram identificadas por PCR-RFLP, mas foram demonstradas em ensaios de isolamento e caracterização por isoenzimas. No entanto, quando estes isolados foram mantidos em cultura por períodos prolongados, *L. naiffi* não pode ser identificada. Características inflamatórias como a intensidade do infiltrado inflamatório, da presença de corpúsculos de Schaumann, fibrose e necrose não foram diferentes entre infecções únicas e mistas. Contudo, houve intensa presença de células vacuoladas nas infecções mistas. A carga parasitária nas lesões, ao final do curso clínico de 10 semanas, foi semelhante entre os grupos. Entretanto, no linfonodo poplíteo foi observada carga parasitária significativamente maior no grupo *L. braziliensis* (5×10^6 parasitas) comparada aos grupos infectados com *L. naiffi* e *L. braziliensis* ($2,5 \times 10^6$ parasitas). O grupo de infecção mista apresentou expressão de RNAm de IL-4, IL-10 e IFN- γ semelhante aos demais grupos e a maior expressão de RNAm de TNF- α , o que pode explicar o grande dano tecidual observado. As infecções mistas por *L. naiffi* e *L. braziliensis* no modelo hamster levaram ao desenvolvimento de uma doença mais grave do que infecções únicas por *L. braziliensis* e por *L. naiffi*. A investigação experimental de infecções mistas pode auxiliar no entendimento de aspectos clínicos e imunológicos importantes que levam ao agravamento ou melhora das infecções.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESPOSTA IMUNOPATOLÓGICA DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*) SUBMETIDOS À INFECÇÃO MISTA POR *Leishmania (V.) braziliensis* E *Leishmania (V.) naiffi*

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Dias das Chagas

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* involved in the development of various clinical manifestations. In the Americas, cutaneous clinical forms may be caused by several species of this parasite and have already been identified as occurring in sympatry in some regions of Brazil. The species *L. braziliensis* and *L. naiffi* occur in sympatry in Amazonia and have been shown to occur simultaneously in the same individual. Mixed infections by *Leishmania* species may appear to be rare events, but the lack of available diagnostic methods to detect events of this type may underestimate the occurrence of these cases. Despite this, there are records in the nature of mixed infections by *Leishmania* species on vectors, reservoirs and humans. Thus, this study aimed to compare the immunopathological profile of mixed infections by *L. braziliensis* and *L. naiffi* with unique infections caused by the same species. The golden hamster (*Mesocricetus auratus*) was the model used, because it is more susceptible to experimental infections by parasites of the subgenus *Viannia*, presenting clinical and histopathological characteristics similar to those observed in humans. The clinical course of mixed infections was similar to the clinical course of single infections with twice the amount of *L. braziliensis* parasites. Mixed infections were not identified by PCR-RFLP, but were demonstrated in isolation and isoenzyme characterization assays. However, when these isolates were kept in culture for prolonged periods, *L. naiffi* could no longer be identified. Inflammatory features such as intensity of inflammatory infiltrate, of presence Schaumann corpuscles, fibrosis and necrosis were not different between single and mixed infections. However, there was an intense presence of vacuolated cells in mixed infections. The parasitic load on lesions at the end of the 10-week clinical course was similar between groups. However, in the popliteal lymph node a significantly higher parasitic load was observed in the *L. braziliensis* (5×10^6 parasites) group compared to the groups infected with *L. naiffi* and *L. braziliensis* ($2,5 \times 10^6$ parasites). The mixed infection group showed expression RNAm of IL-4, IL-10, IFN- γ similar to the other groups and a higher expression RNAm of TNF- α , which may explain the great tissue damage observed. Mixed infections by *L. naiffi* and *L. braziliensis* in the hamster model led to the development of a more severe disease than single infections by *L. braziliensis* and by *L. naiffi*. Experimental investigation of mixed infections may help in the understanding of important clinical and immunological aspects that lead to the worsening or improvement of infections.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. <u>INTRODUÇÃO</u>	
1.1.As Leishmanioses.....	1
1.2.Ciclo Biológico.....	4
1.3.Aspectos Imunológicos na Leishmaniose.....	6
1.4.As Espécies de <i>Leishmania</i> e a LTA.....	10
1.5.Infecções Mistas por Espécies de <i>Leishmania</i>	15
2. <u>OBJETIVOS</u>	
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	
3.1. Animais.....	20
3.2. Cepas de <i>Leishmania</i>	20
3.3. Infecções Experimentais com <i>Leishmania spp.</i>	20
3.4. Evolução Clínica de Infecções Únicas e Mistas nos Animais Experimentalmente Infectados.....	21
3.5. Detecção e Caracterização dos Parasitos em Fragmentos de Tecidos das Lesões dos Animais Infectados.....	22
3.5.1. <i>hsp70</i> PCR-RFLP.....	22
3.5.2. Ensaio de Isoenzimas.....	22
3.6. Análises Histopatológicas.....	23
3.6.1. Escore Histopatológico.....	23
3.6.2. Análise Semi-Quantitativa de Amastigotas nas Lesões.....	23
3.7. Carga Parasitária por PCR em Tempo Real.....	24
3.8. Expressão Gênica de Citocinas.....	25
4. <u>RESULTADOS</u>	
4.1. Evolução Clínica de Infecções Únicas e Mistas nos Animais Experimentalmente Infectados.....	27
4.2. Detecção e Caracterização dos Parasitos em Fragmentos de Tecidos das Lesões dos Animais Infectados.....	30

4.3. Análises Histopatológicas.....	31
4.3.1. Escore Histopatológico.....	33
4.3.2. Análise Semi-Quantitativa de Amastigotas nas Lesões.....	35
4.4. Carga Parasitária por PCR em Tempo Real.....	36
4.5. Expressão Gênica de Citocinas	37
5. <u>DISCUSSÃO</u>	40
6. <u>CONCLUSÃO</u>	49
7. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. As Leishmanioses

Protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae*, da ordem *Kinetoplastida*, podem causar um largo espectro de doenças, chamadas leishmanioses. Essas doenças constituem um grave problema de saúde pública do qual é estimado de 700 mil a 1,3 milhões novos casos e de 20 a 30 mil óbitos anualmente (WHO, 2017). Cerca de 98 países possuem indivíduos infectados (Alvar J. *et al.*, 2012) e a maior concentração dos casos se encontra em países atingidos pela pobreza, como aqueles do Sudeste da Ásia, África Oriental e América Latina, além de também ser endêmica em alguns países mediterrânicos, em um total de 14 milhões de pessoas diretamente afetadas pela doença em todo o mundo (Pace D., 2014; Savoia D., 2015).

Alguns fatores estão relacionados com o favorecimento da expansão da doença, como: a ausência de recursos e acesso à saúde, a desnutrição, a falta de gerenciamento de resíduo e ainda mudanças ambientais, como: desmatamento, construção de barragens, esquemas de irrigação, e a urbanização (WHO, 2017). Além disso, há variáveis mais recentes dentro deste contexto de expansão da doença, como o aumento das viagens internacionais, que tem levado ao aumento do número de casos de leishmaniose em países não endêmicos (Field V. *et al.*, 2010), e o aumento do número de pacientes imunodeprimidos, que tem favorecido o aumento dos casos de leishmaniose na Europa, relatados na região do Mediterrâneo, principalmente na França, Itália, Portugal e Espanha (Alvar J. *et al.*, 2012; Okwor I. & Uzonna JE., 2013; Monge-Maillo B. *et al.*, 2014). Dentro deste panorama, composto por diversas variáveis, tem-se ainda que a doença ocorre em um sistema biológico complexo, que envolve o parasito, o inseto vetor e diferentes hospedeiros vertebrados, o que dificulta ainda mais o seu controle.

As distintas características biológicas das espécies que compõem o gênero *Leishmania*, em conjunto com as características do hospedeiro levam ao desenvolvimento de uma diversidade de manifestações clínicas, que vão desde lesões cutâneas localizadas de cura espontânea até formas mais graves que acometem vísceras e quando não tratadas podem levar ao óbito. De maneira geral, essas doenças podem ser divididas em dois grandes grupos: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV). É importante ressaltar que existem ainda formas subclínicas da doença, em que há ausência de sinais clínicos e por isso, em alguns casos, são erroneamente diagnosticadas. Entretanto, existe nesses casos a possibilidade de identificação por métodos sorológicos e/ou moleculares (Meinecke C. *et al.*, 1999; Mir F. *et al.*, 2012).

Na LV, as manifestações clínicas podem ocorrer desde estados assintomáticos (Sasannejad P. *et al.*, 2016) até formas progressivas (Giannitrapani L. *et al.*, 2009), entretanto nos casos de síndrome clássica, ocorre: febre, palidez, emagrecimento, anemia, leucopenia, plaquetopenia e hipergamaglobulinemia. Além disso, órgãos e vísceras, como gânglios, medula óssea, fígado e baço podem ser acometidos (Herwaldt L. 1999; Darcis G. *et al.*, 2017). Há ainda o pós-kala-azar, que é uma complicação da LV. É caracterizado por uma erupção macular, maculopapular e nodular hipopigmentada que geralmente ocorre em pacientes que se recuperaram da doença. Pode ocorrer em simultâneo com a LV, mas geralmente aparece entre seis meses a um ou mais anos após a cura aparente da doença (WHO, 2017).

A LV é considerada como a segunda doença parasitária mais fatal existente (Savoia D., 2015). É estimado que 616 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas com risco de infecção. Apenas no ano de 2015, mais de 23 mil novos casos foram reportados, dos quais 39% ocorreram na região do Sudeste Asiático, 24% na região Africana, 19% na região do Mediterrâneo Oriental, 15% nas Américas, 2% na região do Pacífico Ocidental e 1% na região Européia (Figura 1.1). Somente no Brasil foram 3336 casos (correspondente a 14% dos casos novos do ano de 2015). Atualmente, os países: Brasil, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia e Somália somam 90% dos casos de LV existentes em todo o mundo (WHO, 2017).

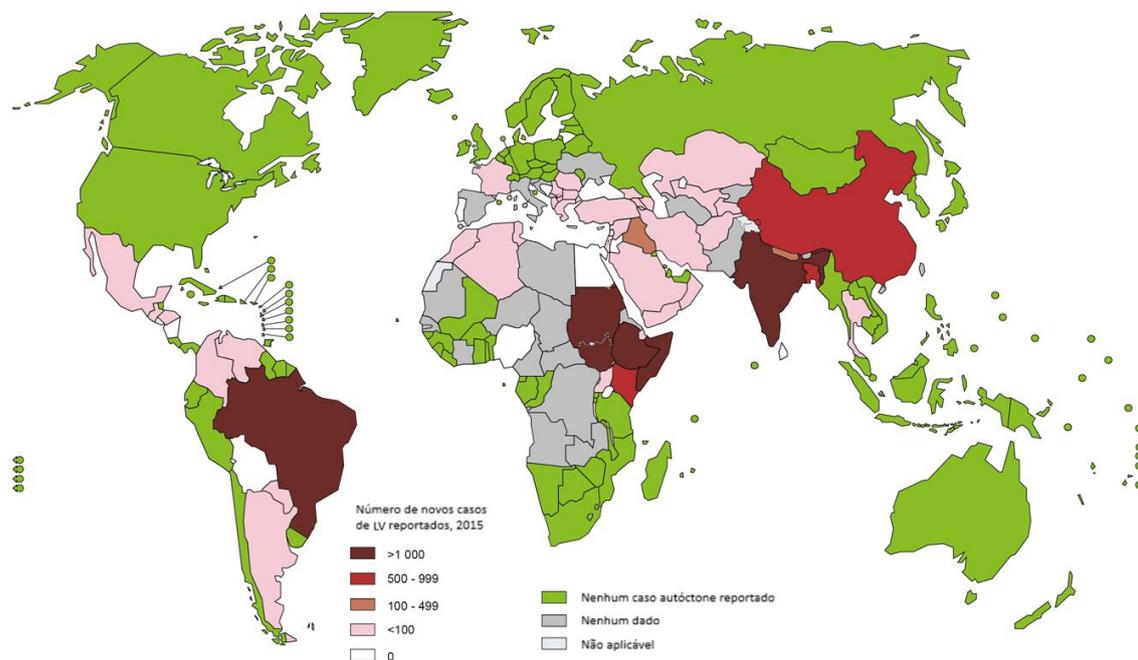


Figura 1.1: Panorama da endemidade de Leishmaniose Visceral no mundo em 2015.

As regiões estão representadas por cores. Marrom: mais de 1000 casos novos, vermelho: entre 500 e 999 casos novos, laranja: entre 100 e 499 casos novos, rosa: menos de 100 casos novos, branco: nenhum novo caso, verde: nenhum caso autóctone reportado, cinza: nenhum dado obtido. Fonte: WHO (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1), obtido em 02/03/2018.

Na LC, as manifestações clínicas conhecidas que podem ser desenvolvidas são: lesões cutâneas localizadas (Wright J. 1903; Fikre H. *et al.*, 2017), disseminadas (Torres O. 1920; Mancheno-Valencia A. *et al.*, 2017) ou difusas (Convit J. & La penta P., 1946; Silva F. 1946; Ordaz-Farias A. *et al.*, 2013), e lesões em regiões de mucosa nasal, oral, faringe e laringe (também conhecida como forma mucocutânea), que geralmente culminam em uma destruição tecidual progressiva (Marsden P. 1986; Safa S. *et al.*, 2015; Darcis G. *et al.*, 2017).

A LC é a forma mais comum de leishmaniose e estima-se que 431 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas com risco de infecção. No ano de 2015 foram reportados 197.552 mil novos casos de LC, dos quais mais de 90% estava concentrado nas Américas (23%) e Mediterrâneo Oriental (70%). Os demais casos nesse ano corresponderam a 2% na região Européia, 1% no Sudeste Asiático, 4% na região Africana e nenhum novo caso na região do Pacífico Ocidental (Figura 1.2). Apenas os países: Brasil, Colômbia e Peru, somaram juntos 32.395 casos novos e a Argélia, foi o país com o maior número de casos, totalizando sozinho 146.556, que corresponde a 74% dos casos. Atualmente, os países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iémen, Iraque, Marrocos, Peru, República Árabe da Síria, República Islâmica do Irã, Sudão e Tunísia apresentam 90% dos casos de LC em todo o mundo (WHO, 2017).

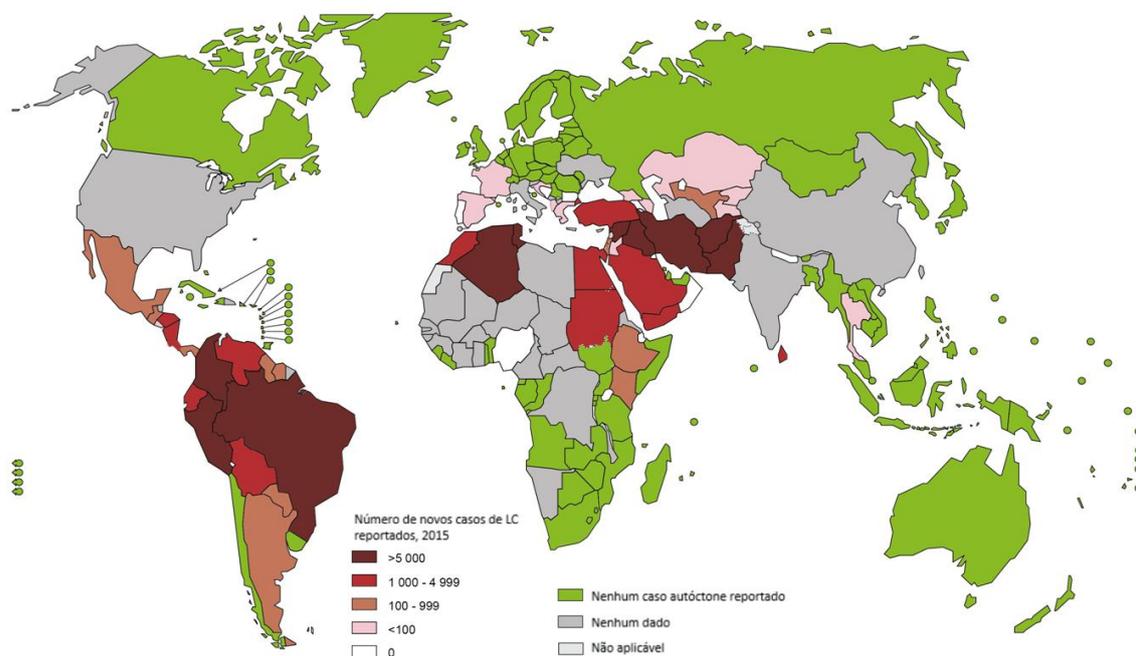


Figura 1.2: Panorama da endemicidade de Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015.

As regiões estão representadas por cores. Marrom: mais de 5000 casos novos, vermelho: entre 1000 e 4999 casos novos, laranja: entre 100 e 999 casos novos, rosa: menos de 100 casos novos, branco: nenhum novo caso, verde: nenhum caso autóctone reportado, cinza: nenhum dado obtido. Fonte: WHO (http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1), obtido em 02/03/2018.

Os expressivos dados epidemiológicos das leishmanioses representam os casos registrados no sistema de vigilância nacional e os relatados a OMS. Entretanto, é preciso considerar a existência de subnotificação e a necessidade de fortalecer a vigilância e detecção da doença, a fim de que se obtenha melhor estimativa do cenário mundial referente à mesma e a garantia de que pacientes recebam tratamento adequado.

1.2. Ciclo Biológico

O ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* é caracterizado por diferentes formas evolutivas do parasito e envolve um hospedeiro vertebrado e um hospedeiro-vetor invertebrado (Figura 1.3). Este último é um inseto de pequeno porte (2-3 mm), denominado flebotomíneo (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), com cerca de 30 espécies incriminadas como vetores de leishmaniose (Lane R., 1993). Esses insetos, na fase adulta, apresentam dimorfismo sexual morfológico e de hábitos alimentares. As fêmeas, por exemplo, que são hematófagas, possuem a probóscide mais alongada em comparação a probóscide dos machos e apresentam uma estrutura envolvida com a ingestão sanguínea denominada cibário, que os machos não possuem (Rangel E. *et al.*, 1986).

Flebotomíneos fêmeas realizam repasto sanguíneo, em mamíferos, para a maturação de seus ovos (Lehane M., 1991). Nos casos em que estes mamíferos encontram-se infectados por *Leishmania* spp., pode ocorrer das fêmeas ingerirem juntamente com o sangue, células contendo amastigotas (forma evolutiva arredondada e com flagelo interno encontrada no hospedeiro vertebrado) ou amastigotas livres, tornando-se assim infectadas.

Os protozoários então, uma vez ingeridos pelo inseto flebotomíneo, alcançam o trato digestório através do rompimento das células que os continham, e no intestino, entram em contato com a matriz peritrófica, uma rede fibrosa composta por quitina e uma série de proteínas associadas (Pimenta P. *et al.*, 1997), onde iniciam a diferenciação da forma amastigota para a forma promastigota procíclica (forma evolutiva ovóide com flagelo externo curto e pouco móvel), multiplicando-se intensamente a seguir. Posteriormente, esses parasitos passam para a forma nectomona (forma mais alongada), preenchendo o intestino abdominal anterior. Em um período de aproximadamente 72 horas, inicia-se a adesão as microvilosidades das células epiteliais da porção anterior do intestino médio, o que impede que os parasitos sejam digeridos e eliminados (Walters L. *et al.*, 1992).

Cerca de 5 dias após a alimentação, as formas nectomonas se encaminham para a porção torácica do intestino médio, onde se diferenciam em seguida nas formas haptomonas, paramastigotas e também em promastigotas metacíclicos (forma delgada, pequena, com

flagelo extenso e que não se multiplica), que é a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Lainson R., Ryan L. & Shaw J., 1987; Saraiva E. *et al.*, 2005).

Entretanto, a diferenciação na forma de promastigota metacíclica não é suficiente para garantir a sobrevivência do parasito, tendo em vista que o mesmo necessita alcançar um novo hospedeiro vertebrado para dar continuidade ao seu ciclo de vida. Para tanto, é necessário que em um próximo repasto sanguíneo, as formas metacíclicas recém-formadas sejam regurgitadas, encaminhando assim os parasitos a um novo hospedeiro.

O processo de regurgitação com consequente transmissão dos parasitos ocorre em função das próprias formas metacíclicas. Esta última forma diferenciada no vetor é capaz de secretar um gel que constitui uma espécie de bloqueio na região anterior do tubo digestivo, que auxilia os parasitos através da redução da entrada de sangue em uma nova alimentação (Rogers M., Chance M & Bates P., 2002). Além disso, essas formas também são capazes de infectar a válvula estomodeal, danificando-a e impedindo assim o bombeamento de sangue, o que estimula a regurgitação das formas metacíclicas (Schlein Y., Jacobson R. & Messer G., 1992).

Os parasitos, em sua forma metacíclica, após serem transmitidos ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo, são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear. Após serem fagocitadas, as promastigotas metacíclicas, diferenciam-se na forma amastigota, que então se multiplica dentro do fagolisossoma. Quando as células não são capazes de eficientemente destruírem os parasitos, ocorre o rompimento da célula e diversas formas amastigotas são liberadas no meio extracelular, levando a fagocitose por novos macrófagos e permitindo a perpetuação do ciclo biológico.

Os ciclos de transmissão do parasito além de envolverem diversas espécies de flebotomíneos, podem envolver diferentes tipos de hospedeiros vertebrados, como: animais silvestres (roedores, marsupiais, raposas, macacos, dentre outros) e domésticos (cavalos, cães, jumento, gato) e o homem (Basano S. & Camargo L., 2004; Silva S., 2007). Além disso, esses ciclos podem apresentar diferentes padrões epidemiológicos, que podem ser caracterizados de acordo com a área e os hospedeiros que atingem. Na LC, por exemplo, duas vias epidemiológicas de transmissão ocorrem: a zoonótica, que inclui animais silvestres ou domésticos como hospedeiros vertebrados e a antroponótica, onde o homem é a única fonte de infecção para o vetor (Artun O. & Kavur H., 2017).

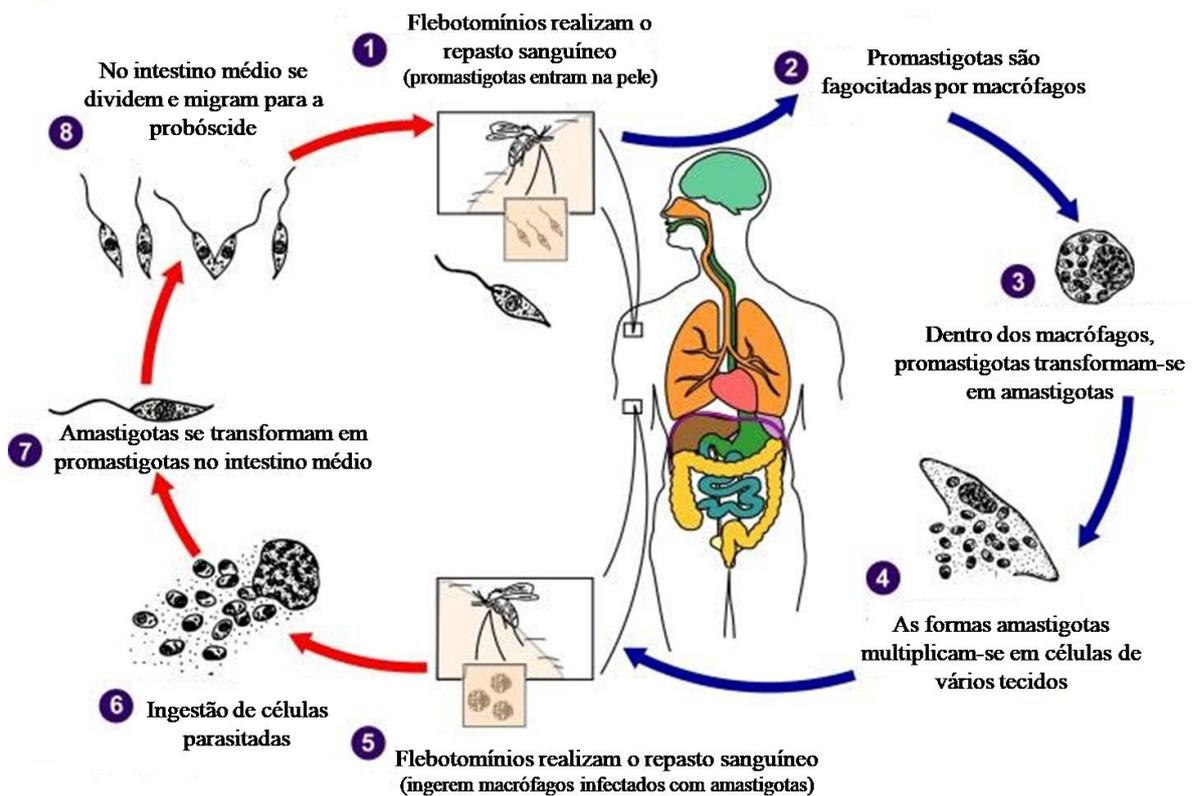


Figura 1.3: Ciclo biológico do parasito *Leishmania*.

1: Os parasitos, em sua forma promastigota, são transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada de um inseto flebotomíneo fêmea infectado quando este realiza o respasto sanguíneo; 2: As formas promastigotas, na pele, são fagocitadas por macrófagos e outras células fagocíticas; 3: Dentro dos macrófagos, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas; 4: As formas amastigotas multiplicam-se e com o rompimento da célula hospedeira, disseminam-se para outras células e tecidos; 5: Quando flebotomíneos realizam um repasto sanguíneo em um indivíduo infectado, ingerem células infectadas com amastigotas; 6: Os macrófagos ingeridos pelos flebotomíneos são rompidos e as amastigotas liberadas; 7: No intestino médio dos flebotomíneos, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas; 8: As formas promastigotas se dividem e migram para a probóscide. (Adaptado de Hailu A. *et al.*, 2005 (2); ilustração: CDC/ Alexander J da Silva/Melanie Moser).

1.3. Aspectos Imunológicos na Leishmaniose

O estabelecimento da infecção por parasitos do gênero *Leishmania* no hospedeiro mamífero depende de inúmeros fatores. Inicialmente, após serem inoculados no hospedeiro vertebrado, para que se estabeleça a infecção, é necessário que os parasitos sejam fagocitados, a fim de que uma vez dentro das células do hospedeiro possam se diferenciar e dividir. Entretanto, para que o processo de fagocitose não elimine o parasito, é preciso que o mesmo consiga escapar das defesas do hospedeiro. Uma das maneiras de como isso acontece, ocorre ainda dentro do vetor, quando uma parte da população de parasitos morre. Este processo é necessário, pois ao ser inoculado um grande número de parasitos vivos, ocorre o desenvolvimento da imunidade do hospedeiro e a destruição dos parasitos (Zandbergen G. *et al.*, 2006). Por outro lado, ao serem inoculados parasitos mortos, que exibem em sua

superfície moléculas de fosfatidilserina (lipídio exposto na camada externa da membrana de células apoptóticas que são reconhecidas por fagócitos) (Wanderley J. *et al.*, 2009), uma ativação não agressiva dos fagócitos é gerada, a secreção de citocinas inflamatórias é inibida e moléculas como TGF- β , PGE 2 e PAF são produzidas (Fadok V. *et al.*, 1998; Ravichandran K. 2010).

Outros mecanismos importantes são desencadeados pelos parasitos antes mesmo de serem fagocitados. A glicoproteína 63 (GP63) é considerada como um fator de virulência e é expresso pelas formas promastigotas (Bouvier J. *et al.*, 1989). Dentre as funções conhecidas desencadeadas por esta metaloprotease está a degradação da matriz extracelular em nível subcutâneo, que se acredita que seja benéfico para auxiliar na mobilidade do parasito (McGwire B. *et al.*, 2003) e na inibição da atividade do complemento, por ligação a C3b e conversão deste à uma forma inativa (Brittingham A. *et al.*, 1995).

Outro mecanismo desencadeado pelo parasito a fim de estabelecer a infecção está relacionado com as células NK (do inglês *natural killer*). Elas desempenham um papel importante, demonstrado em estudos com *Leishmania (Leishmania) major*, na produção de IFN- γ que atua direcionando uma resposta pró-inflamatória, levando a destruição parasitária (Scharton T. & Scott P., 1993). Entretanto, GP63 parece afetar a expressão de receptores da superfície de células NK e inibir sua a proliferação (Lieke T. *et al.*, 2008).

As NETs (do inglês, *neutrophil extracellular traps*) são formadas quando neutrófilos liberam seu DNA e conteúdo de grânulos na presença de um patógeno, sendo capazes de capturar e/ou destruir o mesmo (Guimaraes-Costa A. *et al.*, 2009). Várias espécies de *Leishmania* podem induzir a formação de NETs e serem destruídas por elas, entretanto, algumas espécies como *Leishmania donovani* não são destruídas pelas NETs, mas são apenas imobilizadas, favorecendo a sua internalização por fagócitos. A habilidade de sobreviver às NETs é conferida por lipofosfoglicano (LPG) (Gabriel C. *et al.*, 2010).

No microambiente do sítio de infecção estão presentes células como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas que podem fagocitar os parasitos. Uma vez que os parasitos tenham sido fagocitados, algumas espécies tendem a transformar o fagossoma em um vacúolo parasitóforo, que tem suas propriedades modificadas, como por exemplo, redução da capacidade de fusão às vesículas lisossomais e endossomais, que prejudicam a acidificação do fagossoma (Desjardins M. & Descoteaux A., 1997; Vinet A. *et al.*, 2009).

Outro mecanismo de escape realizado após a fagocitose, por algumas espécies de *Leishmania*, a fim de evadir a resposta imune adaptativa e favorecer a disseminação da infecção, é a inibição da apresentação cruzada, realizado pela clivagem da proteína de membrana associada a vesícula 8 (VAMP8) por GP63 (Matheoud D. *et al.*, 2013). Além

disso, GP63 é capaz de clivar o co-receptor de superfície CD4 nos linfócitos, essencial para ativação destas células (Hey A. *et al.*, 1994). Algumas espécies também modulam a expressão de CD40 gerando células T anérgicas que favorecem o desenvolvimento de células T regulatórias (Treg) que contém a inflamação e favorecem a infecção (Kaye P. *et al.*, 1994; Martin S. *et al.*, 2010).

Portanto, a determinação do desfecho da doença vai depender de uma série de características e habilidades do parasito, como as descritas até aqui, mas vai depender também de fatores que incluem a atuação do sistema imune do hospedeiro.

Está bem descrito que no modelo murino de infecção por *L. (L.) major*, o processo de cura da infecção envolve uma sequência de eventos, que incluem a produção de células TCD4⁺ diferenciadas no perfil Th1 através das citocinas IL-12, IL-18 e IL-27, com consequente produção de IFN- γ e TNF- α , levando a resolução da infecção e controle da replicação dos parasitos. A produção de células TCD4⁺ diferenciadas no perfil Th2 por sua vez, envolvendo a produção de IL-4 e IL-10 leva a falha no controle da carga parasitária e a lesões não resolvidas (Heinzel F. *et al.*, 1991; Scharton T. & Scott P., 1993; Tacchini-Cottier F. *et al.*, 2012) (Figura 1.4). Entretanto, a polarização dos perfis Th1/Th2 observada no que é atualmente considerado como paradigma da LC em modelos murinos de infecção por *L. major*, não é completamente aplicável às doenças humanas e a outros modelos (McMahon-Pratt D. & Alexander J., 2004).

Na LC, diferentes manifestações clínicas são observadas e estas ocorrem de acordo com os diferentes espectros imunológicos desenvolvidos pelo hospedeiro. Alguns indivíduos podem apresentar lesões únicas e de cura espontânea, enquanto outros variam entre extremos que caracterizam doenças graves (Scott P. & Novais F., 2016). Nos casos em que a doença é curada espontaneamente, ocorre um equilíbrio entre as respostas do tipo Th1 e Th2 e no conjunto das principais citocinas inflamatórias identificadas na LC estão: IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-22 e TNF- α , enquanto no conjunto das citocinas anti-inflamatórias estão: IL-6, IL-27, IL-10, IL-4, IL-13 e TGF- β (Maspi N. *et al.*, 2016).

Nos estudos em humanos as citocinas TNF- α e IFN- γ foram demonstradas em altos níveis nas lesões de pacientes com sinais típicos de LC (Ivonise F. *et al.*, 2002), e IL-15 em colaboração com IL-12 facilita a produção de IFN- γ e TNF- α por células T e NK (Fehniger T. & Caligiuri M, 2001). As citocinas IL-17 e IL-22 desempenham um papel complementar com as citocinas do perfil Th1 na proteção contra LC, e estudos em humanos demonstram que vacinas de *Leishmania* foram capazes de induzir elevados níveis dessas citocinas (Wu W. *et al.*, 2010, Banerjee A. *et al.*, 2016). Além disso, citocinas como IL-1 podem contribuir com a progressão da doença para formas mais graves com lesões exacerbadas por promover a

produção de TNF- α (Ikejima T. *et al.*, 1990). Uma resposta exacerbada de citocinas do perfil Th1 pode levar a doenças graves, como a forma mucosa da LC, caracterizada por altos níveis de IFN- γ , de células T citotóxicas, e consequente metástase de parasitos para a mucosa nasofaríngea, levando a lesões desfigurantes (Carvalho E. *et al.*, 1985). A citocina IL-10 apresenta um importante papel na regulação da inflamação e estudos com pacientes infectados com *L. braziliensis* demonstraram um perfil balanceado Th1/Th2 de resposta, com envolvimento de IL-10, inibindo uma resposta exacerbada que leva a danos teciduais (Salhi A. *et al.*, 2008). Em contrapartida, outro papel desta citocina está relacionado com a polarização ao perfil Th2, onde estudos com pacientes também infectados por *L. braziliensis* com lesões ativas, apresentaram elevada produção de IL-10, levando a persistência parasitária devido à supressão da resposta inflamatória (Salhi A. *et al.*, 2008). IL-13, uma citocina relacionada ao perfil anti-inflamatório, foi demonstrada em um estudo, como a citocina Th2 predominante em PBMC de pacientes infectados com *L. guyanensis*, enquanto que a ausência de IL-12 nas lesões desses pacientes indicou um papel crucial de IL-13 na susceptibilidade a LC causada por *L. guyanensis* (Bourreau E. *et al.*, 2001). TGF- β é também uma importante citocina, que tem propriedades imunossupressoras e funciona como um fator de crescimento, já tendo sido reportado que a sua adição *in vitro* em cultura de macrófagos humanos leva ao aumento da carga parasitária (Barral A. *et al.*, 1995). IL-2, também um importante fator de crescimento, já foi observado no soro de pacientes em altas concentrações comparado a indivíduos não infectados ou com infecção secundária (Espir T. *et al.*, 2014).

Os modelos C57BL/6, CBA E C3H/HE são utilizados nos estudos de LC e considerados como modelos murinos resistentes a infecção por *L. major*, enquanto que Balb/c é considerado como um modelo susceptível a essas infecções (Mattner F. *et al.*, 1996; Matthews D. *et al.*, 2000). Apesar disso, é importante considerar que estes são aspectos gerais a respeito destes modelos e resultados diferentes na caracterização destes como resistentes ou susceptíveis já foram demonstrados, como por exemplo, no caso da infecção de C57BL/6 por *L. amazonensis*, que mostrou susceptibilidade à infecção, com consequente amputação da pata e comprometimento da boca e do focinho (Cupolilo S. *et al.*, 2003). Ensaio experimentais com *L. braziliensis* em modelos murinos apresentam dificuldades no estabelecimento da infecção. Mesmo com o uso de inóculo com alta concentração de parasitos, diferentes linhagens destes modelos apresentam apenas pequenos edemas, enquanto outras não mostram nenhuma evidência de infecção (Childs G *et al.*, 1984). *L. braziliensis* se desenvolve melhor no modelo golden hamster (*Mesocricetus auratus*), que é considerado altamente susceptível a infecções por espécies do subgênero *Viannia*, sendo capaz de produzir lesões cutâneas similares as observadas em humanos (Gomes-Silva *et al.*, 2013). Além disso, o fato de serem

não-isogênicos auxilia em estudos de drogas e vacinas, por exemplo, quando é necessário avaliar os resultados clínicos individuais (Sinagra A. *et al.*, 2007; Da Silva-Couto L. *et al.*, 2015).

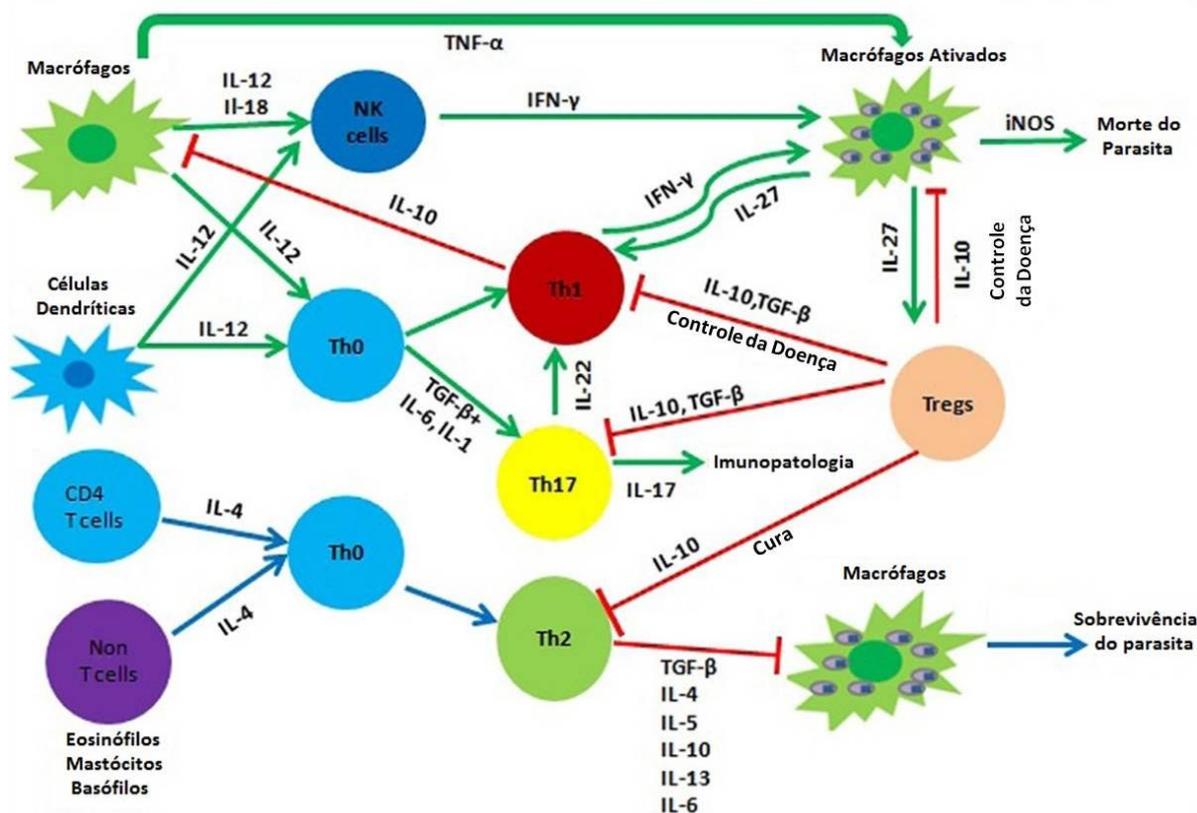


Figura 1.4: Vias imunológicas na leishmaniose cutânea.

As diferentes vias dependem da diferenciação das células TCD4⁺ nos subconjuntos Th1, Th2, Th17 e Treg. Após a entrada do parasito, macrófagos e células dendríticas são estimulados a produzirem citocinas inflamatórias como IL-12. Esta citocina por sua vez, promove a diferenciação ao perfil Th1 e estimula células NK a produzirem IFN- γ , que leva a ativação de macrófagos e morte de parasitos por produção de NO. Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 promovem a diferenciação ao perfil Th2, que inibe a atividade dos macrófagos e leva a sobrevivência do parasito. Uma produção exacerbada de citocinas inflamatórias, entretanto, resulta em uma imunopatologia grave, que pode levar a destruição tecidual. As citocinas TGF- β e IL-27 secretadas por macrófagos e células dendríticas estimulam as células Treg a produzirem IL-10, que atua reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios, levando ao equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, a fim de controlar a doença, eliminando os parasitos sem destruir os tecidos. (Adaptado de Maspi N. *et al.*, 2016).

1.4. As Espécies de *Leishmania* e a LTA

O gênero *Leishmania* é composto por três subgêneros. Inicialmente, Lainson e Shaw dividiram as espécies de *Leishmania* considerando a região que colonizavam do intestino de flebotomíneos (Lainson R. *et al.*, 1987). Mais tarde, entretanto, essa divisão pôde ser sustentada por análises filogenéticas baseadas em sequências de DNA, que permitiram a separação e discriminação das espécies infectantes de mamíferos que se conhecem, nos

subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. E ainda, o agrupamento no subgênero *Sauroleishmania* de espécies que parasitam répteis (Croan D. *et al.*, 1997; Noyes H. *et al.*, 2002).

A respeito dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são conhecidas cerca de 20 espécies patogênicas ao homem, das quais 14 são incriminadas como agentes etiológicos de LC em países do hemisfério ocidental (Lainson R., 2010). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é a denominação usada para as leishmanioses humanas que ocorrem no continente americano por espécies dermatrópicas. A LTA ocorre do México a Argentina, porém a grande concentração dos casos está América do Sul (PAHO, 2018).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2018) há sete espécies envolvidas nos casos de LTA, que são: *L. braziliensis*, a principal espécie envolvida com a doença, que apresenta ampla distribuição no país e foi a primeira incriminada como agente etiológico da LTA; *L. amazonensis*, que já foi observada em áreas das florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), além do Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná); *L. guyanensis*, distribuída quase que exclusivamente na região Norte; *L. lainsoni*, já identificada no Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima e Acre; *L. lindenbergi*, identificada no Pará, *L. shawi*, identificada no Pará e Maranhão e *L. naiffi*, descrita nos estados do Pará, Amazonas e Mato Grosso (de Brito M. *et al.*, 2012; Ministério da Saúde, 2018).

Diversas manifestações clínicas já foram observadas na LTA (Figura 1.5) e para tanto, vários autores propuseram classificações, das quais não é considerado que exista apenas uma ideal. Apesar disso, uma interessante classificação baseada nos aspectos clínicos e evolutivos da doença foi proposta em 1994. Nela, a LTA foi dividida em cinco grupos (Marzochi M. & Marzochi K., 1994), descritos a seguir:

(1) Grupo Subclínico ou Leishmaniose Cutânea Inaparente (LCI): caracterizado pela ausência de lesão cutânea, seja ela ativa ou curada;

(2) Grupo Cutâneo ou Leishmaniose Cutânea (LC), subdividido em:

- Forma Cutânea Localizada: lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente ulceradas e próximas ao sítio de inoculação. Pode ocorrer cura espontânea;

- Forma Cutânea Disseminada: lesões cutâneas pequenas e múltiplas, distantes do sítio de inoculação e geralmente ulceradas;

- Forma Cutânea Difusa: lesões cutâneas múltiplas nodulares e/ou papulosas, distantes do sítio de inoculação;

(3) Grupo Mucoso ou Leishmaniose Mucosa (LM): subdividido em:

- Forma Mucosa Tardia: lesões em região de mucosa, geralmente múltiplas, que se originam após cura espontânea ou terapêutica de lesões cutânea;

- Forma Mucosa Isolada ou Indeterminada ou de Origem Indeterminada: lesões em região de mucosa e ausência de cicatrizes de lesões cutânea ou lesões cutâneas ativas;

- Forma Mucosa Primária: lesões únicas em região de mucosa ocasionadas pela picada do inseto vetor na região. Geralmente ausente de cicatrizes de lesões cutâneas anteriores ou lesões cutâneas ativas;

(4) Grupo Misto ou Leishmaniose Mucocutânea Associada (LMC): subdividido em:

- Forma Mucocutânea Concomitante: lesões cutâneas e em região de mucosa, presentes ao mesmo tempo;

- Forma Mucocutânea Contígua: lesão em região de mucosa que ocorre em continuidade a uma lesão cutânea anterior cicatrizada ou ativa em região adjacente;

(5) Grupo Linfático ou Leishmaniose Glandular (LG): caracterizado por linfadenopatia local ou linfagite nodular, ocorrendo isoladamente ou em associação a lesões cutâneas.

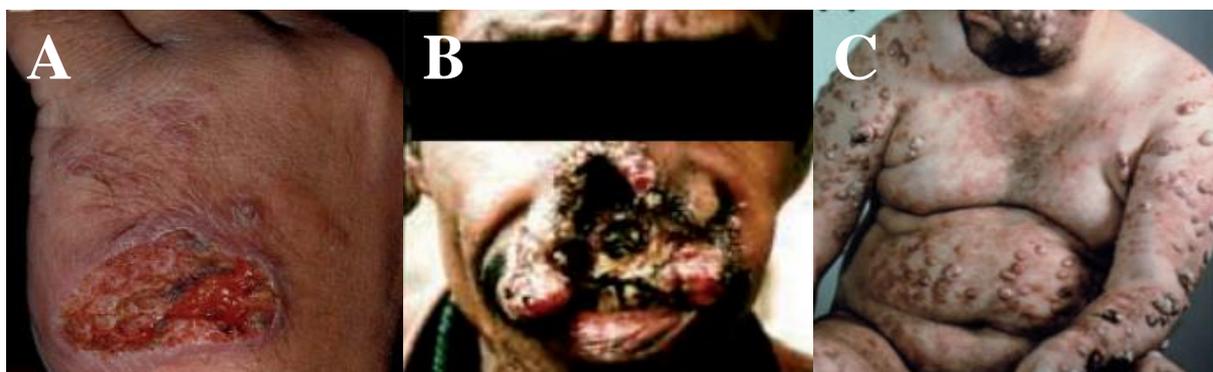


Figura 1.5: Exemplos de manifestações clínicas de LTA.

A: Forma cutânea localizada na mão; B: Forma mucosa na região da boca e do nariz; C: Forma cutânea difusa presente em diversas regiões do corpo. Fonte: adaptado de Mcgwire B. & Satoskar A., 2014

As respostas imunológicas envolvidas nas formas clínicas de LTA variam entre si. Na LC localizada, a resposta em humanos tem sido associada com uma resposta imune intensa, que varia desde uma resposta do tipo Th1 predominante até uma resposta mista Th1 e Th2 (Castellano, L. *et al.*, 2009; Oliveira, W. *et al.*, 2014). O grupo subclínico é caracterizado por apresentar uma resposta do tipo Th1, porém, menos intensa do que a resposta apresentada por pacientes com a doença ativa. Células mononucleadas de sangue periférico (PBMCs) de pacientes do grupo subclínico apresentaram quando re-estimuladas com antígenos de *Leishmania* baixos níveis de IFN- γ e TNF- α e níveis altos de IL-10 (Bittar, R. *et al.*, 2007). Em pacientes com LC disseminada, os linfócitos de sangue periférico produzem baixos níveis de citocinas Th1 (Melby P. *et al.*, 1994; Peacock C. *et al.*, 2007; Oliveira, F. *et al.*, 2011), entretanto, no sítio das lesões, a resposta Th1 é intensa como a apresentada nos casos de LC localizada (Machado, P. *et al.*, 2011). No espectro dessas repostas há extremos que apresentam respostas mais severas, porém, completamente distintas (Figura 1.6). Um desses

extremos corresponde às formas LM e LMC, nas quais em PBMCs estimulados com antígeno de *Leishmania* é observado intensa produção de citocinas do perfil Th1, como IFN- γ e TNF- α e diminuída produção de IL-10, comparado as demais formas de LC (Bacellar O. *et al.*, 2002). Nas lesões há alta expressão de IL-17 (Bacellar O. *et al.*, 2009), reduzida expressão do receptor de IL-10 (Faria D. *et al.*, 2005) e baixa carga de parasitos detectável (Ridley, D. *et al.*, 1989), e, na circulação, os pacientes apresentam alta porcentagem de células T CD4⁺ expressando IFN- γ e TNF- α (Gaze, S. *et al.*, 2006). O outro extremo corresponde a LC difusa, caracterizada por uma resposta imune celular anérgica. As lesões, que não são ulceradas, apresentam intensa multiplicação de amastigotas e significativa redução de células produzindo IFN- γ , iNOS e IL-12 (Diaz N. *et al.*, 2006).

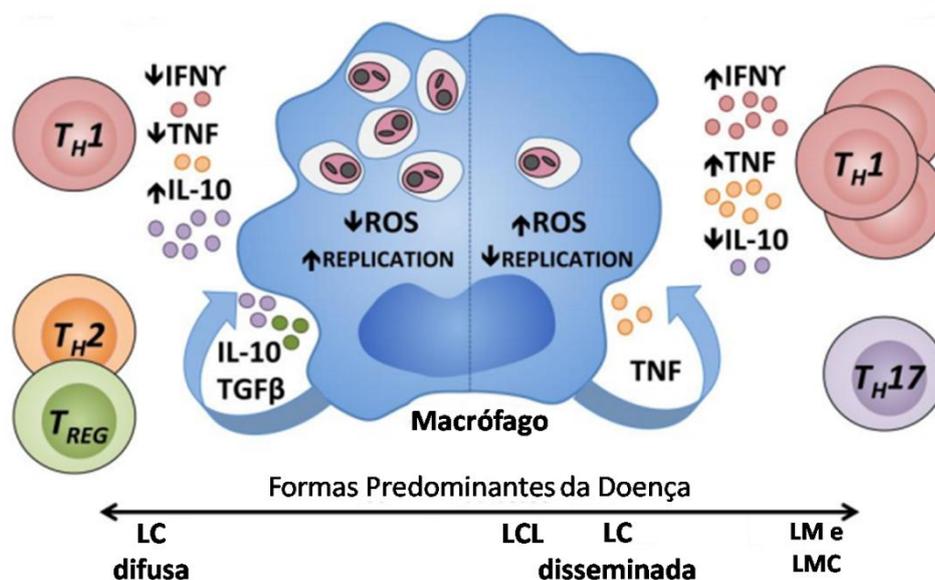


Figura 1.6: Regulação imunológica em diferentes formas de LTA.

Macrófagos parasitados por *Leishmania* são regulados por citocinas presentes no microambiente do sítio de infecção. Em um ambiente regulatório (à esquerda) há baixos níveis de citocinas Th1. Citocinas Th2, IL-10, TGF- β antagonizam os efeitos de IFN- γ e TNF- α , resultando na proliferação dos parasitos, como no caso do extremo relacionado à forma LC difusa. Citocinas do perfil Th1 (à direita) podem induzir a produção de ROS, levando a inibição da replicação dos parasitos. No extremo relacionado às formas LM e LMC ocorre aumento de células Th17, intensa produção de citocinas do perfil Th1, que leva à destruição do parasito e à destruição tecidual (Adaptado de Scorza B. *et al.*, 2017).

De acordo com os dados apresentados pela Organização Pan Americana de Saúde, a maioria dos casos novos identificados, ocorridos em 2016, foram de leishmaniose cutânea e mucosa, que totalizaram 12.690, sendo 27,2% em mulheres e 72,8% em homens, dos quais 56,8% destes eram homens com menos de 20 anos de idade. Além disso, 6,8% dos casos ocorreram em crianças (PAHO, 2018).

A variedade de manifestações clínicas pode ocorrer por diferentes espécies de *Leishmania*, que determinam distintos perfis de resposta imune e histopatológica. Em 2000, de Souza e colaboradores, utilizando o modelo de camundongo CBA, demonstraram que esses animais ao serem infectados por *L. major*, apresentavam um perfil de resistência e

controle à infecção, com a presença de células inflamatórias e formação de granuloma na área de lesão, além da produção de citocinas como IFN- γ , enquanto que, quando eram infectados por *L. amazonensis*, apresentavam um perfil de susceptibilidade à infecção, com macrófagos altamente parasitados e produção de citocinas como IL-4 (de Souza V. *et al.*, 2000).

O perfil antigênico e o perfil de infectividade também variam entre espécies de *Leishmania*. Diferenças relacionadas a essas características foram vistas entre espécies incriminadas como responsáveis por LTA. Em um estudo que utilizou as espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, e *L. naiffi* foi demonstrado, em ensaios imunoenzimáticos, que os antígenos de *L. naiffi* foram os mais frequentemente reconhecidos pelo soro de pacientes infectados com *Leishmania* sp. Em ensaios *in vitro* do mesmo estudo, utilizando macrófagos peritoneais de camundongo todas as espécies avaliadas foram capazes de infectar as células, entretanto, apenas *L. amazonensis* foi capaz de se reproduzir. Além disso, *L. naiffi* foi a espécie que apresentou o maior tempo de sobrevivência em macrófagos (Matta N. *et al.*, 2010). Outro trabalho que demonstra a variabilidade no perfil de infectividade utilizou as espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi*, todas provenientes de lesões cutâneas, para infectar macrófagos peritonias. O índice de infecção, avaliado pela quantidade de macrófagos infectados e a quantidade de amastigostas por macrófago, foi diferente entre as espécies, tendo sido apresentado por *L. braziliensis* o maior e por *L. (V.) naiffi* o menor índice de infecção (Campos M. *et al.*, 2008).

Outro aspecto importante relacionado às espécies responsáveis por LTA é o compartilhamento de vetores e reservatórios, como acontece, por exemplo, no caso de *Nyssomyia whitmani*, que é um importante vetor, de *L. braziliensis* e de *L. shawi* (Rebêlo J. *et al.*, 2000). Além disso, eventos de simpatria também ocorrem entre as espécies responsáveis por LTA. Um estudo apresentou uma série de 50 casos provenientes de sete municípios do Acre, em que foi confirmada a circulação de *L. lainsoni*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (da Silva A. *et al.*, 2006). E, na região amazônica, ocorre a circulação das sete espécies envolvidas nos casos de LTA no Brasil (Reis S. & Franco A., 2010).

Considerando, portanto, dentre as espécies de LTA circulantes no Brasil, as distintas manifestações clínicas que podem ser desenvolvidas, a influência no desenvolvimento de distintos perfis de resposta imune e a apresentação de distintos perfis antigênicos e de infectividade, *L. braziliensis* e *L. naiffi* aparecem como espécies que apresentam características muito distintas entre si.

As infecções pela espécie *L. braziliensis* estão associadas com casos de LC localizada, LC disseminada (Costa J. *et al.*, 1986) e outras formas graves, como a forma mucosa, na qual é a espécie associada mais frequentemente (Guerra J. *et al.*, 2011). Essa espécie de

Leishmania também tem sido identificada em casos atípicos da doença como, lesões verrugosas e nodulares múltiplas em área específica do corpo (Guimarães L. et al., 2009). Também já foi associada às lesões cutâneas grandes em grávidas, apresentando inclusive potencial risco de complicações para o feto (Morgan D. et al., 2007). Além disso, diversos estudos têm mostrado que a eficácia do tratamento em pacientes infectados por *L. braziliensis* varia de acordo com a forma clínica da doença (Murray J. et al., 2005; Guimarães L. et al., 2009), e que as formas LC disseminada e LCM apresentam grande proporção de má resposta ao tratamento (Machado P. et al., 2007; Machado P. et al., 2015).

A espécie *L. naiffi* é associada aos casos benignos da doença. Em geral, os pacientes apresentam lesões únicas, pequenas, de cura espontânea ou boa resposta terapêutica (Naiffi et al., 1991; van der Snoek et al. 2009; Figueira L., 2017) e até então, nenhum caso de LM foi associado à *L. naiffi*. A resposta imune em humanos tem sido associada com altos níveis de TNF- α e IL-4 (Espir T. et al., 2014), mostrando um balanço entre os perfis Th1 e Th2. Estudos mostraram sua associação com persistência parasitária (Matta N. et al., 2010) e baixo índice de infecção (Campos M. et al., 2008), além de já ter sido apontada por possuir características relevantes para utilização como fonte de antígenos em estudos para diagnóstico e vacinas (Matta N. et al., 2010).

Portanto, de acordo com as características de *L. naiffi*, um parasito persistente e benigno, é possível imaginar se estas características não poderiam influenciar, alterando o curso de uma infecção quando associada à outra espécie.

1.5. Infecções Mistas por Espécie de *Leishmania*

Casos de infecções por mais de uma espécie de *Leishmania* não são frequentemente reportados e é possível que a dificuldade de se detectar esses eventos, devido à carência de métodos de diagnóstico práticos e eficientes para casos dessa natureza, contribua para que o mesmo pareça pouco frequente. Entretanto, alguns eventos desse tipo já foram demonstrados.

Em 2016, Rafizadeh S. e colaboradores identificaram no nordeste do Irã a presença das espécies *L. major* e *L. turanica* em *Phlebotomus papatasi*. Esse flebotomíneo, que é considerado como o principal vetor da região, era considerado como um vetor restrito da espécie *L. major*, sendo capaz de suportar apenas o desenvolvimento desta espécie (Dobson D. et al., 2010). Entretanto, por meio de técnicas moleculares, como PCR-RFLP, nested-PCR e sequenciamento foi possível identificar a ocorrência da infecção mista (Rafizadeh S. et al., 2016).

Além de flebotomínios, casos de infecções mistas também foram demonstrados em hospedeiros domésticos e silvestres. Em 2006, no Rio de Janeiro, foi registrado o caso de um cão naturalmente infectado pelas espécies *L. braziliensis* e *L. chagasi* (considerada sinonímia de *L. infantum*), identificadas por análise de PCR seguido de hibridização molecular (Madeira M. *et al.*, 2006). Também, em um estudo realizado em área urbana endêmica de Belo Horizonte, foi demonstrada infecção mista em três cavalos (*Equus caballus*) pelas espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* (principais espécies responsáveis por LC e LV no Brasil respectivamente), utilizando a técnica de PCR (Soares I. *et al.*, 2013). Em outro caso, que ocorreu novamente em área urbana endêmica de Belo Horizonte e envolvendo as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum*, foi identificada infecção mista em roedores *M. musculus* e *R. rattus* por nested-PCR e sequenciamento (Ferreira E. *et al.*, 2015). A identificação de casos de infecção mista, seja em cães, em roedores que vivem próximo a moradias em situação precária ou em equinos que podem estar em contato com o homem, podem ter implicações relevantes relacionadas ao controle da doença em áreas urbanas.

Em humanos, infecções concomitantes também foram identificadas. Em 1984 foi registrado o primeiro caso de infecção humana mista por espécies de *Leishmania*. O caso ocorreu na Amazônia e as espécies envolvidas foram *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, que foram isoladas de lesões distintas presentes no mesmo paciente. A determinação das espécies incluiu observações de comportamento e desenvolvimento em modelos animais e *in vitro*, e eletroforese de isoenzimas (Silveira F. *et al.*, 1984). Outro caso de infecção mista ocorreu com um paciente queniano que residia em área com registro das espécies *L. donovani* e *L. major*. Aspirados de linfonodo foram coletados deste paciente em dois momentos distintos e em ambos foi feita a caracterização das espécies por isoenzimas, que revelou infecção mista por *L. donovani* e *L. major* (Mebrahtu Y. *et al.*, 1991). Em um caso na Bolívia de paciente apresentando LC difusa, foi realizada identificação isoenzimática e foi constatada a existência de coinfeção pelas espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* presentes na mesma lesão (Martinez E. *et al.*, 2002). Já em 2003, na Bolívia, um estudo realizado com 28 pacientes com LC ativa e um com LV, buscou identificar a presença de espécies pertencentes aos complexos *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. mexicana* em amostras de sangue e lesão utilizando *probes* específicas para hibridização em PCR, e o perfil isoenzimático. Dos pacientes avaliados, 27,6% (8) apresentaram infecção mista por espécies dos diferentes complexos avaliados (Bastrenda B. *et al.*, 2003). Em 2012, foi reportado o primeiro caso de LM envolvendo coinfeção, que ocorreu em um paciente iraniano, apresentando lesões orais e nasais. Foi realizado PCR e imunohistoquímica a partir do material das lesões e os resultados demonstraram a presença de *L. tropica* e *L. major* nas lesões orais e nasais, respectivamente.

É importante ressaltar que essas espécies não são associadas com a forma mucosa da doença, entretanto, neste caso de coinfeção houve o desenvolvimento dessa manifestação clínica (Shirian S. *et al.*, 2012). Em 2013, mais um caso de infecção mista em humano foi reportado, quando um paciente peruano apresentou coinfeção por *L. braziliensis* e *L. lainsoni* identificadas por PCR-RFLP (Veland N. *et al.*, 2013).

Já foi demonstrado também que infecções mistas podem influenciar na resposta terapêutica. Antoniou M. e colaboradores apresentaram o relato do caso de um paciente com LV que apresentou falha ao tratamento. Foi verificado que o paciente estava infectado por mais de uma cepa de *L. infantum*, sendo uma delas pertencente ao zimodema MON-1, que é comum na região do Mediterrâneo, onde o caso ocorreu e que geralmente é susceptível ao tratamento e a outra cepa, pertencente ao zimodema MON-98, que é raro e não havia antes sido reportada na região. As cepas exibiram diferentes comportamentos e mostraram diferentes sensibilidades *in vitro* e *in vivo* (Antoniou M *et al.*, 2004). Considerando os diferentes perfis de susceptibilidade das espécies de *Leishmania* com relação aos fármacos, é possível que o que foi visto neste estudo também ocorra em infecções mistas entre espécies. Além disso, o desenvolvimento de lesões atípicas, como sinal de disseminação cutânea da leishmaniose visceral, foi observado em um paciente HIV positivo que apresentou infecção simultânea por *L. infantum* e *L. donovani* (Santos-Oliveira J. *et al.*, 2011).

Infecções mistas experimentais, realizadas entre *L. turanica* e *L. major* em flebotomíneos *P. papatasi*, mostraram que ambas as espécies podem co-existir no vetor, apresentando por vezes maior prevalência de uma ou outra (Chajbullinova A. *et al.*, 2012). A manutenção de mais de uma espécie em um vetor, portanto, pode levar a competição entre elas e esta competição por sua vez, pode vir a afetar a transmissão de uma das espécies. Mesmo considerando eventos de competição entre espécies de *Leishmania* em flebotomíneos, casos de infecção mista não necessariamente deixam de ocorrer, uma vez que muitas espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes espécies de flebotomíneos, como é o caso das espécies *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. naiffi*, que na região Amazônica são transmitidas pelos diferentes vetores: *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis* e *L. squamiventris*, respectivamente.

Em outro caso de infecção mista, foi visto que pode haver alteração na dinâmica de transmissão de determinada espécie em casos de coinfeção. *L. major* e *L. turanica* individualmente se mantêm na pele de gerbil (*Rhombomys opimus*), seu hospedeiro natural, por até seis meses. Entretanto, em casos de infecção mista entre essas espécies, a persistência pode chegar até 18 meses, favorecendo assim a manutenção de *L. major* de uma estação de transmissão até a próxima (Strelkova M. *et al.*, 2001).

Abdullah S. e colaboradores, em 1998, também em estudo de infecções mistas experimentais mostraram que a adição de uma segunda espécie a uma cultura de monócitos humanos U-937, previamente infectados com uma espécie que *Leishmania*, não exclui a permanência da segunda espécie de *Leishmania* infectada 3 horas após a primeira. Indicando que momentos distintos de infecção não impedem o estabelecimento de uma coinfeção (Abdullah S. *et al.*, 1998).

E ainda, um estudo recente de co-infecções experimentais, utilizando o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*) infectado com *L. amazonensis* e *L. infantum*, mostrou por meio de análises clínicas, histopatológicas e imunológicas que as infecções mistas estão associadas a manifestações clínicas mais severas que as infecções únicas pelas mesmas espécies (Celeste J. *et al.*, 2017).

Portanto, infecções mistas por espécies de *Leishmania* estão presentes na natureza nos vetores, reservatórios e em humanos, e as co-infecções experimentais tem contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nessas interações. Dessa forma, o estudo das infecções mistas, pode elucidar aspectos clínicos e epidemiológicos de importância e fatores parasito-específicos que levam ao agravamento ou melhora das infecções. A compreensão a respeito de infecções mistas com espécies que apresentam características distintas entre si, como *L. braziliensis* e *L. naiffi*, que inclusive já ocorreram na natureza em associação (Coelho L. *et al.*, 2011), pode auxiliar na compreensão dos eventos desencadeados e nas alterações por eles geradas durante uma coinfeção.

2. **OBJETIVOS**

2.1. **Objetivo Geral**

Comparar o perfil imunopatológico de infecções mistas por *L. braziliensis* e *L. naiffi* em modelo experimental de Hamster Dourado (*Mesocricetus auratus*) com infecções únicas causadas pelas mesmas espécies.

2.2. **Objetivos Específicos**

- Detectar e analisar mudanças na susceptibilidade, virulência e progresso da doença, em modelo experimental de Hamster Dourado, após infecções únicas e mistas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) naiffi*.
- Caracterizar molecularmente os parasitos envolvidos na infecção, bem como a presença de uma ou ambas as espécies na infecção mista, através de ensaio de isoenzimas para os sistemas enzimáticos 6PGDH e G6PDH, bem como por *hsp70* PCR-RFLP.
- Estimar a magnitude e qualidade do infiltrado inflamatório celular das biópsias de lesão de animais infectados experimentalmente por meio de análises histopatológicas.
- Avaliar a carga parasitária e a resposta imune celular de Hamster Dourado comparando as infecções mistas com infecções únicas através de *real-time* PCR e RT PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Machos de Hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) do IOC/Fiocruz, com idade entre 3 a 5 semanas foram utilizados nos ensaios *in vivo* (CEUA: LW – 14/13).

3.2. Cepas de *Leishmania*

Fornecidas pela coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC – <http://clioc.fiocruz.br>), as cepas utilizadas foram: MHOM/BR/2011/S89 e MHOM/BR/2011/S50, que correspondem respectivamente a *L. braziliensis* e *L. naiffi* e são provenientes de uma mesma região endêmica do estado Pará. As mesmas foram retiradas da criopreservação e mantidas em meio de cultura bifásico NNN + Schneider suplementado (20% SFB, 2% urina, 10.000 U/mL de Penicilina e 10mg/mL de Estreptomicina- Sigma) por até a quinta passagem. Em seguida, para a recuperação da infectividade, as promastigotas foram expandidas em garrafas com 4,5mL de meio Schneider suplementado e 0,5ml da cultura de promastigotas referente ao último tubo utilizado, centrifugadas (4000 rpm/ 4°C/ 10 minutos) e lavadas em solução de PBS 1X (*phosphate-buffered saline*) estéril. Os parasitos foram contados em câmaras de Neubauer e então 5×10^6 parasitos foram inoculados em um volume de 50µl na pata direta de hamsters. Após um período de 2 semanas, no qual foi identificado o desenvolvimento de lesão, os animais foram eutanasiados e a área de lesão gerada foi coletada. Este fragmento foi mantido em meio de cultura bifásico NNN-Schneider a fim de re-isolar os parasitos, que após serem obtidos foram mantidos por até 2 passagens em meio e cultura e então inoculados experimentalmente.

3.3. Infecções Experimentais com *Leishmania* spp.

Formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. naiffi*, foram utilizadas em três ensaios de infecção realizados em momentos distintos. Todos os ensaios foram compostos por 4 grupos de animais experimentalmente infectados, que foram: *Lb* (infecção única com inóculo de 5×10^6 parasitos de *L. braziliensis*), *Ln* (infecção única com inóculo de 5×10^6 parasitos de *L. naiffi*), $\frac{1}{2}Lb$ (infecção única com inóculo de $2,5 \times 10^6$ parasitos de *L. braziliensis*) e Mista (infecção mista por *L. naiffi* e *L. braziliensis* com inóculo de $2,5 \times 10^6$ parasitos de cada espécie) (Figura 3.1).

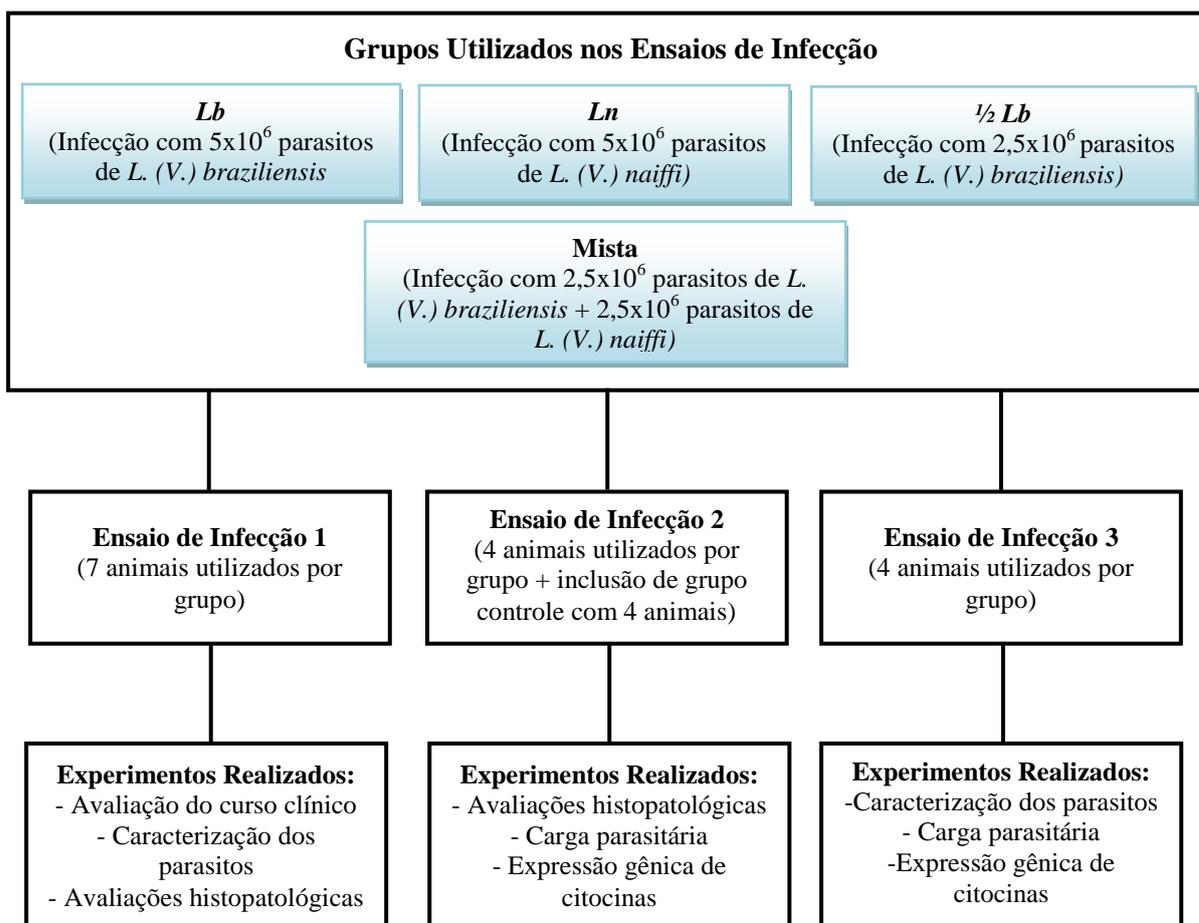


Figura 3.1: Desenho experimental do presente estudo.

No primeiro ensaio cada grupo foi composto por sete animais e nos dois ensaios seguintes os grupos foram compostos por 4 animais cada. No segundo ensaio realizado foi incluído um grupo controle composto por 4 animais. A infecção ocorreu na região dorsal da pata traseira direita e ao final de 10 semanas, os animais foram eutanasiados, tendo sido coletada a área de lesão da pata, o linfonodo poplíteo referente à perna direita traseira e o baço de todos os animais.

3.4. Evolução Clínica de Infecções Únicas e Mistas nos Animais Experimentalmente Infectados

Os animais foram monitorados semanalmente ao longo de 10 semanas. Nesse período, os animais referentes ao ensaio de infecção 1 (total de 28 animais) tiveram suas lesões fotografadas, para registro, e medidas por paquímetros digitais, para avaliação do edema da pata infectada em relação à pata não infectada, e da área da lesão. As medidas obtidas foram utilizadas para analisar a evolução das lesões ao longo das semanas de infecção. Para isso,

foram feitas análises estatísticas usando o programa GraphPad Prism (versão 5.1), com análise por Two-way ANOVA, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.5. Detecção e Caracterização dos Parasitos em Fragmentos de Tecidos das Lesões dos Animais Infectados

Ao final das 10 semanas, período de acompanhamento dos animais, biópsias foram coletadas da área de lesão de todos os 28 animais do ensaio de infecção 1 e de todos os 16 animais do ensaio de infecção 3 e seguiram para distintas análises de caracterização dos parasitos presentes no tecido.

3.5.1. *hsp70* PCR-RFLP

DNA total foi extraído a partir da biópsia utilizando *Qiagen DNeasy kit*. Em seguida, utilizando o *primer* P4 (234pb), desenhado para amplificar um fragmento do gene *hsp70* de *Leishmania*, uma PCR foi realizada. O produto desta reação, em seguida, foi digerido utilizando a enzima de restrição *BstUI*, com o objetivo de identificar as espécies de *Leishmania* presentes nas infecções mistas. Como descrito anteriormente (da Graça et al., 2012), esse protocolo é capaz de identificar *L. naiffi* e *L. braziliensis*, gerando padrões de RFLP distintos.

3.5.2. Ensaio de Isoenzimas

As biópsias foram colocadas em tubos de vidro contendo meio de cultura NNN e Schneider (20% SFB + 2% urina). Logo após o isolamento e multiplicação dos parasitos, foram preparadas massas de isoenzimas através de etapas de centrifugação e adição de tampão de lavagem (0,85% de NaCl e 0,01M de EDTA). Os extratos de parasitos preparados foram mantidos em nitrogênio líquido até a hora de serem submetidos a eletroforese para os ensaios enzimáticos. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% usando soluções-tampão específicas para as enzimas ensaiadas: 6PGDH (6-fosfogliconato desidrogenase) e G6PDH (Glicose-6-fosfato desidrogenase), eficientes para identificação das espécies de *Leishmania* utilizadas nesse estudo (Cupolillo et al 1994). Todas as etapas necessárias para o ensaio enzimático seguiram protocolos operacionais padrão (POP) utilizado na Coleção de *Leishmania* da Fiocruz (CLIOC).

3.6. Análises Histopatológicas

Fragmentos coletados da área de lesão de cada animal foram mantidos em solução de formalina tamponada 10%, em seguida emblocados em parafina e fixados em lâminas. Posteriormente foi realizada a coloração por HE (Hematoxilina-Eosina) e as amostras foram analisadas em microscópio óptico em diferentes aumentos.

Para este ensaio foram utilizados animais referentes aos ensaios de infecção 1 e 2. Entretanto nem todos os animais do ensaio 1 puderam ser utilizados devido a problemas com a coloração de HE em algumas lâminas. Dessa forma, o somatório de animais dos ensaios de infecção 1 e 2, que foram utilizados por grupo foi: 9 animais do grupo *Ln*, 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 10 animais do grupo *Lb* e 8 animais do grupo Mista.

3.6.1. Escore Histopatológico

Nesta análise, características inflamatórias observadas nos fragmentos de lesão foram avaliadas em cada animal. Essas características foram: infiltrado inflamatório, células vacuoladas, necrose, fibrose e corpúsculos de Schaumann. Cada uma dessas características foi classificada quanto à ausência ou intensidade da presença, representado como: ausente (0 ponto), discreta (1 ponto), média (2 pontos) e intensa (3 pontos), adaptado do que foi proposto por Xiao-qiang Yang e colaboradores em 2013. Cada animal, portanto, recebeu uma pontuação referente ao somatório dos pontos obtidos para cada característica.

As análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism (versão 5.1), com análise paramétrica por One-way ANOVA e pós teste por Bonferroni, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.6.2. Análise Semi-Quantitativa de Amastigotas nas Lesões

Para cada animal, 20 campos aleatórios de áreas de infiltrado inflamatório da lesão foram avaliados, a fim de identificar a possível presença de amastigotas nos mesmos. A contagem foi realizada por microscopia óptica, com campo de imersão para aumento de 1000x e foram considerados como campos positivos aqueles em que no mínimo uma amastigota foi visualizada. O somatório final dos campos positivos para amastigotas foi expresso em porcentagem.

As análises estatísticas foram realizadas pelo GraphPad Prism (versão 5.1), com análise não-paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste por Dunn, onde $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3.7. Carga Parasitária por PCR em Tempo Real

Foi determinada a carga parasitária de amostras de linfonodo poplíteo e área de lesão. Animais dos ensaios de infecção 2 e 3 foram utilizados, contudo, problemas no processo de extração impediu a utilização de todos os 32 animais correspondentes a esses ensaios. Para a determinação da carga parasitária da área de lesão foi utilizado um total de 27 animais, que correspondem a: 7 animais do grupo *Ln*, 7 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 7 animais do grupo *Lb* e 6 animais do grupo Mista. E, para a determinação da carga parasitária do linfonodo poplíteo foi utilizado um total de 25 animais, que correspondem a: 6 animais do grupo *Ln*, 5 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 7 animais do grupo *Lb* e 7 animais do grupo Mista.

Logo após a coleta, as amostras foram colocadas em solução de RNAi lter e mantidas em freezer -80°C, a fim de preservar a qualidade do material genético. Em seguida, foi realizada a extração do DNA seguindo protocolo do Trizol. A partir do DNA obtido, foi realizada a avaliação da carga parasitária total, utilizando a técnica de PCR em tempo real. Para tanto, 2,0µl de DNA (25ng/µl) foram usados em um volume final de reação de 15µl contendo 500nM dos *primers forward* e *reverse* *ssrRNA* (para um gene de expressão constitutiva do parasito) ou 100nM dos *primers forward* e *reverse* *GAPDH* (para um gene de expressão constitutiva do hospedeiro). As sequências dos *primers* utilizados constam na Tabela 3.1.

Foram produzidas 4 curvas de diluição 1:10 para a produção de curva padrão referente ao *primer ssrRNA* de *Leishmania* e 3 curvas de diluição 1:10 para a produção da curva padrão referente ao *primer GAPDH* de Hamster, ambas expressas em número de células. Cada curva foi composta por no mínimo 5 pontos de diluição.

Nesta etapa, foi levado em consideração que duas espécies distintas de *Leishmania* foram utilizadas no experimento. Dessa forma, curvas padrão para cada uma das espécies, individualmente foram produzidas. Os valores obtidos em cada uma das curvas foram utilizados para análise da expressão do CT de suas respectivas espécies. Com relação aos animais que sofreram infecção mista, a quantificação destes foi realizada utilizando uma curva padrão obtida através das médias das curvas padrão de *L. braziliensis* e *L. naiffi*.

As reações de amplificação foram realizadas na máquina de PCR em tempo real *ViiA 7* (Applied Biosystems), em placas de 384 poços, com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação das fitas a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 75°C por 30 segundos. A curva de *melt* seguiu as seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

Tabela 3.1: Sequência dos *primers* utilizados na avaliação da carga parasitária

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
ssrRNA	<i>Forward:</i> 5' – TAC TGG GGC GTC AGA G- 3' <i>Reverse:</i> 5' – GGG TGT CAT CGT TTG C- 3'	Prina E. <i>et al.</i> , 2007
GAPDH	<i>Forward:</i> 5' – GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG - 3' <i>Reverse:</i> 5' – TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG - 3'	Ribeiro-Romão R. <i>et al.</i> , 2014

3.8. Expressão Gênica de Citocinas

A expressão gênica de citocinas foi quantificada usando as mesmas amostras utilizadas para determinação da carga parasitária (referente aos animais dos ensaios de infecção 2 e 3), uma vez que o protocolo de extração por Trizol produz uma separação em duas fases: orgânica (utilizada para extração do DNA) e aquosa incolor, que foi utilizada para a extração do RNA.

Entretanto, baixa concentração de RNA foi obtida em muitas amostras, impossibilitando a utilização das mesmas. Para a quantificação da expressão gênica da área de lesão foi utilizado um total de 17 animais, que correspondem a: 3 animais do grupo controle, 4 animais do grupo *Ln*, 3 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 3 animais do grupo *Lb* e 4 animais do grupo Mista. E, na quantificação da expressão gênica do linfonodo poplíteo foi utilizado um total de 14 animais, que correspondem a: 3 animais do grupo *Ln*, 4 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 4 animais do grupo *Lb* e 3 animais do grupo Mista, não tendo sido possível a obtenção de RNA de nenhum animal do grupo controle.

Após a obtenção da molécula de RNA, de acordo com o protocolo citado, foi realizado um tratamento com DNase a fim de evitar possíveis contaminações com DNA que tenham ocorrido durante o processo de extração, e em seguida foi feita a síntese da molécula de cDNA, utilizando *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*. A reação de transcrição reversa da molécula de RNA em cDNA foi composta por 10µl de 2x RT Master Mix (*buffer*, dNTPs, *random primers*, transcriptase reversa e água) e 10µl do RNA extraído.

A partir do cDNA obtido, foi realizado a quantificação da expressão de citocinas inflamatórias e de genes constitutivos utilizando a técnica de PCR em tempo real. Para tanto, 1µl de cDNA (100ng/µl) foi utilizado em um volume final de reação de 10µl. Foram utilizados para avaliar a expressão de genes constitutivos: 300nM dos *primers forward* e *reverse* GAPDH e, 100nM do *primer forward* e 300nM do *primer reverse* β-actina. Para

avaliar a expressão gênica de citocinas, foram utilizados: 400nM dos *primers forward* e *reverse* IL-10, TNF- α e IL-4, e, 400nM do *primer forward* e 100nM do *primer reverse* IFN- γ . As sequências dos primers utilizados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 3.2: Sequência dos primers utilizados na avaliação da expressão gênica de citocinas.

<i>Primer</i>	Sequência	Referência
β -actina	<i>Forward:</i> 5' – TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT ACA- 3' <i>Reverse:</i> 5' – ACA GCA CTG TGT TGG CAT AGA GGT 3'	Este estudo
GAPDH	<i>Forward:</i> 5' – GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG 3' <i>Reverse:</i> 5' – TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG - 3'	Ribeiro-Romão R. <i>et al.</i> , 2014
IFN- γ	<i>Forward:</i> 5' – TGT TGC TCT GCC TCA CTC AGG - 3' <i>Reverse:</i> 5' – AAG ACG AGG TCC CCT CCA TTC - 3'	Espitia C. <i>et al.</i> , 2010
IL-4	<i>Forward:</i> 5'- CCA CGG AGA AAG ACC TCA TCT G- 3' <i>Reverse:</i> 5'- GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT AA- 3'	Zivcec M. <i>et al.</i> , 2011
IL-10	<i>Forward:</i> 5' – GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG 3' <i>Reverse:</i> 5' – TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG- 3'	Espitia C. <i>et al.</i> , 2010
TNF- α	<i>Forward:</i> 5' – TGA GCC ATC GTG CCA ATG – 3' <i>Reverse:</i> 5' – AGC CCG TCT GCT GGT ATC AC – 3'	Espitia C. <i>et al.</i> , 2010

Foram produzidas 4 curvas de diluição 1:4 para cada um dos seis *primers* utilizados, a fim de gerar curvas padrão. Cada curva foi composta por no mínimo 6 pontos de diluição. As reações de amplificação foram realizadas na máquina de PCR em tempo real *ViiA 7* (Applied Biosystems), em placas de 384 poços. Os parâmetros de ciclagem das reações foram os seguintes: desnaturação das fitas a 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 75°C por 30 segundos. A curva de *melt* seguiu as seguintes condições: 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 95°C por 15 segundos.

4. RESULTADOS

4.1. Evolução Clínica de Infecções Únicas e Mistas nos Animais Experimentalmente Infectados

Durante o acompanhamento clínico revelado pela medida do edema da pata infectada em relação a não infectada contra lateral, observou-se que as duas primeiras semanas representaram o período pré-patente onde não observamos diferenças entre os grupos. Após este período, observamos o aparecimento de uma pápula eritematosa que na maioria dos grupos evoluiu para lesão. O edema apresentado pelo grupo *Ln* foi significativamente menor comparado aos demais grupos em todos os pontos de observação. Diferenças não foram observadas entre os grupos $\frac{1}{2}$ *Lb*, *Lb* e Mista até a 5ª semana de observação. A infecção com *Lb* apresentou edema significativamente maior na 6ª semana, enquanto $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista apresentaram medidas semelhante. Na 7ª semana, o edema da pata dos animais que receberam a infecção mista aumentou, alcançando medidas semelhantes as do grupo *Lb* enquanto que o grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, apresentou-se com medida semelhante ao da semana anterior. Na 8ª e 10ª semana, $\frac{1}{2}$ *Lb* foi significativamente diferente do grupo Mista. Além disso, na 10ª semana (final das observações), o grupo que recebeu a infecção mista apresentou edema com medidas semelhante a *Lb* (Figura 4.1 A).

Ao longo das 10 semanas pós-infecção não houve ulceração induzida no grupo *Ln* sobre a pata infectada. Com relação aos grupos $\frac{1}{2}$ *Lb*, *Lb* e Mista, foi observado que a partir da 2ª semana pós-infecção iniciou-se o desenvolvimento de lesões não ulceradas (Figura 4.1 B). Os animais que receberam a infecção mista apresentaram um perfil de desenvolvimento das lesões, ao longo de todas as 10 semanas pós-infecção, muito similar às lesões apresentadas pelo grupo *Lb*, porém, na maioria dos animais, as lesões eram de maior gravidade, com leve ulceração e área de necrose no centro da lesão (Figura 4.2 L). Além disso, na 4ª, 5ª, 8ª, 9ª e 10ª semana pós-infecção, a área de lesão desenvolvida pelo grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* foi significativamente diferente do grupo Mista (que recebeu número de parasitos igual ao do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*), que apresentou maior área de lesão, semelhante ao grupo *Lb*.

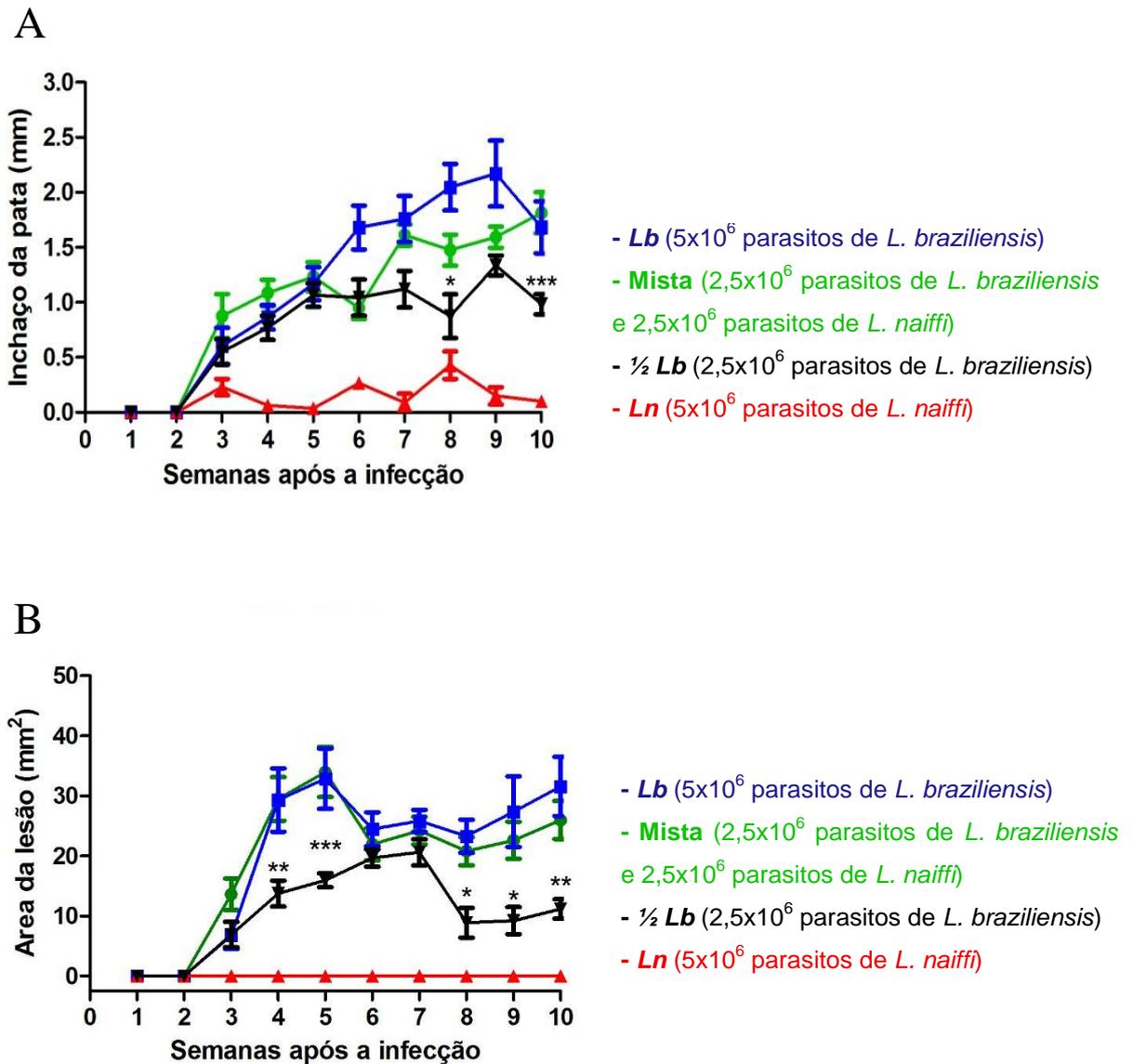


Figura 4.1: Evolução da lesão nos grupos *Ln*, $\frac{1}{2}$ *Lb*, *Lb* e *Mista* durante o período de 10 semanas pós-infecção.

Experimento realizado com um total de 28 animais (7 animais por grupo), referentes ao ensaio de infecção 1. (A) Edema das patas medido através da diferença entre a pata infectada e a pata contra-lateral não infectada. (B) Área da lesão sobre a pata infectada. A significância está demonstrada entre os grupos *Mista* e $\frac{1}{2}$ *Lb* por 2way ANOVA: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

Os registros fotográficos representativos dos animais infectados em três momentos distintos de observação (Figura 4.2) demonstram diferenças visíveis no curso da lesão. Podemos identificar bem o eritema na região do inóculo (Figura 4.2 A, D, G, J), a formação de pápulas (Figura 4.2 B, E, H, K) e o desenvolvimento de lesões não ulceradas na grande maioria dos animais (Figura 4.2 F, I, L). As infecções mistas e as únicas por *L. braziliensis* apresentaram maior gravidade quando comparadas às infecções únicas por *L. naiffi*, em todos os três momentos representados nas imagens. É importante destacar que alguns animais ($n=2$) apresentaram área necrosada e escamativa no centro da lesão, mostrando evolução para uma lesão ulcerada (Figura 4.2 L).



Figura 4.2: Características macroscópicas do curso da lesão nos grupos *Ln*, $\frac{1}{2}Lb$, *Lb* e Mista, em três momentos distintos de observação.

Imagens representativas dos grupos. A: 3ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; B: 6ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; C: 9ª semana pós-infecção do grupo *Ln*; D: 3ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2}Lb$; E: 6ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2}Lb$; F: 9ª semana pós-infecção do grupo $\frac{1}{2}Lb$; G: 3ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; H: 6ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; I: 9ª semana pós-infecção do grupo *Lb*; J: 3ª semana pós-infecção do grupo Mista; K: 6ª semana pós-infecção do grupo Mista; L: 9ª semana pós-infecção do grupo Mista.

4.2. Detecção e Caracterização dos Parasitos em Fragmentos de Tecidos das Lesões dos Animais Infectados

A detecção e caracterização de parasitos nos fragmentos de tecidos das lesões dos animais infectados foi investigada por PCR, tendo como alvo uma região do gene de *hsp70* de *Leishmania*, assim como pelo isolamento em cultura.

Foram avaliadas 44 amostras de 22 animais infectados com *L. braziliensis* (grupos $\frac{1}{2}$ *Lb* e *Lb*), 11 animais do grupo *Ln* e 11 do grupo Mista. Destas, 22, 11 e 11, respectivamente a cada condição de infecção, foram positivas para PCR e 22, 8 e 11 para cultura.

A PCR para região do gene de *hsp70* de *Leishmania* seguida da digestão dos produtos amplificados pela enzima de restrição *Bst*UI, foi utilizada para caracterizar os parasitos nas lesões dos animais com infecção mista, uma vez que nos animais com infecção única a espécie do parasito já era conhecida. Dessa forma, como esperado, as amostras das infecções únicas apresentaram o perfil para as espécies de *Leishmania* correspondentes a infecção, *L. naiffi* ou *L. braziliensis*, comparado com as cepas de referência dessas espécies. As amostras dos animais com infecção mista (*L. naiffi* + *L. braziliensis*) produziram perfis semelhantes aqueles observados para as amostras da infecção por *L. braziliensis* e da cepa de referência dessa espécie. Na Figura 4.3 é possível verificar os diferentes perfis obtidos para algumas das amostras analisadas

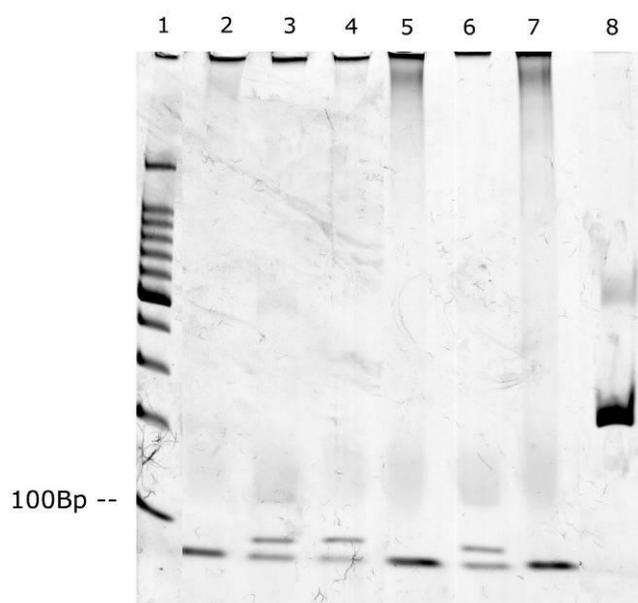


Figura 4.3: Gel de poliacrilamida a 6% apresentando perfis obtidos para amostras de lesão de diferentes animais infectados com uma única espécie ou com infecção mista por *L. braziliensis* e *L. naiffi*.

Gel representativo dos ensaios de digestão por *Bst*UI do produto de PCR para região do gene *hsp70*. O experimento foi realizado ao final do acompanhamento clínico de 10 semanas e executado por 2 vezes, com um total de 28 animais referentes ao primeiro ensaio de infecção e 16 animais referentes ao segundo ensaio de infecção. 1- Marcador de peso molecular DNA Leader 100 bp; 2- Amostra de animal infectado com *L. braziliensis*; 3 e 6- Cepa de referencia de *L. naiffi*; 4- Amostra de animal infectado com *L. naiffi*; 5 e 7- Amostra de animal com infecção mista por *L. braziliensis* + *L. naiffi*; 8- Controle (produto não digerido).

Os ensaios de caracterização pelo perfil eletroforético de isoenzimas confirmaram os parasitos isolados como *L. braziliensis* ou *L. naiiffi*, conforme a infecção realizada. Com relação às infecções mistas, observou-se a presença dos eletromorfos correspondentes as duas espécies, *L. braziliensis* e *L. naiiffi*. No entanto, a manutenção da cultura por cerca de 15 dias mostrou que há prevalência de *L. braziliensis* após este período e que *L. naiiffi* não pode mais ser detectada na cultura (Figura 4.4).

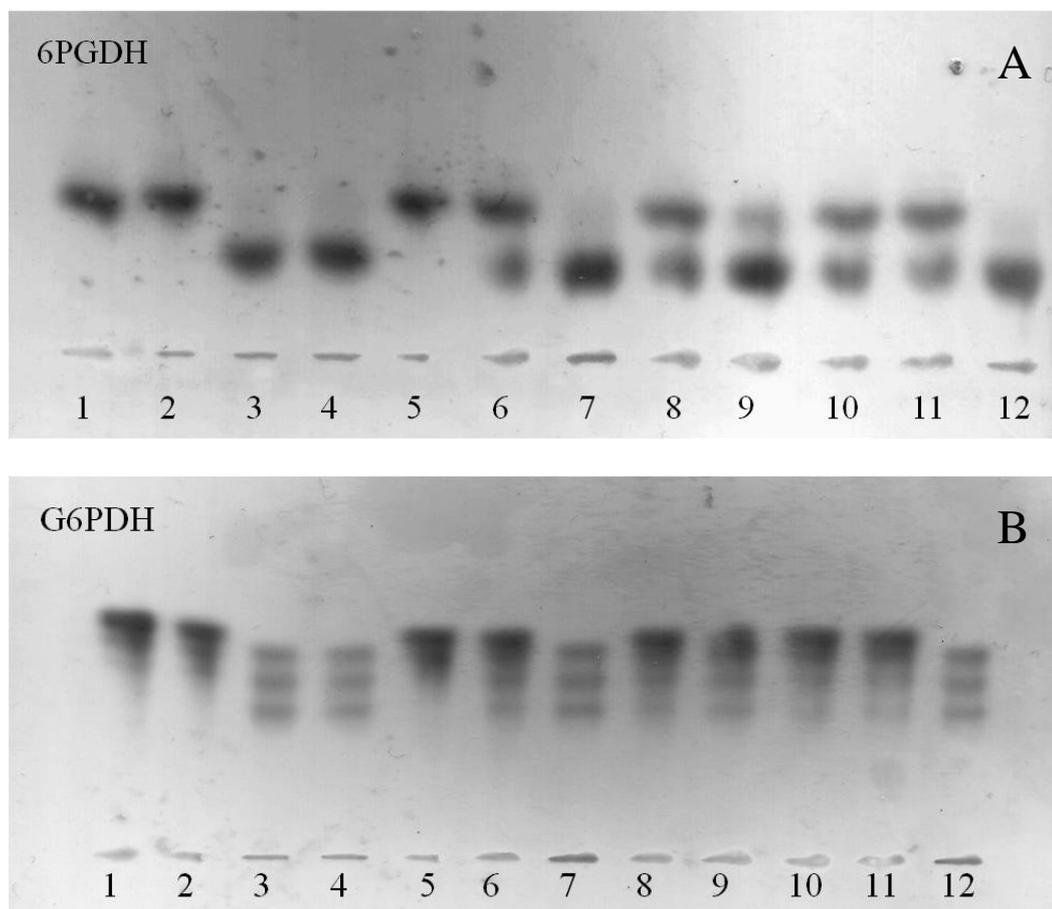


Figura 4.4: Perfil eletroforético, para as enzimas 6PGDH e G6PDH, observado para parasitos isolados e cultivados a partir de fragmento de lesões de animais experimentalmente infectados.

Géis representativos dos ensaios de isoenzimas realizados ao final do acompanhamento clínico de 10 semanas, executados por 2 vezes, com um total de 28 animais referentes ao primeiro ensaio de infecção e 16 animais referentes ao segundo ensaio de infecção. (A) 6PGDH, (B) G6PDH: 1- *L. braziliensis* cepa de referência, 2- cultura de animal infectado com *L. braziliensis*, 3 e 12- *L. naiiffi* cepa de referência, 4 e 7- cultura de animal infectado com *L. naiiffi*, 5- cultura de animal com infecção mista (*L. naiiffi* +*L. braziliensis*), após 15 dias de cultivo, 6, 8-11- cultura de animal com infecção mista (*L. naiiffi* +*L. braziliensis*), 7- cultura de animal infectado com *L. naiiffi*.

4.3. Análises Histopatológicas

As análises histopatológicas indicaram a presença de um infiltrado discreto no grupo *Ln* e poucas células vacuolizadas. No grupo *Lb* foi verificado intenso infiltrado inflamatório com presença de corpúsculos de Schaumann e parasitos em macrófagos. No grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* foi

observada intensa reação granulomatosa e um grande número de parasitos em macrófagos. Uma reação inflamatória intensa com presença de parasitos intracelulares com grandes áreas mostrando vacuolização foi observada em todos os animais no grupo Mista, diferente dos outros grupos. A Figura 4.5 apresenta imagens da área de lesão de cada um dos grupos, ilustrando algumas características descritas.

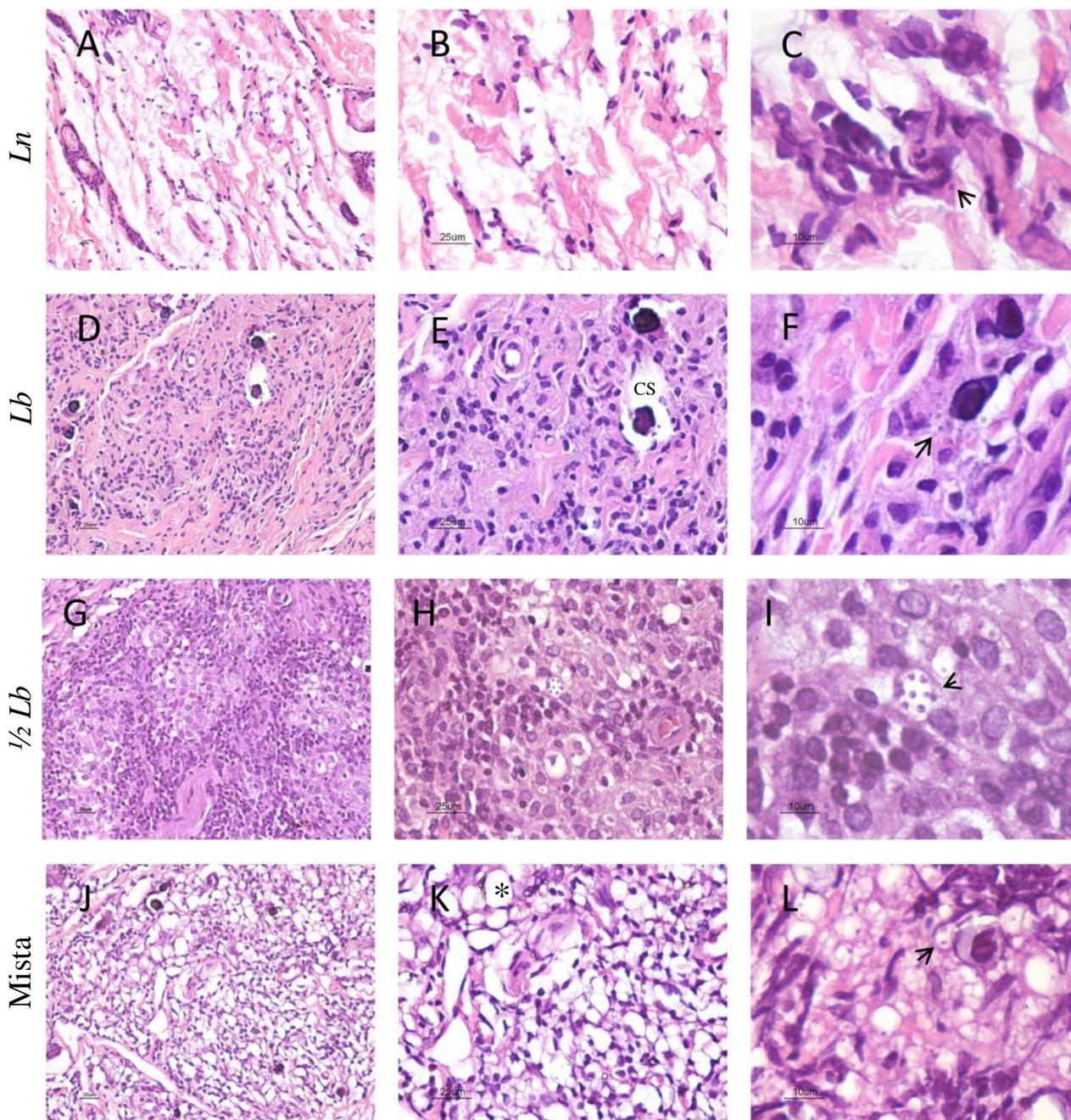


Figura 4.5: Aspectos histopatológicos observados nas lesões de hamsters experimentalmente infectados com *L. braziliensis*, *L. naiffi* ou infecção mista por estas espécies de *Leishmania*.

Coloração de Hematoxilina-Eosina. Imagens representativas de áreas de lesão dos grupos experimentais, obtidas após 10 semanas de infecção. Os experimentos foram executados por 2 vezes, com um total de 9 animais do grupo *Ln*, 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, 10 animais do grupos *Lb* e 8 animais do grupo *Mista*. A-C: área de lesão de animais do grupo *Ln*; D-F: área de lesão de animais do grupo *Lb*; G-I: área de lesão de animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*; J-L: área de lesão de animais do grupo *Mista*. Os símbolos presentes nas imagens significam: CS: Corpúsculo de Schaumann; Seta (→): amastigotas; Asterisco (*): vacuolização.

4.3.1. Escore Histopatológico

Todos os animais do grupo controle obtiveram escore 0, apresentando uma pele sadia e ausência de características inflamatórias. No grupo *Ln* o infiltrado inflamatório foi predominantemente discreto, com apenas 1 animal apresentado infiltrado médio. Os grupos *Lb*, $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista apresentaram 60%, 60,3% e 62,5% dos animais com infiltrado inflamatório intenso, respectivamente. Diferenças estatísticas foram observadas no grupo controle quando comparado aos grupos *Lb*, $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista, e também foram observadas no grupo *Ln* quando comparado aos grupos *Lb*, $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista (Figura 4.6 A).

Com relação as células vacuoladas, os grupos *Ln* e $\frac{1}{2}$ *Lb* apresentaram discreta e média presença dessas células, respectivamente, sendo que no grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* alguns animais não apresentaram células vacuoladas. Grande variação na presença destas células foi vista no grupo *Lb*, no qual foi visualizado desde intensa presença dessas células até a ausência das mesmas. No grupo Mista, em nenhum animal foi visto a ausência total das células vacuolada e 50% dos animais deste grupo apresentaram intensa vacuolização. Diferenças estatísticas foram observadas apenas entre o grupo controle e o grupo que recebeu a infecção mista (Figura 4.6 B).

Com exceção do grupo *Ln*, que apresentou 22,2% dos animais de seu grupo com corpúsculos de Schaumann na área de lesão, os demais grupos apresentaram porcentagem igual ou maior que 60% de animais com esses corpúsculos. Diferença estatística entre os grupos, par a par, não foram identificadas (Figura 4.6 C).

Em ordem crescente de porcentagem de animais com fibrose na área de lesão estão: grupo *Ln* (22,2%), grupo Mista (37,5%), grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* (54,5%) e grupo *Lb* (60%). Não foram observadas diferenças estatísticas para esta característica (Figura 4.6 D).

A maioria dos animais pertencentes aos grupos $\frac{1}{2}$ *Lb* e *Lb* desenvolveram necrose na área de lesão e a porcentagem de animais que apresentaram esta característica, em cada grupo, ultrapassou 80%. A necrose foi desenvolvida na área de lesão por 50% dos animais que receberam a infecção mista e no grupo *Ln*, nenhum animal apresentou necrose. Diferenças estatísticas foram observadas no grupo controle quando comparado aos grupos *Lb* e $\frac{1}{2}$ *Lb*, e também foram observadas no grupo *Ln* quando comparado aos grupos *Lb* e $\frac{1}{2}$ *Lb*. Nenhuma diferença estatística foi identificada no grupo que recebeu a infecção mista (Figura 4.6 E).

A pontuação recebida por cada animal referente à ausência ou intensidade da presença de cada característica inflamatória analisada apresentou variação entre os grupos e também entre animais pertencentes a um mesmo grupo. Apesar disso, na análise do escore histopatológico, diferenças estatísticas foram obtidas entre alguns grupos e podem ser observadas na Figura 4.7. O grupo controle e o grupo *Ln* foram estatisticamente diferentes dos grupos *Lb*, $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista, entretanto, não apresentaram diferença estatística entre si.

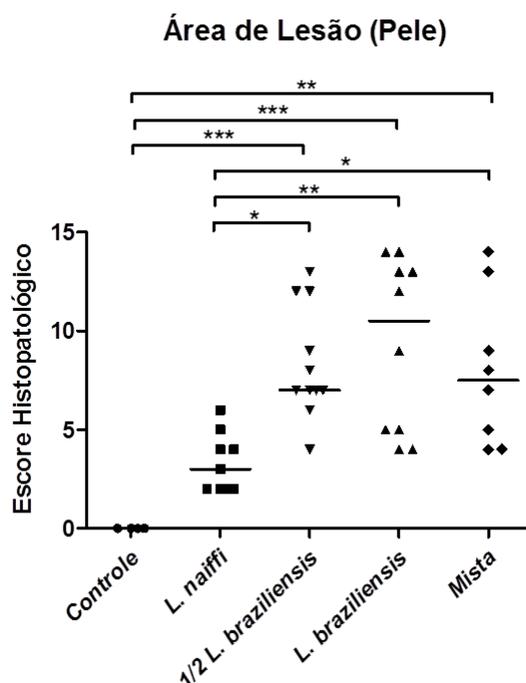


Figura 4.7: Escore histopatológico observado nas lesões cutâneas de hamsters experimentalmente infectados com *Leishmania* spp.

O valor do escore foi obtido por meio do somatório das pontuações referentes à análise semiquantitativa das alterações histopatológicas (intensidade de infiltrado inflamatório, células vacuoladas, corpúsculos de Schaumann, fibrose e de necrose da área de lesão de cada animal) após 10 semanas de infecção. Foram avaliados e comparados: 4 animais do grupo Controle, 9 animais do grupo *Ln* (*L.naiffi*), 11 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*) 10 animais do grupos *Lb* (*L. braziliensis*) e 8 animais do grupo *Mista*, que correspondem aos ensaios de infecção 1 e 2, realizados em momentos distintos. Cada ponto representa um animal. O valor de escore. One-way ANOVA: *** $p < 0,0001$ / pós-teste por Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$.

4.3.2. Análise semi-quantitativa de amastigotas nas lesões

Todos os animais que compõem o grupo *Ln* apresentaram 40% ou menos de campos positivos para amastigotas. Mais da metade dos animais do grupo *Lb* apresentaram porcentagem de campos positivos, menor ou igual a 35%. Para o grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* e o que foi submetido a infecção mista, mais da metade dos animais apresentou acima de 50% de campos positivos para amastigotas. Entretanto, apesar dessas observações, diferenças estatísticas foram encontradas apenas entre o grupo *Ln* e o grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* (Figura. 4.8).

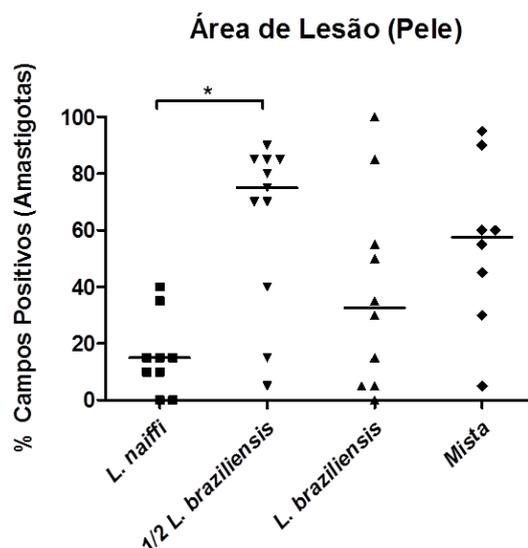


Figura 4.8: Análise semi-quantitativa de amastigotas nas lesões dos hamster experimentalmente infectados.

Foram avaliados 20 campos da área de lesão. Os campos foram considerados positivos quando no mínimo uma amastigota foi visualizada e somatório final dos campos positivos para amastigotas foi expresso em porcentagem. Os ensaios foram realizados após 10 semanas de infecção e foram utilizados: 4 animais do grupo Controle, 9 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 11 animais do grupo $\frac{1}{2}Lb$ ($\frac{1}{2}L. braziliensis$), 10 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 8 animais do grupo *Mista*, que correspondem aos ensaios de infecção 1 e 2, realizados em momentos distintos. Cada ponto representa um animal. Kruskal-Wallis test: * $p < 0,05$ / pós teste por Dunn: * $p < 0,05$.

4.4. Carga Parasitária por PCR em tempo real

Na quantificação da carga parasitária da área de lesão, comparando as diferenças dos grupos, par a par, não foram encontradas diferenças com significância estatística. Os grupos *Lb*, $\frac{1}{2}Lb$ e *Mista* apresentam uma tendência de maior carga parasitária quando comparados ao grupo infectado com *L.(V.) naiffi*. Observamos variação da carga parasitária entre os animais de todos os grupos, exceto no grupo *Ln*, com todos os animais apresentando baixa quantificação de DNA (Figura 4.9 A). No grupo *Ln* a menor quantificação foi de 0,03 e a maior de 0,29, enquanto no grupo $\frac{1}{2}Lb$ observamos uma quantificação que variou de 0,20 a 3,70, de 0,13 a 3,07 no grupo *Lb* e de 0,04 a 2,82 no grupo *Mista*. De uma forma geral, os resultados da quantificação de parasitos por qPCR corroboram o que foi observado pela quantificação de amastigotas na lesão determinada pela avaliação das lâminas.

Quanto à carga parasitária do linfonodo poplíteo (Figura 4.9 B), foi identificada diferença estatística entre *Lb* e *Ln* e entre *Lb* e $\frac{1}{2}Lb$. A infecção mista não apresentou diferença estatística com nenhum dos outros grupos, apesar de apresentar uma tendência de maior carga parasitária quando comparada com *Ln* e com $\frac{1}{2}Lb$. Foi observado ainda que no grupo *Lb* ocorreu variação entre a carga dos animais que compõem este grupo, gerando

grande dispersão dos pontos representativos dos animais no gráfico, quando comparados à distribuição dos pontos dos demais grupos.

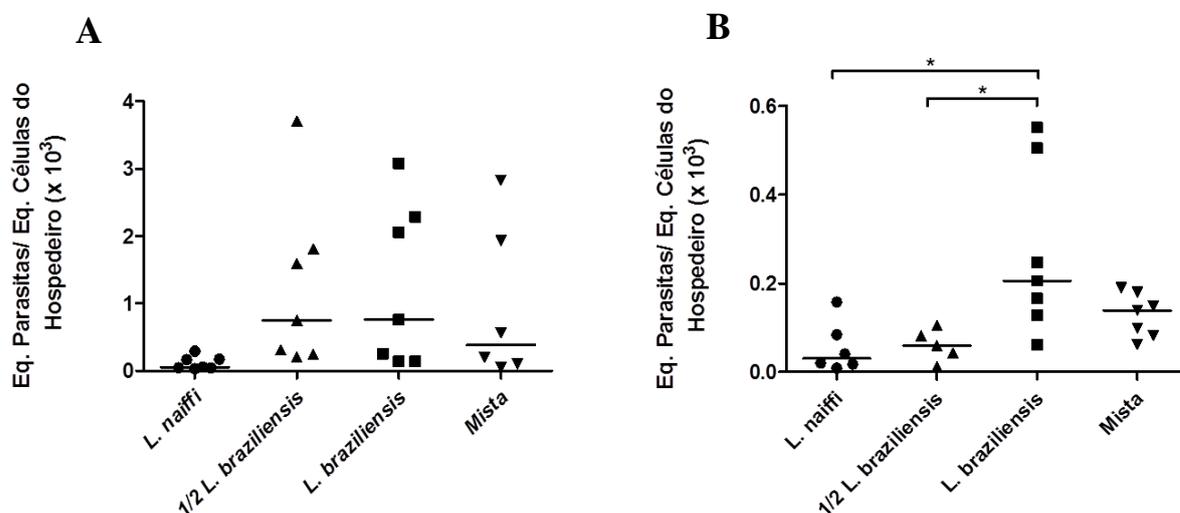


Figura 4.9: Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real.

A carga parasitária foi estimada após 10 semanas de infecção a partir de DNA extraído da área de lesão ou do linfonodo poplíteo de animais infectados, correspondentes aos ensaios de infecção 2 e 3, realizados em momentos distintos. Nos ensaios realizados a partir da área de lesão (A) foram utilizados: 7 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 7 animais do grupo $\frac{1}{2}Lb$ ($\frac{1}{2}L. braziliensis$), 7 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 6 animais do grupo *Mista*. Nos ensaios realizados a partir do linfonodo poplíteo (B) foram utilizados: 6 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 5 animais do grupo $\frac{1}{2}Lb$ ($\frac{1}{2}L. braziliensis$), 7 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 7 animais do grupo *Mista*. Cada ponto representa um animal (one-way ANOVA: ** $p < 0,001$ / pós teste por Bonferroni: * $p < 0,05$).

4.5. Expressão gênica de citocinas

A expressão de citocinas, IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ , na lesão e no linfonodo poplíteo dos animais infectados foi avaliada ao final do acompanhamento da infecção (10 semanas).

Não foi observada significância estatística na expressão de IL-4 (Figura 4.10 A) nas lesões, entretanto alguns dos animais representantes do grupo *Ln* e do grupo *Mista* apresentaram maior expressão desta citocina quando comparados aos demais animais. O grupo controle e o grupo $\frac{1}{2}Lb$ foram os que apresentaram as menores expressões de IL-4. Na avaliação da expressão de IL-10 nas lesões (Figura 4.10 B), diferenças entre os grupos, par a par, não foram identificadas. Ainda assim, é possível visualizar que 3 dos 4 animais representantes do grupo que recebeu a infecção mista apresentam expressão de IL-10 acima da mediana de todos os outros grupos analisados. A expressão de IFN- γ não apresentou significância estatística (Figura 4.10 C), mas o grupo *Ln* e o grupo *Mista* apresentaram alguns animais com maior expressão dessa citocina comparado a animais de outros grupos. Um dos animais do grupo *Mista*, por exemplo, apresentou expressão desta citocina aproximadamente

60 vezes maior que a expressão de animais do grupo controle e do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*. A expressão de TNF- α foi estatisticamente maior no grupo Mista comparado com cada um dos outros grupos (Figura 4.10 D). Além disso, o grupo *Ln* apresentou um de seus animais com expressão de TNF- α semelhante à de animais do grupo Mista.

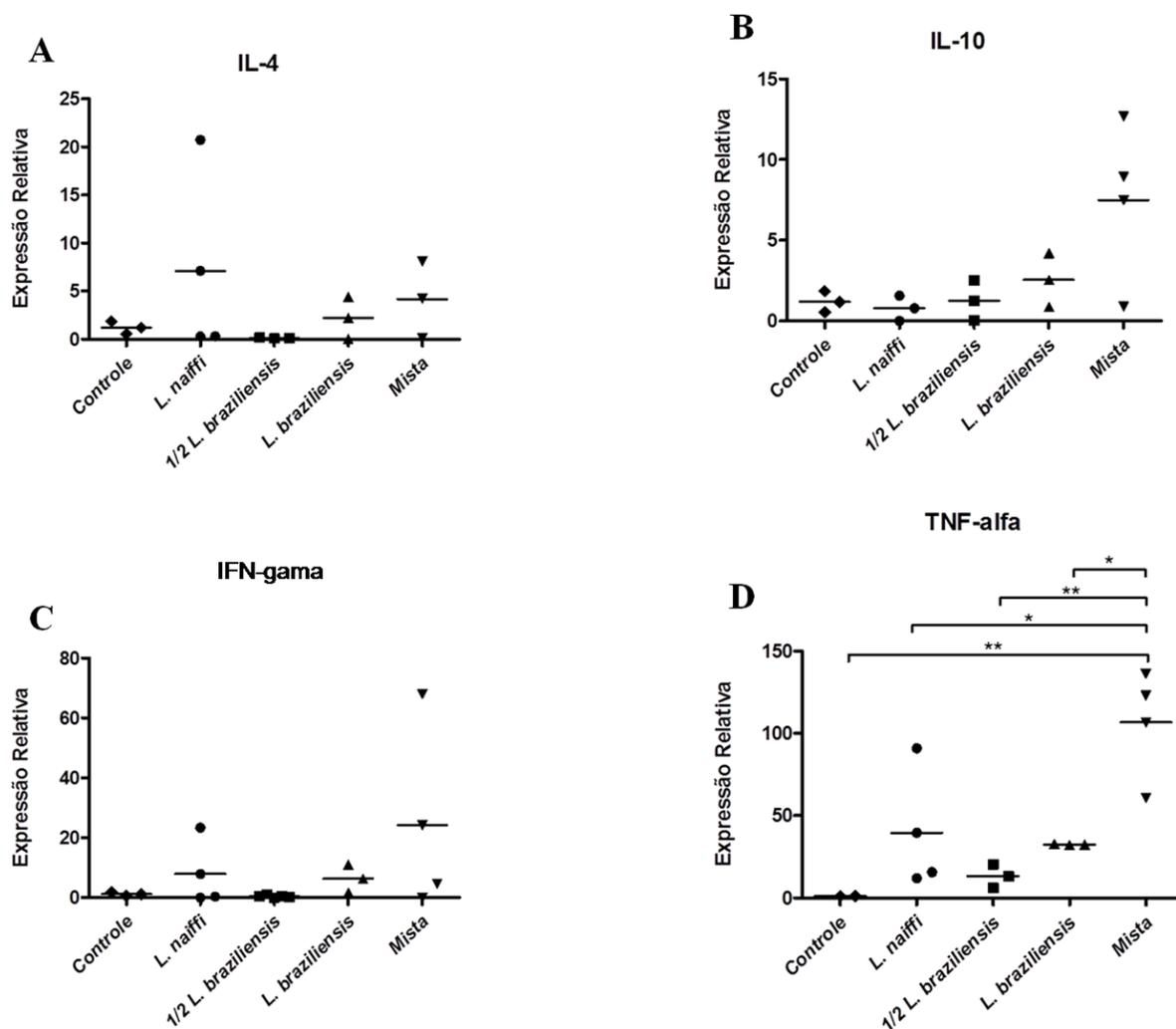


Figura 4.10: Expressão gênica, determinada por PCR em tempo real, de citocinas na área de lesão na pata de animais experimentalmente infectados.

A expressão gênica de citocinas foi determinada após 10 semanas de infecção em animais pertencentes aos ensaios 2 e 3, realizados em momentos distintos. Foram avaliados: 3 animais do grupo Controle, 4 animais do grupo *Ln* (*L. naiffi*), 3 animais do grupo $\frac{1}{2}$ *Lb* ($\frac{1}{2}$ *L. braziliensis*), 3 animais do grupo *Lb* (*L. braziliensis*) e 4 animais do grupo *Mista*. Cada ponto representa um animal. A: expressão relativa de IL-4; B: expressão relativa de IL-10; C: expressão relativa de IFN- γ ; D: expressão relativa de TNF- α . Testes estatísticos realizados por One-way ANOVA/ pós teste por Bonferroni: * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

Não foi observada significância estatística entre os grupos na quantificação de IL-4 nos linfonodos (Figura 4.11 A). Na avaliação da expressão de IL-10 (Figura 4.11 B) diferenças entre os grupos, par a par, também não foram identificadas. Entretanto, no grupo *Ln* e no grupo *Mista* é possível observar que a expressão de IL-10 em todos os animais desses grupos foi próxima de zero e, os grupos *Lb* e $\frac{1}{2}$ *Lb* apresentaram similar expressão desta

citocina. A expressão de IFN- γ foi significativamente maior no grupo *Lb* comparada com a expressão apresentada pelo grupo *Ln* (Figura 4.11 C), entretanto, apesar de não ter sido refletido estatisticamente, os grupos $\frac{1}{2}$ *Lb* e Mista apresentaram tendência de maior expressão desta citocina que o grupo *Ln*. Não foi observada significância estatística na avaliação da expressão de TNF- α e a expressão desta citocina foi similar entre os grupos (Figura 4.11 D).

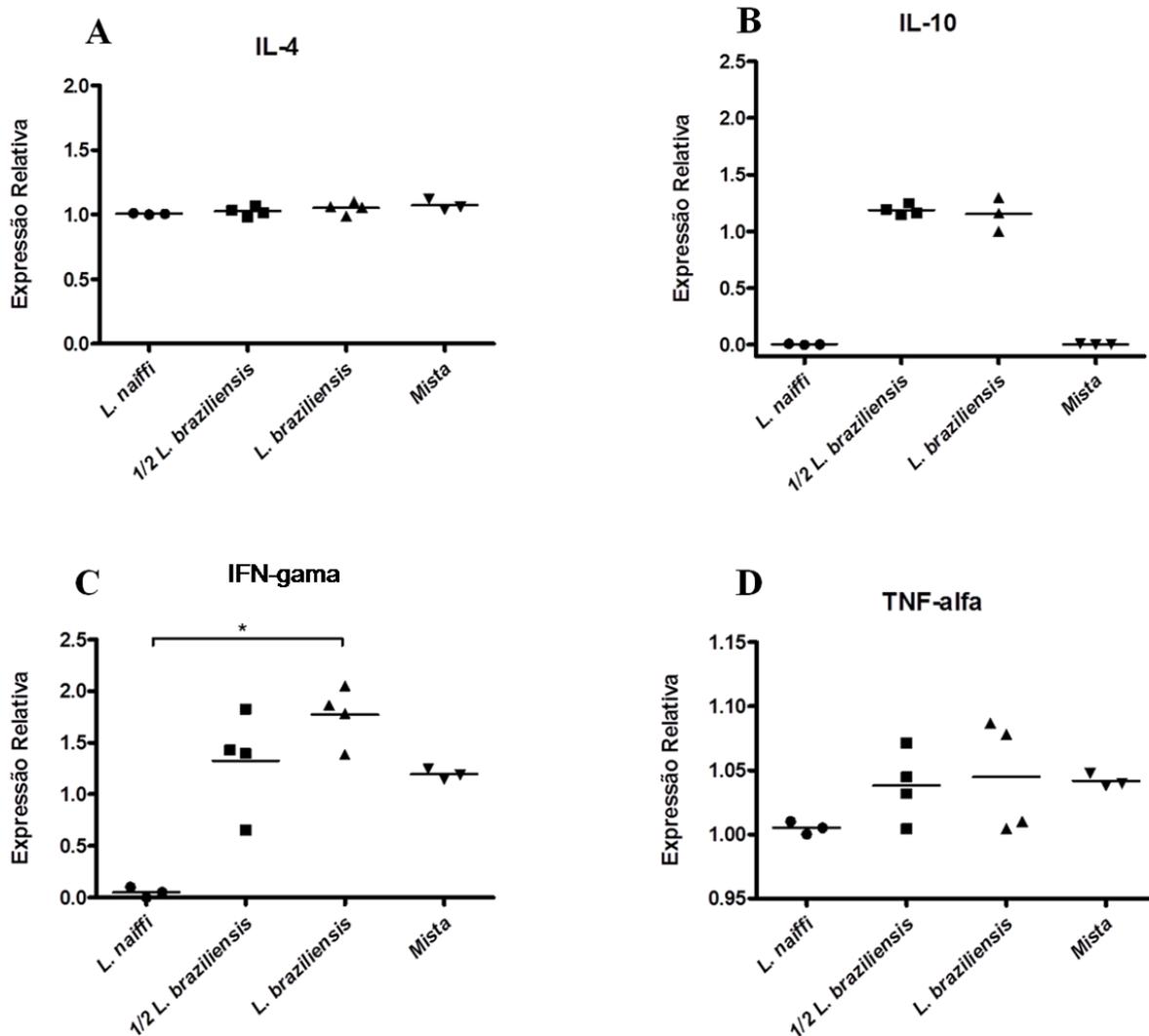


Figura 4.11: Expressão gênica, determinada por PCR em tempo real, de citocinas inflamatórias no linfonodo poplíteo de animais experimentalmente infectados, organizados em grupos.

Os grupos foram: *L. naiffi* (*Ln*), $\frac{1}{2}$ *L. braziliensis* ($\frac{1}{2}$ *Lb*), *L. braziliensis* (*Lb*) e Mista. Cada ponto representa um animal. A: expressão relativa de IL-4; B: expressão relativa de IL-10; C: expressão relativa de IFN- γ ; D: expressão relativa de TNF- α . Testes estatísticos realizados por Kruskal-Wallis/ pós teste por Dunn: * $p < 0,05$)

5. DISCUSSÃO

Parasitas do gênero *Leishmania* encontram-se distribuídos em diferentes regiões do mundo e são os agente etiológicos de uma série de manifestações clínicas conhecidas como leishmanioses (Alvar J. *et al.*, 2012). Nas Américas, as formas clínicas cutâneas causadas por estes parasitos variam desde lesões localizadas até formas mais graves que atingem mucosas e podem causar lesões desfigurantes (Marzochi M. & Marzochi K., 1994). A espécie *L. braziliensis* está envolvida com estas diversas formas clínicas, sendo a principal espécie incriminada com casos da doença ocorridos no Brasil (Min. da Saúde, 2018). Outras seis espécies de *Leishmania* também estão envolvidas com a doença neste país, como por exemplo, *L. naiffi*, envolvida com casos benignos da doença (Naiffi *et al.*, 1991; van der Snoek *et al.* 2009; Figueira L., 2017).

Eventos de simpatria de espécies de *Leishmania* já foram registrados em algumas regiões do Brasil, como por exemplo, na região Amazônica, em que ocorre a circulação das sete espécies do parasito responsáveis pela doença no país (Min. da Saúde, 2018). Casos de leishmaniose causada por mais de uma espécie do parasito podem parecer raros, entretanto, a falta de métodos de diagnóstico disponíveis para detectar eventos deste tipo, podem subestimar estes casos. Apesar disso, existem na literatura registros de infecções mistas por espécies de *Leishmania* em flebotomíneos (Rafizadeh S. *et al.*, 2016), em animais reservatórios (Madeira M. *et al.*, 2006) e também no homem (Coelho L. *et al.*, 2011).

Infecções mistas podem ser a causa do agravamento ou melhora de infecções e o estudo de infecções deste tipo é relevante para a compreensão de aspectos imunológicos importantes e de fatores parasito-específicos envolvidos na doença. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar infecções mistas experimentais entre as espécies *L. braziliensis* e *L. naiffi*, de maneira a detectar e analisar mudanças na susceptibilidade, virulência e progresso da doença.

Ao longo deste estudo foram realizados três ensaios de infecção experimental. Cada ensaio de infecção foi composto por grupos de animais que sofreram infecções únicas ou mistas com as espécies mencionadas. O modelo animal utilizado neste estudo foi o Hamster Dourado (*Mesocricetus auratus*), que vem sendo amplamente citado na literatura como o modelo mais suscetível a infecções experimentais por parasitos do subgênero *Viannia*, apresentando características clínicas e histopatológicas similares às observadas em humanos (Kahl L. *et al.*, 1991; Gomes-Silva *et al.*, 2013).

Um primeiro ponto que deve ser abordado é a natureza dos isolados usados neste estudo. Ambos os isolados são provenientes da mesma área endêmica do Estado do Pará e são

menos virulentos que outros isolados observados na literatura, principalmente para *L. braziliensis*. Isto ficou claro quando ao longo de 10 semanas de infecção não observamos lesões ulceradas. A escolha destes isolados foi devida a ocorrência de híbridos entre estas duas espécies nesta área. Entretanto, este fato resultou em uma melhor visualização do fenômeno biológico que estudamos.

Na avaliação da evolução clínica das infecções nos animais experimentalmente infectados, o grupo *Ln* apresentou edema significativamente menor comparado aos demais grupos, em quase todos os pontos de observação e ausência de lesão, a não ser por um leve eritema e pequena pápula nas primeiras semanas. Nossos achados corroboram dados da literatura que apontam *L. naiffi* como uma espécie benigna. Diferentes autores, já demonstraram em infecções em humanos por *L. naiffi*, o desenvolvimento de lesões únicas, pequenas e de boa resposta ao tratamento (van der Snoek *et al.* 2009; Figueira L. *et al.*, 2017). As diferenças nas medidas das patas, observadas a partir da 5ª semana entre os grupos $\frac{1}{2}Lb$ e *Lb*, e a área de lesão significativamente maior no grupo *Lb* em comparação a $\frac{1}{2}Lb$ observada em 5, das 10 semanas de observação, corroboram o que foi visto por Ribeiro-Romão R. e colaboradores em 2014, que comparou infecções em hamsters por inóculos distintos de *L. braziliensis*. Ao comparar tamanhos de lesões apresentadas por hamsters infectados com os inóculos 10^4 , 10^5 e 10^6 notou que os inóculos maiores (10^5 e 10^6) geraram lesões maiores que o inóculo com menos parasitos (10^4), sugerindo que a concentração de parasitos no inóculo influencia no curso clínico da lesão. O grupo Mista apresentou ao final do acompanhamento clínico de 10 semanas, edema semelhante ao grupo *Lb* e estatisticamente diferente do grupo $\frac{1}{2}Lb$, e desenvolvimento de área de lesão muito similar ao grupo *Lb* (não tendo inclusive apresentado diferença estatística com esse grupo em nenhum ponto). Esses dados sugerem que a infecção mista entre *L. braziliensis* e *L. naiffi* levam ao desenvolvimento de um curso clínico de maior gravidade quando comparada a infecções únicas por *L. braziliensis* (com a mesma quantidade de parasitos) e por *L. naiffi* (com o dobro de parasitos). Demonstrando que, apesar da espécie *L. naiffi* sozinha apresentar um curso clínico benigno, em infecções mistas com *L. braziliensis*, ela parece contribuir com a gravidade do mesmo.

É conhecido que as infecções por *L. braziliensis* são descritas por envolver grande resposta linfoproliferativa acompanhada por alta liberação de IFN- γ , levando a formação de lesões cutâneas. Entretanto, *L. naiffi* induz a uma resposta balanceada Th1 e Th2 com menor produção de IFN- γ por parte do hospedeiro, levando a lesões benígnas, porém com alta taxa de permanência e sobrevivência do parasito (Matta N. *et al.*, 2010). Dessa forma, características intrínsecas de *L. naiffi* que ainda não estão bem esclarecidas, em casos de infecção mista com *L. braziliensis* possivelmente contribuem para uma resposta com maior

liberação de citocinas pró-inflamatórias e dano tecidual, apresentando por essa razão, curso clínico similar às infecções que foram realizadas com maior concentração de parasitos de *L. braziliensis*.

Os resultados obtidos através da análise do curso clínico mostraram diferenças entre infecções únicas e mistas. Para tanto, foi verificado se ambas as espécies administradas na infecção mista eram mantidas até o final do curso clínico, a fim de constatar se os resultados obtidos até então correspondiam à atuação das duas espécies ou apenas àquela que possivelmente se mantinha presente. Dessa forma, foi realizada a caracterização dos parasitos com base no DNA presente nas lesões utilizando-se a técnica de Hsp70 PCR-RFLP, uma metodologia que tem se mostrado importante no diagnóstico molecular, capaz de diferenciar um grande número de espécies do gênero *Leishmania* (da Graça G. *et al.* 2012). Em nossos resultados foram observadas nas infecções únicas as respectivas espécies administradas inicialmente, entretanto, foi identificado na infecção mista a presença apenas de *L. braziliensis*. Uma hipótese para explicar este fato seria a diferença na quantidade relativa entre as duas espécies ao final do período de observação na infecção mista. Campos e colaboradores em 2008 demonstraram em experimentos *in vitro* que a espécie *L. naiffi* apresenta baixo índice de infecção comparada a *L. braziliensis* e, portanto, poderia ser essa a razão pela qual a mesma neste estudo não foi detectada pelo PCR-RFLP. Havendo maior quantidade relativa de uma das espécies, o PCR *hsp70* poderia amplificar uma maior quantidade de alvos da espécie mais abundante, inviabilizando a detecção de outra possível espécie presente na amostra.

Em seguida, para o mesmo fim, foi utilizada a técnica de ensaio de isoenzimas (Cupolillo E. *et al.*, 1994), que é considerada a técnica “padrão ouro” na caracterização de parasitos isolados de lesões.

Os primeiros resultados demonstraram sucesso no isolamento de parasitos de ambas as espécies, provenientes das lesões, até mesmo no caso de *L. naiffi* que não foi capaz de induzir lesão. Diferente do que ocorreu no PCR-RFLP, nas infecções mistas também foi possível isolar e determinar a presença das duas espécies de *Leishmania* por isoenzimas, possivelmente pelo fato de que logo após a extração das biópsias da lesão, as mesmas foram mantidas em cultivo, possibilitando a replicação de parasitos que talvez se encontrassem em menor quantidade. Entretanto, ao analisar amostras de infecções mistas mantidas em cultura ao longo de diversas passagens, a espécie *L. naiffi* desaparece da cultura ou permanece em quantidades não detectadas pelo ensaio de isoenzimas.

Em análises de caracterização de espécies de *Leishmania* provenientes de pacientes, pode ocorrer por vezes, certa demora no período de coleta da amostra, manutenção em cultura

e chegada ao local no qual será realizada a identificação. Os resultados deste estudo demonstram por isoenzimas que é possível durante o cultivo axênico, uma determinada espécie sobrepujar a outra, caracterizando a espécie majoritária na cultura. E ainda, que a técnica de PCR-RFLP pode em casos de infecção mista não ser capaz de eficientemente detectar mais que uma das espécies presentes na amostra. Em conjunto, esses resultados sugerem que casos de infecções mistas que ocorrem na natureza (em que uma das espécies ocorre em menor proporção) podem não estar sendo devidamente identificados, levando a subnotificação dos mesmos.

O infiltrado inflamatório é um importante sinalizador, em análises histopatológicas, da resposta do organismo mediante uma infecção. Ele foi uma das características avaliadas neste estudo e mesmo apresentando diferentes intensidades, foi visualizado em todos os grupos infectados. As diferenças identificadas entre os grupos refletem a gravidade da infecção mediante cada espécie ou inóculo, o que fica claro no grupo *Ln*, que apresentou intensidade de infiltrado inflamatório significativamente menor que os demais grupos infectados, refletindo uma inflamação mais branda comparada aos demais.

Células vacuoladas foram vistas de maneira mais expressiva no grupo Misto, não tendo nenhum animal deste grupo apresentado ausência total destas células. Kahl e colaboradores em 1991 demonstraram que a vacuolização de macrófagos é uma das principais características histopatológicas em lesões crônicas de hamsters infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Além disso, Silveira e colaboradores em 2008 sugeriram que a resposta histopatológica está sujeita, além de outros fatores, também à influência de agente específico. Alguns trabalhos apontam, por exemplo, em casos de LCL, o envolvimento de *L. amazonensis* com o desenvolvimento de muitos macrófagos vacuolados (Moraes M & Silveira F., 1994), enquanto que em casos de LCL por *L. braziliensis* é observada reação linfoplasmocitária, com raros macrófagos vacuolados (Magalhães A. *et al.*, 1986). Outros estudos também associam *L. braziliensis* com a baixa intensidade desta característica, como por exemplo, o trabalho desenvolvido por Silveira F. e colaboradores em 1990, que mostrou a ausência de macrófagos vacuolados em modelo experimental primata *Cebus apella* (Primates: Cebidae) infectado com *L. braziliensis*. Portanto, de acordo com os dados observados no presente estudo é possível que a intensa presença de células vacuoladas na infecção mista, não esteja relacionada apenas com o fato desta ser uma característica geralmente evidenciada no modelo hamster, tampouco com a presença de *L. braziliensis*, que como demonstrado, em geral, não tem sido associada com esta característica, mas sim com a interação das espécies na coinfeção, funcionando como um fator para o desenvolvimento de células vacuoladas, sendo estas um indicativo de degeneração tecidual.

Os corpúsculos de Schaumann, outra característica inflamatória avaliada, são estruturas basofílicas em formato lamelar concêntrico que ocorrem a partir de debris celulares e parasitos mortos que não são rapidamente reabsorvidos e sofrem calcificação. São também consideradas como características histopatológicas peculiares do modelo hamster em infecções cutâneas crônicas com *Leishmania* (Wilson *et al.*, 1979; Kahl L. *et al.* 1991). Dumont A. & Sheldon H. em 1965 apontaram os corpúsculos de Schaumann em hamsters como um indicativo de um sistema fagocítico mononuclear frágil, o que pode estar relacionado aos dados encontrados que mostram que mediante infecções por *L. braziliensis* e nas infecções mistas realizadas neste estudo (que com variações na intensidade, apresentaram pelo menos 60% de seus animais expressando esta característica) a predominância destas estruturas é maior, representando uma maior dificuldade do organismo em combater a infecção. No grupo *Ln*, entretanto, a ausência desta característica ou a baixa intensidade dela podem estar representando a contenção mais rápida e eficiente da infecção.

A necrose, um dos principais achados histopatológicos observados na leishmaniose tegumentar em humanos (Mehregan D. *et al.* 1999), foi também visualizada nos ensaios de infecção realizados nos grupos $\frac{1}{2}Lb$, *Lb* e Mista. Nenhum dos animais do grupo *Ln* apresentaram necrose, reafirmando o curso clínico benigno apresentado por essa espécie. Entretanto, mesmo com a presença desta espécie na infecção mista, o desenvolvimento de necrose ocorreu nos animais infectados com ambas as espécies, mostrando que a presença de *L. naiffi*, interfere aumentando a reação inflamatória, sendo esta característica histopatológica frequentemente observada nas infecções mistas. O desenvolvimento de necrose no modelo utilizado neste estudo corrobora a capacidade dos hamsters em mimetizar a infecção em humanos, apresentando inclusive maior virulência de *L. braziliensis*, com sutis diferenças entre os grupos infectados com esta espécie.

O cálculo de escore histopatológico demonstrou que os animais do grupo controle, como esperado, não apresentaram inflamação, caracterizando uma pele sadia. Os animais do grupo *Ln* apresentaram baixo escore histopatológico comparado aos demais grupos infectados, obtido principalmente pela baixa intensidade do infiltrado inflamatório e pela ausência de necrose, características histopatológicas importantes durante a infecção. Em conjunto, é possível inferir que a infecção causada por *L. naiffi* é responsável pela ativação da resposta imune do hospedeiro, porém com a capacidade de conter a infecção. Os demais grupos infectados não apresentaram diferenças estatísticas entre si, demonstrando que a presença de *L. naiffi* na infecção mista não foi capaz de modular a intensidade de algumas das características inflamatórias avaliadas neste estudo, porém em associação com *L. braziliensis*

leva a maior intensidade da resposta inflamatória com dano tecidual mais intenso, representado principalmente pelas células vacuoladas.

Através das análises histopatológicas também foi realizada uma análise semi-quantitativa de amastigotas da área de lesão. Todos os animais do grupo *Ln* apresentaram 40% ou menos de campos positivos para amastigotas, um indicativo do baixo índice de infecção desta espécie (mas ainda assim com a persistência do parasito na lesão) comparado aos grupos infectados com *L. braziliensis*, que apresentaram animais com até 100% de campos positivos. Esses resultados corroboram os dados apresentados por Campos M. e colaboradores em 2008, que em ensaios *in vitro* com macrófagos, demonstraram o baixo índice de infecção de *L. naiffi* comparado a *L. braziliensis*. Curiosamente, o grupo $\frac{1}{2} Lb$ foi identificado como o único grupo a apresentar mais de 70% de seus animais, com 80% de campos positivos para amastigotas. De acordo com Belkaid e colaboradores em 2000, uma fase de estabelecimento do parasito e consequente aumento da carga parasitária ocorre inicialmente, em seguida, ocorre o desenvolvimento da lesão associada a uma infiltração aguda de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na derme que leva a morte de parasitos no local. De acordo com isso, podemos considerar que a lesão se desenvolve e aumenta quando a carga parasitária diminui. Sendo assim, esta alta porcentagem de campos com amastigostas nos animais do grupo $\frac{1}{2} Lb$ é complementar aos resultados obtidos durante o curso clínico das lesões, nos quais foi vista menor área de lesão nos animais desse grupo, comparado aos animais do grupo *Lb* ou Mista. Portanto, devido ao inóculo dos grupos *Lb* e Mista, ser maior inicialmente, durante o curso clínico de 10 semanas, grandes lesões nas áreas infectadas foram formadas. A infecção no grupo $\frac{1}{2} Lb$, por sua vez, possivelmente por ter recebido a metade do inóculo inicialmente, apresenta um momento de infecção anterior pelo qual os animais que receberam inóculo total já passaram representando que, histologicamente o curso da lesão é alterado e o inóculo menor deve ser comparado com tempos anteriores dos outros grupos experimentais. Magalhães A. e colaboradores em 1986 relataram que o momento em que a infecção se encontra pode ser determinante na quantidade de parasitos presentes na lesão. Ao analisarem material de biópsia de diversos pacientes com LC causada por *L. braziliensis*, relataram que os parasitos apareceram significativamente em maior número nas lesões com menor tempo de evolução.

A carga parasitária da área lesão avaliada por PCR em tempo real apresentou resultado similar ao que foi identificado na histopatologia. Entretanto, o fato das cargas parasitárias dos grupos *Lb* e $\frac{1}{2} Lb$ não terem apresentado diferença estatística entre si, está também de acordo com o que foi verificado por Ribeiro-Romão R. e colaboradores em 2014, que utilizando o modelo hamster, mostrou que diferentes inóculos iniciais (10^4 , 10^5 e 10^6) da espécie *L.*

braziliensis não influenciam na carga parasitária obtida ao final do curso clínico. A baixa carga parasitária identificada na infecção única por *L. naiffi* não ocorreu nas infecções mistas, demonstrando que neste tipo de infecção, a presença de ambas as espécies leva ao desenvolvimento de alta carga assim como ocorre nas infecções únicas por *L. braziliensis*. Wilson H. e colaboradores em 1979 mostraram em experimentos com hamsters infectados com *L. braziliensis* e *L. amazonensis* que diferentes perfis de crescimento e comportamento das lesões são obtidos nas infecções por cada uma das espécies, mostrando dessa forma que a espécie do parasito é uma característica que contribui para a patogênese. No presente estudo, inóculos com a mesma concentração, porém com diferentes espécies de parasitos foram realizados (grupos *Lb* e Mista), mostrando que os distintos eventos e manifestações clínicas geradas foram influenciados pela espécie do parasito e possivelmente, não pela concentração do inóculo, já que este foi igual inicialmente e, ao final das 10 semanas de acompanhamento apresentaram carga parasitária sem diferenças estatísticas.

A carga parasitária quantificada no linfonodo poplíteo foi claramente mais baixa em todos os grupos comparada a carga parasitária da pele. Em relação ao grupo $\frac{1}{2}$ *Lb*, devido à menor quantidade inicial de parasitos, a infecção neste caso, possivelmente está no início da sua expansão para o linfonodo, estando concentrada ainda na lesão. No caso do grupo *Ln*, devido à baixa virulência da espécie, a mesma concentra-se na lesão, expandindo-se pouco para outros locais. O grupo que recebeu a infecção mista, entretanto, apresentou uma tendência de maior carga parasitária, não apresentando inclusive diferença estatística com o grupo *Lb* (que apresentou carga estatisticamente maior comparado aos demais grupos), mostrando que a presença de ambas as espécies pode levar a uma expansão mais rápida da infecção para outros locais, além do sítio de infecção.

Foi avaliado também a presença de RNAm de citocinas envolvidas nos processos de inflamação, inibição da inflamação e regulação da resposta imune. As citocinas são um importante grupo de proteínas envolvidas na resposta imune inata e adaptativa, com a função de direcionar as células ao desenvolvimento de perfis de resposta específicos mediante diferentes situações de risco ao organismo.

Na área de lesão, não houve diferença estatística entre os grupos na expressão de IL-4. Esta citocina tem sido frequentemente associada com a susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, pois desempenha um importante papel na inibição da atividade microbicida de macrófagos prolongando a sobrevivência dos parasitos (Kropf P. *et al.*, 2005; Zamorano J. *et al.*, 2003). Entretanto, observou-se no grupo *Ln* uma tendência de maior expressão desta citocina (com 2 de seus 4 animais apresentando expressão relativa de IL-4 acima da mediana dos outros grupos), assim como observado por Espir e colaboradores em um estudo realizado

em 2014 com pacientes apresentando leishmaniose cutânea por *L. naiffi*. Essa tendência apresentada, em associação com a expressão de TNF- α (também com 2 dos seus 4 animais com expressão acima da mediana dos outros grupos) reflete as características da espécie *L. naiffi* com a apresentação de um perfil inflamatório balanceado, que leva ao desenvolvimento de um curso clínico benigno.

IL-10 é considerada como um citocina imunoreguladora por controlar respostas exacerbadas como aquelas que ocorrem na leishmaniose mucosa, por exemplo, em que há intensa produção de citocinas do perfil Th1, levando a destruição do parasito, mas também à danos teciduais no hospedeiro (Saraiva M. & O'Garra A., 2010; Belkaid Y. *et al.*, 2001). Na avaliação da expressão de IL-10 na área de lesão também não foi identificada diferença estatística entre os grupos, entretanto, o grupo Mista apresentou forte tendência de maior expressão desta citocina (visto que 3 de seus 4 animais apresentaram expressão relativa acima da mediana dos outros grupos), que pode ser interpretado como uma forma de conter a resposta inflamatória apresentada pelos animais do grupo Mista, demonstrada pela expressão significativamente mais elevada de TNF- α em comparação a todos os outros grupos infectados. A citocina TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória na LC (Schoenborn J. & Wilson C., 2007), e sua expressão elevada em comparação aos demais grupos, inclusive ao grupo *Lb*, reflete a gravidade da infecção mista entre *L. naiffi* e *L. braziliensis*. Além disso, apesar de não terem sido identificadas diferenças estatísticas entre os grupos na expressão da citocina IFN- γ , o grupo Mista apresentou tendência de maior expressão desta importante citocina pró-inflamatória (2 de seus 4 animais apresentaram expressão relativa acima da mediana dos outros grupos).

A baixa expressão ou a ausência de detecção das citocinas no grupo $\frac{1}{2}Lb$ pode ser explicada pelo fato de que por ter sido inoculado inicialmente a metade do número de parasitos neste grupo com relação aos outros grupos, é possível que este se encontre em um momento de infecção anterior, e caso fosse mantida a observação do curso clínico por maior período de tempo, o grupo alcançaria também uma maior expressão das citocinas observadas.

As citocinas também foram avaliadas no linfonodo, onde claramente foi possível observar uma expressão reduzida para todas as citocinas em todos os grupos comparado a expressão verificada na área de lesão. De acordo com o que foi observado na carga parasitária, a infecção estava concentrada na área de lesão e iniciando sua expansão para o linfonodo, por essa razão, com a presença de poucos parasitos no órgão, a produção de citocinas também estava reduzida. IFN- γ foi estatisticamente mais expresso pelo grupo *Lb* em relação ao grupo *Ln*, o que pode ser justificado pela carga parasitária mais alta do grupo *Lb*

em relação aos demais grupos, levando dessa forma a uma produção de citocinas mais elevada que nos demais.

Assim, infecções mistas, que já tiveram sua ocorrência na natureza comprovada por diversos trabalhos, devem ser investigadas experimentalmente a fim de que os mecanismos imunológicos envolvidos que levam a melhora ou piora das infecções possam ser compreendidos.

6. CONCLUSÕES

O curso clínico das infecções mistas por *L. naiiffi* e *L. braziliensis* em hamsters é mais grave do que o curso clínico de infecções únicas por *L. braziliensis* com a mesma quantidade de parasitos e com o dobro de parasitos em infecções únicas por *L. naiiffi*;

Casos de infecção mista podem não ser identificados em situações em que a amostra a ser analisada é mantida em cultura por período prolongado, levando a caracterização apenas da espécie majoritária na cultura;

A intensidade do infiltrado inflamatório, da presença de corpúsculos de Schaumann, de fibrose e de necrose, gerada pelas infecções mistas por *L. naiiffi* e *L. braziliensis* é semelhante com a gerada nas infecções únicas por *L. braziliensis* (independente do inóculo). Entretanto, intensa presença de células vacuoladas, que representam degeneração tecidual, ocorre nas infecções mistas com maior intensidade.

Não há diferença na carga parasitária da área de lesão após curso clínico de 10 semanas entre infecções por *L. braziliensis* com inóculos iniciais distintos ($2,5 \times 10^6$ e 5×10^6 parasitos). Entretanto, a infecção por *L. braziliensis* com maior inóculo inicial alcança primeiro o linfonodo, refletindo maior carga parasitária neste órgão.

A infecção mista por *L. naiiffi* e *L. braziliensis* apresenta expressão de RNAm de IL-4, IL-10, IFN- γ e TNF- α na área de lesão, sendo esta última a mais abundante dentre as citocinas avaliadas. Comparada a infecções únicas pelas mesmas espécies, a infecção mista apresenta a maior expressão de RNAm de TNF- α , que pode explicar a degeneração tecidual e agravamento clínico.

Em resumo, sugerimos que as infecções mistas por *L. naiiffi* e *L. braziliensis* no modelo hamster levam ao desenvolvimento de uma doença mais grave do que infecções únicas por *L. braziliensis* (com a mesma quantidade de parasitos) e por *L. naiiffi* (com o dobro de parasitos), evidenciado pelo curso clínico apresentando lesões grandes e edemaciadas, pela intensa presença de células vacuoladas (degeneração tecidual) na área de lesão e pela alta expressão de TNF- α .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abdullah M. et al. Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 59 (2), p. 182-188, 1998.
2. Alidadi S. Oryan A. Cutaneous leishmaniasis and the strategies for its prevention and control. **Trop. Med. Surg.**, v.2, e114, 2014.
3. Alvar J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v.7 (5), e35671, 2012.
4. Ansari N. et al. Elevated levels of interferongamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin Immunol**, v. 119, p. 339–345, 2006.
5. Antoniou M. et al. Short report: treatment failure due to mixed infection by different strain of the parasite *Leishmania infantum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71 (1), p. 71-71, 2004.
6. Artun O. & Kavur H. Investigation of the spatial distribution of sandfly species and cutaneous leishmaniasis risk factors by using geographical information system technologies in Karaisali district of Adana province, Turkey. **J. Vector Borne Dis.**, v. 54, p. 233–239, 2017.
7. Bacellar O. et al. Interleukin 17 production among patients with american cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** v. 200, p. 75–78, 2009.
8. Bacellar O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6734–6740, 2002.
9. Banerjee A., et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cell Immunol.** doi:10.1016, 2016.
10. Barral A. et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.**, v. 147(4), p. 947–954, 1995.
11. Basano S. & Camargo L. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7(3), p. 328-337, 2004.

12. Bastrenda B. et al. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98 (2), p. 255-264, 2003.
13. Bates P. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Internat. Journal for Parasit.**, v. 37, p. 1097-1106. 2007.
14. Belkaid et al. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. **J. Immunol.**, v. 165 (2), p. 969-977. 2000.
15. Belkaid Y. et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of Anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **J. Exp. Med.**, v. 194 (10), p.1497–1506, 2001.
16. Bittar, R. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 625–630, 2007.
17. Bourreau E. et al. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous Leishmaniasis lesions and renders specific CD4+ T cells unresponsive to IL-12. **J. Infect. Dis.**, v. 183(6), p. 953–959, 2001.
18. Bouvier J. et al. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 37, p. 235–245, 1989.
19. Brittingham A., et al. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **J. Immunol.**, v. 155, p. 3102–3111, 1995.
20. Caldas A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**, v. 5, p. 113, 2005.
21. Campos M. et al. In vitro infectivity of species of *Leishmania (Viannia)* responsible for American cutaneous leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, v. 103(4), p. 771-776, 2008.

22. Carvalho E. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J. Immunol.**; v. 135(6), p. 4144–4148, 1985.
23. Castellano, L. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Hum. Immunol.**, v.70, p. 383–390, 2009.
24. Celeste J. et al. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology**, v. 144, p. 1191-1202, 2017.
25. Chajbullinova A. et al. The development of *Leishmania turanica* in sand flies and competition with *L. major*. **Parasit. Vectors**, v. 5, 2012.
26. Childs G. et al. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 78, p. 25-34, 1984.
27. Christoph K. et al. Congenital Transmission of Visceral Leishmaniasis (Kala Azar) From an Asymptomatic Mother to Her Child. **Pediatrics**, v. 104, 1999.
28. Coelho L. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 671-677, 2011.
29. Convit J. & La Penta P. Sobre un caso de leishmaniose disseminada. **Rev. Patología Clínica (Caracas)**, v. 17, p. 153-158, 1946.
30. Costa J. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p. 319–323, 1986.
31. Croan, D. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Mol. Biochem. Parasitol** v. 89, p. 149–159, 1997.
32. Cupolillo E. et al. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.50, p.296–311, 1994.

33. Cupolillo E. et al. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 93, p. 663–668, 1998.
34. Cupolillo S. et al. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. **Histol. Histopathol.**, v. 18 (4), p. 1059-1065, 2003.
35. Da Graça G. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 107(5), p. 664-74, 2012.
36. Da Silva-Couto L. et al. Intranasal vaccination with antigens protects golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 9, e3439, 2015.
37. Da Silva et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 11 (9), p. 1388-1398, 2006.
38. Davies C. et al. Leishmaniasis: new approaches to disease control. **BMJ.**, v. 326, p. 377-382, 2003.
39. De Brito M. et al. Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis. **Case Rep. Dermatol. Med.**, v. 2012: 279517, 2012.
40. De Souza V. et al. Different *Leishmania* species determine distinct profiles of immune and histopathological responses in CBA mice. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1807–1815, 2000.
41. Desjardins M. & Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 2061–2068, 1997.
42. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 239-243, 2001.
43. Desta et al. Module on leishmaniasis for the Ethiopian health center team. **Ethiopia: Debu University**; 2005.

44. Diaz N. et al. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 31, p. 114–117, 2006.
45. Dobson D. et al. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipo-phosphoglycan galactosylation pattern. **PLOS pathogens**. v. 6(11), e1001185, 2010.
46. Dumont A & Sheldon H. Changes in the fine structure of macrophages in experimentally produced tuberculous granulomas in hamsters. *Lab. Invest.*, v. 14(11), p. 2034-2055, 1965.
47. El Hajj L. et al. Localized cutaneous leishmaniasis imported into Paris: a review of 39 cases. **Int. J. Dermatol.**, v.43, p.120-125, 2004.
48. Engwerda C. et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **Am. J. Pathol.**, v. 161, p. 429–437, 2002.
49. Espir T. et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in amazonas state, Brazil. *J. Immunol. Res.*, doi:10.1155/2014/481750, 2014.
50. Espitia C. et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC Immunol.**, v.11:31, 2010.
51. Fadok V. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. **J. Clin. Investig**, v. 101, p. 890–898, 1998.
52. Faria D. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 7853–7859, 2005.
53. Fehniger T. & Caligiuri M. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. **Blood.**, v. 97(1), p. 14–32, 2001.

54. Ferreira E. et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. **BMC Veterinary Research**, v. 11(71), 2015.
55. Field V. et al. Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008. **BCM Infect. Dis.**, v. 10, p.330, 2010.
56. Figueira L. et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. **Acta Amaz.**, v. 47 (1), p. 47-52, 2017.
57. Fikre H. et al. Clinical features and treatment response of cutaneous leishmaniasis in North-West Ethiopia. **Trop. Med. Int. Health**, v. 22(10), p. 1293-1301, 2017.
58. Gabriel C. et al. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J. Immunol.**, v. 185, p. 4319–4327, 2010.
59. Gaze, S. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scand. J. Immunol.**, v. 63, p. 70–78, 2006.
60. Ghalib H. et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 324–329, 1993.
61. Giannitrapani L. et al. Progressive visceral leishmaniasis misdiagnosed as cirrhosis of the liver: a case report. **J. Med. Case Rep.**, v. 3, p. 7265, 2009.
62. Gomes-Silva et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology**, v. 140(6), p. 771-779, 2013.
63. Guerra J. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 5, e980, 2011.
64. Guimarães-Costa A. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, p. 6748–6753, 2009.

65. Guimarães L. et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 103, p. 712–715, 2009.
66. Hailu A et al. Elevated plasma levels of interferon (IFN)-gamma, IFN-gamma inducing cytokines, and IFN-gamma inducible CXC chemokines in visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71 p. 561–567, 2004.
67. Hailu A. et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clin. Immunol.**, v. 117, p. 182–191, 2005. (1)
68. Hailu A. et al. Visceral Leishmaniasis: New Health Tools Are Needed. **PLoS Med.**, v. 2(7), e211, 2005. (2)
69. Heinzl F. et al. Production of interferon γ , interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 7011-7015, 1991.
70. Herwaldt L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 345 (9.185), p. 1.191-1.199, 1999.
71. Hey A. et al. The major surface glycoprotein (gp63) from *Leishmania major* and *Leishmania donovani* cleaves CD4 molecules on human T cells. **J. Immunol.**, v. 152, p. 4542–4548, 1994.
72. Ikejima T. et al. Interleukin-1 induces tumor necrosis factor (TNF) in human peripheral blood mononuclear cells in vitro and a circulating TNF like activity in rabbits. **J. Infect. Dis.**, v. 162(1), p. 215–223, 1990.
73. Ivonise F. et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34(11), e54–e8, 2002.
74. Karp C. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 1644–1648, 1993.

75. Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 9, p. 604–615, 2011.
76. Kaye P. et al. Deficient expression of co-stimulatory molecules on *Leishmania*-infected macrophages. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, p. 2850–2854, 1994.
77. Kaye P. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p.239–253, 2004.
78. Kenney R. et al. Splenic cytokine responses in Indian kala-azar before and after treatment. **J. Infect. Dis.**, v. 177, p. 815–818, 1998.
79. Kropf P. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. **Faseb. J.**, v. 19 (8), p. 1000–1002, 2005.
80. Kurkjian K. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry A**, v. 69, p. 353–358, 2006.
81. Lainson R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão história sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev. Pan-Amaz. Saude**, v. 1(2), p. 13-32, 2010.
82. Lainson R., Ryan L. e Shaw J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 421-424, 1987.
83. Lane, R. Sandflies (Phlebotominae). **Medical Insects and Arachnids. Chapman and Hall,London**, p. 78–119, 1993.
84. Lehane M. Biology of blood-sucking insects. **London: Haper-Collins Academic**, 1991.
85. Lieke T. et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 153, p. 221–230, 2008.
86. Machado P. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 44, p. 788-793, 2007.

87. Machado P. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, p. 438–444, 2011.
88. Machado P. et al. Treatment of disseminated leishmaniasis with liposomal amphotericin B **Clin. Infect. Dis.**, v. 61, p. 945-949, 2015.
89. Madeira M. et al. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. and Hyg.**, v. 100(5), p. 442–445, 2006.
90. Magalhães A. et al. Histopatologia da Leishmaniose Tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*- 1.Padrões Histopatológicos e Estudo Evolutivo das Lesões. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28(4), p. 253-262, 1986.
91. Marsden P. Mucosal leishmaniasis (“spundia” Escomel, 1911). **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80:6, p. 859-876, 1986.
92. Mancheno-Valencia A. et al. Case report: disseminated cutaneous leishmaniasis (LCD). **Gac. Med. Mex.**, v. 153(2), p. 251-254, 2012.
93. Martin S. CD40 expression levels modulate regulatory T cells in *Leishmania donovani* infection. **J. Immunol.**, v. 185, p. 551–559, 2010.
94. Martinez E. et al. Co infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/.chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96 (5), p. 529-532, 2002.
95. Marzochi M. & Marzoqui K. Tegumentar and Visceral Leishmaniasis in Brazil – emerging anthrozoonosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saude Publica*, v. 10 (2), p. 359-375, 1994.
96. Maspi N. et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110:6, p. 247-260, 2016.

97. Matheoud D. et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. **Cell Host. Microbe.**, v. 14, p. 15–25, 2013.
98. Matta N. et al. Differences in the Antigenic Profile and Infectivity of Murine Macrophages of *Leishmania (Viannia)* Parasites. **Journal of Parasitology.**, v. 96(3), p. 509-515, 2010.
99. Matthews D. et al. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **J Immunol.**, v. 164(3), p. 1458–1462, 2000.
100. Mattner F. et al. Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. **Eur. J. Immunol.**, v. 26(7), p. 1553–1559, 1996.
101. Mcgwire B. et al. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1008–1010, 2003.
102. Mcgwire B. & Satoskar A. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q. J. Med.**, v. 107, p. 7–14, 2014.
103. McMahon-Pratt D. & Alexander J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniases or the visceral disease? **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 206–224, 2004.
104. Mebrahtu Y. et al. Concurrent infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania major* in a Kenyan patient: clinical description and parasite characterization. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 45 (3), p. 290-296, 1991.
105. Melby P. et al. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 837–842, 1994.
106. Melby P. et al. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like response. **J. Immunol.**, v. 166, p. 1912–1920, 2001.

107. Ministério da Saúde. <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>. Acessado em 07 de março de 2018.
108. Mir F. et al. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *J. Small Anim. Pract.*, v. 53(7), p. 419-22, 2012.
109. Moraes M & Silveira F. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 36, p. 459-463, 1994.
110. Morgan D. et al. Cutaneous leishmaniasis during pregnancy: exuberant lesions and potential fetal complications. **Clin. Infect. Dis.**, v.45, p. 478–482, 2007.
111. Murray J. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
112. Naiff et al. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 317-321, 1991.
113. Nylen S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med**, v. 204, p. 805–817, 2007.
114. Noyes H. A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* sp. **Parasitology**, v. 124, p. 17–24, 2002.
115. Okwor I. & Uzonna J. The immunology of *Leishmania*/ HIV coinfection. **Immunol. Res.**, v.56, p.163-171. 2013.
116. Oliveira, F. et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 70–73, 2011.
117. Oliveira, W. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, p. 127–132, 2014.

118. Ordaz-Farias A. et al. Case report: Transient success using prolonged treatment with miltefosine for a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana mexicana*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88(1), p. 153-6, 2013.
119. Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde, 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index>.
120. Osorio E. et al. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PLoS Pathog**, 8:e1002417, 2012.
121. Pace D. Leishmaniasis. **J. Infect.**, v. 69, p. s10-s18, supplement 1, 2014.
122. Pan American Health Organization (PAHO). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas: Washington: Pan American Health Organization. www.paho.org/leishmaniasis. 2018.
123. Peacock C. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.**, v. 39, p. 839–847, 2007.
124. Pimenta P. et al. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. **Parasitology**, v. 115, p. 359-369. 1997.
125. Prina E. et al. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. **Microbes and Infection**, v:9: 11, p. 1307-1315, 2007.
126. Rafizadeh S. et al. Molecular Detection of *Leishmania major* and *L. turanica* in *Phlebotomus papatasi* and First Natural Infection of *P. salehi* to *L. major* in North-East of Iran. **J. Arthropod-Borne Dis.**, v.10 (2), p. 141-147, 2016.
127. Rangel E. et al. Biology of *Lutzomyia intermedia* Lutz & Neiva, 1912 and *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 (Diptera, Psychodidae), under experimental conditions. I. Feeding aspects of larvae and adults. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, p. 431-438, 1986.

128. Ravichandran K. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. **J. Exp. Med**, v. 207, p. 1807–1817, 2010.
129. Rebêlo J. et al. Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of Lagoas, a city of Buriticupu, Amazonia of Maranhão. I. The richness and relative abundance of the species in an area of recent colonization. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33 (1), p. 11-19, 2000.
130. Reis S. & Franco A. A Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado do Amazonas, Brasil. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Canina. **Revista CFMV**, v. 50, p. 35-40, 2010.
131. Ribeiro-Romão R. et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. **Infect Immun.**, v. 82(12), p. 5203–5213, 2014.
132. Ridley D. et al. Histological analysis and the pathogenesis of mucocutaneous leishmaniasis. **J. Pathol.** v. 159, p. 293–299, 1989.
133. Rogers M., Chance M. & Bates P. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Parasitology**, v. 124, p. 495-507, 2002.
134. Safa S. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in an 11-year-old girl with ataxia telangiectasia– case report. **Libyan J. Med.**, v.10, 2015.
135. Salhi A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **J. Immunol.**, v. 180(9), p. 6139–6148, 2008.
136. Santos-Oliveira J. et al. Atypical Lesions as a Sign of Cutaneous Dissemination of Visceral Leishmaniasis in a Human Immunodeficiency Virus–Positive Patient Simultaneously Infected by Two Viscerotropic *Leishmania* Species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85(1), p. 55-59, 2011.

137. Saraiva E. et al. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, v. 110, p. 39-47, 2005.
138. Saraiva M. & O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10(3), p. 170–181, 2010.
139. Sasannejad P. et al. Leishmaniasis with Femoral Bone Involvement. **Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan**, v. 26, S37-S38, 2016.
140. Savoia et al. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 9(6), p. 588-596, 2015.
141. Scharon T. & Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.**, v. 178, p. 567–577, 1993.
142. Schlein Y., Jacobson R. & Messer G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and impede parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 89, p. 9944-9948, 1992.
143. Schoenborn J. & Wilson C. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Adv. Immunol.**, v. 96, p. 41–101, 2007.
144. Scott P. & Novais F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Review Immunology**, v.16, p. 581-592, 2016.
145. Scorza B. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 1-26, 2017.
146. Shirian S. et al. Mixed mucosal leishmaniasis infection caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50 (11), p.3805-3808, 2012.
147. Silva F. Forma raríssima de leishmaniose tegumentar. Leishmaniose dérmica não ulcerada em nódulos extensas placas infiltradas e hiperpigmentadas. **Separata do volume da Reunião Anual de Dermato-sifilógrafos Brasileiros**, Rio de Janeiro, 1946.

148. Silva F. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev. Trop. – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1(1), p. 20-31, 2007.
149. Silveira F. et al. Experimental cutaneous leishmaniasis. III -Histopathological aspects of the developmental behavior of cutaneous lesions induced in the *Cebus apella* monkey (Primates: Cebidae) by *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 32, p. 387-394, 1990.
150. Silveira F. et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de Leishmânias: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 26 (5), p. 272-275, 1984.
151. Silveira F. et al. Revisão sobre a Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Rev. Para. Med.**, v. 22(1), 2008.
152. Sinagra A. et al. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 40(6), p. 627–630, 2007.
153. Soares I. et al. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet. Parasit.*, v. 197 (3-4), p. 665-669, 2013.
154. Stanley A. & Engwerda C. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol. Cell Biol.*, v. 85, p. 138–147, 2007.
155. Strelkova M. et al. Mixed leishmanial infections in *Rhombomys opimus*: a key to the persistence of *Leishmania major* from one transmission season to the next. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 95 (8), p. 811-819, 2001.
156. Tacchini-Cottier F. et al. Does T helper differentiation correlate with resistance or susceptibility to infection with *L. major*? Some insights from the murine model. **Frontiers Immunol.**, v. 3, p. 1–9, 2012.

157. Torres O. A leishmaniose na Bahia. **Arquivos Brasileiros de Medicina**, v. 7, p. 374-425, 1920.
158. Van der Snoek E. et al. Spontaneous cure of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania naiffi* in two Dutch infantry soldiers. **Clin. Exp. Dermat.**, v. 34, e889-e891, 2009.
159. Veland N. et al. Simultaneous Infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) lainsoni* in a Peruvian Patient with Cutaneous Leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 88 (4), p. 744-777, 2013.
160. Verma S. et al. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. **PLoS One** 5:e10107, 2010.
161. Vinet A. et al. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V. **PLoS Pathog**, 5 e1000628, 2009.
162. Walters L. et al. Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, p. 211-228, 1992.
163. Wanderley J. et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One**, v. 4(5), e5733, 2009.
164. WHO. **Leishmaniasis - Media centre**. 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acessado em 11 de janeiro de 2018.
165. Wilson H. et al. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in *Golden* hamsters. **Experimental Parasitology**, v. 47, p. 270- 283. 1979.
166. Wilson M. et al. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microb. Pathog.**, v. 38, p. 147–160, 2005.

167. Wright J. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer (“Delhi Sore”). **J. Med. Res.**, v.10 (3), p. 472-482, 1903.
168. Wu W. et al. A live *Leishmania major* vaccine containing CpG motifs induces the *de novo* generation of Th17 cells in C57BL/6 mice. **Eur. J. Immunol.**, v. 40(9), p. 2517–2527, 2010.
169. Xiao-qiang Yang et al. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile* infected animal model. **BMC Gastroenterology**, v. 13(117), 2013.
170. Zamorano J. et al. Interleukin-4: a multifunctional cytokine. **Immunologia.**, v. 22(2), p. 215–224, 2003.
171. Zandbergen G. et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculums. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 13837–13842, 2006.
172. Zivcec M. et al. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **J Immunol Methods.**, v. 368(1–2), p. 24–35. 2011.