

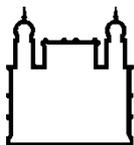
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*)

THAIS BRAGA GOMES ARAUJO

Rio de Janeiro
Novembro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária

THAIS BRAGA GOMES ARAUJO

Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*).

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária.

Orientadora: Dra. Alda Maria da Cruz

RIO DE JANEIRO

Novembro de 2020

Braga Gomes Araujo, Thais.

Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*). / Thais Braga Gomes Araujo. - Rio de Janeiro, 2020.

xx, 63 f.; il.

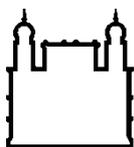
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2020.

Orientadora: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: f. 52-63

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2. Hamster dourado. 3. Citocinas. 4. iNOS. 5. Arginase. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Biologia Parasitária

THAIS BRAGA GOMES ARAUJO

Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*).

ORIENTADORA: Prof^a. D^{ra}. Alda Maria da Cruz.

Aprovada em: 23/11/2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral – **Presidente** (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr^a Rachel Ann Hauser-Davis (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr^a Patrícia Maria Lourenço Dutra (Faculdade de Ciências Médicas/UERJ)

Prof. Dr. Renato Porrozi, de Almeida (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr^a Maria Jania Teixeira (Faculdade de Medicina/Universidade Federal do Ceará)

Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2020

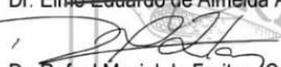


Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Thais Braga Gomes Araujo**, sob orientação da Dr^a. Alda Maria da Cruz. Ao vigésimo terceiro dia do mês de novembro de dois mil e vinte, realizou-se às treze horas e trinta minutos, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: "**Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*)**"., no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia e Patogênese de Doenças Infecciosas e Parasitárias A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Rachel Ann Hauser-Davis– IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Patrícia Maria Lourenço Dutra – UERJ/RJ e como suplentes: Dr. Renato Porrozi de Almeida- IOC/FIOCRUZ e Dr^a. Maria Jania Teixeira - UFC/CE. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 23 de novembro de 2020.


Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral (Presidente da Banca):


Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

À minha mãe, por ter sido minha
inspiração em todos os dias de sua vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me sustentar e me iluminar todos os dias. Não seria nada sem a sua graça e favor diários.

À minha mãe, que não está mais presente fisicamente, mas cujos esforços e palavras de incentivo me fizeram chegar aonde cheguei hoje. Ninguém jamais me amou como você, mãe. Sua vida e história sempre foram dedicadas à nossa família e seu carinho vai sempre ecoar dentro de mim. Mesmo que eu vivesse mil anos, jamais seria capaz de expressar toda a gratidão e amor que tenho por você. Espero ansiosamente por encontrá-la na eternidade.

Ao meu esposo Douglas, por estar ao meu lado e ser o meu apoio e companheiro em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis.

Ao meu pai e irmão, Thiago. Vocês me fazem ter ânimo para lutar.

À doutora Alda, por me acolher em seu laboratório e por acreditar em mim, mesmo nas vezes em que eu não acreditava mais. Muito obrigada pela paciência, pela compreensão, pelos conselhos, por estar ao meu lado, pelas conversas científicas e pessoais. Você é uma pessoa iluminada, em todos os sentidos. Se um dia for um pouquinho do que você é, já estarei realizada.

À doutoranda Milla por compartilhar seu conhecimento comigo, pelas longas discussões científicas até tarde, pelos conselhos e por toda ajuda que me proporcionou nesses dois anos de mestrado. Sem dúvidas, esta dissertação não seria realizada sem a sua contribuição.

À doutora Márcia, por ser tão gentil e contagiar a todos com o seu jeito humilde e descontraído. Muito obrigada por sempre estar disponível para me ajudar e por toda paciência e excelência ao me orientar na condução da imunohistoquímica e das análises histopatológicas. Você é um ser humano incrível.

Ao doutor Antônio, pela sua alegria e por me ajudar, juntamente com a Márcia, a realizar a imunohistoquímica. Te admiro muito como pessoa e profissional.

À doutora Raquel, pelos conselhos, caronas e companhia no laboratório. Jamais vou me esquecer de que você abdicou do seu tempo, nas raras vezes que pôde vir ao Rio, para nos ajudar com a condução dos experimentos de PCR.

Ao doutor Otacílio Moreira, por sua grande contribuição nas análises de PCR, na construção dos mapas de calor e por todo conhecimento científico que compartilhou conosco.

Ao doutor Adriano Gomes da Silva, por toda ajuda nas análises, pela ajuda na discussão dos resultados e elaboração dos gráficos e por ser uma pessoa disponível e que sempre agrega valor no que faz. Te agradeço imensamente por tudo.

À mestre Larissa Resende, que não conheci pessoalmente, mas cujo estudo inspirou e forneceu dados importantíssimos para a condução deste trabalho.

Ao Dr. Hermano Lathema pela realização da análise multivariada.

À Tayany de Deus, pelas conversas e pela amizade.

À Prisciliana por ser sempre tão querida e gentil.

Ao Clébio por sua alegria contagiante.

À Maria, Luciana e todos os demais membros do LIPMED.

À minha terapeuta Camila Kurdian por me ajudar, me acolher e me mostrar que há sempre uma saída. Você é uma profissional e ser humano incrível e sempre me atende com muito carinho e empatia.

A Renata e ao Magno, pelo apoio e compreensão.

À Ana, pela ajuda com a formatação das figuras e do trabalho.

À Lucianne Fragel e ao Enrico Saggiore, por me iniciarem no mundo da pesquisa científica.

À Paulinha, Karen e Iohana pela amizade que se iniciou na UFF e perdura até hoje.

Ao CNPq e aos demais órgãos de fomento.

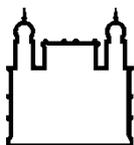
À Rita e à pós-graduação em Biologia Parasitária.

À população, que através de seus impostos financia nossas pesquisas. Vocês são o motivo pelo qual, mesmo no cenário político e financeiro atual, nos empenhamos em fazer ciência neste país.

À banca, por aceitar o convite de avaliar o meu trabalho.

“Eu sonho com um país onde a educação
prevalecerá.”

(Malala Yousafzai)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Padrões imunopatológicos que influenciam no desfecho clínico das lesões cutâneas ocasionadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*)

RESUMO

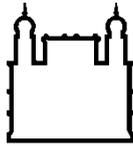
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Thais Braga Gomes Araujo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de ampla incidência, cuja principal espécie envolvida é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Um modelo promissor para estudo dessa doença é o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*). Resultados prévios de nosso grupo utilizando esse modelo e crescentes inóculos do parasito (10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* /20 μ L) demonstraram que o tamanho e gravidade das lesões não foram proporcionais ao inóculo e que aos 50 dias de infecção, as lesões ocasionadas pelos inóculos de 10^5 e 10^6 evoluíram similarmente. Isso sugere que há características particulares que influenciam no desfecho e evolução da doença. Baseado nisso, objetivamos descrever as características histopatológicas, determinar o perfil de citocinas (IFN γ , IL-10, TGF- β , TNF, IL-4 e IL-6) e enzimas (iNOS e arginase) em 4h, 24h, 15, 30 e 50 dias pós-infecção (dpi) em peles de hamsters infectados com *L. (Viannia) braziliensis*. Para isso, utilizamos técnicas histopatológicas e PCR em tempo real. Também detectamos igG anti-*Leishmania* por meio de ELISA. Fizemos análises em rede e paramétrica desses biomarcadores e imunohistoquímica anti-*Leishmania* às 4h e 24h. Observamos que, o tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional ao inóculo. Contudo, o aspecto e a mediana do tamanho das lesões e presença de IgG foram diretamente proporcionais ao tempo de infecção e ao inóculo. Até 15 dpi, o parasito se replicou ativamente sem sinais clínicos. O aparecimento de lesões coincidiu com o aumento de TGF- β . A arginase aumentou até 50 dpi, o que favoreceu a replicação parasitária. Houve também aumento de iNOS na maior parte dos animais nesse período, o que não conteve a carga parasitária. Houve modulação positiva de IL-6, IL-10 e IL-4 nos animais dos inóculos

10⁵ e 10⁶, mas não nos inoculados com 10⁴ parasitos às 4h. Às 24h, houve indução de IFN- γ e TNF. Foram observadas às 4h antígenos de *Leishmania* fragmentados e às 24h algumas amastigotas íntegras. A análise multivariada mostrou que IFN- γ foi a única citocina que impactou na evolução clínica. As análises de rede mostraram que os animais infectados com 10⁴ promastigotas/20 μ L e aqueles que, independentemente da carga parasitária evoluíram com controle da doença tiveram um maior número de interações positivas.

Palavras-Chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; Hamster dourado; Citocinas; iNOS; Arginase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IMMUNOPATHOLOGICAL PATTERNS THAT INFLUENCE THE CLINICAL OUTCOME OF SKIN LESIONS CAUSED BY LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS IN THE GOLDEN HAMSTER MODEL (MESOCRICETUS AURATUS)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITIC BIOLOGY

Thais Braga Gomes Araujo

American cutaneous leishmaniasis (ACL) is a wide-incidence disease, mainly caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) has showed up as a promising model to study this disease. Previous results from our group using increasing parasite (10^4 , 10^5 and 10^6 *L. braziliensis* promastigote/20 μ L) inoculum in this model demonstrated that injuries' size and severity were not proportional to the inoculum, and that on the 50th day of infection, injuries induced by 10^5 and 10^6 inoculum had similar development. This data suggests that particular characteristics have an effect on ACL outcome and evolution. Thus, we aimed to describe histopathological characteristics, and to determine the profile of cytokines (IFN γ , IL-10, TGF- β , TNF, IL-4 e IL-6) and enzymes (iNOS and arginase) at 4h, 24h, 15 days, 30 days and 50 days post-infection (dpi) in hamster's skin infected with *L. (Viannia) braziliensis*. Therefore, we used histopathological techniques and real-time PCR. Also, we detected anti-Leishmania IgG through ELISA. At 4h and 24h post-infection, we performed network and parametric analyses, and anti-Leishmania immunohistochemistry. The time of injuries' onset was inversely proportional to the inoculum. However, aspect and size of injuries, and IgG presence were directly proportional to the time of infection and inoculum. Until 15 dpi, parasite actively replicated without any clinical signs. However, injuries' onset coincided with TGF- β increase. Arginase increased up to 50 dpi, which worked in favor of parasitic replication. During this period, most animals presented an iNOS increase, which did not prevent parasitic replication. There was positive modulation of IL-6, IL-10 and IL-4 on models infected with 10^5 and 10^6 inoculums, but not on those inoculated with 10^4 parasites, at four hours post infection. Within 24h, there was IFN- γ and TNF

induction. In addition, at 4h post-infection, we observed *Leishmania* fragmented antigens, and at 24 hours, some intact amastigotes. Multivariate analysis showed that IFN- γ was the only cytokine that actually impacted clinical evolution. Network analysis showed that animals infected with 10^4 promastigotes/20 μ L inoculum, and those who have evolved to disease control, regardless of parasite load, had a greater number of positive interactions.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; Golden hamster; Cytokines; iNOS; Arginase.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Características gerais das leishmanioses.....	1
1.1.1 Aspectos epidemiológicos das leishmanioses.....	1
1.1.2 Agente etiológico e ciclo biológico.....	3
1.1.3 Formas clínicas da leishmaniose.....	5
1.1.4 O Modelo Experimental Hamster Dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>).	8
1.1.5 O Hamster Dourado Como Modelo da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).....	9
1.1.6 Resposta Imune Inicial na leishmaniose tegumentar Americana e imunopatogênese no modelo hamster.....	11
1.2 Justificativa.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODO.....	17
3.1 Parasitos utilizados para infecção.....	17
3.2 Animais de experimentação.....	18
3.3 Infecção experimental dos hamsters por <i>leishmania (viannia) braziliensis</i>.....	18
3.4 Características clínicas e morfometria das patas dos hamsters pós infecção por <i>leishmania (viannia) braziliensis</i>.....	18
3.5 Procedimentos para realização de eutanásia nos animais.....	19
3.6 Processamento dos tecidos para avaliação histopatológica e coloração histológica pela técnica de hematoxilina-eosina.....	20
3.7 Detecção de antígenos de <i>leishmania (vianna) braziliensis</i> na pele e no linfonodo dos hamsters por imuno-histoquímica.....	21
3.8 Quantificação de imunoglobulinas anti-<i>leishmania</i>.....	22
3.9 Análise da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase por ensaio de PCR em tempo real.....	23
3.9.1 Extração de ácidos nucleicos e transcrição reversa.....	23

3.9.2	Análise da expressão gênica por transcriptase reversa-PCR quantitativa (rt-qPCR).....	24
3.10	Quantificação da carga parasitária por pcr quantitativa (qPCR)	26
3.11	Clusterização de amostras e elaboração do gráfico intensidade de cores (<i>heatmap</i>).....	26
3.12	Análises estatísticas.....	27
4	RESULTADOS.....	28
4.1	Aspectos clínicos e histopatológicos.....	28
4.2	Cinética de anticorpos igG anti-<i>leishmania</i> após infecção por diferentes inóculos de <i>leishmania (viannia) braziliensis</i>.....	29
4.3	Carga parasitária e associação com a expressão de arginases e iNOS.....	29
4.4	A carga parasitária de <i>leishmania (viannia) braziliensis</i> está relacionada com o padrão de citocinas induzido pelo parasito.	33
4.5	A assinatura gênica das citocinas parece estar relacionada com a baixa carga parasitária, mas não à progressão da doença.....	36
4.6	Uma intensa rede de interação positiva entre as citocinas é mantida entre os animais capazes de controlar a doença.....	40
5	DISCUSSÃO.....	44
6	CONCLUSÕES.....	50
7	PERSPECTIVAS.....	51
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no mundo.....	2
Figura 2	Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i> , ressaltando as formas evolutivas do parasito e os hospedeiros humano e invertebrado.....	5
Figura 3	Diferentes estágios de evolução clínica da leishmaniose cutânea.....	8
Figura 4	Comparação entre a evolução das lesões causadas por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> no modelo Balb/C (A) e no hamster dourado (B), mostrando que neste último as lesões apresentam curso crônico e progressivo.....	10
Figura 5	Recrutamento da resposta imune inata durante a infecção por <i>Leishmania</i>	13
Figura 6	Resumo da resposta imune celular e produção de citocinas na infecção por <i>Leishmania spp.</i>	14
Figura 7	Desenho experimental do presente estudo.....	17
Figura 8	Aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos da infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em hamster dourado nas fases precoces e tardia.....	31
Figura 9	Imunohistoquímica para detecção de antígenos de <i>Leishmania</i> em 4hpi e 24hpi.....	32
Figura 10	Mudança de dobra relativa entre as expressões gênicas de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> em relação a animais não infectados.....	35
Figura 11	Mapas de calor de expressão gênica em lesões de pele ocasionadas por <i>L. (V.) braziliensis</i>	38
Figura 12	Clusterização dos aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos dos animais infectados por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> , de acordo com a assinatura de expressão gênica observada na Figura 10B (clusters: 1A1, 1A2, 1B, 2A, 2B1 e 2B2).....	39
Figura 13	Redes de biomarcadores envolvidos nas fases precoces e tardia do curso da infecção por <i>Leishmania (Viannia)</i>	42

	<i>braziliensis</i> em hamsters.....	
Figura 14	Redes de biomarcadores envolvidos nos hamsters que controlaram a infecção e nos que evoluíram com doenças progressivas.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação em escores dos parâmetros clínicos de hamsters dourados infectados com <i>L. (Viannia) braziliensis</i>	19
Tabela 2	Avaliação em escores dos parâmetros histopatológicos de hamsters dourados infectados com <i>L. (Viannia) braziliensis</i>	21
Tabela 3	Alvos e sequências de indicadores desenhados para quantificação de citocinas, iNOS e arginase de hamster dourado utilizados nos ensaios de RT-qPCR em Tempo Real.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar (do inglês: <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>)
CP	Carga parasitária
Ct	Do inglês: <i>CycleThreshold</i>
DC	Célula dendrítica (do inglês: <i>Dendritic cells</i>)
Dpi	Dias pós infecção
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Do inglês: <i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
Fw	Do ingles: <i>Forward</i>
Hpi	Horas pós infecção
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-23	Interleucina 23
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida (do inglês: <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
LA	Leishmaniose atípica
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LDiss	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa /mucocutânea
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês: <i>Neutrophil</i>)

	<i>extracellular traps</i>)
NO	Óxido nítrico
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: <i>Peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Solução salina fosfatada tamponada (do inglês: <i>Phosphate buffer solution</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
RT-qPCR	Transcrição Reversa quantitativa da reação em cadeia pela polimerase (do inglês: <i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>)
Rv	Do inglês: <i>Reverse</i>
ssDNA	DNA de fita simples (do inglês <i>single-stranded DNA</i>)
T CD4+	Linfócitos ou células T CD4+
T CD8+	Linfócitos ou células T CD8+
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta (do inglês: <i>transforming growth fator beta</i>)
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do Tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>tumor necrosis factor</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características gerais das leishmanioses

1.1.1. Aspectos epidemiológicos das leishmanioses

A leishmaniose é uma doença infecciosa que afeta milhares de pessoas ao redor do mundo e está incluída na lista de doenças negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018). Sua ocorrência está intimamente associada a fatores socioeconômicos, tais como pobreza, desmatamento, urbanização acelerada, habitações precárias, movimentos migratórios, má nutrição, dentre outros (WHO, 2018).

Anualmente, são reportados cerca de 900.000 - 1,3 milhão de novos casos de leishmaniose no mundo, sendo que 50.000 casos evoluem a óbito, especialmente decorrente da forma visceral da doença, quando não tratados. Há, aproximadamente, 20 espécies de *Leishmania spp.* causadoras da doença em humanos e mais de 70 espécies animais constituem-se reservatórios do parasito (WHO, 2018). Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam sujeitas a desenvolver a doença, uma vez que esta é endêmica em 102 países ou territórios e há casos notificados nos cinco continentes (OPAS, 2019). Atualmente, as leishmanioses estão entre as seis doenças infecto-parasitárias de maior impacto mundial. Dentre as doenças causadas por protozoários, está na segunda colocação dentre as doenças notificáveis de maior importância médica, perdendo apenas para a malária em número de mortes (Ghorbani; Farhoudi, 2018).

A Leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença, a qual, se não tratada, levará o portador a óbito em mais de 95% dos casos. Anualmente, ocorrem cerca de 0,2 a 0,4 milhão de novos casos de LV no mundo (Anversa *et al.*, 2018). Mais de 90% desses ocorrem nos seguintes países: Bangladesh, Brasil, Etiópia Índia, Sudão do Sul e Sudão. No Brasil, somente no ano de 2017 (ano mais recente de vigilância), foram reportados 4.103 casos de LV no Brasil, sendo que a maior parte ocorreu na região Nordeste (44,5%), em pacientes do sexo masculino (64,8%) e 48,9% dos casos ocorreram em crianças de 0-9 anos. Outro dado importante é que 7,8% dos pacientes encontram-se coinfetados com o vírus HIV (Ministério da Saúde, 2017a).

A Leishmaniose tegumentar (LT), por sua vez, destaca-se por representar a grande maioria dos casos de leishmaniose e por ser uma doença dermatológica de grande impacto físico e social. Ela é um agravo de saúde pública em 85 países, com cerca de 0,7 a 1,3 milhão de novos casos no mundo. A Figura 1 evidencia a incidência da forma cutânea desta doença a nível global. No Brasil, entre os anos de 2001 a 2017, a média anual de novos casos foi de 55.317. A doença afeta majoritariamente o sexo masculino (72,7% dos infectados em 2017). Porém, ao contrário da LV, apenas 8% dos casos ocorrem em menores de 10 anos, constituindo-se uma doença que tem características ocupacionais. Estima-se que 0,7% dos pacientes diagnosticados com LT estejam coinfectados com o vírus HIV (Ministério da Saúde, 2017b).

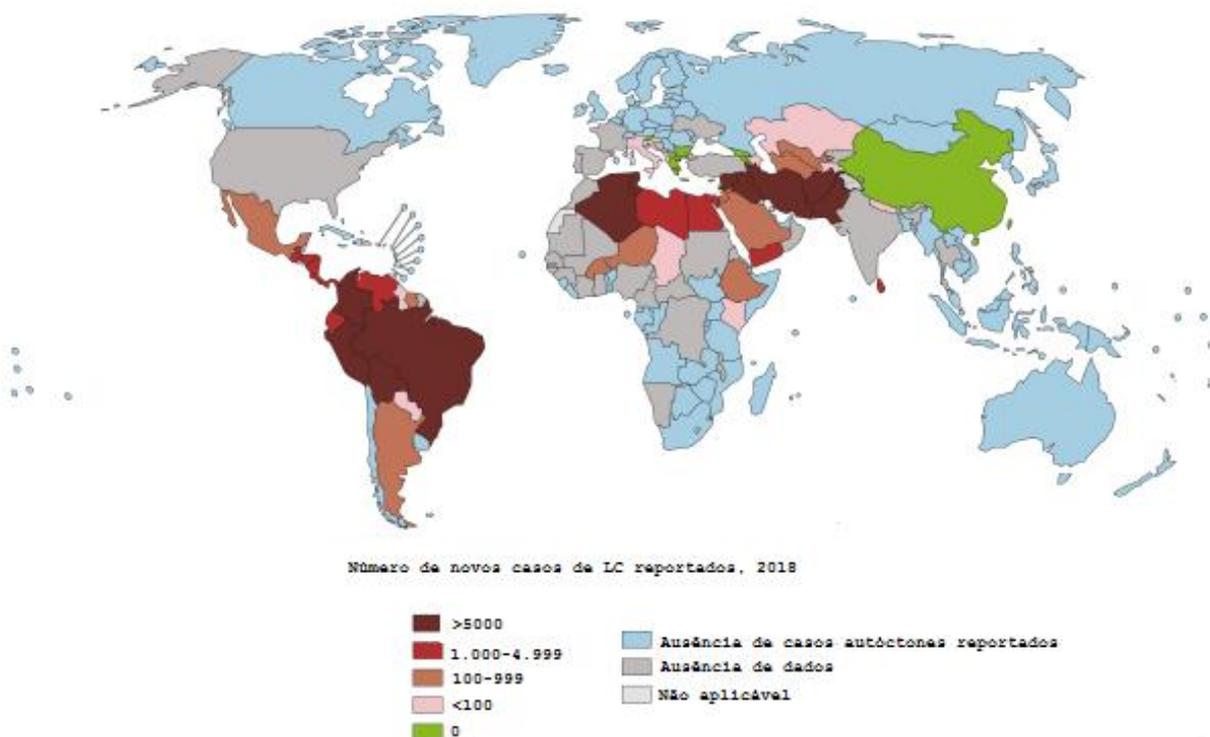


Figura 1: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea no mundo. Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde (WHO) (2018).

Em relação à Leishmaniose tegumentar americana (LTA), há três padrões epidemiológicos de transmissão bem definidos: 1. transmissão silvestre: zoonose em animais silvestres que acomete o homem quando este adentra em áreas de vegetação; 2. transmissão ocupacional e de lazer: zoonose que ocorre quando há atividades de exploração da floresta para desenvolvimento de hidrelétricas, pecuária, instalação de povoados, treinamentos de cunho militar, ecoturismo, etc.; 3.

transmissão rural e Peri urbana: transmissão associada à migração e à construção de casas em centros urbanos próximos a matas residuais (Ministério da Saúde, 2017b; OPAS, 2019).

1.1.2. Agente etiológico e ciclo biológico

Os agentes causadores da leishmaniose são parasitos do gênero *Leishmania*, os quais ocupam a seguinte classificação filogenética: Reino: PROTISTA, Sub-reino: PROTOZOA, Classe: ZOOMASTIGOPHOREA, Ordem: KINETOPLASTIDA, Família: TRYPANOSOMATIDAE, Gênero: *Leishmania*, Subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, (Rey, 2010). Há, aproximadamente, 22 espécies patogênicas aos humanos e 15 delas são encontradas nas Américas (WHO, 2018). Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxenos e possuem duas formas evolutivas durante o seu ciclo de vida: promastigotas e amastigotas. São dotados de uma organela chamada cinetoplasto (por isso pertencem à ordem Kinetoplastida), a qual é bem evidente em ambas as formas e uma única mitocôndria presente nesses parasitos (Simpson, 1987; Stuart; Feagin, 1992). A forma promastigota é extracelular, possui flagelo livre, corpo alongado e mede cerca de 14 a 20 μm . Já a amastigota é intracelular, ovoides, imóvel (apresenta flagelo internalizado) e possui entre 2,1 a 3,2 μm de comprimento (Pessoa; Martins, 1982).

Os vetores de *Leishmania* spp. são fêmeas de flebotomíneos infectadas. Esses animais são pequenos insetos que pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Torres-Guerrero *et al.*, 2017). O hábito alimentar principal desses animais é a fitofagia. Contudo, as fêmeas necessitam da hemoglobina para maturar seus ovos, após a cópula, e por isso buscam hospedeiros vertebrados para obter sangue. É nesse momento que adquirem o parasito ou que o inoculam em um novo hospedeiro (Pace, 2014).

Ao picar um hospedeiro infectado, essas fêmeas adquirem o parasito na forma amastigota. Estas migram para o intestino médio do inseto, aonde dão origem à forma promastigota procíclica. Após, esta forma é convertida a promastigota metacíclica, mais infectante, em um processo chamado metaciclogênese (Silva Júnior *et al.*, 2015; Bates, 2018). Além do aumento da infectividade, durante este processo, o parasito sofre mudanças morfológicas, bioquímicas e de expressão

gênica. Dentre as mudanças mais proeminentes, pode-se destacar a expressão da metaloprotease de superfície GP-63, uma glicoproteína dependente de zinco também conhecida como leishmaniolisina, a qual regula negativamente a atividade e função de células do sistema imune inato do hospedeiro. Outra molécula importante que é expressa é o lipofosfoglicano (LPG), que tem ação negativa direta sobre a função dos macrófagos (Olivier *et al*, 2012). Essas mudanças estão relacionadas com uma maior virulência do parasito e maior capacidade de sobrevivência à ação do sistema imunológico (Sacks, 1989). De fato, promastigotas metacíclicas são mais infectivas aos macrófagos e mais resistentes à lise mediada pelo sistema complemento (Zakai *et al.*, 1998). Por fim, a forma promastigota metacíclica poderá ser inoculada em outro hospedeiro durante um novo repasto sanguíneo (Pace, 2014).

No hospedeiro vertebrado, a forma promastigota metacíclica é fagocitada por células do sistema monocítico fagocitário, sobretudo macrófagos, onde ficam abrigadas nos fagolisossomos e dão origem à forma amastigota. Esta forma se multiplica ativamente no interior dessas células por meio de divisão binária, o que causa o seu rompimento. As amastigotas recém-formadas ficam então livres para serem internalizadas por novos fagócitos. Caso esse hospedeiro seja novamente picado por um flebótomo, este irá adquirir as formas amastigotas, reiniciando o ciclo (Pace, 2014) (Figura 2).

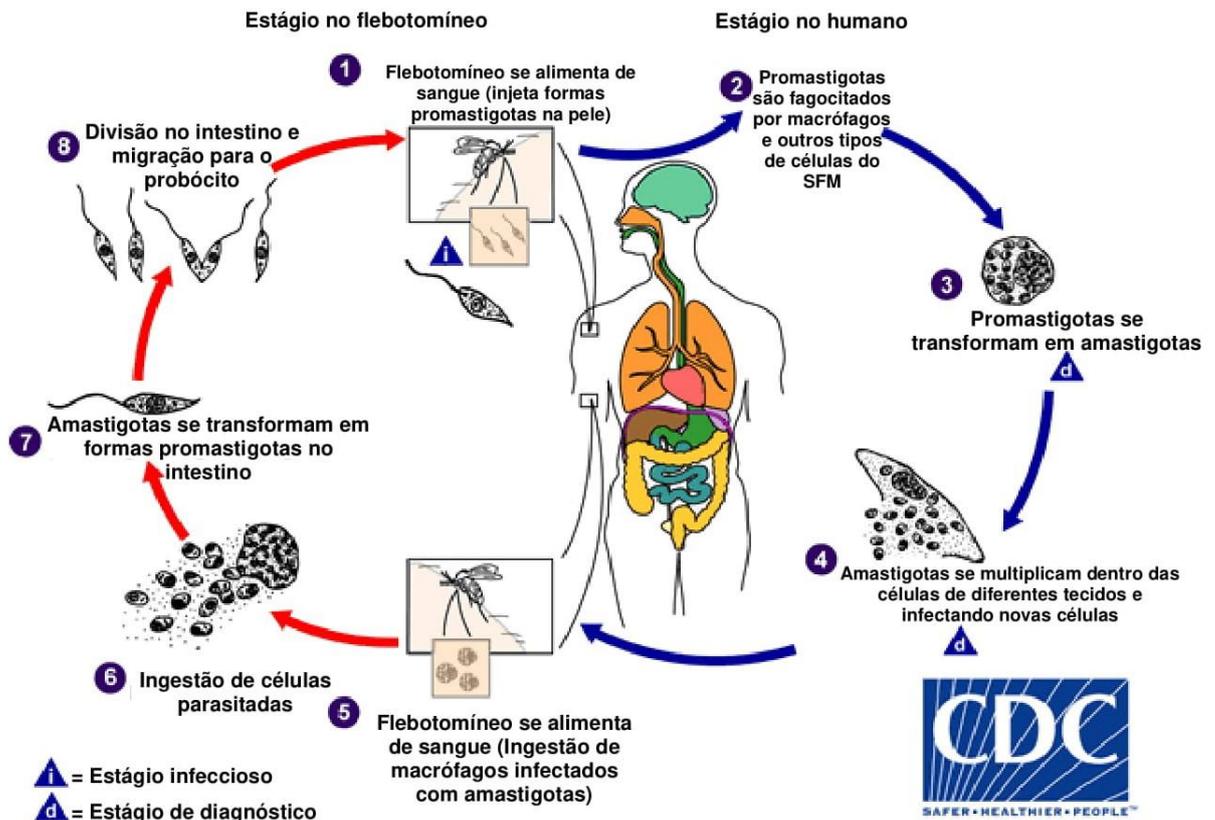


Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania sp.*, ressaltando as formas evolutivas do parasito e os hospedeiros humano e invertebrado. Fonte: Adaptado de CDC (2017).

1.1.3. Formas clínicas da leishmaniose

As formas evolutivas nas diferentes espécies de *Leishmania* são morfologicamente muito similares e, dependendo dos tipos celulares envolvidos na infecção e da resposta imune do hospedeiro, podem causar as duas formas clínicas já citadas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar. Na LV, os parasitos, após infectarem os macrófagos da pele e se multiplicarem, provocam sua lise e se disseminam para a corrente sanguínea. Por via hematogênica, podem então atingir células mononucleares fagocíticas do retículo endotelial de órgãos como baço, fígado e linfonodos (Wilson *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2014, Ibrahim *et al.*, 2014). Quando a infecção se restringe à pele e a mucosas, no entanto, a manifestação da doença ocorre na forma tegumentar (LT), uma vez que os macrófagos residentes repletos de parasitas sofrem lise celular e as amastigotas formadas infectam apenas macrófagos vizinhos (Alexander; Russel, 1992). Vale

ressaltar que a inoculação do parasito não significa necessariamente que o hospedeiro irá desenvolver leishmaniose, pois este pode tornar-se um indivíduo assintomático, uma vez que o estabelecimento da doença depende de fatores inerentes ao parasito e também ao status imunológico do paciente, isto é, depende da interação parasito-hospedeiro (Conceição-Silva; Morgado, 2019).

A LV é caracterizada por um período de incubação que varia de duas semanas a oito meses. As principais espécies envolvidas na doença são *L. infantum* e *L. donovani*. Os sintomas frequentemente observados incluem hepatoesplenomegalia, perda de peso progressiva, febre, anemia e linfadenopatia. No começo da infecção, os sintomas são inespecíficos. Com a evolução da doença, observa-se persistência da febre associada à perda de peso, anorexia, palidez cutânea, edema abdominal e hepatoesplenomegalia severa. Devido aos órgãos afetados, pode haver a presença de leucopenia, hipoalbumemia, trombocitopenia e hipergamaglobulinemia (Sundar; Singh, 2018). Esse quadro clínico pode favorecer hemorragias, o que associado a infecções oportunistas, pode agravar o estado geral do paciente e levá-lo à morte. Por isso, o diagnóstico diferencial e a intervenção terapêutica precoce são de suma importância. (OPAS, 2019).

A LT, por sua vez, pode ser subdividida em cinco apresentações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose cutânea disseminada, leishmaniose cutânea atípica e leishmaniose mucosa (LM) (Da-Cruz; Pirmez 2013).

O primeiro sinal da LC é a presença de uma mácula no local aonde o vetor realizou o repasto sanguíneo no indivíduo. Ao redor deste, há uma região com bordas mais claras, as quais são bem evidentes. Este sinal clínico é uma reação normal à saliva do inseto, não representando necessariamente que este está infectado. Com o passar do tempo, caso haja a presença do parasito, a mácula dá origem a uma pápula que evolui, formando um nódulo arredondado e indolor, o qual posteriormente sofre ulceração. Uma úlcera típica é indolor, apresenta fundo rosado, tecido granulomatoso, arredondado, de bordas irregulares e elevadas (Gontijo; Carvalho, 2003). Caso haja uma infecção bacteriana secundária, é possível observar a presença de uma secreção purulenta nas úlceras (Handler *et al.*, 2015). As lesões, por sua vez, podem evoluir para a cicatrização central e reativação nas bordas (figura 3). O teste de Montenegro nesse estágio é positivo. Outro sinal que aparece em concomitância com os nódulos ou até mesmo antes destes, é a presença de

linfadenopatia, sobretudo nos gânglios linfáticos regionais. A doença tem um período de incubação que varia de 2 semanas a 2 meses. Os agentes mais comumente relacionados a essa forma clínica são: *Leishmania braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. venezuelensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. pifanoi* (Rey, 2010).



Figura 3: Diferentes estágios de evolução clínica da leishmaniose cutânea. A: pequeno nódulo ulcerado, com bordas elevadas; B: úlcera arredondada, com bordas elevadas, fundo granuloso e eritematoso. C: lesão cicatrizada, apresentando aspecto liso e brilhante, hipocrômica ao centro e hiperpigmentada na periferia. Adaptado de OPAS (2019).

A leishmaniose cutânea disseminada, por sua vez, é uma forma menos comum da doença, mas que vem sendo cada vez mais descrita, sobretudo na Bahia (Silva *et al.*, 2017). No início da infecção, o indivíduo apresenta lesões típicas de LC. Com o passar do tempo, devido a disseminação linfática e hematogênica, há o aparecimento de lesões secundárias, geralmente longe das primárias (mecanismo metastático) e com aspecto que lembram acnes. Estas lesões são numerosas e geralmente associadas à espécie *L. braziliensis*, *L. panamensis*, mas também são descritas sendo ocasionadas em infecções por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* (Hashiguchi *et al.*, 2016; Scorza *et al.*, 2017; OPAS, 2019).

Já a leishmaniose cutâneo-difusa é caracterizada por uma resposta imunológica insuficiente frente à infecção. O indivíduo infectado apresenta lesões numerosas e repletas de parasitos. Na fase inicial, há o aparecimento de placas ou pápulas em uma pequena superfície do corpo, que podem se estender para outras áreas em alguns poucos meses. As placas lembram lesões de hanseníase lepratomatosa. O tratamento dessa forma clínica é difícil e muitas vezes o paciente apresenta diversas recaídas. A espécie comumente associada é a *L. amazonenses*, além de *L. mexicana* (Goto; Lindoso, 2010; OPAS, 2019;).

A leishmaniose cutânea atípica, por sua vez, apresenta lesões com um padrão diferenciado. Essas são circulares, crônicas, não ulceradas e geralmente associadas à espécie *L. infantum*. Esta forma clínica está sendo descrita em Honduras (Flores *et al.*, 2020)

A leishmaniose mucosa é uma forma clínica grave, capaz de causar deformações que comprometem o estado físico e a interação social do paciente. Geralmente, surgem cerca de dois a cinco anos após a infecção primária, aparente ou assintomática, uma vez que existem pacientes que apresentam lesões mucosas sem um histórico da forma cutânea da doença (Gontijo; Carvalho, 2003). Alguns indivíduos, contudo, podem apresentar essa forma clínica juntamente com a lesão cutânea, e neste caso denominamos leishmaniose mucocutânea. As lesões mucosas costumam surgir primeiramente na cavidade nasal. O paciente apresenta obstrução nasal, eritema, edema, dentre outros sinais, que com o tempo irão aumentar de tamanho e evoluir. O septo nasal frequentemente é perfurado e a pele do nariz pode se tornar espessa e edemaciada, dando origem à fâscias leishmaniótica, também conhecida como “nariz de anta ou tapir” (Lessa *et al.*, 2007). Pode haver comprometimento também da cavidade oral, faringe e laringe, o que causa uma série de deformidades e mutilações, as quais podem impedir ou dificultar a respiração, fonação e alimentação. Em casos muito graves, o paciente pode vir a óbito por asfixia, infecções oportunistas ou por pneumonia associada à broncoaspiração (Bustos *et al.*, 2016). Esta forma clínica geralmente está associada a *L. braziliensis*, o que leva a inferir que fatores inerentes a esse parasito são cruciais para o aparecimento da infecção. A forma mucosa associada a *L. guyanensis* foi descrita na região Amazônica (Guerra *et al.*, 2011, 2015).

1.1.4. O Modelo Experimental Hamster Dourado (*Mesocricetus auratus*)

A espécie animal *Mesocricetus auratus*, também conhecida como hamster dourado ou hamster sírio, é uma espécie bastante útil às pesquisas biomédicas, sobretudo devido às suas características anatômicas e fisiológicas singulares. (Valentine *et al.*, 2012). Os hamsters possuem a bolsa jugal, uma invaginação nas bochechas que lhes serve para armazenar comida, mas que, por ser um sítio imunológico privilegiado, também pode ser utilizada para estudos imunopatológicos. Dentre as aplicações já descritas na literatura, estão: estudos relacionados ao

câncer (Garabalino *et al.*, 2019), estudos de microcirculação (Castiglione *et al.*, 2018), pesquisas com doenças infecciosas e parasitárias (Arruda *et al.*, 2002), teste de fitoterápicos (Koochi-Hosseini *et al.*, 2017), dentre outras.

O tamanho do hamster também favorece uma visualização mais apurada dos sistemas biológicos, incluindo o sistema reprodutor, quando comparado, por exemplo, a camundongos. Eles são relativamente livres de patógenos naturais, mas altamente suscetíveis a patógenos experimentais (Valentine *et al.*, 2012).. Além disso, por ser um modelo *outbreak*, isto é, que apresenta heterogeneidade genética, desenvolve uma série de doenças hereditárias que se comportam de forma muito semelhante às doenças humanas. Ademais, apresenta fácil manuseio em laboratório. Várias doenças parasitárias têm sido estudadas nesse modelo experimental, tais como doença de Chagas (Cabrine-Santos *et al.*, 2001), leishmaniose (Santos *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2013; Ribeiro-Romão *et al.*, 2014), amebíase (Nakda-Tsukui *et al.*, 2018), Covid-19 (Sia *et al.*, 2020), dentre outras.

1.1.5. O hamster dourado como modelo da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA, como já citada anteriormente, é uma doença de ampla incidência no território nacional, tendo grande importância epidemiológica. Os estudos utilizando animais experimentais são necessários para entendermos os aspectos de sua imunopatogênese e características que levam a diferentes desfechos clínicos (o que, devido a fatores éticos, não podem ser abordados em pacientes), bem como investigar novas formulações de medicamentos e candidatos vacinais. A espécie de *Leishmania* mais comumente associada a essa forma clínica é a *L. braziliensis* e modelos animais, tais como roedores (camundongos e ratos) apresentam-se pouco suscetíveis a essa espécie. Outros animais como cães e primatas não humanos são suscetíveis, porém, apresentam dificuldades no manuseio e alto custo de manutenção em laboratório (Loría-Cervera, Andrade-Narváez, 2014). Até mesmo o BALB/c, espécie de camundongo mais suscetível a *L. braziliensis*, apresenta lesões brandas, que evoluem para a resolução espontânea, dificultando estudos de longo prazo e não mimetizando a doença humana (Moura *et al.*, 2005) (Figura 4).

O modelo hamster dourado, contudo, apresenta alta suscetibilidade à *L. braziliensis* (Figura 4) e a outras espécies do subgênero *Viannia*, tais como

L. panamensis (Gómez-Galindo; Delgado-Murcia, 2013) e *L. guyanensis* (Teixeira et al., 2019). Além disso, esse modelo já é utilizado há muitos anos no estudo das leishmanioses, sobretudo ocasionadas pelas espécies *L. donovani* e *L. infantum*, espécies associadas à forma clínica visceral (Kauffmann et al., 2016; Celeste et al., 2017).

Baseado nisso, nosso grupo vem realizando estudos no sentido de entender a história natural da infecção por *L. braziliensis* neste modelo, que foi apontado como adequado para tais estudos (Mears et al., 2015). Silva e colaboradores (2013), demonstraram que este modelo apresenta semelhança com a doença humana em diversos aspectos, sobretudo na evolução e no grau de integridade dos tecidos. Análises histopatológicas demonstram a presença de úlceras, reação granulomatosa, bem como tendência à visceralização em animais mais graves (Ribeiro-Romão et al, 2014), assim como observado em humanos imunocomprometidos (Gontijo et al, 2002; Silva et al, 2002)

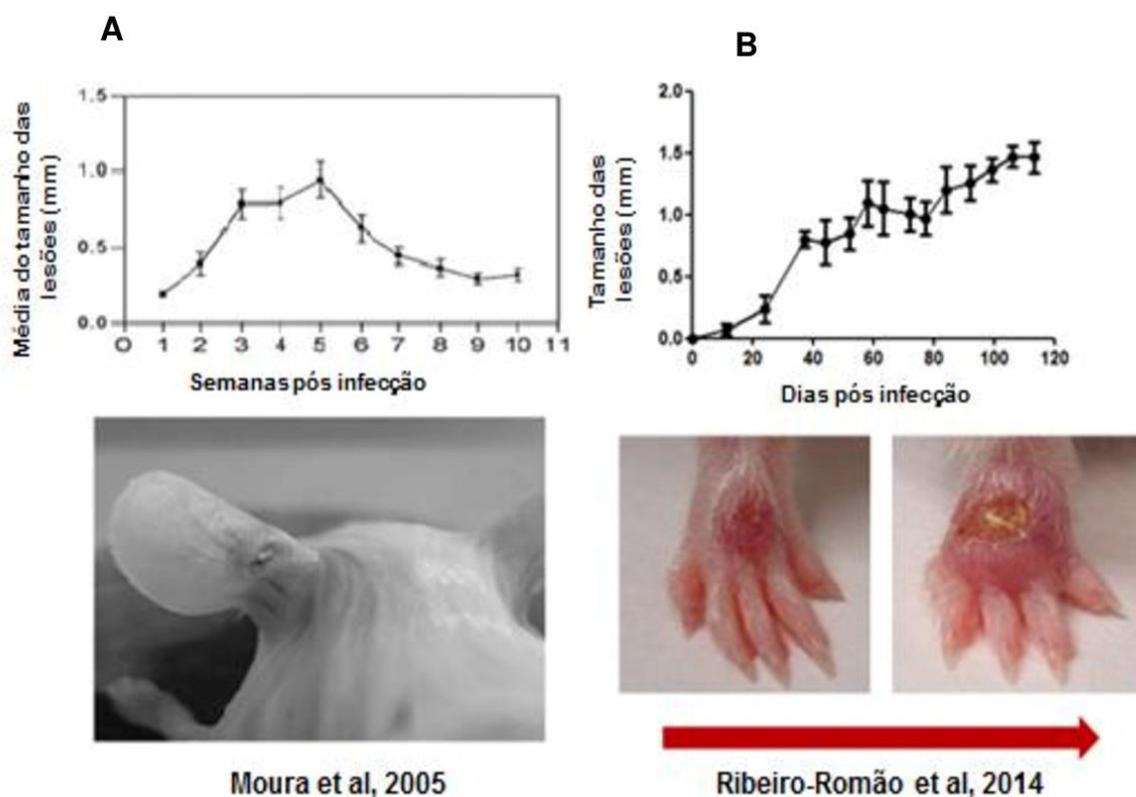


Figura 4: Comparação entre a evolução das lesões causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo Balb/C (A) e no hamster dourado (B), mostrando que neste último as lesões apresentam curso crônico e progressivo. Fonte: Adaptado de Moura et al. (2005) e Ribeiro-Romão et al. (2014).

Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), demonstraram a relação entre o inóculo inicial com o tempo de surgimento das lesões. Neste trabalho, os hamsters foram infectados com diferentes e crescentes inóculos (10^4 , 10^5 e 10^6) de *L. braziliensis*. Na ocasião, foi visto que o tempo de surgimento de lesões foi inversamente proporcional à concentração de parasitos utilizada para infectá-los. Assim sendo, animais infectados com o inóculo de 10^6 parasitos desenvolveram lesões mais precocemente do que os que foram infectados com os inóculos de 10^5 e 10^4 . No entanto, foi visto que o tamanho e gravidade das lesões não foi proporcional ao tamanho do inóculo em todos os animais de estudo, havendo alguns que foram infectados com um pequeno inóculo e desenvolveram lesões tão ou mais graves do que aqueles que foram infectados com mais parasitos e vice-versa. Outro dado intrigante é que, aos 105 dias de infecção, as lesões ocasionadas pelos inóculos de 10^5 e 10^6 , a despeito da grande diferença no número de parasitos, evoluem clinicamente de forma semelhante. O mesmo achado foi encontrado por Vieira (2017), porém aos 50 dias. Esses resultados talvez sugiram que a resposta imune desencadeada nas fases iniciais da doença, bem como o inóculo e fatores intrínsecos ao parasito e ao hospedeiro contribuam para o desfecho em fases mais tardias.

Outros grupos têm estudado a evolução da leishmaniose causada por *L. braziliensis* nesta espécie (Santos *et al.*, 2018; Rêgo *et al.*, 2019; Montoya *et al.*, 2018), contudo, a falta de insumos imunológicos, tais como anticorpos monoclonais para uso em imunohistoquímica ou citometria de fluxo, seja um fator preponderante para a não consagração do modelo.

1.1.6. Resposta Imune Inicial na Leishmaniose Tegumentar Americana e Imunopatogênese no modelo hamster

A resposta imune frente aos antígenos de *Leishmania* é um processo complexo que envolve participação tanto de células do sistema imune inato quanto do adaptativo. Logo após a inoculação do parasito pelo flebótomo na pele do hospedeiro, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas por uma variedade de células residentes, principalmente células dendríticas e macrófagos, onde ficam localizadas nos fagolisossomos (Von Stebut; Tenzer, 2017). Logo após, há um recrutamento de neutrófilos para o local de infecção. Esse recrutamento se dá

primeiramente pelo dano tecidual causado pela inserção da probóscite na pele e também pela própria saliva do animal, que contém fatores anti-hemostáticos (vasodilatadores e anticoagulantes) (Peters *et al.*, 2008; Peters; Sacks, 2009). Há evidências de que neutrófilos já são encontrados nos primeiros 30 minutos de infecção e os parasitos são detectados nessas células até 18h após infecção (Bruschi *et al.*, 2018; Peters *et al.*, 2008). O papel desses neutrófilos parece ser bastante controverso. Os neutrófilos são células fagocíticas do sistema imune que têm atividade microbicida principalmente através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). No entanto, o parasito desenvolveu mecanismos de evasão do sistema imune. No interior dos neutrófilos, eles podem escapar para compartimentos não líticos, além de expressar nucleases, que inibem NETS (do inglês *Neutrophil extracellular traps*, isto é, armadilhas extracelulares com função microbicida produzidos por neutrófilos) (Chagas *et al.*, 2014). Por fim, ainda exploram a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, o que faz com que esses neutrófilos sirvam de “cavalo de tróia” para infecção de macrófagos (Ritter *et al.*, 2009). Esse termo se refere ao fato de o parasito utilizar os neutrófilos como um artifício silencioso para infectar outras células, sobretudo macrófagos. De fato, estudos conduzidos por Peniche e colaboradores (2017) demonstraram que na infecção por *L. panamensis* utilizando o modelo hamster, há um primeiro infiltrado neutrofílico importante no período de 2h-6h pós infecção e depois uma segunda onda entre 16 e 22 dias após a infecção. A presença dessas células no sítio da infecção, em nenhum dos períodos, foi suficiente para conter a infecção ou controlar a carga parasitária.

Em momentos mais tardios, ocorre o recrutamento de macrófagos e monócitos para o sítio de infecção. Esse recrutamento ocorre em parte pela degranulação de neutrófilos infectados e também por fatores quimiotáticos produzidos por eles, tais como a MIP-1 β (proteína inflamatórias de macrófago1 β , do inglês *macrophage inflammatory protein 1 β*) (Von Stebut *et al.*, 2003; Meira; Gedamu, 2019). Esses macrófagos constituem-se as principais células hospedeiras. Dentro dos macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas e se replicam ativamente dentro dos fagolisossomos. Estas amastigotas causam a ruptura do macrófago, liberando-as no meio extracelular, onde estas podem ser revestidas por imunoglobulinas e capturadas por outros fagócitos através do receptor FC, uma estratégia que parece favorecer a sobrevivência do parasito (Wetzel *et al.*, 2012).

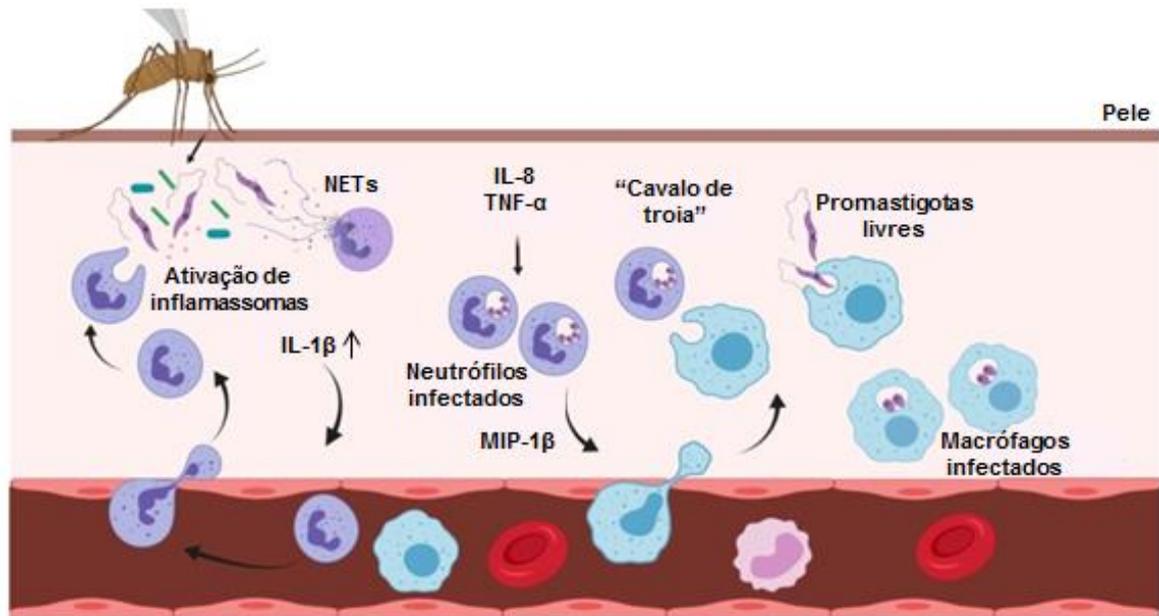


Figura 5: Recrutamento da resposta imune inata durante a infecção por *Leishmania*. IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-8: interleucina 8; MIP-1 β : proteína inflamatória de macrófago 1 beta, quimiocina que atrai macrófagos; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; Adaptado de Meira e Gedamu (2019).

A interação entre as diferentes células do sistema imune do hospedeiro e fatores do parasito parecem ditar qual será o desfecho da infecção. A participação do sistema imune adaptativo se dá pela ativação de diferentes tipos de células T. A diferenciação de células TCD4+ em células T *helper* do Tipo 1 (TH1) está associada com uma resposta predominantemente pró-inflamatória, que está relacionada à secreção de citocinas como IFN- γ , TNF, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23. Essas ativam os macrófagos, aumentando a produção de EROS e de espécies reativas de nitrogênio, o que está relacionado com a destruição parasitária. Já a diferenciação dessas células em um perfil T *helper* do tipo 2 (TH2), está associada com a produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-13, IL-5, que estão associadas a replicação e sobrevivência do parasito no macrófago. No entanto, a ativação exacerbada de células Th1 pode levar a danos no tecido do hospedeiro, assim como a produção moderada de citocinas anti-inflamatórias pode mitigar as reações inflamatórias e acelerar o processo de cura. As células T regulatórias (Treg), também apresentam papel crucial na infecção, produzindo citocinas regulatórias, tais como TGF- β e IL-10 que podem contribuir para a progressão da doença ou retração, dependendo da espécie de *Leishmania* associada e de fatores genéticos do hospedeiro. (Maspi *et al.*, 2016; Bahrami *et al.*, 2018) (Figura 5).

A produção de óxido nítrico (NO) e de outras espécies reativas de oxigênio por macrófagos é um mecanismo bastante eficiente de eliminação do parasito. Macrófagos M1 são caracterizados por uma resposta efetora aos antígenos de *Leishmania*. Eles expressam a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que metaboliza o substrato L-arginina em óxido nítrico (NO) e citrulina. Já macrófagos M2 são caracterizados pela expressão da enzima arginase, a qual hidrolisa a L-arginina em ornitina e ureia. Como essas duas enzimas competem entre si pelo substrato L-arginina, fica claro que, devido à indução da produção de NO, a iNOS está relacionada com um maior controle da infecção, enquanto a arginase, à sobrevivência do parasito (Rath *et al.*, 2014; Gogoi *et al.*, 2016) (figura 6).

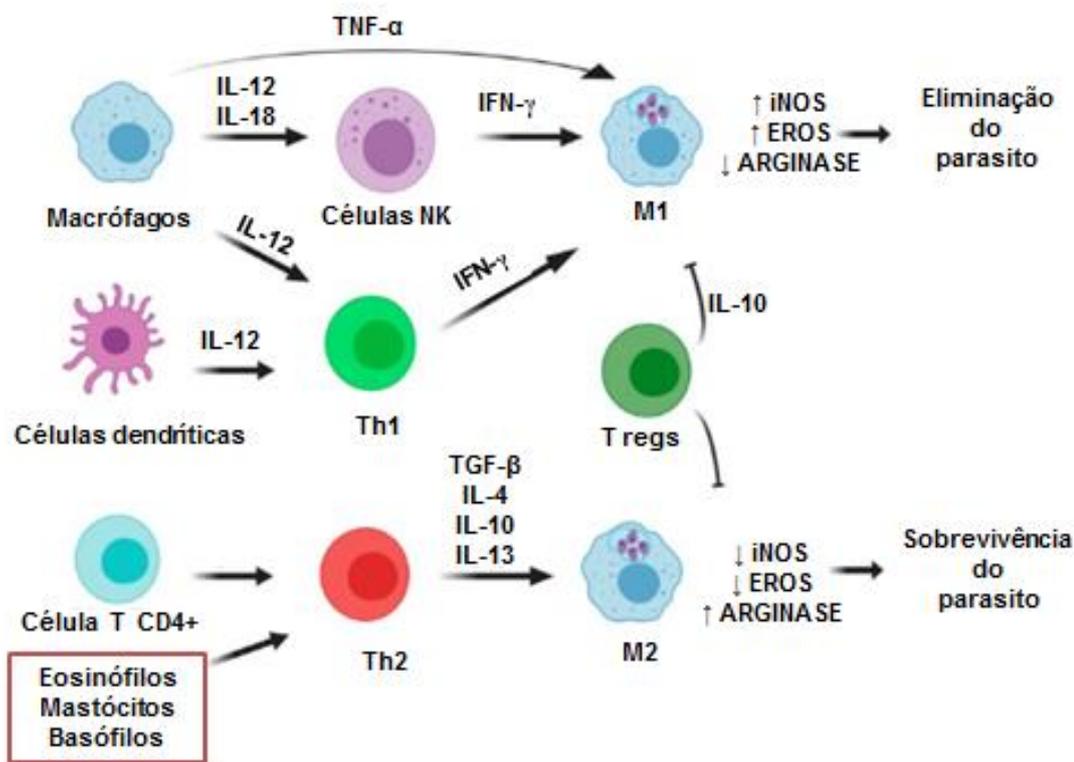


Figura 6. Resumo da resposta imune celular e produção de citocinas na infecção por *Leishmania* spp. Fonte: Adaptado de Maspi *et al.* (2016) e Meira e Gedamu (2019).

1.2. Justificativa

Atualmente, grande parte do que já se sabe sobre a LTA ocasionada por *L. braziliensis* advém do estudo com pacientes. No entanto, investigar a doença em humanos na fase subclínica muitas vezes não é possível, pois o paciente só procura

auxílio médico após a lesão já ter sido estabelecida. Nesse sentido, utilizar modelos animais pode ser bastante útil para estudar, com maior precisão, o desenvolvimento da doença. Para isso, é necessário que o animal seja suscetível à infecção e apresente curso clínico semelhante ao observado em humanos. Nosso grupo vem demonstrando no modelo hamster-*L. braziliensis* que a lesão cutânea tende a cronificar com o tempo, o que também é reportado na infecção humana. Além disso, por ser um modelo não isogênico, mimetiza a diversidade genética e de desfechos clínicos observada nos seres humanos. Esse último fator apresenta especial relevância, pois identificar que fatores individuais levam à progressão da doença e quais levam à cura espontânea pode ser útil para formular novas estratégias de tratamento, além de ser fundamental para o estabelecimento de prognóstico e de estratégias vacinais. Por esta razão este projeto tem o propósito de realizar análises *in situ* das lesões experimentais de leishmaniose cutânea, visando identificar padrões histológicos e de citocinas que influenciam no controle e na progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar, por análise histológica e perfil de citocinas, padrões de estrutura tecidual em lesões de pele de hamsters dourados causadas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* que evoluíram para a cura espontânea ou para a cronificação.

2.2. Objetivos específicos

- Descrever as características histológicas do infiltrado inflamatório observadas nas fases iniciais (4h e 24h), precoces (15 e 30) e tardias (50 dias) da infecção desafiadas com diferentes inóculos (10^4 , 10^5 e 10^6) do parasito em lesões de pele, visando identificar o grau de comprometimento tecidual associado as diferentes cargas infectivas;
- Determinar se o perfil de citocinas (IFN γ , IL-10, TNF, TGF- β , IL-6, IL-4) e de enzimas (iNOS e arginase) expresso nas lesões cutâneas de animais que tiveram capacidade de controlar a infecção difere daqueles que evoluíram com lesão progressiva;
- Detectar a presença do parasito em fragmentos de pele nas fases iniciais (4h e 24h) da infecção em animais desafiados com diferentes inóculos (10^4 , 10^5 e 10^6) de *L. braziliensis*, com o objetivo de identificar as rotas de disseminação do parasito nesses tempos iniciais;
- Utilizar análises multiparamétricas para identificar uma assinatura clínico-laboratorial que permita propor mecanismos imunopatológicos que sejam importantes na evolução da infecção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado com amostras biológicas provenientes de dois protocolos de pesquisa: 1) Análise de amostras obtidas no contexto do projeto de pesquisa do qual fez parte a dissertação de mestrado de Vieira (2017, Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária) (itens 3.1 a 3.5); 2) Amostras biológicas obtidas no projeto de pesquisa relativo a esta dissertação (itens 3.6 em diante). Foram utilizados dados clínicos, parasitológicos, histológicos e imunológicos obtidos previamente. A figura 7 resume o desenho experimental do presente trabalho. Esses estudos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob licença número IOC 032/15 (CEUA-IOC) e LW11/11 (CEUA-FIOCRUZ).

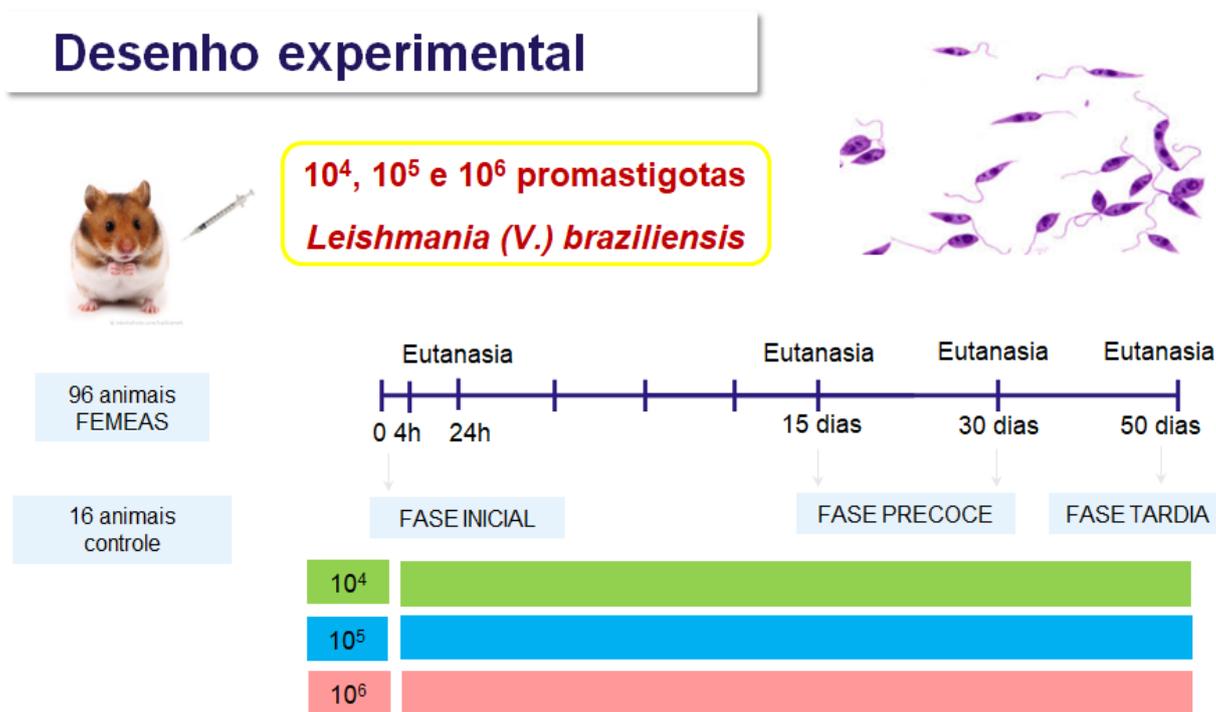


Figura 7. Desenho experimental do presente estudo.

3.1. Parasitos utilizados para infecção

Foi utilizada a cepa (MCAN/BR/98/R619) de *L. (V.) braziliensis*, proveniente de um mesmo lote de congelamento, cultivada em meio Schneider (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) acrescido de L-glutamina (1mmol L⁻¹), antibiótico

(penicilina: 200u mL⁻¹; estreptomicina: 200µg mL⁻¹), soro fetal bovino (20%) (Cultilab, Campinas, BR) e 2% de urina humana masculina filtrada, em temperatura de 27°C, durante 4-5 dias, até que os parasitos atingissem a fase estacionária de desenvolvimento da terceira passagem *in vitro*.

3.2. Animais de experimentação

Utilizou-se hamsters do sexo feminino, com idade entre 6 e 8 semanas e peso aproximado de 90 g, provenientes do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ). Os animais foram alocados no biotério de experimentação animal do Pavilhão Carlos Chagas IOC/Fiocruz, em gaiolas apropriadas para hamsters em número de quatro animais por gaiola.

Foram utilizados 96 animais infectados (quatro/grupo): a) um experimento para 4 e 24 horas pós-infecção (dpi); b) dois experimentos para 15, 30 e 50 dias pos-infecção (dpi). Doze animais inoculados com tampão fosfato-salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) foram utilizados como controle.

3.3. Infecção experimental dos hamsters por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Os animais passaram por um período de aclimatação no biotério durante uma semana. Após esse período, foram inoculados no dorso da pata posterior direita com formas promastigotas de *L. braziliensis* na fase estacionária de crescimento, suspensas em PBS estéril, nas concentrações de 10⁴, 10⁵ e 10⁶ parasitos por inóculo, num volume de 20 µL por via intradérmica, com o auxílio de seringa e agulha hipodérmica *Ultra-fine* de 8 mm x 0,3 mm (30 G) (Becton, Dickinson and Company, EUA). Os animais controles foram inoculados apenas com 20 µL de PBS estéril.

3.4. Características clínicas e morfometria das patas dos hamsters pós infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Com a finalidade de avaliar a evolução clínica das lesões cutâneas após a infecção, as mesmas foram acompanhadas quanto às suas alterações

macroscópicas. Nos tempos de 15, 30 e 50 dias pós-infecção, a espessura das patas foi mensurada semanalmente com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo America Corporation, São Paulo Brasil). O resultado foi expresso como incremento em milímetros (mm) do tamanho da pata, obtido pela diferença entre a pata infectada e a contralateral não infectada. Os aspectos clínicos das lesões foram qualificados com um sistema de escores, como enunciado na tabela a seguir. Esses valores foram somados para a determinação do escore clínico total de cada animal.

Tabela 1: Avaliação em escores dos parâmetros clínicos de hamsters dourados infectados com *L. (Viannia) braziliensis*.

Avaliação em Escores¹	
Escore 0	Ausência de lesão
Escore 1	Edema
Escore 2	Pápula discreta
Escore 3	Pápula moderada
Escore 4	Nódulo discreto
Escore 5	Nódulo moderado
Escore 6	Nódulo amplo
Escore 7	Nódulo muito amplo
Escore 0.5	Úlcera inicial
Escore 1	Úlcera
Escore 1.5	Úlcera com crosta
Escore 2	Úlcera profunda

Fonte: Yang et al, 2013

3.5. Procedimentos para realização de eutanásia nos animais

A eutanásia dos hamsters foi realizada pela administração de medicações pré-anestésicas associadas: cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (nas doses de 200 mg Kg⁻¹ e 10 mg Kg⁻¹, respectivamente), injetadas por via intraperitoneal no quadrante inferior esquerdo do abdômen, com o auxílio de uma seringa de 1 mL e agulha hipodérmica 24 G (12 mm), inserida em um ângulo de 45°. A eficácia da medicação anestésica foi anuída por meio da ausência de reflexos. Após a sedação dos animais, foi injetado tiopental sódica na dose de 150 mg Kg⁻¹ também por via intraperitoneal. A morte do animal foi confirmada pela constatação da parada cardíaca.

3.6. Processamento dos tecidos para avaliação histopatológica e coloração histológica pela técnica de hematoxilina-eosina

Fragmentos de pele dos hamsters inoculados foram fixados em uma solução de paraformaldeído a 4% e processados para inclusão em parafina. Após a inclusão, a pele foi cortada em seções com 5 µm de espessura, que foram aderidas em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina. As lâminas foram coradas por 20 minutos com hematoxilina de Mayer (Merk, Alemanha) e por 2 minutos em eosina (Merck, Alemanha), com posterior desidratação em concentrações crescentes de álcool a 70%, 90%, 95% e 100% e diafanização em três banhos de xilol para posterior montagem com lamínula. As análises foram feitas em microscópio óptico em objetivas com aumento de 20, 40 e 100 vezes (20 x; 40 x; 100 x). Também foi utilizada uma avaliação semiquantitativa em escores (intensidade de ocorrência) de alterações histopatológicas, variando desde a não ocorrência (escore 0), leve (escore 1), moderada (escore 2) e intensa ocorrência (escore 3), conforme tabela 2 (Yang *et al.* 2013, Ribeiro-Romão *et al.* 2014). As seguintes alterações histopatológicas foram avaliadas: presença de infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão de vasos, macrófagos vacuolizados, amastigotas, granuloma, corpúsculos de Schaumann e ocorrência de necrose.

Tabela 2: Avaliação em escores dos parâmetros histopatológicos de hamsters dourados infectados com *L. (Viannia) braziliensis*.

Avaliação Semiquantitativa em Escores¹	
Escore 0	Sem alterações
Escore 1	Alteração leve
Escore 2	Alteração moderada
Escore 3	Alteração intensa

Fonte: Yang et al, 2013

3.7. Detecção de antígenos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na pele dos hamsters por imunohistoquímica

Para a análise de imunohistoquímica, fragmentos de pele do dorso da pata direita dos animais inoculados foram embebidos em O.C.T. (“*ornithine carbamyl transferase compound*”; Tissue Tek, Illinois, EUA) e acondicionados no gelo seco ainda no biotério. Para conservação até o momento de processamento, os tecidos foram alocados em ultrafreezer (-80°C). Esses tecidos congelados foram então cortados na espessura de 4 a 5 µm em criostato (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), na temperatura média de -22°C. Os cortes foram aderidos em lâminas tratadas com poli-L-lisina, o material foi fixado com acetona P.A. (Merck, Darmstadt, DE) por 10 minutos e depois armazenados a -20°C.

As lâminas foram hidratadas por 5 minutos em tampão Tris-Triton 0,1%. Após, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas com peróxido de hidrogênio a 0,6% (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) por 10 minutos seguidas por três lavagens em tampão Tris-Triton 0,1% e incubação com albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, USA) a 4% por 10 minutos. Depois, para a detecção de antígenos de *Leishmania* foi utilizado soro de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* (IFLA/BR/1967/PH8), na concentração de 1:100. As lâminas foram incubadas durante a noite em câmara úmida, conforme padronização realizada previamente por nosso laboratório. O *kit* Polymer Detection System for Human Tissue (Abcam,

Cambridge, UK foi utilizado para a imunohistoquímica conforme as instruções do fabricante. No lugar do anticorpo secundário, foi utilizado um polímero específico para camundongo associado à peroxidase (Dako Envision, DakoCytomation, Califórnia, EUA) por 30 minutos (amplifier + HRP polímero). Para a revelação da reação, foi utilizado o 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Sigma, EUA), que produz um precipitado de cor vermelha nas áreas marcadas. Finalmente, os núcleos foram corados com hematoxilina de Harris (Merk, Darmstade, Alemanha) e as lâminas foram montadas com meio gelatina/glicerina e lamínula. Como controle negativo, foi omitido o anticorpo primário da reação. Para a obtenção dos resultados, a marcação pela imunohistoquímica foi avaliada por microscopia óptica. As estruturas ou células que exibiam imunoprecipitação vermelha foram consideradas positivas e os resultados foram expressos qualitativamente. As imagens foram capturadas em câmera digital acoplada ao microscópio óptico.

3.8. Quantificação de imunoglobulinas anti-*Leishmania*

Após a confirmação da morte dos animais, o sangue foi obtido por punção cardíaca e armazenado em tubos contendo anticoagulante heparina (BD-Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, EUA). Posteriormente, foi realizada a separação do plasma após a centrifugação a 670 x g durante 10 min a 20°C. O plasma foi armazenado em alíquotas de 1 mL, a -20°C até o momento da avaliação.

Os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania* IgG foram determinados nas amostras de plasma por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA - do inglês "Enzyme-linked immunosorbent assay") padronizado pelo nosso laboratório (Silva *et al* 2013). Para isso, antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) em uma solução de 50 µg mL⁻¹ de PBS foram adicionados em placas de poliestireno de 96 poços (Nunc – Immuno Plate, Roskilde, Denmark) em volume de 50 µL por poço, e estas foram incubadas durante a noite em uma câmara úmida. Após lavagem, 50 µL das amostras de plasma de animais infectados e não infectados (controles negativos, n=5) em concentração de 1:50 foram adicionados em triplicata e a placa foi então incubada à temperatura ambiente. Como sistema de detecção, foi utilizado o anticorpo de cabra anti-IgG de hamster (1:5.000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), conjugado a uma peroxidase de rabanete silvestre (*horseradish peroxidase* (HRP)). Os resultados foram obtidos por

espectrofotometria em absorvância a 490 nm e expressos em índice ELISA, obtido pela razão entre a média das absorvâncias das amostras e a média das absorvâncias dos controles negativos. A linha de corte foi determinada pela curva ROC (do inglês, *receiver operator characteristic curve*) baseado na melhor relação entre sensibilidade e especificidade.

3.9. Análise da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase por ensaio de PCR em tempo real

3.9.1. Extração de ácidos nucleicos e transcrição reversa

Os fragmentos de pele obtidos do local da infecção foram conservados em RNA later (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e armazenados a -20°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos. Para obtenção do RNA, as amostras de tecido foram lisadas em 1 mL de Trizol[®] (Life Technologies, California, EUA), com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax Dispenser (IKA, Wilmington, EUA). Os lisados de tecido foram tratados com proteinase K (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) a 56°C por 30 minutos. Após a adição de 200 µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 18 minutos a 10.000 XG, para a separação das fases orgânica e aquosa. O RNA total foi extraído a partir da fase aquosa, utilizando o RNeasy mini Kit (Qiagen, Austin, Texas, EUA), conforme as especificações do fabricante. Após remoção da fase aquosa, a precipitação sequencial com etanol 100% extraiu o DNA a partir da fase orgânica, para quantificação da carga parasitária. O DNA foi precipitado em 0,3 mL de etanol a 100%. Após precipitação por centrifugação por 18 minutos a 10.000 XG, o DNA foi lavado duas vezes em 1 mL de solução de citrato de sódio (0,1 M) em etanol a 10% (com intervalo de 30 minutos entre cada lavagem). Em seguida, o DNA foi lavado em 1,5 mL de etanol a 75%, e o *pellet* foi seco ao ar e dissolvido em 400 µL de solução de hidróxido de sódio (8 mM). O RNA e DNA foram armazenados a -80° C e -20° C, respectivamente até a sua utilização.

O RNA foi quantificado por espectrofotometria em um Picodrop P200 (Astranet Systems, UK) e, posteriormente, tratado com DNase I (Promega Corporation, Madison WI, EUA) para remoção de possíveis resquícios de DNA. A transcrição reversa foi realizada a partir de 2,0 µg de RNA tratado, utilizando o *High*

Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, EUA), conforme especificações do fabricante. O cDNA resultante foi dosado por fluorometria, no equipamento Quibit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA), utilizando o kit *single strand DNA* (ssDNA).

3.9.2. Análise da expressão gênica por transcriptase reversa-PCR quantitativa (RT-qPCR)

A quantificação da expressão gênica por RT-qPCR foi previamente padronizada por nosso grupo para sequências de citocinas e moléculas já descritas para a espécie *M. auratus* e consideradas importantes na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar humana, listadas a seguir: IFN- γ , TGF- β , TNF, IL-10, arginase, iNOS, IL-4, IL-6 e os genes de referência GAPDH e γ -actina, pelo método do Ct (limite do ciclo, do inglês *cycle threshold*) comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), utilizando iniciadores já descritos na literatura (Ribeiro-Romão *et al.* 2016). Para a reação de RT-qPCR, para cada alvo foram utilizados 20 ng de cDNA ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) por poço, utilizando Power SYBR Green[®] PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), em volume final de 10 μ L por poço, em duplicata. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços, no equipamento ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), que integra a plataforma FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), sob a coordenação dos doutores Milton Moraes e Otacílio Moreira Moreira (IOC). As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da presença de um único pico nas curvas de dissociação. Os iniciadores foram utilizados nas concentrações de 100 nM Fw X 100 nM Rv, exceto IL-4, que foi utilizado 200 nM X 200 nM. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada usando o método do Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), como previamente descrito (Livak *et al.*, 2001), com limite de 0.02. Os resultados foram expressos em $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (número de vezes de aumento ou diminuição - *fold change*), e amostras provenientes de animais controles (não infectados) foram utilizadas como

calibradores. O software de expressão gênica Suite (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) foi utilizado para as análises.

Tabela 3: Alvos e sequências de iniciadores desenhados para quantificação de citocinas, iNOS e arginase de hamster utilizados nos ensaios de RT- qPCR em Tempo Real.

Alvo	Sequência	Tamanho do amplicon	Referência
GAPDH	Fw 5'-GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3' Rv 5'-TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	69 pb	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> (2014)
γ Actina	Fw 5'-ACA GAG AGA AGA TGA CGC AGA TAA TG-3' Rv 5'-GCC TGA ATG GCC ACG TAC A-3'	70 pb	Espitia <i>et al.</i> (2010)
IFN-γ	Fw 5'-TGT TGC TCT GCC TCA CTC AGG-3' Rv 5'-AAG ACG AGG TCC CCT CCA TTC-3'	130 pb	Espitia <i>et al.</i> (2010)
TGF-β	Fw 5'-GGC TAC CAC GCC AAC TTC TG-3' Rv 5'-GAG GGC AAG GAC CTT ACT GTA CTG-3'	81 pb	Espitia <i>et al.</i> (2010)
TNF	Fw 5'-TGA GCC ATC GTG CCA ATG-3' Rv 5'-AGC CCG TCT GCT GGT ATC AC-3'	79 pb	Espitia <i>et al.</i> (2010)
IL-10	Fw 5'-GGT TGC CAA ACC TTA TCA GAA ATG-3' Rv 5'-TTC ACC TGT TCC ACA GCC TTG-3'	194 pb	Espitia <i>et al.</i> (2010)
IL-4	Fw 5'-CCA CGG AGA AAG ACC TCA TCT G-3' Rv 5'-GGG TCA CCT CAT GTT GGA AAT AAA-3'	72 pb	Zivcec <i>et al.</i> (2011)
IL-6	Fw 5'-GGA CAA TGA CTA TGT GTT GTT AGA A-3' RV 5'- AGG CAA ATT TCC CAA TTG TAT CCA G-3'	99 pb	Ribeiro-Romão <i>et al.</i> (2016)
iNOS	Fw 5'-TGA GCC ACT GAG TTC TCC TAA GG-3' Rv 5'-TCC TAT TTC AAC TCC AAG ATG TTC TG-3'	93 pb	Osorio <i>et al.</i> (2012)
Arginase	Fw 5'-ACC TAT GTG TCA TTT GGG TGG A-3' Rv 5'-GCA GAT ATG CAG GGA GTC ACC-3'	163 pb	Osorio <i>et al.</i> (2012)

IL – interleucina; TGF- β – fator de crescimento transformador (*transforming growth fator*); iNOS – oxido nítrico sintetase induzível (*inducible nitric oxid synthetase*), Pb- pares de bases, FW - *forward*, RV - *reverse*

3.10. Quantificação da carga parasitária por PCR quantitativo (qPCR)

A aferição da carga parasitária foi efetuada por quantificação absoluta, tendo por base uma curva padrão produzida a partir da contaminação artificial de amostra de fragmento de pele de hamster (não infectado) com formas promastigotas de *L. braziliensis*. Para isso, foram adicionadas 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* à 3 mg de pele obtida do dorso da pata posterior direita dos animais e o DNA de ambos foi extraído como descrito anteriormente. Foram feitas diluições seriadas com tampão Tris-EDTA na concentração de 1:10 para produzir os sete pontos da curva padrão variando entre 10 a 0.5 equivalentes de parasitos, ou de 3 a 3×10^{-6} mg equivalentes de pele. Para realizar a quantificação do parasito, foram utilizados iniciadores que amplificam a região conservada dos minicírculos de kDNA, a 50 nM e 50 nM (iniciadores direto e inverso, respectivamente). Previamente ao ensaio de qPCR, foram diluídas amostras de DNA de hamster na concentração de 1:500 para que houvesse melhor adaptação à curva padrão do DNA parasito. As reações foram efetuadas no equipamento ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), pertencente à plataforma FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), em colaboração com o Dr. Otacilio Moreira (LABIMDOE - IOC/FIOCRUZ), com 5 μ L do Power SYBR Green® PCR Master Mix (Life Technologies, CA, EUA), em um volume final de 10 μ L por poço. A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 64°C por um minuto. Terminada a amplificação, a curva de dissociação foi efetuada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C.

3.11. Clusterização de amostras e elaboração do gráfico intensidade de cores (*heatmap*)

A representação da expressão gênica por mapa de intensidade de cores “heatmap” foi utilizada para avaliar os padrões diferenciais de expressão gênica. Para isso, por meio do *software online* Heat mapper® (Wishart Research Group, University of Alberta, EUA) foi desenhado um *heatmap* a partir de uma planilha contendo o $\Delta\Delta C_t$ das amostras. O método de clusterização usado para análise foi o *average linkage* (média de ligação) e o método de medição de distância aplicado foi

o Euclidiano. Foram feitas clusterizações por linhas e colunas. O espectro de cores foi utilizado para identificar os padrões de expressão gênica: a cor vermelha representa baixo $\Delta\Delta Ct$, o que significa alta expressão gênica e a cor verde, alto $\Delta\Delta Ct$, o que significa baixa expressão gênica: a cor preta significa que a expressão gênica está abaixo do limite de detecção do método.

3.12. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil. Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Grupos experimentais foram comparados utilizando a análise unilateral de variância (ANOVA). Testes paramétricos ou não paramétricos foram selecionados de acordo com a distribuição dos dados brutos, seguidos pela aplicação de pós testes de múltiplos grupos, conforme o apropriado. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando os valores de p foram ≤ 0.05 .

Todos os ensaios de RT-qPCR e qPCR foram realizados em quintuplicatas biológicas e duplicatas ou triplicatas experimentais. Testes estatísticos derivados dos valores de ΔCT (teste t de estudante ou teste de soma de classificação de Mann-Whitney e análise de variância) foram realizados com o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, EUA) ou SigmaPlot versão 12.0 (Systat Software, Inc).

Uma matriz de correlação de Spearman foi feita utilizando o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows (GraphPad Software, EUA), usando os valores de ΔCT para expressão gênica. A rede de interações foi feita com o software Cytoscape versão 3.7.2, a partir de correlações que apresentaram nível de significância ≤ 0.05 . Estas análises contaram com a colaboração do Dr. Adriano Gomes Silva (Laboratório de Pesquisa Clínica em Micobacterioses, INI, FIOCRUZ)

A análise estatística multivariada foi feita através de regressão múltipla linear (software SPSS, versão 9.0) para determinar a influência de variáveis intervenientes. O modelo de regressão linear múltipla que foi selecionado pelo método Stepwise relacionando o tamanho da lesão (TL) e a carga parasitária com as variáveis independentes. Todas estas análises foram realizadas pelo Dr Hermano Lathema (Laboratório de Transmissores de Hematozoários, IOC, FIOCRUZ).

4. RESULTADOS

4.1. Aspectos clínicos e histopatológicos

A cinética de desenvolvimento da lesão desde as primeiras horas até a fase tardia (50 dias pós infecção (dpi)) (Figura 8B), confirmou um curso progressivo de evolução em direção à fase crônica, conforme esperado para este modelo animal. Independentemente do inóculo, sinais clínicos de inflamação, como eritema, já foram observados aos 15 dpi em alguns animais. A relação inversa entre a concentração do inóculo do parasito e o tempo de início da lesão foi reproduzida (Figura 8A) (Ribeiro-Romão *et al.* 2014). Aos 50 dpi, a mediana do tamanho da lesão nos animais infectados com inóculo de 10^5 parasitos/20 μ L (grupo 10^5) foi significativamente maior (1,00 mm [0,86 - 1,51 mm]) quando comparada com os inoculados com 10^4 parasitos/20 μ L (grupo 10^4) (0,24 mm [0,08 - 0,88 mm]), mas inferior ao grupo 10^6 parasitos/20 μ L (grupo 10^6) (1,59 mm [1,39 - 1,93 mm]). Nenhum dos animais dos grupos inoculados com 10^5 e 10^6 parasitos/20 μ L evoluíram com resolução espontânea das lesões.

Um padrão variável de incremento da lesão foi observado especialmente nos 50 dpi. Nesse momento, a maioria dos animais infectados com um inóculo de 10^4 parasitos/20 μ L (6 de 8) apresentava inchaço menor que 0,5 mm. No entanto, dois animais tiveram lesões tão grandes quanto às observadas nos grupos 10^5 ou 10^6 . Por outro lado, 1 em cada 8 animais infectados com um inóculo de 10^6 parasitos/20 μ L desenvolveu lesão menor (0,65 mm) do que a mediana desse grupo (1,6 mm) (Figura 8B). As lesões da maioria dos animais do grupo 10^4 foram menos graves do que a dos animais infectados dos grupos 10^5 e 10^6 (Figura 8C). Curiosamente, apesar das diferenças no tamanho das lesões, esses dois grupos apresentaram semelhantes escores de sinais clínicos, com predomínio de lesões nodulares e ulceradas, o que foi considerado um desfecho com mais destruição tecidual. Padrões semelhantes também foram observados para os escores histopatológicos (Figura 8D).

4.2. Cinética de anticorpos igG anti-*Leishmania* após infecção por diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Os níveis de IgG2 anti-*Leishmania* foram quantificados em amostras de plasma e expressos como Índice Elisa (Figura 8F). A produção de IgG2 relativa aos antígenos de *Leishmania* foi observada em todos os grupos (10^4 , 10^5 ou 10^6) aos 15 dpi. Aos 30 dpi, enquanto a maioria dos animais do grupo 10^4 (0.63 [0.34-0.76]) e 10^5 (0.93 [0.70-1.25]) manteve os níveis de IgG2 anti-*Leishmania* abaixo do limite de detecção, (exceto um único animal infectado com um inóculo de 10^5 parasitos/20 μ L), a maior parte dos animais infectados do grupo 10^6 já soroconverteu neste tempo de avaliação (2.33 [1.51-3.99]). Aos 50 dpi, a mediana dos níveis de IgG do grupo 10^4 foi positiva (1.79 [1.11-4.37]), mas significativamente menor do que a do grupo 10^5 (6.03 [3.65-6.28]). Não houve diferença significativa nos níveis de IgG2 entre os grupos 10^5 e 10^6 . É importante ressaltar que aqueles animais que aos 50 dpi apresentaram IgG2 abaixo do limite de detecção foram os mesmos com tamanho de lesão menor que 1.0 mm (Figura 8B) e carga parasitária menor que 10^2 MEq (Figura 8E).

4.3. Carga parasitária e associação com a expressão de arginase e iNOS

Aos 15 dpi, não houve diferença significativa na expressão do DNA do parasito nas lesões: grupo 10^4 - 13,6 [2,15 - 86,7]; grupo 10^5 - 39,4 [3,82 - 88,6]; grupo 10^6 - 223 [5,84 -687] Eq / mg pele (Figura 8E). Em 50 dpi, os animais do grupo 10^4 apresentaram quantidades variáveis de carga parasitária. Os grupos 10^5 e 10^6 tiveram um padrão semelhante, porém com menor variabilidade em comparação com o grupo 10^4 . Para evitar resultados equivocados, o experimento não foi realizado nas 4 e 24 horas após a infecção, uma vez que os parasitos do inóculo experimental ainda poderiam estar presentes na pele. Em vez disso, foi realizada histologia e imunohistoquímica para detectar o parasito ou seus antígenos. Surpreendentemente, nenhum parasito íntegro foi visto na análise histopatológica em 4 horas pós infecção (hpi), mas observamos uma coloração avermelhada difusa espalhada por toda a derme. Em 24 hpi a coloração estava mais concentrada e grupos de amastigotas foram vistos, em geral próximos a folículos pilosos (Figura 9). Em ambos os tempos não houve reação inflamatória, mostrando que a presença do

parasito ou o trauma ocasionado pela agulha não foram suficientes para causar alterações teciduais. Chamava a atenção o ingurgitamento dos vasos linfáticos, provavelmente devido à drenagem do líquido do inóculo.

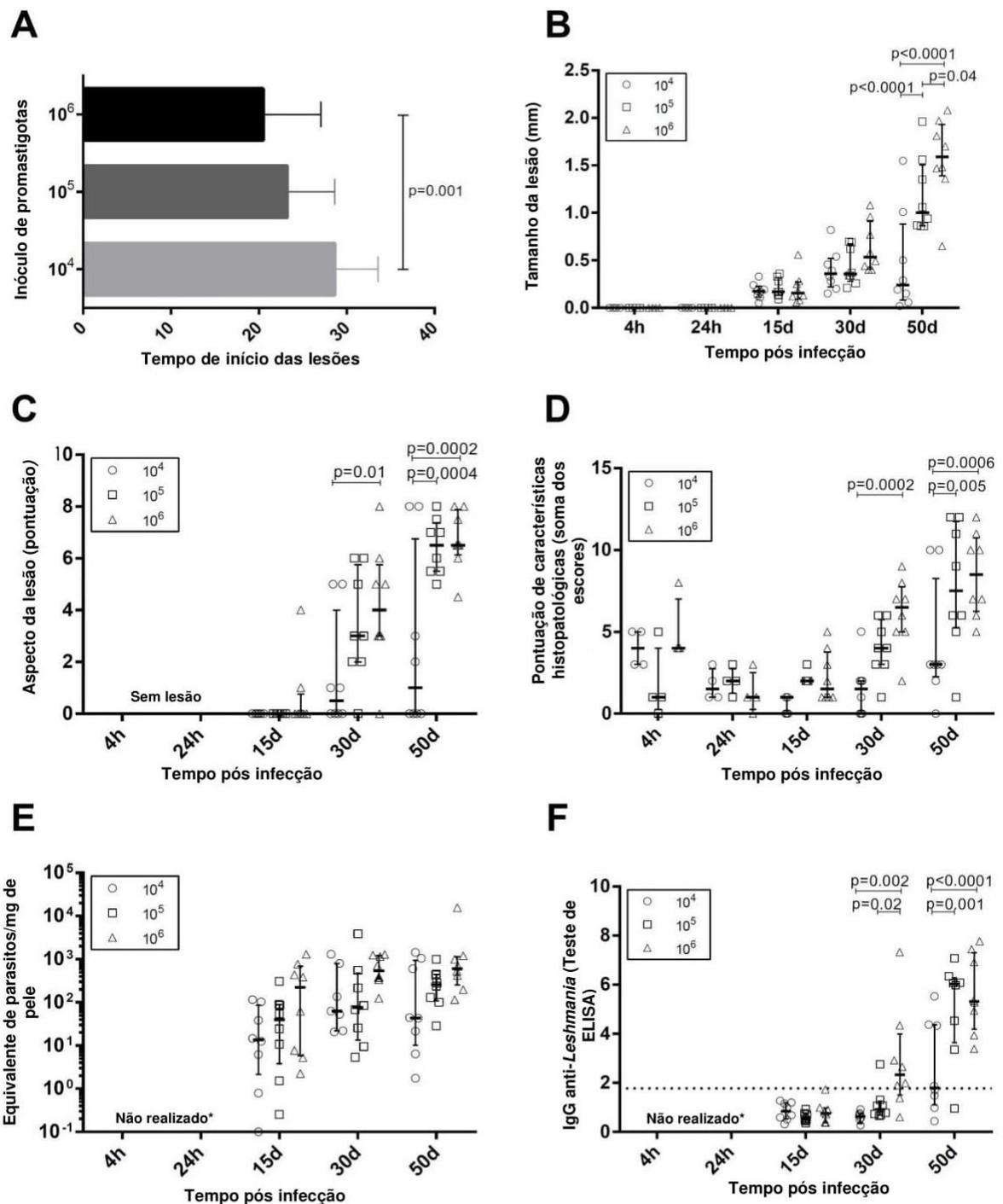


Figura 8: Aspectos clínicos, parasitológicos e imunológicos da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em hamster dourado nas fases precoces e tardia. Os animais foram infectados com um inóculo de 10^4 promastigotas de *L. braziliensis*/20 μ L (grupo 10^4), 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*/20 μ L (grupo 10^5) e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis*/20 μ L (grupo 10^6) e acompanhados nas fases iniciais (4 e 24h), precoce (15 e 30 dias) e tardia (50 dias) da infecção. Cada símbolo representa um animal; a linha em cada grupo representa a mediana e o intervalo interquartil. A linha pontilhada indica o valor de corte para a quantificação de IgG2 anti-*Leishmania*. nível de significância estatística – $p < 0.05$

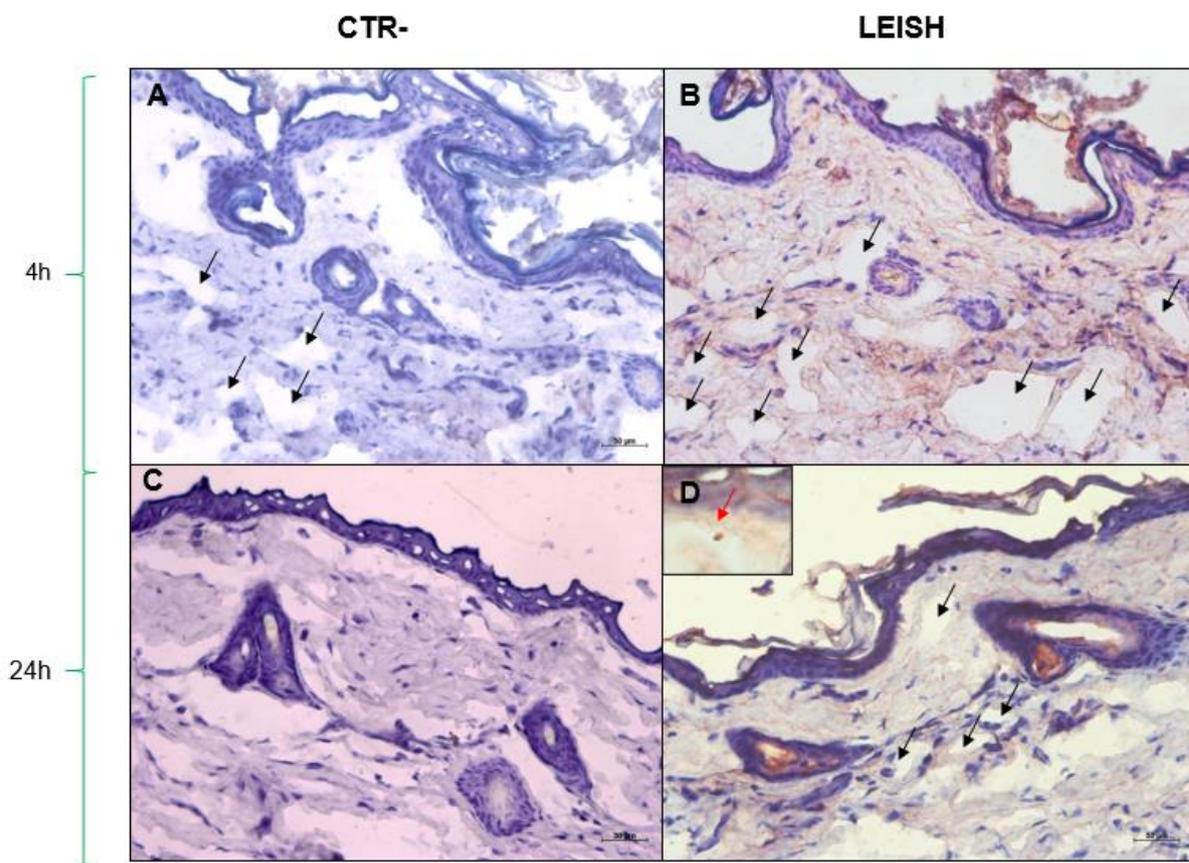


Figura 9: Detecção de antígenos de *Leishmania* por imunohistoquímica nas fases iniciais da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Os animais foram infectados com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*/20 μ L e os tecidos foram obtidos com 4 e 24 horas pos-infecção. Os tecidos representados nos painéis A e C são os controles negativos da reação, em que foi omitido o anticorpo primário; nos tecidos representados nos painéis B e D foi utilizado anticorpo primário anti-*Leishmania*. As imagens A, B, C e D possuem aumentos de 200X. No tecido representado no painel D, o insert possui aumento de 400X e a seta vermelha aponta para uma amastigota no tecido. As setas pretas destacam vasos linfáticos dilatados.

A arginase, uma enzima produzida por macrófagos e encontrada também em todas as cepas de *Leishmania*, estimula a replicação do parasito e também inibe a função do óxido nítrico (Pessenda; Silva 2020). Às 4 horas pós infecção (hpi), a expressão basal de arginina é elevada na pele de hamster (Ribeiro-Romão *et al* 2016). Em 4 hpi, a expressão de arginina foi regulada positivamente, em relação à pele normal, nos grupos 10^5 e 10^6 , mas não no grupo 10^4 . Porém, após 24 hpi, observamos um aumento de arginina também no grupo 10^4 . Todos os três grupos de inóculos mostraram um aumento na expressão de arginase em cerca de 5 vezes aos 15 e 30 dpi, e cerca de 10 vezes aos 50 dpi (Figura 10A). Este ambiente foi acompanhado por elevada carga parasitária (Figura 8E).

A função microbicida do macrófago foi avaliada pela expressão gênica de iNOS (Figura 10B e 11A). A expressão basal de iNOS foi baixa e modulada

negativamente ou até mesmo foi ausente (cor cinza) nas primeiras horas (4 e 24 hpi) e em 15 dpi, independente do inóculo. Em 30 dpi, uma tendência semelhante foi observada para animais do grupo 10⁴ e em metade dos animais do grupo 10⁵, mas o grupo 10⁶ teve uma expressão elevada desta enzima. Em 50 dpi, foi detectada uma alta expressão de iNOS em metade dos 8 animais do grupo 10⁴ e em todos os animais dos grupos 10⁵ e 10⁶ (Figura 11 A). No entanto, o aumento da expressão gênica de iNOs não foi associada ao controle da carga parasitária.

4.4. A carga parasitária de *Leishmania (Viannia) braziliensis* está relacionada com o padrão de citocinas induzido pelo parasito

A expressão gênica basal encontrada em animais não infectados, varia entre os alvos: IFN- γ e IL-10 – baixa expressão (Ct maior que 31); TNF, IL-6 e IL-4 – expressão intermediária (Ct entre 23 e 30); e TGF- β – alta expressão (Ct menor que 31) (Ribeiro-Romão *et al.*, 2016). Assim sendo, quanto menor o Ct, maior a expressão do gene e vice-versa. Levando isso em consideração, foram analisadas as alterações no Ct para expressão gênica de peles infectadas em relação às não infectadas.

No momento da infecção os promastigotas de *Leishmania* encontraram um ambiente no qual o gene TGF- β era altamente expresso (Figura 10H), enquanto os genes TNF (Figura 10E), IL-6 (Figura 10F) e IL-4 (Figura 10C) apresentavam uma expressão basal intermediária.

No grupo 10⁴, a presença de promastigotas não desencadeou a expressão do gene IL-4 em 4 hpi (Figura 10C). Os níveis os basais ou mesmo reduzidos de expressão de IL-4 foram mantidos até 30 dpi, e apenas em 50 dpi foi observada um pequeno aumento da expressão (Figura 10C). No entanto, uma onda de IFN- γ e TNF foi observada em 24 hpi (Figura 10D e 10E). Nesse grupo 10⁴, IL-6 e IL-10 também foram moduladas positivamente em 24 hpi e essa expressão foi mantida ou mesmo aumentada aos 50 dpi (Figura 10F e 10G). O aumento da expressão de TGF- β foi observado aos 15 dpi e 50 dpi (Figura 10H).

No grupo 10⁶, observamos uma ligeira indução do gene de IL-4 logo após a infecção (Figura 10C), enquanto IL-6 e IL-10 aumentaram cerca de duas a 10 vezes (Figura 10F e 10G). Além desses genes, IFN- γ , TNF e TGF- β foram mantidos

altamente expressos durante a fase inicial (15 e 30 dpi) e na fase crônica, quando infectados com 10^6 promastigotas (Figura 10D, 10E e 10H). O grupo 10^5 tendeu a seguir o padrão do grupo 10^6 , mas as alterações tenderam a demorar mais para ocorrer. Uma característica dos três grupos experimentais foi o aumento da expressão de todos os genes de citocinas na fase crônica. No entanto, a intensidade do gene IL-4 foi muito menor no grupo 10^4 em comparação com o grupo 10^5 e 10^6 (Figura 10C). Essas diferenças nos levaram a investigar possíveis perfis de genes de citocinas associados ao desfecho da doença.

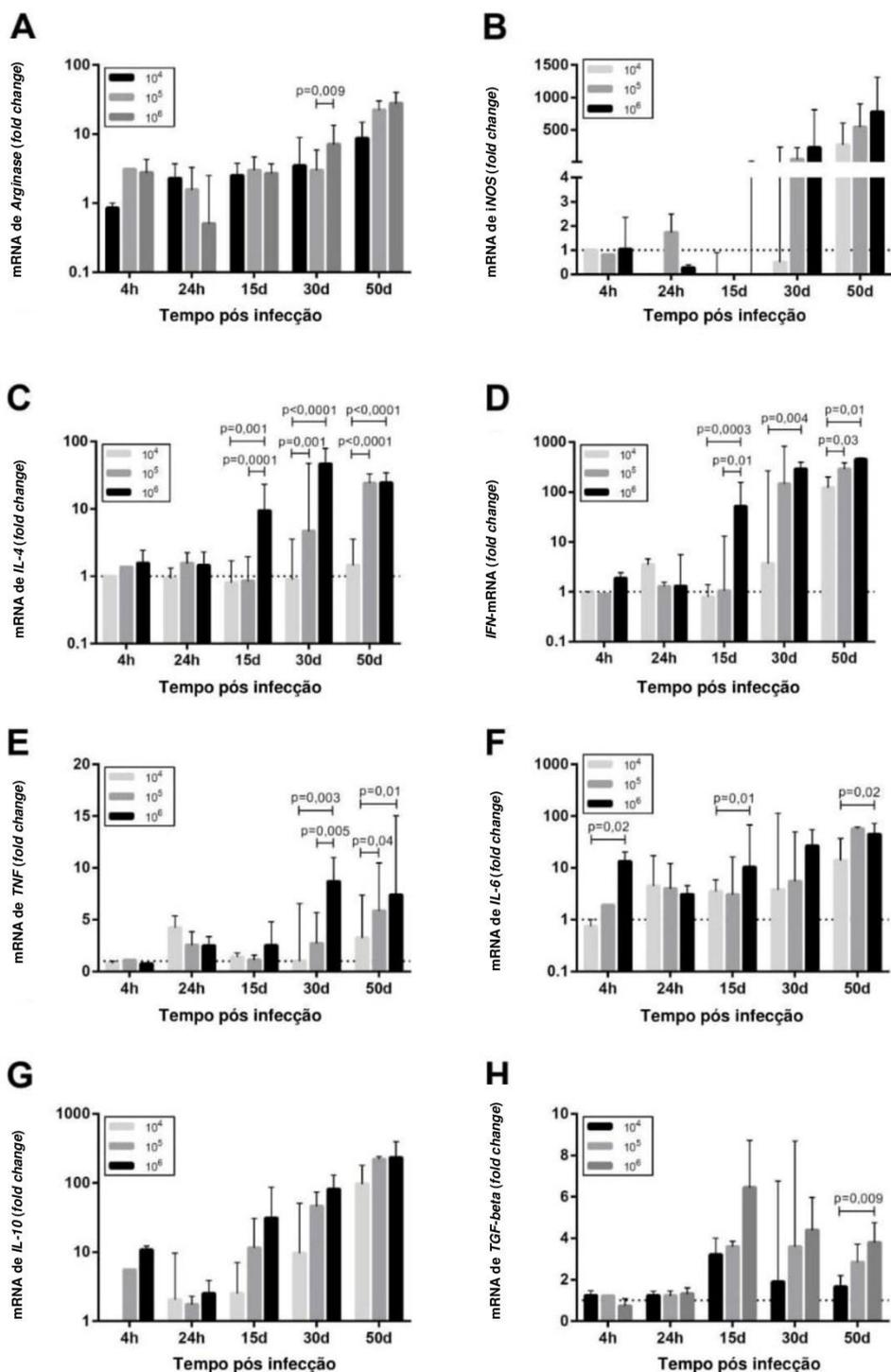


Figura 10: Alterações na expressão gênica de citocinas, arginase e iNOS. Foi analisado o aumento ou redução dos $\Delta\Delta Ct$ dos genes alvo detectados na pele de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* em relação aos animais não infectados. A expressão de RNA mensageiro na pele foi determinada por RT-qPCR em diferentes momentos pós-infecção. A linha pontilhada indica a expressão basal da pele não infectada. A barra representa a mediana e a linha, os intervalos interquartis. As análises estatísticas se referem às comparações dos valores dos $\Delta\Delta Ct$. p - Significância estatística. 10⁴, 10⁵, 10⁶ - número de promastigotas usados para infecção.

A análise multivariada da expressão gênica de IFN- γ demonstrou que essa citocina foi a única que influenciou no tamanho da lesão, apesar de não ter exercido efeito sobre a carga parasitária

Os fatores subjacentes à evolução clínica da doença também foram analisados. Para tal análise, foram consideradas variáveis dependentes (expressão do gene de IgG anti-Leishmania, citocinas, arginase e iNOS) e variáveis independentes (tamanho da lesão e carga parasitária cutânea). A expressão do gene de IFN- γ foi positivamente correlacionada com o tamanho da lesão. Nenhuma variável dependente influenciou a carga parasitária.

4.5. A assinatura gênica das citocinas parece estar relacionada com a baixa carga parasitária, mas não à progressão da doença

Um mapa de calor, (*heatmap*), foi utilizado para comparar a intensidade da expressão gênica de citocinas na pele dos hamsters nos 5 diferentes tempos de avaliação (Figura 11A). Os animais foram agrupados nos clusters 1A1, 1A2, 1B, 2A, 2B1 e 2B2, de acordo com o padrão gênico das citocinas (Figura 11B). O cluster 1A1 agrupou os animais 4h e 24h pós-infecção, sem que se observasse qualquer segregação relacionada aos diferentes inóculos. Os clusters 1A2 e 1B agruparam a maioria dos animais aos 15 dpi (19 de 23), 4 animais aos 30 dpi (3 deles do grupo 10^4 e 1 do grupo 10^5), e três animais aos 50 dpi do grupo 10^4 . Mesmo considerando essa heterogeneidade, os animais desses dois agrupamentos apresentavam apenas discreto edema na pata (Figura 12B), além de discreto infiltrado inflamatório (Figura 12C). No entanto, com exceção de um animal, todos os outros apresentaram carga parasitária igual ou inferior a 10^2 Eq / mg de pele, incluindo os animais com 30 e 50 dpi (Figura 12D).

O cluster 1A1 foi caracterizado por apresentar comparativamente uma intensidade de expressão mais elevada do gene de IL-4 (Figura 11B). No cluster 1A2, no entanto, os genes de TGF- β e IL-10 tiveram uma expressão comparativa mais elevada e os de IL-4 foram ligeiramente mais reduzidos. No cluster 1B, a maioria dos animais apresentou expressão comparativa mais elevada de TGF- β . Quatro animais do cluster 1B (todos do grupo 10^4 , um de 30 dpi e três de 50 dpi) em que o TGF- β estava baixo, apresentaram alta expressão de IL-10. Então, pelo

menos dois perfis de genes de citocinas parecem definir essas clusterizações. A assinatura de citocinas do cluster 1A2 pode ter alguma relação com a carga parasitária mais elevada (embora não significativa) quando comparada com o cluster 1B (Figura 12D). Todavia, maior variabilidade em termos de carga parasitária foi observada neste último grupo.

O cluster 2, especialmente 2B2, agrupou a maioria dos animais na fase tardia da infecção (50 dpi) ou infectados com inóculos mais altos (Figura 11B). Como esperado, os animais deste cluster apresentaram lesões mais graves, maior carga parasitária e maiores quantidades de IgG anti-*Leishmania* quando comparados ao cluster 1 (Figura 12B, 12D e 12E). No entanto, houve uma variabilidade considerável de todos os parâmetros avaliados. A carga parasitária foi a principal distinção entre os subclusters 2B1 e 2B2 (Figura 12D). Os animais do subcluster 2B1 (triângulos pretos) apresentaram carga parasitária significativamente menor do que os do subcluster 2B2 ($p = 0,0005$) (Figura 12D). Outra diferença marcante entre esses dois subclusters foi a expressão comparada mais reduzida de todas as citocinas, sendo o fenômeno pronunciado para IL-4 e IL-6 no subcluster 2B1 quando comparado com o 2B2 (Figura 11B). É importante remarcar que, a exceção da carga parasitária, as assinaturas de citocinas dos subclusters 2B1 e 2B2, não foram eficientes em definir um padrão imunológico associado a status clínico da infecção nessa última fase da infecção, uma vez que houve uma grande variação em termos de gravidade clínica dos animais com relação a tamanho e aspecto da lesão (Figura 12A e 12B), e intensidade de comprometimento histológico (Figura 12C) e níveis de IgG anti-*Leishmania* (Figura 12E). Isso nos levou a aprofundar nossas análises na tentativa de identificar que fatores poderiam estar influenciando as diferenças de comportamento e as distintas evoluções clínicas observadas entre os três grupos.

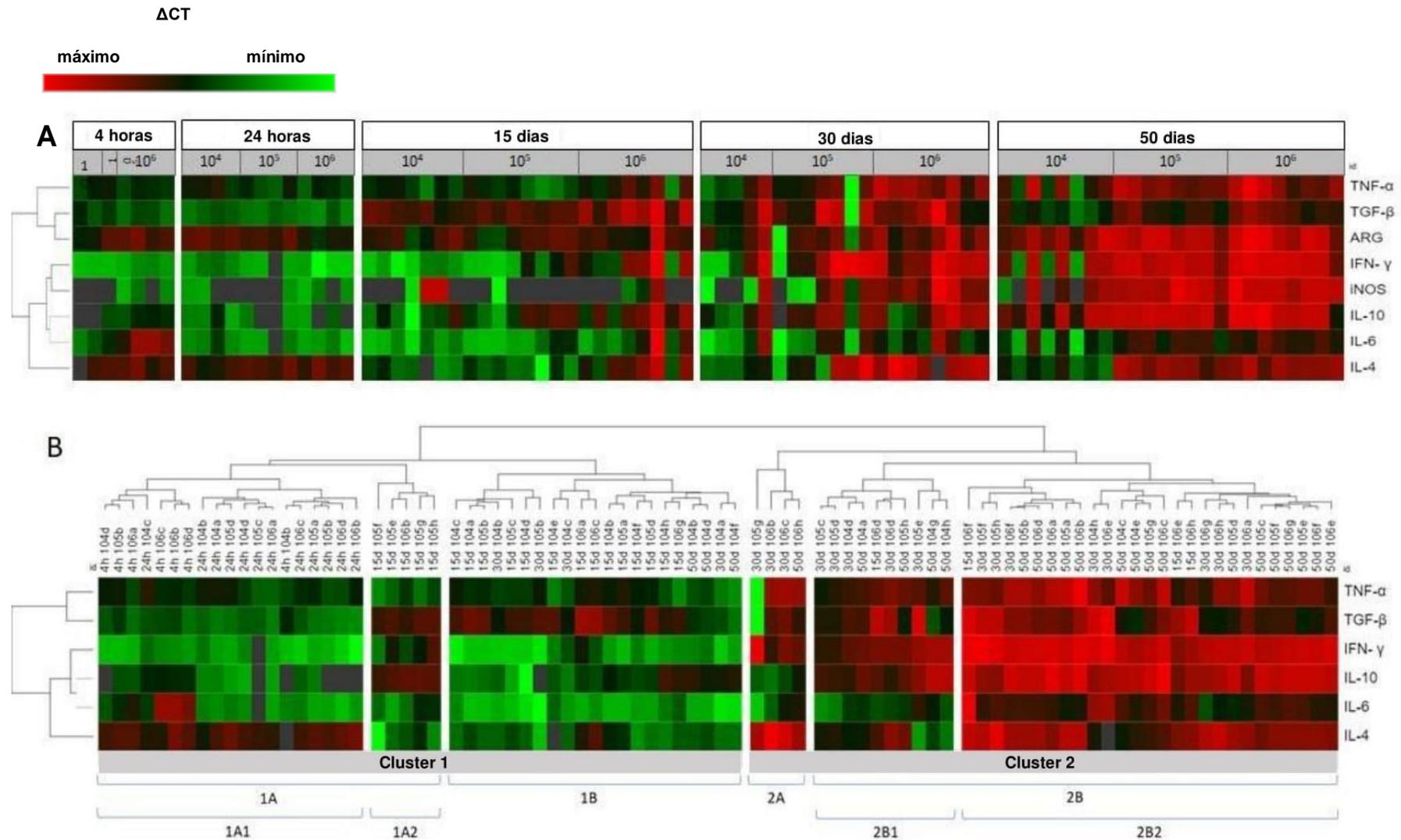


Figura 11: Mapas de intensidade de calor de expressão gênica em lesões de pele de hamstere ocasionadas por *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) Os animais foram agrupados por tempo pós-infecção (4 e 24 horas; 15, 30 e 50 dias) e diferentes inóculos (10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas). (B) Os animais foram agrupados por assinatura de expressão gênica. Cada linha representa uma molécula e cada coluna representa um animal. A cor vermelha indica maior expressão gênica e a cor verde, menor expressão. A cor cinza significa expressão gênica abaixo do limite inferior de detecção.

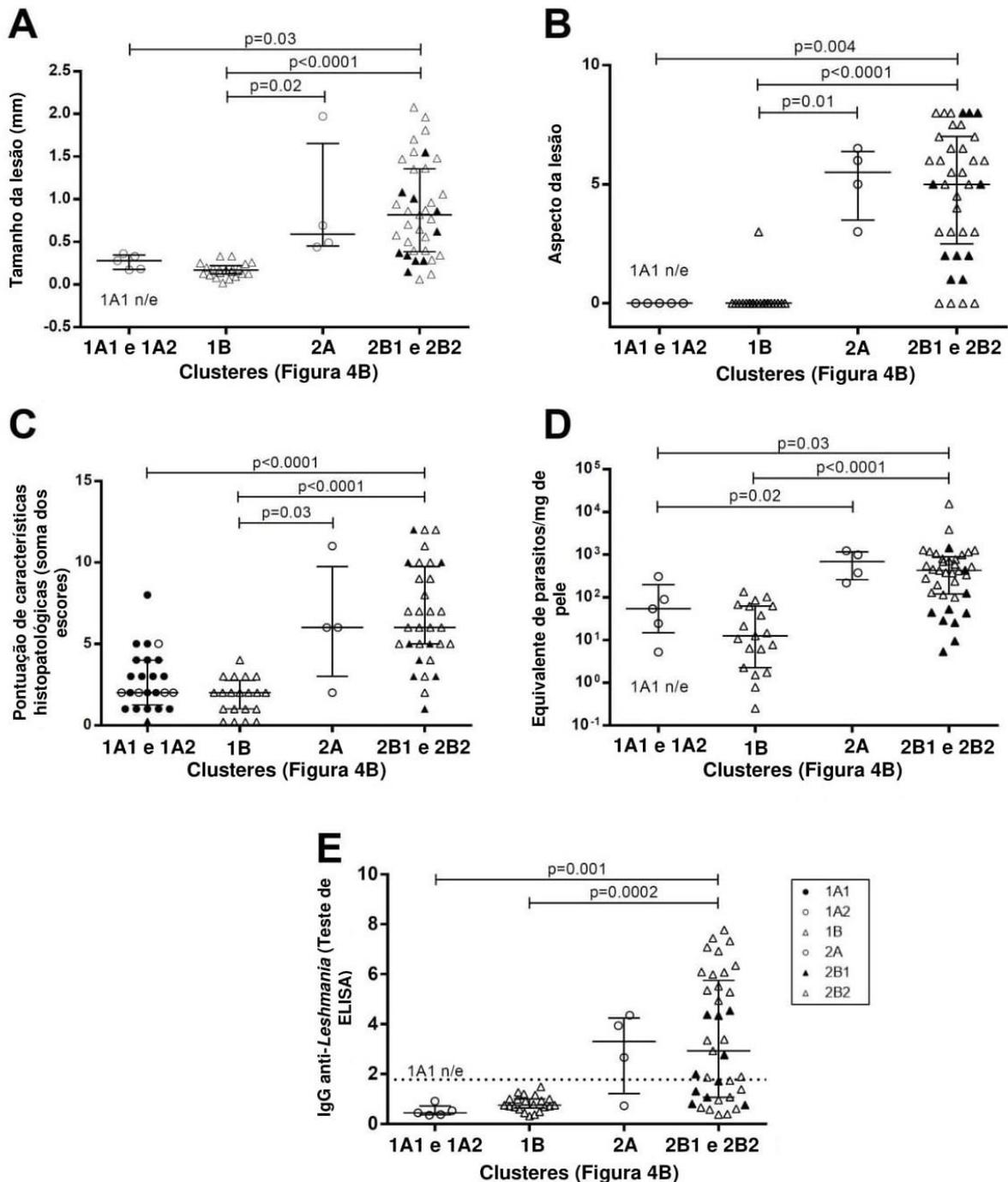


Figura 12 – Características clínicas, parasitológicas e imunológicas dos animais infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, de acordo com a assinatura de expressão gênica. Os animais foram agrupados pelo programa em clusteres (clusters: 1A1, 1A2, 1B, 2A, 2B1 e 2B2) utilizando o software Heat mapper® (Wishart Research Group at the University of Alberta) conforme demonstrado na Figura 10B. Cada símbolo representa um animal; As linhas em cada grupo de dispersão representam mediana e intervalo interquartil; a linha pontilhada indica o valor de corte para a quantificação de IgG; os símbolos pretos ▲ representam o subcluster 2B1 e ● representam 1A1; foram considerados os significativos os valores de $p \leq 0.05$.

4.6. Uma intensa rede de interação positiva entre as citocinas é mantida entre os animais capazes de controlar a doença

Para avaliar globalmente o estado imunopatológico conjuntamente com as características clínico-laboratoriais dos animais, foi feita uma análise em rede da matriz de correlação, incluindo todos os parâmetros biológicos estudados (Figura 12). Em 15 dpi, as interações de rede aumentaram diretamente com o aumento do número de promastigotas inoculadas. O grupo 10⁶ apresentou o maior número de correlações positivas entre os genes das citocinas, principalmente para IFN- γ versus expressão dos genes IL-10, TGF- β , TNF e IL-4.

Aos 30 dpi, o grupo 10⁴ apresentou aumento das correlações positivas quando comparado aos 15 dpi, principalmente para expressão de TGF- β . No grupo 10⁵, o gene TNF estabeleceu o maior número de interações, com correlações fortes e positivas com a expressão de TGF- β , IL-10, IL-6 e arginase em comparação aos 15 dpi. O grupo 10⁶ diferiu no conjunto de interações em comparação àquelas observadas aos 15 dpi, mas manteve múltiplas interações com IFN- γ , e também com IL-6 e arginase. Esse grupo perdeu a correlação positiva entre IFN- γ e citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β), da mesma forma como ocorreu para TNF e IL-6.

Aos 50 dpi, o grupo 10⁴ apresentou uma intensa rede de correlações positivas em comparação ao escasso número de interações observadas nos grupos 10⁵ e 10⁶. Isso incluiu numerosas e fortes correlações positivas envolvendo IFN- γ e citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β), bem como TNF ou IL-6 com citocinas antiinflamatórias (IL-4). Esse padrão foi associado a animais que apresentavam controle parcial da carga parasitária (Figura 8E) ou tamanho da lesão (Figura 8B).

Para certificar se o controle da doença estava associado a uma intensa interação na rede, dividimos os animais de 50 dpi em dois grupos, de acordo com o tamanho da lesão, independente do inóculo: os que controlaram da doença (lesões menores que 1mm e carga parasitária <10²); e os que evoluíram com progressão da doença (lesões maiores que 1 mm e carga parasitária > 10²). A assinatura observada em 50 dpi para o grupo 10⁴ foi reproduzida pelo grupo de “controle da doença”, com um espectro ainda mais intenso de interações fortes e positivas (Figura 14). Por outro lado, o grupo de progressão da doença apresentou uma rede com menor número de interações, que foram moderadas e positivas, ou moderadas

e negativas (Figura 14), sustentando a hipótese de que a imunopatogênese está associada à resposta imune modulada negativamente.

Nossos resultados demonstraram que o ambiente de citocinas encontrado pelo parasito no momento da infecção tem um predomínio de arginase e por expressão basal de citocinas como IL-4, IL-6 e TGF- β , que são fatores que favorecem a replicação da *Leishmania*. Com relação, a intensa destruição de parasitos que ocorre logo após a infecção, os parasitos que escaparam da resposta imune inata são internalizados e sobrevivem em um ambiente intracelular. A quantidade de parasitos no inóculo influenciou a indução de citocinas, sendo estas mais intensas nos grupos 10^5 e 10^6 , em relação ao grupo 10^4 , reforçando a hipótese de que a carga infectiva influencia a evolução da infecção. A infecção com baixos inóculos (10^4 promastigotas/20 μ L) causou uma indução de citocinas. A expressão comparada menos intensa de IL-4 e IL-6 parecem ter impactado na assinatura de citocinas que foi associada à carga parasitária mais baixa. Entretanto, mais que o efeito da ação de uma outra citocina específica, a interação entre esses fatores e a interrelação entre elas, é o mecanismo apresentado pelos animais que tiveram uma evolução mais benigna das lesões cutâneas.

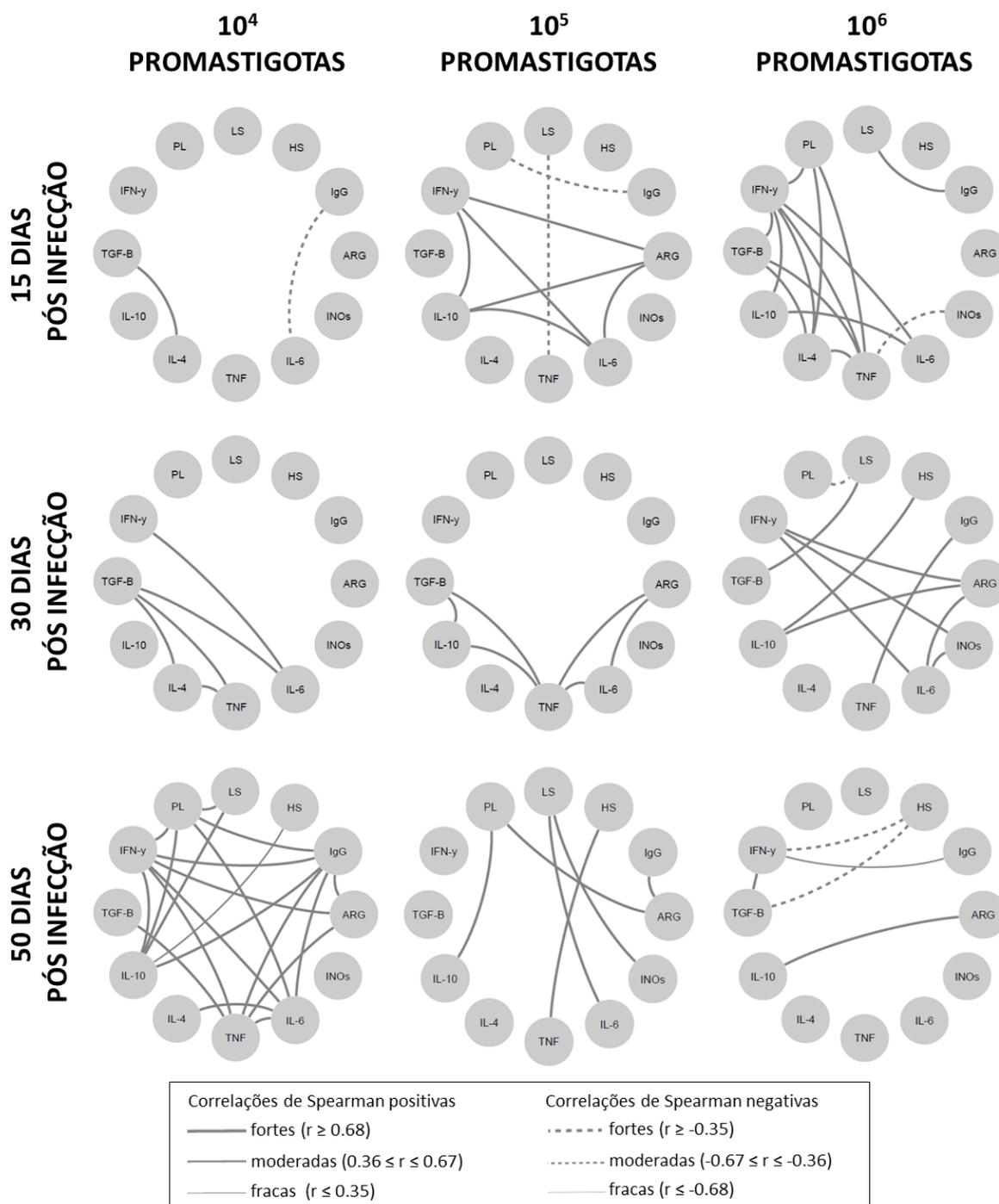


Figura 13. Redes de biomarcadores envolvidos nas fases precoces e tardia do curso da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em hamsters. Os animais avaliados aos 15, 30 ou 50 dias após a infecção com diferentes inóculos de promastigotas (10^4 promastigotas/ $20 \mu\text{L}$, 10^5 promastigotas/ $20 \mu\text{L}$ ou 10^6 promastigotas/ $20 \mu\text{L}$). As correlações de Spearman significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$ e representadas por uma linha conectando os nós do círculo. A força do índice de correlação foi representada pela espessura da linha de conexão. Foram utilizadas linhas contínuas para as correlações positivas (que variam entre fortes, moderadas ou fracas de acordo com a espessura) e linhas pontilhadas para as correlações negativas (que variam entre fortes, moderadas ou fracas de acordo com a espessura). PL: carga parasitária; LS: tamanho da lesão; HS: pontuação histopatológica dos escores; ARG: arginase; INOs: óxido nítrico sintase induzível.

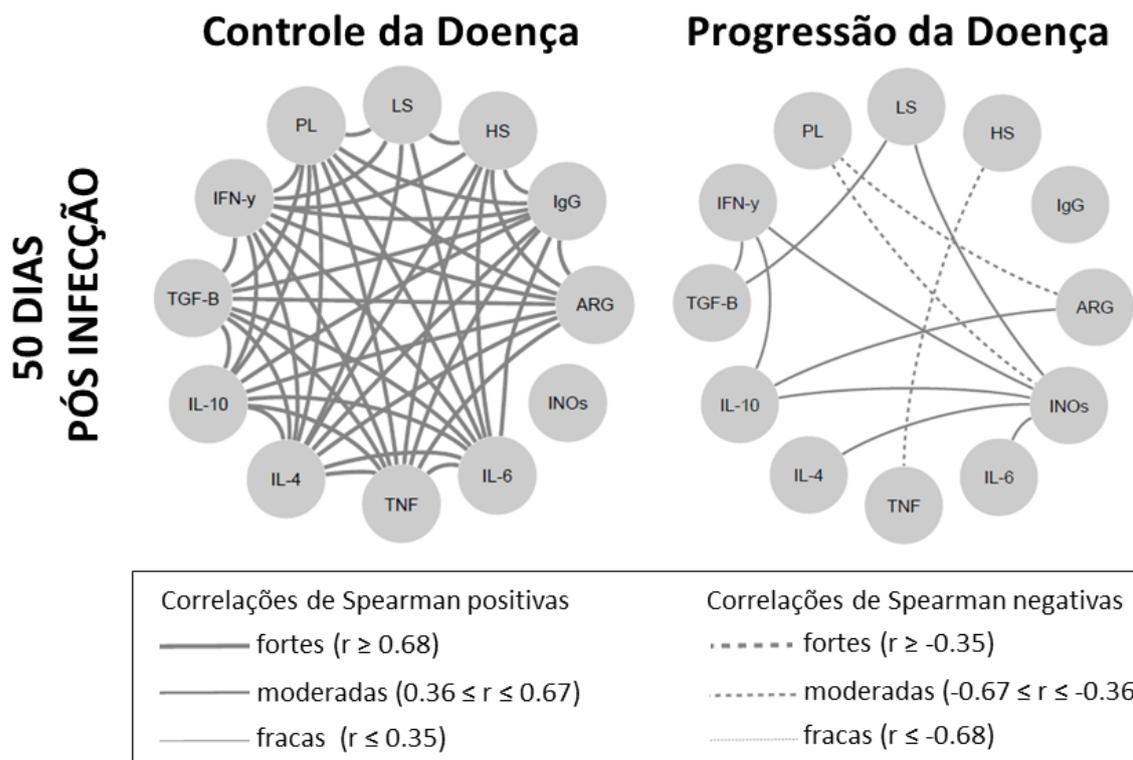


Figura 14. Redes de biomarcadores envolvidos nos hamsters que controlaram a infecção e nos que evoluíram com doenças progressiva. As interações das redes de hamsters avaliadas nos animais com controle da doença (lesões menores que 1mm e carga parasitária $<10^2$ promastigotas/20 μ L) ou progressão da doença (lesões maiores que 1mm e carga parasitária $>10^2$ promastigotas/20 μ L). Correlações de Spearman significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$, e foram representadas por uma linha conectando os nós do círculo. A força do índice de correlação foi representada pela espessura da linha de conexão. Foram utilizadas linhas contínuas para as correlações positivas (que variam entre fortes, moderadas ou fracas de acordo com a espessura) e linhas pontilhadas para as correlações negativas (que variam entre fortes, moderadas ou fracas de acordo com a espessura). As correlações relacionadas com o controle da doença estão representadas na rede à esquerda, enquanto aquelas relacionadas com a progressão da doença estão representadas na rede à direita. PL: carga parasitária. LS: tamanho da lesão. HS: pontuação histopatológica dos escores. ARG: arginase. INOs: óxido nítrico sintase.

5. DISCUSSÃO

Em um trabalho anterior, Vieira e colaboradores (2017) estudou a imunopatologia de animais inoculados com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis*, nos tempos de 15, 30 e 50 dias pós-infecção, e verificou que a baixa indução de IL-4 e TGF- β era associada à carga infectiva, tendo importante papel no controle da doença. Entretanto, vários aspectos ainda ficaram por ser elucidados. Ficou claro que a análise binária de comparação entre parâmetros biológicos não era suficiente para entender a complexidade do fenômeno, não sendo, assim, suficiente para explicar o impacto das diferenças das cargas infectivas na evolução da infecção. Também encontramos uma grande variabilidade de comportamento clínico e imunopatológico, o que era esperado, já que lidamos com um modelo não isogênico. Por outro lado, também verificamos que, do mesmo modo que foi visto no modelo experimental camundongo, as interações que ocorrem nas fases logo após a infecção deveriam impactar substantivamente o curso clínico da leishmaniose cutânea experimental no modelo hamster. Assim, neste trabalho, nós reanalisamos os resultados obtidos por Vieira e colaboradores (2017), utilizando avaliações multiparamétricas, bem como estendemos os estudos do curso da lesão no modelo hamster-*L. braziliensis* para as fases iniciais logo após a infecção. Dessa forma, esperamos estabelecer como se dá o comportamento desse modelo desde o período pré-patente, ou seja, antes do início das lesões até as fases precoces e tardias da doença.

Na infecção natural por *L. major* é sugerido que um flebótomo transfere menos de 600 promastigotas ao hospedeiro, embora inóculos maiores do que 100.000 promastigotas também possam ocorrer (Kimblin *et al.*, 2008), conforme observado para outras espécies de *Leishmania* (Giraud *et al.*, 2019). A carga parasitária influencia na gravidade da doença, uma vez que altos inóculos aceleram processos patogênicos (Kimblin *et al.*, 2008; Bretscher *et al.*, 1992; Ribeiro-Romão *et al.*, 2014). Por outro lado, uma menor carga parasitária parece estar associada ao autocontrole da infecção, um desfecho comum em áreas endêmicas (Andrade-Narvaez *et al.*, 2006)

No presente estudo, os três diferentes inóculos de *L. braziliensis* encontraram um ambiente altamente favorável na pele para a sua replicação: altas taxas de arginase e TGF- β , além de uma expressão intermediária de IL-4 e baixas taxas de

iNOS. Em 4 hpi, não foram observados parasitos intactos, mas antígenos de *Leishmania* foram detectados espalhados na derme, sugerindo que grande parte deles foi destruída *in situ* pela imunidade inata. Às 24 hpi, pouquíssimas amastigotas foram vistas dentro de células, como já demonstrado em estudos de outros autores (Peniche *et al.*, 2017). É bastante plausível inferir que, mesmo com a destruição em massa dos parasitos, aqueles infectados com os maiores números de promastigotas tiveram também maior sobrevivência de parasitos para darem início aos processos patogênicos.

O tempo de início da lesão e o incremento do tamanho das lesões também estiveram diretamente relacionados ao tamanho do inóculo. A carga parasitária também aumentou com o tempo, apontando para uma replicação contínua dos parasitos. Durante a fase inicial, nenhum sinal clínico de lesão foi visto até os 15 dpi, porém uma quantidade considerável de parasitos já foi detectada no local da lesão nesse período. Essa evolução se encaixa no conceito de “fase silenciosa” descrita na infecção por *L. major* no modelo C57BL-6, na qual o estabelecimento de um pico de carga parasitária na derme ocorreu mesmo na ausência de lesão ou quaisquer alterações histopatológicas evidentes no local, ou seja a replicação parasitária antecedeu o aparecimento das lesões (Belkaid *et al* 2000). Barral e colaboradores também identificaram parasitos no linfonodo antes do surgimento das úlceras (Barral *et al* 1995). Após 30 dpi, a carga parasitária variou de 10^1 a 10^3 Eq parasito/mg pele na maioria dos animais dos três grupos. Mesmo assim, 75% dos animais do grupo 10^4 (6 de 8) apresentaram lesões de tamanho muito pequeno (abaixo de 0,5 mm) e escores histopatológicos baixos. Isso indica claramente que esses animais foram capazes de controlar o dano tecidual, mas não a replicação do parasito *in situ*.

Aos 50 dpi, o inóculo mais baixo foi o mais frequentemente associado com o controle das lesões cutâneas. Na maioria dos animais do grupo 10^4 , as lesões foram pequenas ou mesmo ausentes, mas a carga parasitária, embora mais baixa, não foi significativamente diferente em relação aos grupos 10^5 e 10^6 . Os grupos 10^5 e 10^6 apresentaram similaridade nos seguintes parâmetros: aspecto da lesão, grau de dano tecidual, bem como similares cargas parasitárias. No entanto, isto não ocorreu em todos os animais, resultando em um perfil clínico e parasitológico muito heterogêneo aos 50 dpi. Os parâmetros associados ao aspecto de lesão, o escore histopatológico, a carga parasitária e os anticorpos IgG anti-*Leishmania* também aumentaram com o tempo, mas tornaram-se semelhantes nos grupos 10^5 e 10^6 aos

50 dpi. Nosso grupo demonstrou, em estudos anteriores, que após 102 dias de infecção, esses grupos apresentaram um desfecho similar (Ribeiro-Romão *et al.*, 2014). No presente trabalho, o curso clínico do grupo 10^5 também se tornou semelhante ao grupo 10^6 após a fase inicial. Considerando a grande diferença nos inóculos iniciais (900.000 promastigotas), não era esperado que os grupos 10^5 e 10^6 apresentassem comportamento semelhante. Curiosamente, em humanos, a carga parasitária nas lesões de leishmaniose cutânea não parece ser um bom preditor da progressão da doença (Pereira *et al.*, 2017). O mecanismo que direciona a evolução clínica da lesão do grupo 10^5 em direção ao grupo 10^6 parece estar presente no final da fase inicial de infecção. Um atraso no desenvolvimento da doença observado no grupo 10^5 sugere que os mecanismos imunológicos anti-*Leishmania* foram inicialmente acionados, mas não foram suficientes para conter os efeitos da carga parasitária. Outras ferramentas para análise de lesões, como mudanças da assinatura espectral, recentemente descritas para o modelo hamster infectado com *L. braziliensis* irão estender nossa compreensão acerca da formação e desenvolvimento das lesões cutâneas (Montoya *et al.* 2019). A interação de promastigotas com o sistema imune da pele antes delas adentrarem as células hospedeiras resulta em uma estimulação local do sistema imune inato. Observamos que os genes de IL-10 e IL-6 foram induzidos na pele dos animais infectados dos grupos 10^5 e 10^6 , enquanto não foram observadas mudanças para TGF- β . Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de humanos saudáveis estimuladas por promastigotas também tiveram a produção de IL-10 aumentada, mas não de IL-6, enquanto TGF- β foi até mesmo negativamente modulado (Gomes *et al.*, 2014). É sabido que IL-6, juntamente com IL-1- β e IL-17, aumentam as moléculas de adesão nas células endoteliais, permitindo a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (Goebel *et al.*, 2000; Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007; Boaventura *et al.*, 2010). É possível que o número de parasitos que desafiam o sistema imunológico tenha conduzido esses fenômenos, uma vez que nenhum aumento na indução de citocinas foi observado no grupo 10^4 em 4 hpi. Por outro lado, é importante ressaltar que somente o grupo 10^4 , avaliado às 24 hpi, apresentou uma regulação positiva dos genes TNF e IFN- γ , o que possivelmente está relacionado com as amastigotas recém transformadas intracelularmente. Essa onda poderia ter exercido alguma influência nas etapas seguintes de infecção.

A indução do gene de IL-4 também foi bem distinta nos três grupos de animais infectados. Uma sutil regulação positiva desse gene foi observada nos grupos 10^5 e 10^6 em 4 e 24 hpi, mas não no grupo 10^4 . Juntamente com a ausência de uma modulação positiva dos genes de TGF- β , IL-6 ou IL-10, apontando para um ambiente menos permissivo para a proliferação do parasito. Por outro lado, uma expressão basal de IL-4 foi confirmada na pele de hamsters em estudos conduzidos anteriormente (Ribeiro-Romão *et al.*, 2014). Já foi observado que essa citocina é produzida pela ativação de mastócitos cutâneos (Oliveira *et al.*, 2005; Descatoire *et al.*, 2017) ou queratinócitos (Ehrchen *et al.*, 2010). A produção precoce de IL-4 se destaca como um importante mediador para a ativação e diferenciação de células dendríticas residentes (Hurdal *et al.*, 2013; Govender *et al.*, 2018), necessárias para a ativação futura de uma resposta Th1 efetora (Biedermann *et al.*, 2001; Hurdal *et al.*, 2013). No entanto, a indução de IL-4 durante fases mais tardias de infecção pode estar relacionada a uma resposta Th2, a qual contribui para a progressão da leishmaniose cutânea (Biedermann *et al.*, 2001). Aos 50 dpi, todos os genes de citocinas foram modulados positivamente no grupo 10^4 , com destaque para a expressão de IL-4, que apresentou quantificação relativa muito menor, quando comparada aos grupos 10^5 e 10^6 .

Durante a fase silenciosa, observamos uma regulação positiva de TGF- β já em 15 dpi, quando espera-se que os efeitos de uma resposta de células T induzida por *Leishmania* devam estar começando a ocorrer. Nesse momento, as lesões tornaram-se aparentes e foi observado um aumento do infiltrado de macrófagos. No modelo hamster infectado por *L. panamensis*, essas células também apareceram após 10 dpi (Peniche *et al.*, 2017) e aos 15 dpi (Montoya *et al.*, 2018). Em macrófagos de BALB/c, TGF- β aumentou a replicação de *L. braziliensis*, que, por sua vez, também produziu seu produto biologicamente ativo assim como também foi observada uma exacerbação *in vivo* das lesões de leishmaniose, que relacionaram à presença de IL-10 e não de IL-4, devido à indução de uma regulação negativa da resposta imune (Barral *et al.*, 1993).

A estimulação com amastigotas de *L. braziliensis* aumenta em 10 vezes a indução de TGF- β em humanos saudáveis, e também aumenta a indução do RNA mensageiro de IL-10, IL-6 e IL-1 β em menor intensidade. Esses autores demonstraram que sua estimulação foi seguida pela liberação de citocinas por cultura de PBMC (Gomes *et al.*, 2014). Já foi demonstrado também que seis cepas

de *L. braziliensis* induziram diferentes genes de citocinas inflamatórias e regulatórias aos 30 e 60 dpi, com exceção de IL-6 (Rêgo *et al.*, 2019). Como utilizamos em todos os experimentos parasitos provenientes do mesmo lote de congelamento, a influência da heterogeneidade do background genético do hospedeiro no resultado da infecção pode ser claramente observada.

A clusterização de citocinas pelo mapa de calor (*heatmap*) permitiu separar, ao menos nas fases iniciais, os animais de acordo com o tempo de evolução, uma vez que todos os animais avaliados às 4 e 24 hpi (CL 1A) e a maioria dos analisados aos 15 e 30 dpi (CL 1A e CL 1B) foram agrupados juntos. Todavia, o CL 2, incluindo principalmente os animais em fase inicial e crônica, apresentaram maior expressão de citocinas. Como mencionado anteriormente, IL-4, TGF- β e IL-6 pareceram ser responsáveis pela evolução da doença. Não obstante, a análise multivariada mostrou que o gene de IFN- γ , que foi altamente expresso durante a fase crônica, foi a única varável que influenciou positivamente no tamanho da lesão, apontando para o papel deletério da resposta proinflamatória desregulada (Oliveira *et al.*, 2014). Embora nenhuma citocina tenha influenciado na carga parasitária, o CL 2B1 apresentou menor carga parasitária quando comparado ao CL 2B2. Os genes das citocinas IL-4 e IL-6 foram claramente expressos de forma diferenciada nesses clusters, tendo sido menos expressos no cluster 2B2. É importante pontuar que a IL-6 foi positivamente regulada desde o início da infecção, especialmente nos grupos 10^5 e 10^6 . Tomados em conjuntos, estes resultados apontam para um possível papel da IL-6, além da IL-4, na replicação do parasito nesse modelo.

A inter-regulação entre as citocinas já foi demonstrada na leishmaniose humana ocasionada por *L. braziliensis* (Oliveira *et al.*, 2014). Esses autores observaram, em estudos *in vitro* utilizando células humanas, que IL-10 e TGF- β regularam negativamente a produção de TNF e IL-17, enquanto IFN- γ e TNF induziram positivamente uma à outra, reciprocamente. Contudo, a neutralização de IFN- γ , mas não de TNF, induziu a liberação de IL-10. Logo, o equilíbrio entre a expressão das citocinas, mais que seus níveis quantitativos absolutos, parece impactar de forma mais expressiva o desfecho clínico. A análise por rede dos parâmetros clínicos e da expressão gênica de citocinas envolvidas na patogênese demonstrou que hamsters com a capacidade de controlar a doença aos 50 dpi parecem ter adaptado sua resposta imunológica a uma expressão geral mais baixa de citocinas, a qual foi associada a um equilíbrio de expressão entre elas. Essas

condições provavelmente mantiveram a regulação das funções efetoras das citocinas, possivelmente com produção de quantidades proporcionais de fatores solúveis antagônicos. Essa assinatura harmônica envolvendo as diferentes citocinas observadas em animais que controlaram a leishmaniose cutânea experimental pode ser traduzida pela intensa rede de numerosas interações, baseadas em correlações de Spearman fortes e positivas. Nessa rede, a ausência de correlações negativas também reforça a ideia de uma resposta imune bem modulada (Maucher *et al.*, 2011; Vinhaes *et al.*, 2019). Diferentemente, aqueles animais com progressão de doença, apresentaram um número reduzido de relações entre as expressões gênicas de citocinas o que aponta para um ambiente de baixa imunomodulação. Ademais, uma correlação inversa da expressão gênica de IFN- γ com a progressão da doença, juntamente com uma expressão constante de IL-4 ao longo do tempo foram também consideradas para definir a assinatura molecular imunológica associada com o controle da leishmaniose cutânea em hamsters.

6. CONCLUSÕES

1) No modelo *L. braziliensis*-hamster, a baixa carga parasitária está associada com lesões menos graves, mas a susceptibilidade individual pode subverter os mecanismos de controle imunopatogênico.

2) A IL-4, IL-6, IL-10 e o TGF- β foram associados com a progressão da infecção, enquanto que o IFN- γ parece estar relacionado ao dano tecidual.

3) Mais que os níveis de citocinas, a intermodulação entre elas deve ser o que leva ao equilíbrio entre a resposta efetora e a regulatória, propiciando um melhor controle da infecção e redução dos danos ao tecido.

7. PERSPECTIVAS

Pretendemos avaliar os fatores de virulência da cepa (MCAN/BR/98/R619) de *L. (V.) braziliensis*, a qual utilizamos para a infecção dos hamsters no presente estudo. A principal molécula de interesse relacionada à virulência é a leishmanolisina ou GP63, proteína de superfície das promastigotas que é crucial para a infecção, uma vez que medeia importantes processos, como a ligação e internalização dos parasitos pelos macrófagos e sua sobrevivência dentro dos fagolisossomos. Também gostaríamos de avaliar se a proporção de células TCD4+ e TCD8+ nos animais que conseguem controlar a infecção difere daqueles que evoluem com lesão progressiva. Além disso, também pretendemos realizar a quantificação de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo, a fim de investigar se a produção de espécies reativas de oxigênio pelos macrófagos e a expressão de proteínas relacionadas ao equilíbrio redox (como a glutathiona reduzida e a catalase) é mais efetiva em animais que conseguem conter a infecção do que nos animais que tendem à cronificação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchi fa A, Sallusto F. Interleukins 1 beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol.* 2007; 8: 942-949.

Alexander J, Russel DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Adv Parasitol.* 1992; 31: 175-254.

Andrade-Narvaez FJ, Loría-Cervera EN, Sosa-Bibiano EI, Van Wynsberghe NR. Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2016; 111(10): 599-604.

Anversa L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB, Ramirez LE. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2018; 64(3): 281-289.

Arruda MSP, Nogueira MÊS, Bordon AP. Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of *Leishmania mexicana* in the cheek pouch of the hamster. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2002; 35(4): 293-297.

Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2018; 8: 1-8.

Barral AMP, Barral Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twarzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(8): 3442-3446.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53(3): 256-259.

Bates PA. Revising *Leishmania's* life cycle. *Nat Microbiol.* 2018; 3(5): 529-530.

Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. 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.* 2000; 165(2): 969-977.

Biedermann T, Zimmermann S, Himmelrich H, Gummy A, Egeter O, Sakrauski AK, *et al.* IL-4 instructs Th1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol.* 2001; 2(11): 1054-1060.

Boaventura VS, Santos CS, Cardoso CR, Andrade J, Dos Santos WLC, Clarêncio J, *et al.* Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol* 2010; 40(10): 2830-2836.

Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 1992; 257(5069): 539-542.

Bruschi F, Gradoni L. The leishmaniasis: old neglected tropical diseases. Berlin, Germany: Springer; 2018.

Bustos MFG, González-Prieto G, Ramos F, Mora MC, Hashiguchi Y, Parodi C, *et al.* Clinical and epidemiological features of leishmaniasis in northwestern-Argentina through a retrospective analysis of recent cases. *Acta Trop.* 2016; 154:125-32.

Cabrine-Santos M, Silva EL, Chapadeiro E, Ramírez LE. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol.* 2001; 99(3): 160-167.

Carrillo E, Jimenez MA, Sanchez C, Cunha J, Martins CM, Seva AP, *et al.* Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. *PLoS One* 2014; 9(2): 1-10.

Castiglione RC, Barros CMMR, Boa BCS, Souza MGC, Bouskela E. Effects of selenium in the microcirculation of fructose-fed hamsters. *J Vasc Res* 2018; 55: 203-209.

Celeste JLL, Moura APV, França-Silva JC, Sousa GM. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology* 2017; 144(9): 1191-1202.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 27 de mar. 2020.

Chagas AC, Oliveira F, Debrabant A, Valenzuela JG, Ribeiro JMC, Calvo E. Lundep, A sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits X1la contact activation in human plasma. *PLoS Pathog* 2014; 10(2): 1-12.

Conceição-Silva F, Morgado FN. *Leishmania spp*-host interaction: there is always an onset, but is there an end? *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9: 1-14.

Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose tegumentar Americana. In JR Coura. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; 2013.

Descatoire M, Hurrell BP, Govender M, Passelli K, Martinez-Salazar B, Hurdayal R, *et al*. IL-4R α signaling in keratinocytes and early IL-4 production are dispensable for generating a curative T helper 1 response in *Leishmania major*-infected C57BL/6 mice. *Front Immunol*. 2017; 8: 1-12.

Ehrchen JA, Roebrock K, Foell D, Nippe N, Von Stebut E, Weiss JM, *et al*. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog* 2010; 6(4): 1-16, 2010.

Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, *et al.* Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol.* 2010; 11:1-12.

Flores A, Venicia G, Pacheco S, Maria C, Ochoa S, Humberto W, *et al.* Th17 lymphocytes in atypical cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Central America. *Parasite Immunol.* 2020; 1-16.

Garabalino MA, Olaiz N, Portu A, Saint Martin G, Thorp SI, Pozzi ECC, *et al.* Electroporation optimizes the uptake of boron-10 by tumor for boron neutron capture therapy (BNCT) mediated by GB-10: a boron biodistribution study in the hamster cheek pouch oral cancer model. *Radiat Environ Biophys.* 2019; 58(3): 455-467.

Ghorbani M, Farhoudi R. Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 2018; 12: 25-40.

Giraud E, Martin O, Yakob L, Rogers M. Quantifying *Leishmania* metacyclic promastigotes from individual sandfly bites reveals the efficiency of vector transmission. *Commun Biol.* 2019; 2(1): 1-12.

Goebel MU, Mills PJ, Irwin MR, Ziegler MG. Interleukin-6 and tumor necrosis factor- α production after acute psychological stress, exercise, and infused isoproterenol: differential effects and pathways. *Psychosom Med.* 2000; 62(4): 591-598.

Gogoi M, Datey A, Wilson KT, Chakravorty D. Dual role of arginine metabolism in establishing pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2016; 29: 43-48.

Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LI, Abrahamsohn IA, *et al.* *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TGF- β by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol* 2014; 36(5):225-231.

Gómez-Galindo AM, Delgado-Murcia LG. Body weight as a determinant of clinical evolution in hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2013; 55(5): 357-361.

Gontijo CMF, Pacheco RS, Oréfice F, Lasmar E, Silva ES, Melo MN. Concurrent cutaneous, visceral and ocular leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a kidney transplant patient. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 2002; 97(5): 751-753.

Gontijo B, Carvalho MLR. American cutaneous leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2003; 36(1): 71-80.

Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8(4): 419-433.

Govender M, Hurdayal R, Martinez-Salazar B, Gqada K, Pillay S, Gcanga L, *et al.* Deletion of interleukin-4 receptor alpha-responsive keratinocytes in BALB/c mice does not alter susceptibility to cutaneous leishmaniasis. Infect Immun 2018; 86 (12): 1-16.

Guerra JAO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIARC, Gama P, Moura A, *et al.* Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5(3): 1-5.

Guerra JAO, Maciel MG, Guerra MCF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, *et al.* Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2015; 48(1): 12-19.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartx RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. J Am Acad Dermatol. 2015; 73(6): 911-926.

Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health* 2016; 44(1): 1-9.

Hurdayal R, Nieuwenhuizen NE, Revaz-Breton M, Smith L, Hoving JC, Parihar SP, *et al.* Deletion of IL-4 receptor alpha on dendritic cells renders BALB/c mice hypersusceptible to *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10,): 1-15.

Ibrahim MK, Barnes JL, Osorio EY, Anstead GM, Jimenez F, Osterholzer JJ, *et al.* Deficiency of lymph node-resident dendritic cells (DCs) and dysregulation of DC chemoattractants in a malnourished mouse model of *Leishmania donovani* infection. *Infect Immun.* 2014; 82(8): 3098-3112.

Kauffmann F, Dumetz F, Hendrickx S, Muraille E, Dujardin JC, Maes L, *et al.* *In vivo* characterization of two additional *Leishmania donovani* strains using the murine and hamster model. *Parasite Immunol.* 2016; 38(5): 290-302.

Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, *et al.* Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(29): 10125-10130.

Koohi-Hosseiniabadi O, Ranjbar Z, Sepehrimanesh M, Tadbir AA, Poorbaghi SL, Bahranifard H, *et al.* Biochemical, hematological, and pathological related healing effects of *Elaeagnus angustifolia* hydroalcoholic extract in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in male golden hamster. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2017; 24(31): 24447-24453.

Lessa MM, Lessa HÁ, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, *et al.* Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2007; 73(6): 843-847.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408.

Loría-Cervera EN, Andrade-Naváez FJA. Animals Models for the Study of *Leishmania* Immunology. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 2014; 56(1):1-11.

Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. Pathog Glob Health 2016; 110(6): 247-260.

Maucher M, Kracher B, Kuhl M, Kestler HA. Inferring Boolean network structure via correlation. Bioinformatics 2011; 27(11): 1529-1536.

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A review: the current *in vivo* models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. PloS Negl Trop Dis. 2015; 9(9): 1-23.

Meira CS, Gedamu L. Protective or detrimental? Understanding the role of host immunity in leishmaniasis. Microorganisms 2019; 7(12): 1-25.

Ministério da Saúde. Leishmaniose Visceral. 2017a. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/leishvisceral-17-novo-layout.pdf>. Acesso em: 27 de març. 2020.

Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2017b. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 27 de març. 2020.

Montoya A, Yapes L, Bedoya A, Henao R, Delgado G, Vélez ID, *et al.* Transforming Growth Factor Beta (TGF β 1) and Epidermal Growth Factor (EGF) as Biomarkers of *Leishmania (V) braziliensis* Infection and Early Therapeutic Response in Cutaneous Leishmaniasis: Studies in Hamsters. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8: 1-10.

Montoya A, López MC, Vélez ID, Robledo SM. Label-free quantitative proteomic analysis reveals potential biomarkers for early healing in cutaneous leishmaniasis. PeerJ. 2019; 6:1-18.

Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 2005; 73(9): 5827-5834.

Nakda-Tsukui K, Sekizuka T, Sato-Ebine E, Cazid AE, Ji DD, Tomii K, *et al.* AIG1 affects *in vitro* and *in vivo* virulence in clinical isolates of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathog.* 2018; 14(3): 1-31.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C: OPS; 2019.

Oliveira MP, Lima MC, Calheiros AS, Martins MA. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. *Exp Parasitol.* 2005; 109(2): 72-79

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine* 2014; 66(2): 127-132.

Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and infection* 2012; 14(15): 1377-1389.

Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, *et al.* Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathog.* 2012;8(1): 1-17.

Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014; 69(s1): s10-s18.

Peniche AG, Bonilla DL, Palma GI, Melby PC, Travi BL, Osorio EY. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental american cutaneous leishmaniasis. *PloS One* 2017; 12(6): 1-20.

Pessenda G, Silva JS. Arginase and its mechanisms in *Leishmania* persistence. *Parasite Immunol.* 2020; 42(7): 1-12.

Pessoa SB, Martins AV. *Parasitologia Médica.* 11 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Pereira LOR, Moreira RB, Oliveira MP, Reis SO, Oliveira Neto MP, Pirmez C. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? *Int J Infect Dis.* 2017; 57: 132-137.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008; 321(5891): 970-974.

Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 2009; 11(9): 1290-1296.

Rath M, Muller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Front Immunol* 2014; 5: 1-10.

Rêgo FD, Fradico JRB, Teixeira-Carvalho A, Gontijo CMF. Molecular variants of *Leishmania (Viannia) braziliensis* trigger distinct patterns of cytokines and chemokines expression in golden hamster. *Mol Immunol.* 2019; 106: 36-45.

Rey L. *Bases da Parasitologia Médica.* 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Silva AG, Valverde JG, *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.* 2014; 82(12): 5203-5213.

Ribeiro-Romão PR, Saavedra AF, Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Parasites & Vectors 2016; 9(1): 361.

Ritter U, Frinschknecht F, Van Zandbergen G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? Trends Parasitol. 2009; 25(11): 505-510.P

Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol. 1989; 69(1):100-103.

Santos AGA, Lima LL, Mota CA, Gois MB, Fernandes ACBS, Silveira TGV, *et al.* Insights of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) intestine. Biomed Pharmacother. 2018; 106: 1624-1632.

Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. Inte J Mol Sci. 2017; 18(6): 2-26

Sia SF, Yan LM, Chin AWH, Fung K, Choy KT, Wong AYL, *et al.* Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. Nature 2020; 583: 834-844.

Silvia ES, Pacheco RS, Gontijo CMF, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 2002; 44: 145-149.

Silva AG, Valverde JG, Romão RPR, Pereira RMP, Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology 2013; 140(6): 771-779.

Silva J, Queiroz A, Moura I, Sousa RS, Guimarães LH, Machado PRL, *et al.* Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in northeast Brazil. PLoS Negl Trop Dis. 2017; 11(11): 1-14.

Silva Junior IA, Morato CI, Quixabeira VBL, Pereira LIA, Dorta ML, Oliveira MAP, *et al.* In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 1-15.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41(1): 363-380.

Sundar S, Singh OP. Molecular diagnosis of visceral leishmaniasis. *Mol Diagn Ther.* 2018; 22(4): 443-457.

Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of kinetoplastids. In: Wolstenholme DR, Jeon KW. *Inter. Rev. Citol.* Academic Press, 1992. p. 65-88.

Teixeira EM, Rabello ALT, Aguiar MMG. In vitro activity and *in vivo* efficacy of fexinidazole against New World *Leishmania* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019; 74(8): 2318-2325.

Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis : a review. *F1000 Res.* 2017; 6: 1–15.

Valentine H, Daugherty EK, Singh B, Maurer SKJ. The Experimental Use of Syrian Hamsters. In: Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents.* 1st ed. Elsevier Inc., 2012. p. 875–906.

Vieira LR. Avaliação das alterações imunopatológicas das lesões cutâneas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*). Dissertação [Mestrado em Ciências] - Instituto Oswaldo Cruz; 2017

Vinhaes CLA, Souza DO, Mattos PSMS, Nogueira B, Shi R, Wei W, *et al.* Changes in inflammatory protein and lipid mediator profiles persist after antitubercular treatment

of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: A prospective cohort study. *Cytokine* 2019; 123: 1-12.

Von Stebut E, Tenzer S. Cutaneous leishmaniasis: Distinct functions of dendritic cells and macrophages in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*. *Int J Med Microbiol.* 2018; 308(1): 206-214.

Wetzel DM, McMahon-Pratt D, Koleske AJ. The Abl and Arg kinases mediate distinct modes of phagocytosis and are required for maximal *Leishmania* infection. *Mol Cell Biol* 2012; 32(15): 3176-3186.

World Health Organization (WHO). Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis worldwide, 2018. Disponível em: https://www.who.int/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/gho-cl-2018.pdf?sfvrsn=1687250a_>. Acesso em: 23 de març. 2020.

Wilson ME, Jeronimo SMB, Pearson RD. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. *Microb Pathog.* 2005; 38(4): 147-160.

Yang XQ, Zhao YG, Chen XQ, Jiang B, Sun DY. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile*-infected animal model. *BMC Gastroenterol.* 2013;13: 1-13.

Zakai HA, Chance ML, Bates PA. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mex*. *Parasitology* 1998; 116(Pt 4): 305-309.

Zivcec M, Safronetz D, Haddock E, Feldmann H, Ebihara H. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Immunol Methods.* 2011;368(1):24-35.

