

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Influência do tamanho do inóculo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na imunopatogênese da leishmaniose cutânea experimental no modelo *golden hamster (Mesocricetus auratus)***

**RAQUEL PERALVA RIBEIRO ROMÃO**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**RAQUEL PERALVA RIBEIRO ROMÃO**

**Influência do tamanho do inóculo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na imunopatogênese da leishmaniose cutânea experimental no modelo *golden hamster (Mesocricetus auratus)***

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

**Orientadora:** Dra. Alda Maria da Cruz

**Coorientador:** Dr. Eduardo Fonseca Pinto

**RIO DE JANEIRO**  
**2013**

**Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Pós-Graduação em Medicina Tropical**

**Influência do tamanho do inóculo de *Leishmania (Viannia) braziliensis* na imunopatogênese da leishmaniose cutânea experimental no modelo *golden hamster (Mesocricetus auratus)***

**Autora: Raquel Peralva Ribeiro Romão**

**Orientadora: Dra. Alda Maria da Cruz**

**Coorientador: Dr. Eduardo Fonseca Pinto**

**Examinadores:**

---

Dr. Marcelo Pelajo Machado - IOC - FIOCRUZ/RJ  
(Presidente da banca)

---

Dra. Kátia da Silva Calabrese - IOC - FIOCRUZ/RJ

---

Dra. Christiane Bandeira de Melo - UFRJ/RJ

---

Dra. Maria Jânia Teixeira - UFC/CE

---

Dr. Luis Carlos Crocco Afonso - UFOP/MG

---

Dr. André Luiz Rodrigues Roque - IOC-FIOCRUZ/RJ (Suplente)

---

Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva - UERJ/RJ (Suplente)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter vivido tudo o que vivi. Agradeço cada dia, cada dificuldade, alegria, tristeza e a vitória de estar aqui hoje;

Ao meu marido Wagner e aos meus filhos Caio e João Pedro, sem vocês não conseguiria chegar aonde cheguei, vocês são a minha inspiração diária;

A minha mãe Consuelo e minha avó Ilce (*in memoriam*), e ao meu pai José Wellington por terem sido os responsáveis pela minha formação, sei o quanto vocês estão orgulhosos de mim;

Aos meus sogros Walter e Malu pela torcida e incentivo constantes e por estarem sempre na retaguarda;

À amiga Janaina Oliveira, por ser minha quase irmã;

À minha orientadora Dra. Alda Maria da Cruz pela oportunidade e confiança depositadas e pelo exemplo de profissionalismo e competência;

Ao meu coorientador Eduardo Fonseca Pinto pela grande ajuda e pela oportunidade em trabalharmos juntos;

À mestranda Yaneth Osorio pela grande ajuda na técnica de PCR em tempo real;

À Dra. Claude Pirmez pelo auxílio nas análises histopatológicas;

Ao Dr. Pedro Cabello pela ajuda e disponibilidade nas análises estatísticas;

À amiga Joanna Reis, pela constante disponibilidade como amiga, companheira e como colaboradora intelectual deste trabalho, tenho muita admiração por você;

À Dra. Lea Cysne pela colaboração científica neste trabalho, alé do carinho e amizade dispensados a mim;

Ao Dr. Adriano Gomes-Silva por ter sido o responsável pela minha vinda para o laboratório;

Aos amigos do LIPMED, Giselle Fagundes, Milene Yoko, Ricardo Gonçalves, Ricardo Nogueira, Joanna Valverde, Maria Fatinatti, Luzinei Couto, Rosa Plácido, Carolina Aguiar, Andréa Saavedra, Andrielli pelo companheirismo e pela agradável convivência diária;

Aos demais membros e pesquisadores do LIPMED, especialmente a Dra. Márcia Oliveira, Dra. Luíza Pereira e Rosimar Batista, pelo apoio na execução deste trabalho;

Aos membros dos demais laboratórios da FIOCRUZ que foram indispensáveis para a realização deste trabalho, em especial ao Dr. Eduardo Caio Torres, Dr. Elmo Amaral, Dr. Otacílio Moreira e Dra. Constança Britto;

Aos membros do LIP pela concessão do espaço onde grande parte deste trabalho foi realizado;

Aos amigos dos demais laboratórios da FIOCRUZ em especial a Angélica Cardoso, Flávia Cardozo, Raquel Ferraz, Clarissa Cunha, Daiana, Myllena, Natália e Vítor pela amizade e ajuda na execução deste trabalho;

Ao Dr. Marcelo Pelajo, a Dra. Kátia Calabrese e a técnica Luciana pelo auxílio no processamento histopatológico;

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical Filipe Aníbal pelo apoio e compreensão.

À todos que não citei aqui, mas que compartilharam desse momento tão especial, meus sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS E ANEXOS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1-Aspectos epidemiológicos e características gerais das leishmanioses.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2- O modelo experimental <i>golden hamster</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3- O <i>golden hamster</i> como modelo da leishmaniose tegumentar Americana.....</b>	<b>5</b>
<b>1.4- Aspectos clínico-evolutivos de lesões de <i>golden hamster</i> como modelo da leishmaniose tegumentar Americana.....</b>	<b>6</b>
<b>1.5-Aspectos imunopatológicos do <i>golden hamster</i> como modelo da leishmaniose tegumentar Americana.....</b>	<b>10</b>
<b>2-JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>13</b>
<b>3-OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1- Geral.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2-Específicos.....</b>	<b>15</b>
<b>4.MÉTODOS E RESULTADOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4.1-Manuscrito 1.....</b>	<b>17</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>58</b>
<b>7- PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

LV – Leishmaniose visceral

LC – Leishmaniose cutânea

LTA - Leishmaniose tegumentar Americana

LCL – Leishmaniose cutânea localizada

LM – Leishmaniose mucosa

iNOS - Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: inducible nitric oxide synthase 2)

IgG - imunoglobulina G

cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar (do inglês: complementary deoxyribonucleic acid)

IFN- $\gamma$  - Interferon gama

TNF- Fator de necrose tumoral (do inglês: tumor necrosis factor alpha)

TGF- $\beta$  - Fator de crescimento de transformação beta (do inglês: transforming growth factor)

IL-10 - Interleucina dez

IL-2 - Interleucina dois

IL-4 - Interleucina quatro

IL-12p40 - subunidade beta da Interleucina doze

IL-13 - Interleucina treze

IL-21 - Interleucina vinte e um

mRNA - ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: messenger ribonucleic acid)

VC - Coeficiente de variância (do inglês: variance coefficient)

FBS - Soro fetal bovino (do inglês: foetal bovine serum)

PBS - Solução salina fosfatada tamponada (do inglês: phosphate buffer solution)

Real time RT-PCR - Transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (do inglês reverse transcription-polymerase chain reaction)

## LISTA DE FIGURAS E ANEXOS

<b>Figura 1.</b> Análises clínica e morfológica de lesões de pele de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>26</b>
<b>Figura 2.</b> Carga parasitária na lesão de pele e no linfonodo drenante e níveis de IgG anti- <i>Leishmania</i> de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>28</b>
<b>Figura 3.</b> Aspecto macroscópico e peso do baço (g) de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b> Expressão de mRNA de citocinas em lesões de pele e linfonodo drenante de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>31</b>
<b>Figura 5.</b> Escore histopatológico de lesões de pele de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Fotomicrografia de pele e baço de <i>goldenhamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>34</b>
<b>Tabela 1.</b> Dados numéricos da infecção de <i>golden hamsters</i> após 105 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ promastigotas).....	<b>36</b>
<b>Anexo 1.</b> Artigo publicado “ <i>Golden Hamster (Mesocricetus auratus)</i> as an experimental model for <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> infection”.....	<b>69</b>

## RESUMO

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por diferentes espécies de *Leishmania* cujas apresentações clínicas variam de acordo com a espécie do parasito envolvido na infecção e com o número de parasitos inoculados além das características imunológicas e genéticas do hospedeiro. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie envolvida na leishmaniose tegumentar Americana (LTA) e, apesar de sua grande importância, o conhecimento de sua imunopatogênese é baseado em estudos com pacientes. Poucos estudos foram conduzidos utilizando modelos experimentais de infecção por *L. braziliensis*, provavelmente devido à falta de uma linhagem murina que reproduza a infecção por esta espécie. O *golden hamster* representa o modelo experimental mais suscetível a espécies do subgênero *Viannia*, porém a ausência de reagentes imunológicos específicos para este modelo limita sua utilização. Além disso, os estudos disponíveis com o modelo apresentam diferentes protocolos de infecção utilizando diversas cepas em inóculos geralmente altos, levando a diferentes cursos clínicos da doença e culminando com a visceralização do parasito. Este estudo teve como objetivo investigar o inóculo ideal de *L. braziliensis*, em condições padronizadas, que garanta a infecção sem levar a uma doença exacerbada e analisar os aspectos clínicos e imunopatológicos associados a cada inóculo. Para isto, grupos de cinco animais, em quatro experimentos independentes, foram infectados por via intradérmica com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis*. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado por 105 dias e então fragmentos da pele inoculada, do linfonodo drenante, do baço além de soro foram coletados para avaliação da carga parasitária, expressão de citocinas, investigação da visceralização para o baço, análise histopatológica, e dosagem de IgG anti-*Leishmania*. Os resultados mostraram que o tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional ao tamanho do inóculo e que o tamanho final das lesões variou entre os inóculos de  $10^4$  e  $10^5$  e entre  $10^4$  e  $10^6$ , sem variação entre  $10^5$  e  $10^6$ . O aspecto clínico das lesões também variou com o inóculo, onde os animais inoculados com  $10^4$  apresentaram lesões mais nodulares em contrapartida aos animais inoculados com  $10^6$ , com lesões mais ulceradas. Apesar da diferença no número de parasitos inoculados, a carga parasitária foi a mesma entre os três inóculos. A expressão de citocinas e a dosagem de IgG anti-*Leishmania* apresentaram níveis elevados em todos os grupos analisados, porém sem diferenças estatísticas entre os diferentes inóculos. A análise histopatológica revelou envolvimento inflamatório leve na pele dos animais infectados com  $10^4$  enquanto os infectados com  $10^5$  e  $10^6$  apresentaram elevado grau de dano tecidual. A visceralização foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo, pouco frequente no inóculo de  $10^4$ , acometendo a maioria dos animais infectados com  $10^6$ . Portanto, verificou-se que diferentes números de parasitos no inóculo exercem influência na evolução e na apresentação clínica da doença, no tamanho final da lesão e no grau de dano tecidual, porém não exerce influência na carga parasitária e na expressão de citocinas na lesão e no linfonodo e nos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Estes resultados indicam que o inóculo de  $10^4$  gera lesão mais benigna e menor comprometimento sistêmico e que a modulação da resposta imune frente a diferentes números de parasitos inoculados ocorre na fase inicial da infecção e determina o estabelecimento e a magnitude da fase crônica da doença.

## ABSTRACT

Leishmaniasis are complex of diseases caused by different species of *Leishmania* which clinical presentation varies according to involved parasite species as well as the number of parasites inoculated, immunological and genetic characteristics of the host. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species involved in American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) and despite its great importance the majority of current knowledge about its immunopathogenesis comes from studies in patients. Few studies were conducted using experimental models of *L. braziliensis*, probably due to the lack of a susceptible murine model for this *Leishmania* species. The *golden* hamster appears as the most susceptible model for species from *Viannia* subgenus but the absence of specific commercial immunological reagents to this animal model limits its utilization. Besides that, the available studies have different infection protocols with variances in clinical features and the number of inoculated parasites is usually high, leading to the visceralization of *Leishmania*. This study aimed to investigate the inoculum that ensures infection without leading to an exacerbated disease in a well standardized inocula conditions and analyse the clinical and immunopathological features associated with each one. For that, groups of five animals in four independent experiments were intradermally infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  promastigotes from *L. braziliensis*. Lesion development was accompanied for 105 days and after that skin of infected site, draining lymph node, spleen and sera were collected for evaluation of final parasite load, spleen visceralization, cytokine expression, histopathological features and levels of IgG anti-*Leishmania*. Our results showed that outcome of skin lesions was inversely proportional to inoculum burden and that final lesion size varied among  $10^4$  and  $10^5$  or  $10^6$  infected animals, but not between  $10^5$  and  $10^6$  ones. Clinical aspects of lesions also varied with inoculum, which  $10^4$  animals presented more nodular lesions and  $10^6$  more ulcerated lesions. Despite difference in the number of parasites inoculated, final parasite load was the same among the three inocula. Cytokine expression and levels of anti-*Leishmania* IgG presented high levels in all infected animals, but with no statistical differences among different inocula. Histopathological analysis revealed a mild inflammatory involvement in skin of  $10^4$  infected animals, while  $10^5$  and  $10^6$  presented elevated degree of tissue damage. Finally, visceralization was directly proportional to the inoculum burden, less frequently observed in  $10^4$  infected animals, with high spleen commitment between  $10^6$  animals. In summary, different numbers of inoculated parasites influences disease outcome, clinical presentation, final lesion size and degree of tissue damage among inocula but not final parasite load, cytokine expression and IgG anti-*Leishmania* levels. These results indicates that  $10^4$  inoculum generates more benign lesions and a less systemic commitment and that modulation of immune response to different parasites inoculated occurs in the early phase of infection and dictates the establishment and magnitude of the chronic phase of disease.

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1-Aspectos epidemiológicos e características gerais das leishmanioses

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos a hospedeiros mamíferos por flebotomíneos. Existem em torno de 20 espécies de *Leishmania* e 30 espécies e subespécies de flebotomíneos implicados nas diferentes formas clínicas da doença, tendo também como fatores determinantes o status imunológico e a condição sócio-econômica do hospedeiro (Reithinger et al. 2007, Antirioni et al. 2012, Stockdale & Newton 2013).

O ciclo biológico da *Leishmania* é originalmente zoonótico, tendo mamíferos silvestres como reservatórios, o qual houve uma adaptação para o ciclo antroponótico, principalmente devido à urbanização, ao crescente desmatamento e a mudanças climáticas e alterações no ecossistema do vetor. Esses fatores associados ao comprometimento imunológico do indivíduo e à falha terapêutica têm contribuído para a crescente expansão da doença observada nos últimos anos (Shaw 2007, Reithinger et al. 2007).

Estudos epidemiológicos recentes mostraram que as leishmanioses atingem 98 países situados em regiões tropicais e subtropicais, apresentando oficialmente mais de 58 mil casos de leishmaniose visceral (LV) e 220 mil casos de leishmaniose cutânea (LC), podendo chegar a números bem maiores, em decorrência de casos não diagnosticados ou não relatados, já que sua notificação é compulsória somente em cerca da metade dos países nas quais são endêmicas. Considerando o número de casos estimados, aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LC ocorrem a cada ano (Desjeaux, 2004, Alvar et al. 2012). No contexto mundial, o Brasil se destaca por estar entre os dez países mais acometidos pela LC e entre os seis mais acometidos pela LV, tornando-as importante problema de saúde pública em nosso país. (Den Boer et al. 2011, Alvar et al. 2012).

A LV representa a forma mais grave da doença, levando o indivíduo à morte se não tratado, sendo caracterizada pela multiplicação dos parasitos no sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, linfonodos e medula óssea do hospedeiro (Ministério da Saúde, 2006). Já a LC apresenta um espectro de manifestações clínicas, variando desde uma doença benigna como a leishmaniose cutânea localizada, que tende para cura espontânea, até formas graves da doença como a leishmaniose mucosa e a disseminada (Da-Cruz & Pirmez 2012).

Nas Américas a leishmaniose cutânea é conhecida como leishmaniose tegumentar Americana (LTA), ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Ministério da Saúde, 2006). Espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia* estão implicadas na LTA, sendo 90% dos casos causados por *L. (V.) braziliensis* (Den Boer et al. 2011).

No Brasil, a LTA encontra-se difundida em todas as regiões federadas, com número de casos variando de 20 a 35 mil por ano entre os anos de 1990 e 2010 (SVS, 2011). É causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo que as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* as mais frequentemente associadas à doença humana (revisto por Da-Cruz & Pirmez 2012).

Todas as espécies citadas acima causam a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que é a apresentação clínica mais comum da LTA, caracterizada por baixo parasitismo tecidual sendo considerada benigna uma vez que responde bem à terapêutica antimonial, podendo mesmo evoluir para a cura espontânea. No caso de infecção por *L. braziliensis*, cerca de 3 a 5% dos indivíduos infectados evoluem para leishmaniose mucosa (LM). Esta é considerada uma forma grave, onde as lesões são destrutivas, localizadas em áreas distantes do local do inóculo, no caso o trato respiratório superior. Nessa apresentação clínica, a exacerbação da resposta imune aos antígenos de *Leishmania* e a cronicidade da doença impõem dificuldades no manejo terapêutico, a despeito da escassez de parasitos. Os casos de LM evoluem mais frequentemente com resistência terapêutica e reativação da lesão, em comparação com a LCL. Além dos aspectos patogênicos da infecção, cabe ressaltar o fato de existirem indivíduos nas áreas endêmicas que estão expostos ao parasito mas que não desenvolvem a doença, sendo considerados assintomáticos ou subclínicos (revisto por Da-Cruz & Pirmez 2012).

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas apesar de diversos trabalhos nos últimos anos terem mostrado esforços crescentes para o desenvolvimento de vacinas e novas drogas (Costa et al. 2011). O antimonial ainda é o tratamento de eleição preconizado, baseado em injeções parenterais com antimoniais pentavalentes que, além de causarem intensa dor local e serem tóxicos para o fígado, rins e coração, têm sido alvo de resistência conferida por algumas espécies de *Leishmania* em regiões endêmicas (Romero et al. 2001).

Além do tratamento, outra estratégia que geraria impacto no controle da doença seria o desenvolvimento de uma vacina que pudesse aumentar a resistência ao protozoário. Porém, apesar dos avanços recentes nas pesquisas em vacinas contra as leishmanioses, não existe

ainda uma vacina para uso humano com eficácia comprovada (Kedziersk et al. 2006, Kedziersk et al. 2010).

Diante desses fatos, o estudo das leishmanioses em modelo experimental é necessário não só para o entendimento de sua imunopatogênese como para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas, onde são necessários para a avaliação da eficácia de drogas e da imunogenicidade de candidatos vacinais. A escolha do modelo adequado baseia-se em diversos fatores como semelhanças clínicas, fisiológicas e imunológicas com o hospedeiro, capacidade em manifestar a doença e permitir estudos por um longo período, além da disponibilidade e facilidade de manejo animal (Hommel et al. 1995, Awasthi et al. 2004, Oliveira et al. 2005, Garg & Dube 2006).

Poucos são os estudos experimentais conduzidos com espécies do subgênero *Viannia* comparados com o subgênero *Leishmania*, apesar de sua grande importância na América Latina (De Moura et al. 2005, Salay et al. 2007). No caso da *L. braziliensis*, provavelmente a escassez se deve à dificuldade no crescimento desse parasito em cultura e na obtenção das formas infectivas *in vivo* e principalmente à resistência conferida por camundongos à infecção por essa espécie (Neal & Hale 1983, De Moura et al. 2005).

A maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção por espécies do subgênero *Viannia*, particularmente *L. (V.) braziliensis*. Dentre os camundongos mais utilizados, o BALB/c é o mais susceptível, apesar da lesão produzida ser benigna e apresentar curso rápido de evolução, culminando com a cura em poucas semanas. Portanto, não existe um modelo murino capaz de reproduzir a infecção natural de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Oliveira et al. 2004, Hommel et al. 1995).

Diferente do modelo murino, o modelo hamster é altamente susceptível a infecção por espécies do subgênero *Viannia* e reproduz a LC causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Oliveira et al. 2004). As lesões geradas pela infecção tendem a se desenvolver rapidamente nesse modelo apresentando curso crônico de evolução, o que permite monitoramento por longos períodos, útil em estudos terapêuticos e imunológicos. Além disso, a infecção cutânea no hamster reproduz muitos dos aspectos observados na infecção humana como a linfadenopatia, a metástase cutânea e a capacidade de montar uma resposta protetora em lesões secundárias (Hommel et al. 1995). Nesse sentido, o *golden hamster* preenche todas as características necessárias destacando-se como modelo ideal no estudo das leishmanioses, principalmente pela susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia*.

O fato dessa espécie de animal experimental não ter linhagens *inbred* disponíveis comercialmente, impossibilitando manipulações genéticas nesse modelo, e a inexistência de reagentes imunológicos específicos, o que impede um estudo imunopatogênico mais detalhado, podem ter contribuído para a não consagração deste como modelo principal no estudo da leishmaniose tegumentar (Hommel et al. 1995, Awasthi et al. 2004, Oliveira et al. 2005).

## **1.2-O modelo experimental *golden hamster***

Os primeiros hamsters usados em experimentação animal foram os chineses (*Cricetus griseus*) e já em 1919 foi comprovada sua susceptibilidade à *Leishmania*. Devido à dificuldade na reprodução desta espécie em cativeiro e aos dados insatisfatórios obtidos em estudos de leishmaniose no Mediterrâneo, foi criada por volta de 1930, em laboratórios da França e Inglaterra, uma nova colônia de hamsters oriundos da Síria. Essa criação foi posteriormente estendida para os Estados Unidos. Estes animais foram inicialmente denominados de hamsters sírios (Syrian hamsters) em virtude do local onde foram encontrados e mais tarde, juntou-se a denominação dourado (*golden*) devido à sua cor de pelagem. A taxonomia do *golden hamster* é definida como: Classe Mammalia, Ordem Rodentia, Família Cricetidae, Gênero *Mesocricetus*, Espécie *Mesocricetus auratus* (Andrade et al. 2006, Sirois 2008).

Os *golden hamsters* são animais de pequeno porte, cujo comprimento quando adulto pode chegar de 15 a 17 centímetros e seu peso de 85 a 120 gramas. Possuem hábitos noturnos, preferindo temperaturas mais altas, podendo hibernar quando a temperatura cai. As fêmeas são mais agressivas que os machos. A puberdade ocorre aos 28 dias de idade, a maturidade sexual se dá por volta dos 42 dias, com uma longevidade de cerca de 2,5 anos. Os hamsters são buscados como modelos experimentais para pesquisa por possuírem alta taxa de reprodução e pela facilidade no manejo, sendo relativamente livres de infecções espontâneas e, em contrapartida, susceptíveis a uma série de agentes patogênicos introduzidos (Andrade et al. 2006, Sirois 2008).

O *golden hamster* é conhecido por ser um excelente modelo em diversas doenças infecciosas humanas como a sífilis e as leishmanioses (Revisto por Melby et al. 1998), além de ser usado também como modelo no estudo da doença de Chagas, clostridiose e ancilostomose (Mendez et al. 2005, Bilate et al. 2007, Goulding et al. 2009), sendo o único modelo disponível em algumas dessas doenças. Dada sua alta sensibilidade à infecção por microrganismos

intracelulares, ele tem sido usado para o isolamento de diversos agentes infecciosos humanos incluindo *Leishmania* (Melby et al. 1998).

Particularmente nas leishmanioses, o hamster é o modelo animal de eleição empregado para o isolamento e conservação *in vivo* de *Leishmania* de materiais biológicos suspeitos, além de ser utilizado desde a década de setenta como modelo susceptível de infecção por *L. donovani* na China, dada sua alta susceptibilidade à infecção e sua capacidade em manifestar a maioria das alterações patológicas observadas em humanos (Rojas & Scorsa 1995, Riça-Capela et al. 2003). Além disso, a primeira classificação das espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA, proposta por Lainson e Shaw, foi baseada no comportamento dos diferentes isolados em infecções em hamsters, além do crescimento em cultura (Lainson e Shaw, 1970).

Grande parte dos estudos experimentais de *Leishmania* no modelo hamster é feita com as espécies responsáveis pela forma visceral da doença (*Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*), uma vez que o hamster reproduz a maioria dos aspectos encontrados na doença humana, sendo considerado o modelo ideal para a LV (Melby et al. 2001; Dea-Ayuela et al. 2007). Esses estudos abrangem desde a imunopatogênese do modelo na forma visceral da doença (Melby et al. 1998, Requena et al. 2000), até teste de eficácia de drogas (Dea-Ayuela et al. 2007, Gupta et al. 2011), sendo a maioria deles em testes de candidatos vacinais para a LV (Samant et al. 2009, Gomes et al. 2011). Em contrapartida, os estudos envolvendo espécies responsáveis pela LTA são mais escassos, onde as espécies mais frequentemente usadas são *L. braziliensis* e *L. panamensis* (Zelédon et al. 1969, Wilson et al. 1979, Kahl et al. 1991, Osório et al. 2003, Espitia et al. 2010, Gomes-Silva et al. 2013).

### **1.3-O golden hamster como modelo da leishmaniose tegumentar Americana**

A susceptibilidade do modelo hamster às espécies responsáveis pela LTA foi comprovada nos primeiros trabalhos realizados com *L. braziliensis* em infecção de hamsters e camundongos, onde foi observado que o desenvolvimento da doença era mais difícil em camundongos quando comparados aos hamsters, além do período de incubação nesses também ser maior (Zelédon et al. 1969). Neal & Hale em 1983, mostraram que mesmo grandes inóculos de *L. braziliensis* não eram capazes de causar lesão em camundongos Balb/c e CBA/H, enquanto que hamsters desenvolveram lesões grandes, que evoluíram para a cura espontânea.

Além da extrema susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia*, o hamster provou ser um modelo apropriado ao estudo da LTA, uma vez que também reproduz a metástase e a

linfadenopatia observada em humanos devido a natureza crônica da infecção, levando à disseminação dos parasitos e podendo resultar em lesões distantes do local de inoculação (Travi et al. 1988, Travi et al. 1993).

#### **1.4- Aspectos clínico-evolutivos de lesões do *golden hamster* como modelo da leishmaniose tegumentar Americana**

De maneira geral, as lesões clínicas na pele de hamsters infectados com espécies do subgênero *Viannia* iniciam-se com eritema e edema local, evoluindo para uma pápula, culminando com uma apresentação nodular ou ulcerada (Wilson et al. 1979, Hommel et al. 1995). Porém, o período de surgimento da lesão, a apresentação clínica e o tamanho da lesão, que refletem a gravidade da doença, dependem de uma série de fatores, que podem levar a variações nesses parâmetros. Características relacionadas ao hospedeiro e ao parasito estão envolvidas nas apresentações clínicas e na evolução da infecção por *Leishmania* em humanos (Mehegan et al. 1999), fato observado também no modelo hamster da LTA.

Uma das primeiras características do parasito que contribui para diferenças na patogênese da doença é a espécie envolvida na infecção. Animais infectados com *Leishmania (Viannia) peruviana* e *L. braziliensis* mostraram diferenças nas manifestações clínicas entre essas espécies, onde *L. braziliensis* mostrou ser mais virulenta que *L. peruviana*, gerando lesões maiores de surgimento mais precoce (Gamboa et al. 2008). Em contrapartida, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* mostrou ser mais virulenta para hamsters do que *L. braziliensis*, gerando lesões mais necróticas e conseqüentemente mais graves (Wilson et al. 1979, Ribeiro-Romão et al. manuscrito em preparação), enquanto as lesões geradas por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* apresentaram-se mais benignas e similares do ponto de vista clínico patológico (Ribeiro-Romão et al. manuscrito em preparação). Fêmeas de hamsters infectadas com *L. braziliensis*, *L. panamensis* ou *L. guyanensis* apresentaram lesões mais graves na infecção por *L. guyanensis* comparada com as outras duas espécies (Rey et al. 1990).

Espécies de *Leishmania* menos frequentemente associadas com a LTA, que levam a lesões mais benignas no ser humano (Costa et al. 2009), também mostraram-se menos patogênicas para hamsters. Infecções com *Leishmania (Viannia) naiffi* levaram somente a um discreto edema na região inoculada apesar da presença dos parasitos (Naiff et al. 1991). A primeira descrição de *Leishmania (Viannia) lindenbergi* foi realizada a partir da inoculação em hamsters de material biológico suspeito de pacientes, que não desenvolveram lesão no local de inoculação, mesmo havendo parasitos no tecido (Silveira et al. 2002).

Além da espécie utilizada na infecção, variações intraespecíficas na infectividade do isolado de parasito utilizado, devem ser levadas em consideração para definir o tamanho do inóculo a ser utilizado na infecção, uma vez que a espécie *L. braziliensis* está associada a um baixo crescimento e desenvolvimento das formas infectantes *in vitro*, necessitando de um inóculo elevado para garantir a infecção (Oliveira et al. 2005). Em estudo onde hamsters foram infectados com diferentes números de parasitos, inóculos muito baixos ( $10^2$ ,  $10^1$ ,  $10^0$ ) de *L. braziliensis* foram capazes de levar ao desenvolvimento de lesões (Wilson et al. 1979). Outros estudos que avaliaram diferentes isolados de *L. braziliensis* obtidos de lesões cutâneas e de lesões mucosas de pacientes, mostraram diferenças nos períodos de prepatência das lesões no modelo hamster, tanto entre isolados obtidos somente de lesões cutâneas (Sinagra et al. 1997) quanto de oriundos de lesões cutâneas e mucosas (Kahl et al. 1991), sugerindo a existência de diferentes graus de virulência entre isolados de uma mesma espécie.

As condições dos inóculos utilizados em infecção experimental também influenciam o desenvolvimento da doença, onde fatores como o número de parasitos inoculados, o pH do meio de cultivo e a forma evolutiva dos parasitos inoculados tem relação direta com o desenvolvimento das lesões. Em contrapartida, fatores associados ao hospedeiro, incluindo o local anatômico de inoculação e a via de infecção, assim como gênero, idade e a condição imunológica, também podem influenciar no processo patológico (revisto por Gomes-Silva et al. 2013).

O meio de cultura de crescimento dos parasitos pode interferir no desenvolvimento da doença uma vez que o pH do meio exerce efeito na metaciclologênese e consequentemente na infectividade *in vitro* e *in vivo* desses parasitos. Culturas de *L. braziliensis* e *L. peruviana* com pH igual a 5.5 geram maior percentual de promastigotas metacíclicas do que culturas com pH igual a 7.4, bem como maior percentual de macrófagos infectados e tamanho das lesões em hamsters (Gamboa et al. 2008).

O número de parasitos inoculados também é um fator importante para determinar o tempo de surgimento das lesões e o desenvolvimento da doença. Hamsters infectados com diferentes inóculos, tanto de *L. braziliensis* quanto de *L. panamensis*, apresentaram menores períodos de incubação da doença quanto maior o número de *Leishmania* no inóculo (Zeledón et al. 1969, Wilson et al. 1979, Osório et al. 2003). Estes trabalhos mostraram que para o desenvolvimento de lesões no focinho, foram necessários de 100 a 1000 parasitos (Osorio et al. 2003).

O local de inoculação dos parasitos também influencia no curso da doença no hamster, uma vez que infecções realizadas na pata, focinho e orelha com *L. braziliensis* mostraram ser

mais bem sucedidas quando comparadas às infecções no flanco (Wilson et al. 1979). Isto se deve provavelmente à menor temperatura observada na pele das extremidades corpóreas e nas diferenças na microcirculação da derme, que podem favorecer a presença dos parasitos (Zeledón et al. 1969, Osorio et al. 2003). Além desses fatores, a resposta imune local pode influenciar no controle ou exacerbação da infecção. Lesões resultantes da inoculação de *L. braziliensis* e *L. panamensis* no focinho de hamsters desenvolveram-se mais rapidamente, além de terem apresentado evolução mais grave e maior ulceração quando comparadas com as lesões na pata (Zeledón et al. 1969, Osório et al. 2003). Foi observado que a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram maiores nas lesões do focinho, consideradas mais graves, do que nas lesões da pata (Osório et al. 2003).

A via de inoculação e as formas evolutivas dos parasitos foram os fatores mais importantes envolvidos no surgimento e evolução da infecção quando hamsters foram inoculados com amastigotas ou promastigotas de *L. braziliensis* por diferentes vias (Wilson et al. 1979). As formas amastigotas mostraram maior infectividade quando comparadas às promastigotas e a via intradérmica foi mais eficiente que a via subcutânea quanto à infecção e ao início das lesões. Animais quando foram infectados com  $10^2$  amastigotas por via subcutânea levaram praticamente o mesmo tempo para desenvolverem lesão quando comparados com animais infectados com  $10^6$  amastigotas pela via subcutânea. Assim, a via intradérmica usada nesse estudo mostrou que é necessário um inóculo muito menor para desenvolver a lesão (Wilson et al. 1979).

O gênero do hospedeiro, em virtude das diferenças hormonais, também pode levar a diferentes evoluções das lesões. Hamsters machos infectados na pata com *L. panamensis* ou *L. guyanensis* apresentaram lesões maiores e mais graves, além de maior probabilidade de desenvolverem metástases, quando comparados às fêmeas (Travi et al. 2002, Saravia et al. 2005). O efeito hormonal foi comprovado através da administração dos respectivos hormônios de cada gênero para o gênero oposto, onde fêmeas que receberam hormônios androgênicos passaram a apresentar lesões maiores que as fêmeas não tratadas (Travi et al. 2002). Nesse mesmo sentido, a idade dos animais influencia na patogenia da doença, uma vez que animais mais jovens não produzem esses hormônios. Foi observado que machos adultos desenvolveram lesões maiores que os animais mais jovens em infecção por *L. panamensis*, porém essa diferença não foi observada entre as fêmeas. Além disso, o desenvolvimento de lesões necróticas foi mais frequente entre hamsters adultos do que entre os jovens. (Travi et al. 2002).

Ainda sobre a influência hormonal contribuindo na modulação da resposta imune e no desenvolvimento da infecção, foi observado que fêmeas prenhes de hamsters infectadas com *L. panamensis* desenvolveram lesões menores e com menos parasitos quando comparadas às não prenhes. Essa influência sob o sistema imune foi atribuída a uma maior contribuição da resposta imune inata no início da infecção, com maior expressão de iNOS e maior produção de óxido nítrico por neutrófilos e macrófagos e uma consequente diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias (Osorio et al. 2008).

Embora nos primeiros estudos de infecção por *L. braziliensis* em hamsters não tenha sido observado metástase cutânea (Lainson e Shaw 1972), *golden* hamsters são capazes de reproduzir a metástase cutânea observada na doença humana, que geralmente ocorre entre seis e quinze semanas de infecção com *L. panamensis*, variando entre os diferentes isolados utilizados. Diferentes espécies de *Leishmania* levam a diferenças na predisposição à metástase nesse modelo, mostrado em estudo onde o maior percentual observado foi atribuído a *L. guyanensis* (22%), seguido por *L. panamensis* (8,6%), não sendo observada metástase em infecção por *L. braziliensis* (Travi et al. 1988). A capacidade metastática da infecção por *L. guyanensis* em hamsters foi maior que na infecção por *L. panamensis*, assim como as lesões primárias e as metastáticas foram mais graves com *L. guyanensis*, independente do tamanho do inóculo (Martinez et al. 1991). A metástase mucosa foi observada em infecção de hamsters com *L. guyanensis*, sendo esta atribuída a um trauma local (Santrich et al. 1990).

Além da metástase cutânea observada nas infecções com espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA, a visceralização dessas espécies, que são originalmente associadas à infecções cutâneas, é um achado frequente no modelo hamster (Kahl et al. 1991, Martinez et al. 1991, Almeida et al. 1996, Gomes-Silva et al. 2013).

A visceralização de *Leishmania* tendo a pele como sítio primário de infecção em hamsters foi observada em estudo que utilizou 500 promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis*, onde após três meses de infecção, parasitos foram encontrados no linfonodo drenante, fígado e baço, sendo o linfonodo o órgão com maior percentual de positividade para os parasitos, seguido pelo fígado e baço (Almeida et al. 1996). Em outro estudo, a infecção com *L. braziliensis* levou à visceralização dos parasitos para o linfonodo drenante em todos os animais infectados, enquanto alguns animais apresentaram visceralização no baço e raros apresentaram no fígado (Kahl et al. 1991). Em estudo recente, hamsters infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* apresentaram visceralização dos parasitos para o baço após três meses de infecção, e o peso do baço, considerado um sinal clínico da visceralização quando aumentado, correlacionou-se positivamente com o tamanho da pata e

consequentemente com a gravidade da doença (Gomes-Silva et al. 2013). Esses estudos mostram que a visceralização é um evento comum em hamsters frente à infecção com *Leishmania* originalmente associada com a infecção cutânea, provavelmente devido a características inerentes ao modelo.

Embora estudos sobre reinfecção com *Leishmania* do subgênero *Viannia* sejam escassos, Osorio e colaboradores (1998) observaram proteção parcial heteróloga, em hamsters infectados com formas não infectivas de *L. major* e desafiados com *L. panamensis*, representada por lesões menores quando comparadas ao grupo controle. Esses dados sugerem que uma imunidade parcial pode ser gerada no modelo, a despeito da alta susceptibilidade do modelo às espécies do subgênero *Viannia*.

### **1.5- Aspectos imunopatológicos do *golden hamster* como modelo da LTA**

As principais características histopatológicas em lesões crônicas de hamsters infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia* é a presença de uma reação granulomatosa, cujos macrófagos em arranjos epitelióides apresentam-se vacuolizados e com número variado de parasitos, além de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos ao redor ou infiltrados no granuloma, podendo haver ou não necrose (Wilson et al. 1979, Kahl et al. 1991, Almeida et al. 1996, Osorio et al. 2003, Corrêa et al. 2007, Gomes-Silva et al. 2013). Assim como nos hamsters, a formação de granuloma mediado pela infecção por *L. braziliensis* é o principal achado histopatológico observado na doença humana (Magalhães et al. 1986, Pirmez et al. 1990 in Souza-Lemos et al. 2008), além da presença de infiltrado histiolinfoplasmocitário, com ou sem células gigantes multinucleadas e necrose (Mehegan et al. 1999, Hepburn 2000). Porém outros padrões podem ser observados de acordo com o estágio da doença (Gherstich et al. 1999, Mehegan et al. 1999, Choi & Lerner 2001).

Diferentes padrões histopatológicos podem ser encontrados nas lesões de hamsters dependendo do tempo de evolução da doença. A fase inicial da infecção é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, constituído por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, sendo que a reação granulomatosa se estabelece a partir de 15 dias de infecção, caracterizando a fase crônica da doença (Laurenti et al. 1990, Kahl et al. 1991, Ribeiro-Romão et al. 2000, manuscrito em preparação).

Uma característica histopatológica peculiar do modelo em infecções cutâneas crônicas com *Leishmania* é a presença de estruturas basofílicas em formato lamelar concêntrico, denominadas corpúsculos de Schaumann (Wilson et al. 1979, Laurenti et al. 1990, Kahl et al.

1991, Gomes-Silva et al. 2013). Hamsters infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* também apresentam esses corpúsculos, assim como seres humanos com sarcoidose (Essayag et al. 2002), porém em lesões de leishmaniose tegumentar humana a presença dessas estruturas nunca foi relatada.

A formação dos corpúsculos de Schaumann ocorre a partir de debris celulares e parasitos mortos que não são rapidamente reabsorvidos e sofrem calcificação (Kahl et al. 1991, Essayag et al. 2002). Laurenti e colaboradores (1990) associaram a presença destes corpúsculos em macrófagos de hamster como indicativo de um sistema fagocítico mononuclear frágil.

Devido à falta de insumos imunológicos específicos para hamsters, a resposta imune frente à infecção por *Leishmania* é pouco conhecida (Hommel et al. 1995, Awasthi et al. 2004, Garg & Dube 2006). A avaliação da resposta imune celular em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de hamsters infectados com *L. braziliensis* mostrou capacidade proliferativa de linfócitos específicos frente a antígenos de *Leishmania* que, entretanto correlacionou-se negativamente com aumento da pata (Gomes-Silva et al. 2013). Uma menor capacidade proliferativa de linfócitos do baço de hamsters também foi observada em animais inoculados no focinho com *L. panamensis*, que apresentaram lesões mais graves, em comparação com animais inoculados na pata, com lesões mais brandas (Osorio et al. 2003). Esses dados sugerem que no modelo hamster de LTA, a capacidade proliferativa de linfócitos é reduzida em nos quadros mais graves da infecção.

A resposta humoral na leishmaniose tegumentar em hamsters é caracterizada pelo aumento nos níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*, apresentando correlação positiva com o tamanho da lesão e conseqüentemente, com a gravidade da doença (Gomes-Silva et al. 2013). Níveis aumentados de IgG total anti-*Leishmania* também foram observados em infecção de hamsters com *L. panamensis*, mais altos em animais com lesões no focinho, consideradas mais graves, do que nos animais com lesão na pata, mais brandas. Essa diferença foi observada no período inicial da infecção, não havendo diferença nos níveis IgG na fase crônica da doença (Osorio et al. 2003).

A primeira descrição molecular dos aspectos imunopatológicos no modelo hamster de leishmaniose foi feita em estudo com *L. (L.) donovani* a partir de sequências de DNA complementar (cDNA) baseadas em sequências homólogas de rato e camundongo, determinada por Northern blotting. Nesse estudo, foi observado que, diferente do esperado já que os animais apresentam doença progressiva com incapacidade de controlar a replicação dos parasitos, não existe uma polarização para o perfil de resposta do tipo 2 e ausência de resposta

do tipo 1, uma vez que houve aumento na expressão de IL-2 e IFN- $\gamma$ , além de IL-10. Outra característica observada no modelo foi a presença de uma cauda adicional de aminoácidos no IFN- $\gamma$ , na região C-terminal da proteína, local de ligação ao receptor na célula-alvo, que poderia influenciar nessa perfeita ligação (Melby et al. 1998).

Em estudo subsequente, foi observada ausência na expressão e atividade da iNOS, responsável pela produção de óxido nítrico, além da baixa produção de óxido nítrico. A ausência de iNOS não foi atribuída à ausência do gene de iNOS, nem a uma polarização para o tipo 2 de resposta, uma vez que não houve aumento na expressão de IL-4 comparado com os animais não infectados. Essa ausência também não foi decorrente da falta de TNF, um segundo sinal potente para indução de iNOS, já que houve alta expressão dessa citocina (Melby et al. 2001).

A menor atividade biológica do IFN- $\gamma$  do hamster foi confirmada em estudo com infecção viral no modelo, onde a retirada do resíduo de aminoácidos aumentou a capacidade de sinalização da citocina e a atividade antiviral em dez vezes (Zhao et al. 2006). Porém, apesar da menor atividade biológica do IFN- $\gamma$ , outro estudo mostrou que a baixa expressão de iNOS era decorrente de um comprometimento na transcrição da iNOS e não da menor capacidade de ativação desta citocina, uma vez que a cascata de sinalização do IFN- $\gamma$  mostrou expressão e função normais (Perez et al. 2006).

A única análise do padrão de citocinas na leishmaniose cutânea no modelo foi realizada em hamsters infectados com *L. panamensis*. Foram observadas altas expressões de IFN- $\gamma$ , IL-12p40, IL-10 e TGF- $\beta$  em lesões crônicas com dois meses de evolução, sem um padrão de polarização para o tipo 1 ou tipo 2 de resposta (Osorio et al. 2003). Em estudos mais recentes, onde foram descritas outras sequências de DNA complementar de citocinas e quimiocinas de hamsters, a fase inicial de infecção de hamsters com *L. panamensis* (sete dias de infecção) mostrou também uma coexpressão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2, caracterizada por alta expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12p40, assim como de IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21 (Espitia et al. 2010), evidenciando o mesmo caráter de expressão de citocinas observado na LV no modelo hamster.

## 2- JUSTIFICATIVA

O estudo das leishmanioses em modelo experimental é de extrema importância para o entendimento da dinâmica do processo patológico bem como para o teste de novas drogas e potenciais candidatos vacinais. O crescente avanço nos estudos observado nos últimos anos aponta para a possibilidade de desenvolvimento de uma vacina eficaz e de tratamentos alternativos ao antimonial. Além disso, uma maior compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos nas diversas apresentações clínicas frente às inúmeras espécies de *Leishmania* possibilita um melhor manejo da doença tanto do ponto de vista clínico como epidemiológico.

A principal espécie responsável pela LTA nas Américas e no Brasil é a *L. braziliensis* e sua importância na dinâmica da doença está não só na sua ampla distribuição geográfica como também na possibilidade de desenvolver a forma mucosa, mais grave e de tratamento mais difícil. Apesar da grande importância dessa espécie na LTA, poucos estudos são realizados em modelo experimental, principalmente devido à resistência à infecção apresentada pela maioria das linhagens de camundongos. O modelo *golden* hamster se destaca pela alta susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia*, apresentando muitos dos aspectos imunopatológicos envolvidos na doença humana. Porém, é subutilizado pela falta de reagentes imunológicos comerciais, necessários para uma investigação mais detalhada dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença.

Estudo recente do nosso grupo avaliou a reprodutibilidade da infecção em *golden* hamsters utilizando  $10^6$  promastigotas de um mesmo isolado de *L. braziliensis*. Todos os animais desenvolveram lesão cutânea, embora grande variação no tamanho das lesões intra e inter-experimento tenha sido observada. Não houve metástase cutânea, porém a visceralização para o baço foi freqüente, havendo correlação positiva entre o tamanho do baço e das lesões. Embora o inóculo utilizado tenha assegurado o desenvolvimento da lesão, este produzia um quadro clínico muito grave, provavelmente relacionado a um déficit na resposta efetora devido à alta carga parasitária. Paralelamente, desde 2008 nosso grupo desenvolve trabalhos envolvendo candidato vacinal contra a LTA, baseado em antígenos de *L. amazonensis*, com proteção comprovada no modelo murino em infecção homóloga, que passaram a ser testados no modelo hamster de infecção por *L. braziliensis*.

Levando em consideração que o tamanho da lesão é um parâmetro essencial na avaliação da eficácia de um candidato vacinal para a leishmaniose cutânea, foi levantada a hipótese de que a variabilidade observada poderia influenciar nesse resultado e, além disso,

que a utilização do inóculo de  $10^6$  parasitos, que leva a um quadro clínico grave com comprometimento sistêmico, poderia mascarar um possível efeito protetor da vacina. Baseados nesses fatos, este presente estudo teve como proposta investigar o tamanho do inóculo que garantisse a infecção, mas que não gerasse uma doença exacerbada, através da análise dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção por cada inóculo, utilizando condições mais controladas na infecção, com a padronização do pH, da taxa de metaciclogênese e da passagem *in vitro* dos parasitos nos referidos inóculos.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- Objetivo Geral

Investigar a influencia de diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas) na evolução clínica e imunopatológica da leishmaniose experimental no modelo *golden hamster*.

#### 3.2-Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar a influência do tamanho do inóculo no desenvolvimento e defecho clínico da lesão cutânea;
- ✓ Investigar a repercussão sistêmica da infecção com diferentes inóculos na visceralização dos parasitos;
- ✓ Verificar se a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN- $\gamma$  e IL-10) está associada com o tamanho do inóculo e com a gravidade da doença;
- ✓ Identificar a influência da carga infectiva nas alterações histopatológicas observadas nas lesões de pele;
- ✓ Identificar o inóculo de *Leishmania* a ser utilizado em estudos de candidatos a fármacos e vacinas.

## MÉTODOS E RESULTADOS

**Artigo 1:** Manuscrito em preparação

**Título:** Different inoculum size of *Leishmania (Viannia) braziliensis* influences lesion development and tissue damage but not cytokine expression in infected *golden hamsters (Mesocricetus auratus)*.

Raquel P. Ribeiro-Romão<sup>1</sup>, Elvia Yaneth Osorio<sup>2</sup>, Otacilio Moreira<sup>3</sup>, Adriano Gomes-Silva<sup>1</sup>, Joanna G. Valverde Galvão<sup>1</sup>, Lea Cysne Filkestein<sup>4</sup>, Claude Pirmez<sup>1</sup>, Eduardo Fonseca Pinto<sup>1</sup>, Alda Maria Da-Cruz<sup>1\*</sup>.

### Resumo

Poucos estudos são conduzidos em modelo experimental da leishmaniose tegumentar Americana (LTA), provavelmente devido à falta de um modelo murino susceptível a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, principal espécie envolvida na infecção. O *golden hamster* é apontado como o modelo mais susceptível a espécies do subgênero *Viannia*, porém estudos disponíveis neste modelo apresentam diferentes protocolos, utilizando diferentes cepas e números variados de parasitos no inóculo, levando a diferentes apresentações clínicas e patogenias. Esse estudo teve como objetivo investigar o tamanho do inóculo que garanta a infecção sem levar a uma doença exacerbada. Para isto, grupos com cinco animais em quatro experimentos independentes foram infectados por via intradérmica com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis*. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado por 105 dias e após este período foram coletados sangue, fragmentos de pele, linfonodo e baço, para dosagem de IgG anti-*Leishmania*, avaliação da carga parasitária, expressão gênica de citocinas, análise histopatológica e investigação da visceralização para o baço. Nossos resultados mostraram que o tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional ao tamanho do inóculo, com diferença no tamanho final das lesões entre os inóculos de  $10^4$  e  $10^5$  e entre  $10^4$  e  $10^6$ . O aspecto clínico das lesões variou de acordo com o inóculo: animais infectados com  $10^4$  apresentaram lesões mais nodulares e com  $10^6$ , lesões mais ulceradas. A carga parasitária nas lesões e nos linfonodos foi equivalente entre os três inóculos utilizados. A expressão de citocinas e os níveis de IgG anti-*Leishmania* apresentaram-se altos porém sem diferença estatística entre os inóculos. A análise histopatológica mostrou envolvimento inflamatório moderado na pele dos animais infectados com  $10^4$ , enquanto os infectados com  $10^5$  e  $10^6$  apresentaram grau elevado de dano tecidual. A visceralização de parasitos para o baço foi menos frequente no inóculo de  $10^4$ , acometendo a maioria dos animais infectados com  $10^6$ . Esses resultados indicam que o inóculo de  $10^4$  leva a lesões mais benignas e a um menor comprometimento sistêmico e que a modulação da resposta immune frente diferentes números de parasitos inoculados ocorre na fase inicial da infecção, ditando o estabelecimento e a magnitude da fase crônica da doença.

**Title: Different inoculum size from *Leishmania (Viannia) braziliensis* influences lesion development and tissue damage but not cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*).**

Raquel P. Ribeiro-Romão<sup>1</sup>, Elvia Yaneth Osorio<sup>2</sup>, Otacilio Moreira<sup>3</sup>, Adriano Gomes-Silva<sup>1</sup>, Joanna G. Valverde Galvão<sup>1</sup>, Lea Cysne Filkestein<sup>4</sup>, Claude Pirmez<sup>1</sup>, Eduardo Fonseca Pinto<sup>1</sup>, Alda Maria Da-Cruz<sup>1\*</sup>.

Author affiliations:

<sup>1</sup>Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas- Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

<sup>2</sup>Department of Medicine, The University of Texas Health Science Center, San Antonio, Texas, USA

<sup>3</sup>Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas- Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

<sup>4</sup>Laboratório de Imunoparasitologia- Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ)

**Corresponding author: [alda@ioc.fiocruz.br](mailto:alda@ioc.fiocruz.br)**

## ABSTRACT

Few studies are conducted with experimental models of American tegumentary leishmaniasis (ATL), probably due to the lack of a susceptible murine model to *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main especie involved in infection. The *golden* hamster appears as the most susceptible model to species from *Viannia* subgenus but available studies have different infection protocols varying in parasite strain and number, generating different clinical and pathological presentations. This study aimed to evaluate a well standardized inoculum that ensures infection without leading to an exacerbated disease. For that, groups of five animals in four independent experiments were intradermally infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  promastigotes from *L. braziliensis*. Lesion development was accompanied by 105 days and after that skin of infected site, draining lymph node, spleen and sera were collected to investigate final parasite load, spleen visceralization, cytokine expression, histopathological features and levels of IgG anti-*Leishmania*. Our result showed that outcome of lesions was inversely proportional to inoculum size and that difference in final lesion size was observed only between  $10^4$  and  $10^5$  or  $10^6$  infected animals. Clinical aspects of lesions were also different:  $10^4$  animals presented more nodular lesions and  $10^6$  more ulcerated lesions. Final parasite load was the same between the three inocula. Cytokine expression and levels of anti-*Leishmania* IgG presented high values in the different inocula, but did not differ among them. Histopathological analysis revealed a mild inflammatory involvement in skin of  $10^4$  infected animals, while  $10^5$  and  $10^6$  presented elevated degree of tissue damage and visceralization of parasites to spleen was less frequently observed in  $10^4$  infected animals, with high spleen commitment between  $10^6$  animals. These results indicates that  $10^4$  inoculum generated more benign lesions end less systemic commitment and that modulation of immune response to different numbers of inoculated parasites occurs in the early phase of infection and dictates the establishment and magnitude of the chronic phase of disease.

Key words: *Golden* hamster, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, inoculum, cytokine expression, pathology.

## INTRODUCTION

In leishmaniasis, several characteristics are responsible for differences in the course of human infection. An important factor is the diversity of species causing different clinical forms, as well as different clones of the same species causing clinical variants (Schriefer et al. 2004, Costa et al. 2009). The number of parasites infecting the host is also determinant to the outcome of infection as well as the immunological and genetic characteristics of the host (Coutinho et al. 1987, Jerônimo et al. 2007).

Parasites from *Viannia* subgenus, as *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (V.) guyanensis*, are the most spread species causing tegumentary leishmaniasis in Americas. Most of our knowledge on the immunopathogenesis of *L. braziliensis* infection comes from studies in patients and in asymptomatic individuals (Reithinger et al. 2007, Costa et al. 2009, Carvalho et al. 2012). Despite the greater importance of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), few experimental studies were developed with *L. braziliensis* infection (De Moura et al. 2005, Salay et al. 2007), since various strains of mice are resistant to this species (Neal & Hale 1983, Oliveira et al. 2004). Balb/c mouse has been widely used, but it has the disadvantage of not developing a long-term lesion when infected with *L. braziliensis* (Dekrey et al. 1998, De Moura et al. 2005).

The lack of an adequate experimental model which reproduces the human *L. braziliensis* infection is a limiting factor for the development of biological and pharmacological health inputs to ATL. Hamster has proved to be an excellent model for cutaneous leishmaniasis caused by *Viannia* subgenus given by its high susceptibility and since it reproduces many clinical and histopathological characteristics of human cutaneous leishmaniasis (Kahl et al. 1991, Osorio et al. 2003, Gomes-Silva et al. 2013).

Considering that hamsters present an *outbred* genetic background is expected that individual characteristics have an important role in differences found in clinical outcome of disease, in such way reproducing immune response observed in human being disease. Despite these advantages, few studies have involved *L. braziliensis* infection in this model and the protocols vary among them in terms of isolate and inoculum burden (Wilson et al. 1979, Almeida et al. 1996, Kahl et al, 1991). However, even infection with the same number of parasites and strain of *L. braziliensis* there was variability in terms of lesions development when independent experiments were compared. Moreover, although high inocula as  $10^6$  parasites have guaranteed lesion development, it lead to the visceralization, that is not observed in human ATL (Gomes-Silva et al. 2013). Higher inocula burden produce larger lesions and reduced time onset in the *L. braziliensis*-hamster model (Wilson 1979) and *L.*

*major*-murine model of infection (Bretscher et al. 1992). On the other hand, the reduction of number of parasites results in lower lesions and can also protect animals from further infections (Bretscher et al. 1992). Besides, it is known that biological characteristics of inoculated parasites such as the number of *in vitro* passages, growth phase, developmental stages or rate of metacyclic forms can impact on the clinical course of *Leishmania* experimental infection (Rey et al. 1990, Gamboa et al. 2008).

Unlike the murine model of *L. major* infection, human does not develop a polarized cytokine profile in ATL and a well modulated inflammatory *versus* effector response to control the parasite replication without inducing tissue damage (Carvalho et al. 2012). Only recently, studies in molecular biology have allowed the development of tools for the detailed study of hamster immunology in cutaneous leishmaniasis (Melby et al., 1998), thus enabling the knowledge of its immune response in experimental infection with *Leishmania* (*Viannia*) complex. Few studies described the hamster cytokine pattern generated by *Leishmania* infection, particularly *L. panamensis* infection in the chronic and early phase, characterized by a mixed type 1 and type 2 cytokine profile, with high expressions of IFN- $\gamma$ , IL12P40, IL-4, IL-10 and IL-13 (Osorio et al. 2003, Espitia et al, 2010). However, the influence of the cytokine expression on the clinical evolution of hamster lesions from cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* still remains to be addressed.

In the present study we investigated the parasite inocula that more closely reproduces the cutaneous leishmaniasis usually observed in human beings and the hamster's immunopathological aspects associated with these infections. Our hypothesis was that the lower inoculum would induce a benign lesion, without visceralization and would be associated with a balanced IFN- $\gamma$ /IL-10 ratio. For that, hamsters were infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  *L. braziliensis* promastigotes in well defined inoculum condition, and were evaluated for lesion increment, histological alterations and mRNA cytokine expression.

## MATERIAL AND METHODS

### Animals and ethics statements

Outbred *golden* hamsters (*Mesocricetus auratus*) adult female (6-10 weeks old), weighing 80-90 g, from the animal facilities from Fundação Oswaldo Cruz, were used. Sixty infected animals were divided in four independent experiments, with three groups (n=5) according to the inoculum load, and 10 uninfected animals, were used as control. This study was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz –FIOCRUZ, with protocol number LW 11/11.

### Parasites for infection and immunological studies

*L. (V.) braziliensis* promastigotes (MCAN/BR/98/R619) in stationary growth phase (third *in vitro* passage) in Schneider's *Drosophila* medium (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) supplemented with L-glutamine (1mM/ml), antibiotics (penicillin: 200u/ml; streptomycin: 200µg/ml) (Sigma, USA) and 20% FBS (Gibco, Brazil) were used to infect. Promastigotes were washed in sterile phosphate-buffered saline, 0.15 M, pH 7.2 (PBS) and  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$  or  $1 \times 10^4$  parasites were inoculated intradermally in 30 µl of PBS in the dorsal hind paw of hamsters. For a better standardized protocol, some conditions were established as use of the same parasite frozen batch with known percentage of metacyclic forms (determined by the complement lysis test, described by Gamboa et al, 2008) and pH of culture medium, determined using a pH indicator strip (Merck, Darmstadt, Germany). Percentage of metacyclic forms stayed between 44% and 51.6% and pH between 5.5% and 6.5%. Disrupted antigens of *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) promastigotes (Lb-Ag) were obtained for immunological studies in a final concentration of 1 mg/ml.

### Clinical evaluation of *L. (V.) braziliensis* infection

The clinical aspects and lesions size were monitored weekly from day 10 up to 105 days post-infection. The paw dorsum-ventral thickness was measured with help of a digital thickness gauge (Mitutoyo America Corporation, São Paulo, Brazil) and expressed in millimeter. The lesion size was determined by the difference between the infected and the non-infected paw of the same animal. Discrepancies in lesions size were determined by the variance coefficient [VC= (standard deviation / mean) x 100]. Clinical aspects of the lesions were described and

classified as nodular lesions, nodular and ulcerated lesions and ulcerated ones. The macroscopic aspects of paws were also registered by digital photographs.

### **Evaluation of parasite load from infected skin and popliteal lymph node**

Parasite load of infected skin fragments were performed by Limiting Dilution Assay (LDA) according to Titus *et al* (1985). Briefly, skin from inoculated paws and adjacent lymph node (popliteal) fragments were placed on stainless steel screen containing one milliliter of Schneider's medium (Sigma, USA) and was macerated with the help of a pistil. Twenty microliters of cell suspension were diluted in 180  $\mu$ l of supplemented Schneider's medium in a Nunclon Delta 96 well microwell plate (Thermo Scientific Nunc, Denmark) in quadruplicate. From the first well, serial dilutions were made (dilution factor 1:10). The plates were then incubated at 26°C in a B.O.D. incubator (Fanem, São Paulo, Brasil) and evaluated weekly for the presence of promastigotes for a period of 30 days. Results were obtained from the average of the last four wells where viable parasites were observed divided by the weight of fragments, expressed in number of parasites per gram of tissue.

### **Quantification of anti-*Leishmania* antibodies**

The anti-*Leishmania* IgG levels were determined in plasma samples by ELISA assay (Enzyme-linked immunosorbent assay) as described elsewhere (Gomes-Silva *et al.* 2008) with some adaptations. Briefly, *L. braziliensis* promastigotes (MHOM/BR/1975/M2903) soluble antigen (40 $\mu$ g/ml) was added (50  $\mu$ l/well) to a polystyrene flat-bottom microtitre plate (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Denmark) and incubated overnight in a humidified chamber. After washing, 50  $\mu$ l/well diluted plasma samples (1:5000) of animals infected and negative control (n=5), represented by uninfected animals, were added in duplicate and plate was incubated at room temperature. Horseradish peroxidase labelled goat anti-hamster IgG (1:5000) was used as detector system (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The results were expressed as ELISA index (EI), obtained by sample absorbance divided by mean of negative controls absorbance. The cut off was determined by ROC curve, which value was defined based on the best relationship between sensibility and specificity.

## **Macroscopic and microscopic analysis of spleens**

In order to evaluate the enlargement of spleens as a result of the presence of nodules in the parenchyma, spleens of hamsters were submitted to macroscopic inspection and weighed in a precision balance. Dissemination of parasites from the inoculation site to spleens was confirmed by visualization of *Leishmania* or histopathological alterations (presence of granuloma) through histopathological analysis of spleens.

## **Histopathological analysis**

Fragments from the skin of the infected paw and spleens were fixed in 10% buffered formalin and processed for paraffin embedding. Sections of 4 µm thickness were stained with haematoxylin-eosin and then observed by light microscopy (Nikon Eclipse E600, Microscope, Tokyo, Japan). The images were captured in CoolSNAP-ProcCF and edited by ImagePro Plus 4.5.1.29 (Media Cybernetics, Maryland, EUA). The results were expressed in a score criteria according to Xiao-qiang Yang (2013), based on a semiquantitative analysis that evaluated the intensity of each histopathological feature occurrence, varying from no observation (score=0), slight observation (score=1), moderate observation (score=2) and intense observation (score=3). Final results were given by mean of the four independent experiments per inoculum, each one representing the sum of individual animal's scores. The histopathological features analyzed were: Granuloma extension, vacuolated macrophages, presence of *Leishmania* amastigotes, Schaumann's bodies and necrosis.

## **Tissue cytokine mRNA expression by real time RT PCR**

The samples (skin of paws and popliteal lymph nodes) were collected in RNA later (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and frozen at -80°C until use. Total RNA was extracted from 20 mg of tissue using the RNeasy kit (Qiagen, Austin, Texas, USA). All RNA samples were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega Corporation, Madison WI, USA) and quantified using the µl Spectrophotometer Pico 200 (Picodrop Ltd., Saffon Walden, United Kingdom) and kept at -80°C until ready to use. RNA (0,8 µg) was reverse transcribed using High Capacity Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). For real-time PCR reaction of each target gene, 2 µl of RNA were used in a final volume of 15 µL, in duplicate, using TaqMan Universal PCR Master in Applied Biosystems 7500 Fast

Real-Time PCR equipment (Applied Biosystems, USA). The sequences of primers and probes for specific target genes of hamster as well as denaturation, annealing and extension temperatures used in this study have been described previously by Espitia and collaborators (2010). Results were calculated by relative quantification formula using the comparative method of Ct (threshold cycle) to calculate the  $\Delta Ct$ , having as endogenous control the expression of the constitutive gene GAPDH. Subsequently, we calculated the  $\Delta\Delta Ct$  based on calibrator, represented by uninfected animals. Final results was expressed by the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , representing the number of times that there was a change in cytokines gene expression in relation to calibrator (fold change).

### **Statistical analysis**

Statistical tests were performed with GraphPad Prism software version 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparison between experimental groups was performed using one-way ANOVA. A parametric or non-parametric test was selected according the distribution of the raw data, followed by a post-test analysis for multiple groups as appropriate. The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and median. Significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

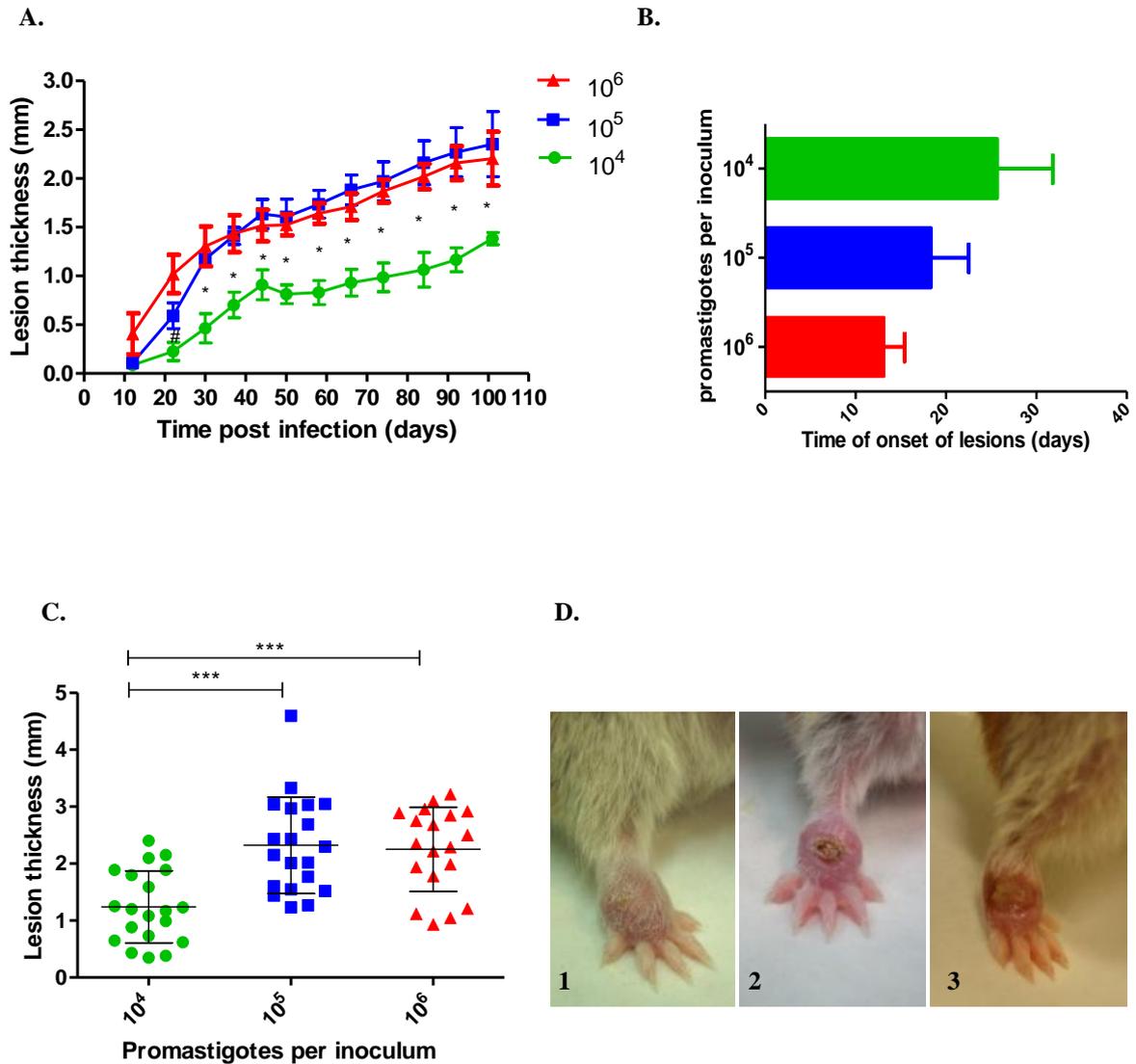
## RESULTS

### **The inoculum burden of *Leishmania (Viannia) braziliensis* influences the clinical course of skin lesions**

The kinetics of lesions development over approximately 105 days revealed a chronic and progressive course of evolution. No animal evolved with spontaneous resolution of lesion. The lesion sizes of animals infected with  $10^4$  parasites were significantly smaller when compared with  $10^5$  and  $10^6$  infected animals during all period of clinical evolution ( $p < 0.05$ ). These two last groups of animals showed similar lesions size in all points of the kinetic curve, once no statistical difference was observed (Figure 1A). The inoculum burden directly influenced the time onset of lesions, been inversely proportional. Animals infected with  $10^4$  promastigotes presented longer time onset (mean =  $25.7 \pm 6.1$  days post infection) than animals infected with  $10^5$  (mean =  $18.3 \pm 4.2$ ) or  $10^6$  parasites (mean =  $13.2 \pm 2.2$  days post infection). Statistical differences were observed among  $10^4$  and  $10^5$  groups ( $p < 0.05$ ),  $10^5$  and  $10^6$  ( $p < 0.01$ ) and between  $10^4$  and  $10^6$  ( $p < 0.0001$ ) (Figure 1B). The mean of lesion size at end point was significantly lower in animals infected with  $10^4$  parasites ( $1.24 \pm 0.63$  mm, median = 1.18,  $n = 20$ ,  $p < 0.0001$ ) than those infected with  $10^5$  ( $2.32 \pm 0.85$  mm, median = 2.22;  $n = 20$ ) or  $10^6$  parasites ( $2.25 \pm 0.74$  mm, median = 2.35,  $n = 19$ ) (Figure 1C).

The clinical aspect of the lesions also varied with the inoculum: 37% of animals infected with  $10^4$  inoculum exhibited nodular lesions and 58% exhibited nodular and ulcerated lesions, with only 5% of ulcerated ones. Animals infected with  $10^5$  parasites developed 15% of nodular lesions, 60% of nodular and ulcerated lesions and 25% ulcerated ones, while the majority of  $10^6$  infected animals showed nodular and ulcerated lesions (63%) and ulcerated ones (32%), with only 5% of them presenting nodular lesions. Of note, all  $10^5$  and  $10^6$  inoculated animals presented clinical lesions while between  $10^4$  infected ones, only one animal did not present skin lesion. Clinical aspects of the lesions are shown in Figure 1D.

The variability pattern of lesion increment was determined by the variance coefficient in each experiment. All 4 experiments in which the animals were infected with  $10^4$  inoculum load presented a heterogenous pattern ( $VC > 30\%$ ). This pattern was observed in two experiments using  $10^5$  and  $10^6$  inoculum load each and finally, an intermediary pattern ( $VC \geq 15\%$  and  $\leq 30\%$ ) was observed in 2 out of 4 experiments using  $10^5$  and  $10^6$  parasites. Homogenous pattern ( $VC < 15\%$ ) was not observed in any one experiments with any inoculum load.



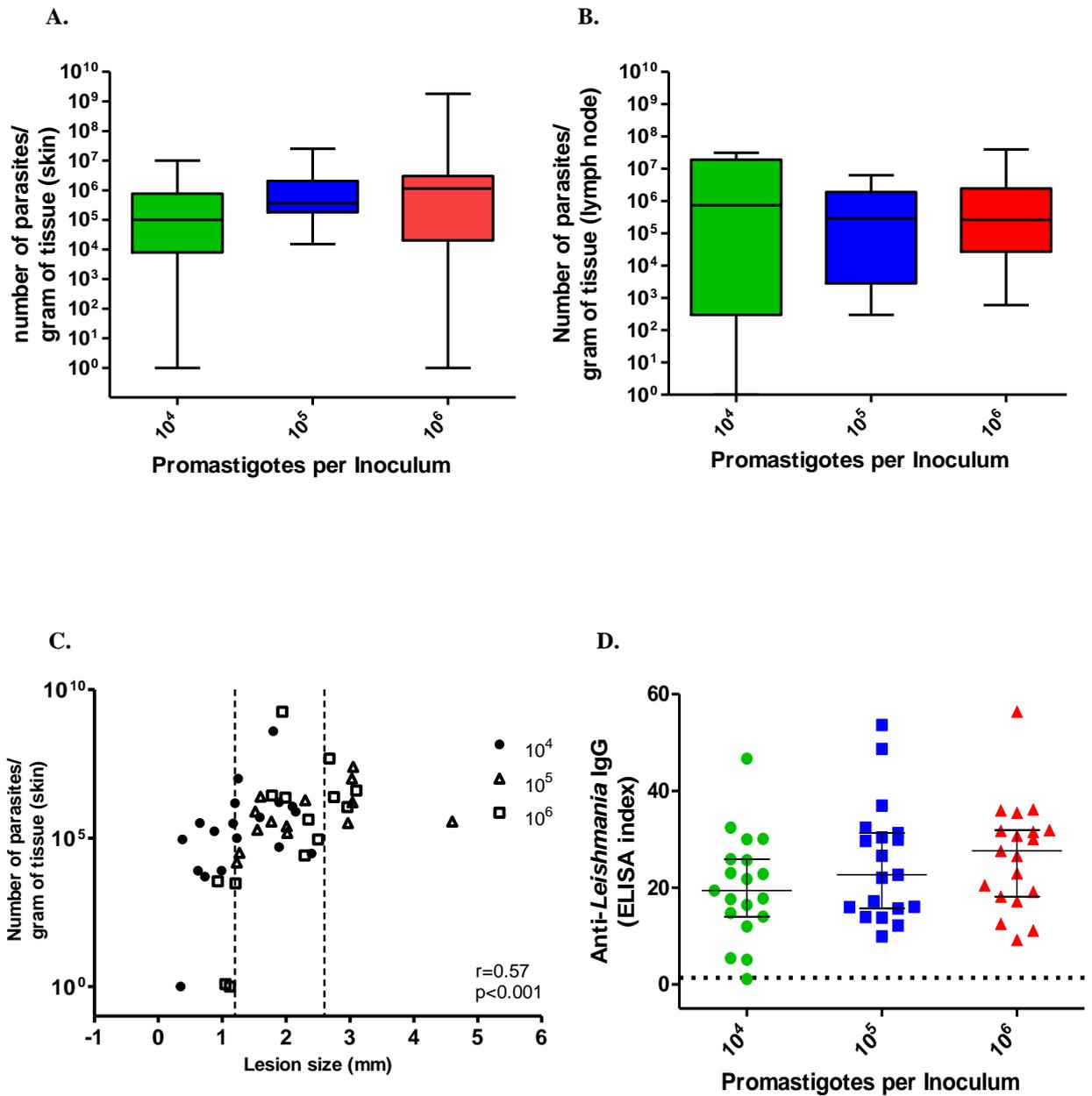
**Figure 1:** Evaluation of golden hamsters skin lesions after infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in three different inoculum burden ( $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites). Lesions size were given by dorsum-ventral thickness difference between infected and uninfected paw, and expressed in millimeters. A- Kinetics of skin lesions development along 105 days post infection. Graphs represents four independent experiments (Median and standard error, n=59, p<0.05 related to  $10^4$  compared with  $10^5$  and  $10^6$ ; # p<0.05 related to  $10^4$  compared with  $10^6$ ). B- Onset of skin clinical lesions of each inoculum, given in days post infection (Mean  $\pm$  SD); C- Final measurement of skin lesions after 105 days of evolution, given by the difference between infected and uninfected paw, expressed in millimeters (mm), n=59 (Mean  $\pm$  SD, p<0.0001). D- Clinical aspects of final lesions after 105 days of inoculation (Nodular lesion in 1, nodular and ulcerated lesion in 2 and ulcerated lesion in 3).

### **Skin lesions and lymph node presented similar parasite load independent of the number of *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasites in inocula**

Animals infected with  $10^4$  parasites presented median of  $1 \times 10^5$  parasites/g, whereas  $10^5$  animals showed  $3.6 \times 10^5$  parasites/g. In  $10^6$  animals was observed a median of  $11 \times 10^5$  parasites/g. Although it was observed an increase of parasite load according to inocula, it was not significant (Figure 2A). Adjacent lymph node also did not present significant difference between the median values of the three groups:  $10^4 = 7.4 \times 10^5$  parasites/g,  $10^5 = 2.9 \times 10^5$  parasites/g and  $10^6 = 2.6 \times 10^5$  parasites/g (Figure 2B). The skin parasite load was positively correlated with lesion size ( $r=0.57$ ,  $p<0.0001$ ). Of note, figure 2C shows a region (represented between dotted lines), which 58.7% of animals of the three inocula present lesions size between 1.2 to 2.6 mm (interquartile range:25%-75%), independent of inoculum and final parasite load.

### **The different number of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in inoculum versus anti-*Leishmania* IgG levels**

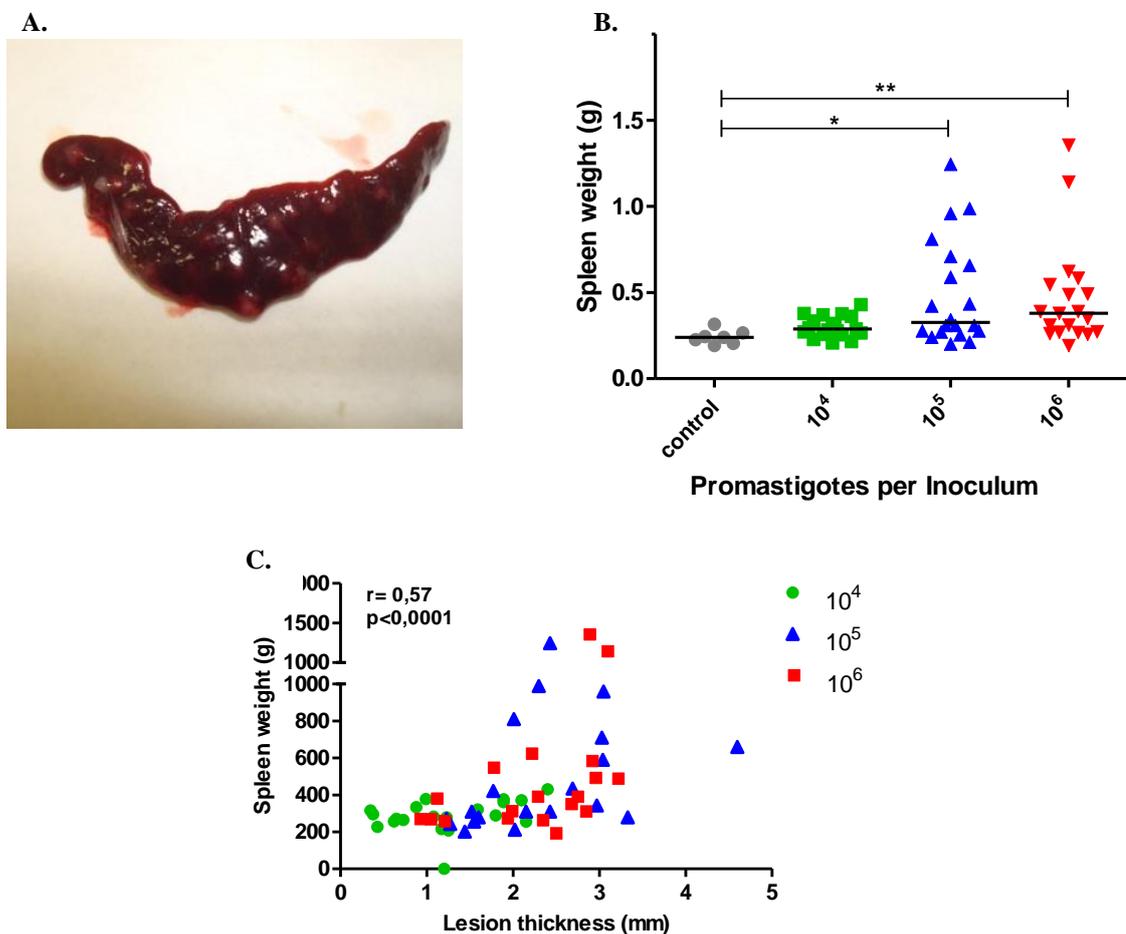
All groups of animals presented high levels of anti-*Leishmania* IgG, independently of different parasite burden in inoculum. Still, there was not observed statistical difference between inocula groups.  $10^4$  infected group presented mean =  $20.1 \pm 10.8$  (median = 19.4),  $10^5$  mean =  $25.2 \pm 12.1$  (median = 22.7) and  $10^6$  group mean =  $26.6 \pm 11.2$  (median = 27.6) (Figure 2D). Animals that developed small lesions or did not develop lesions showed lower IgG levels or no production, respectively. A weak but positive correlation was observed between lesion size and anti-*Leishmania* IgG ( $r= 0.31$ ,  $p= 0.02$ , data not shown).



**Figure 2:** Parasite load and anti-*Leishmania* immunoglobulin levels in *goldenhamsters* infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. Animals were infected with three different inocula ( $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites). Final skin parasite load (A) and final lymph node parasite load (B) after 105 days of infection (Median and interquartile range); (C) Correlation between final skin parasite load and lesion size ( $r=0.57$ ,  $p<0.0001$ ) ; D- Anti-*Leishmania* IgG serum levels after 105 days of infection. The dotted line represents the cut off value. Each point represents one animal. The horizontal bars represent median value.

### Spleens weight varied with the highest inocula burdens and were correlated with lesion increment

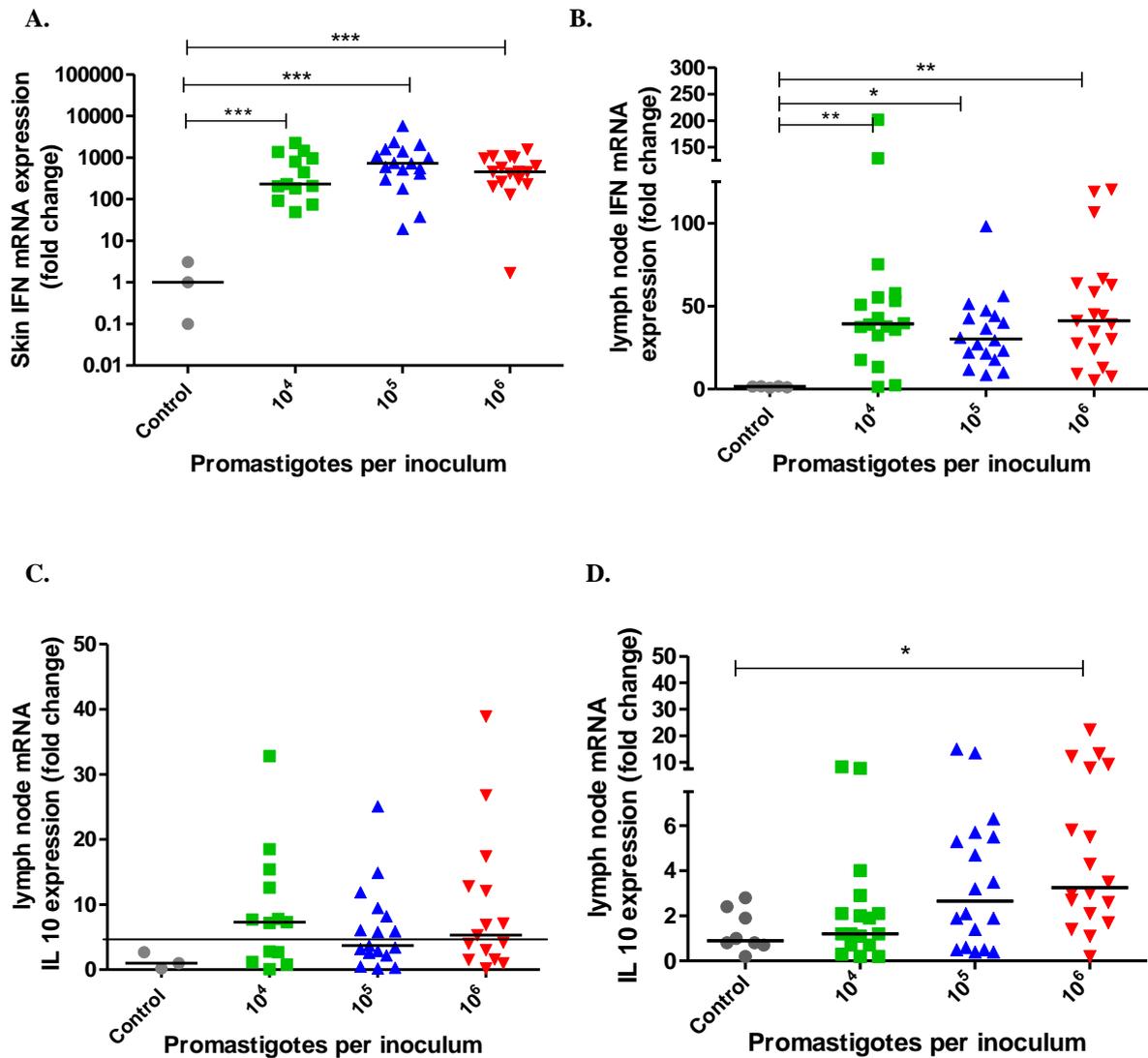
To evaluate the enlargement of spleens as a result of the presence of nodules in the parenchyma (Figure 3A), the measurement of spleen weights was performed. Animal infected with  $10^4$  (median: 0.289 g) did not exhibit a significant spleen enlargement in comparison to uninfected animals (median: 0.240 g). The spleen size of both  $10^5$  (median: 0.326 g) and  $10^6$  (median: 0.380 g) were higher than controls animals ( $p < 0.05$ ). Of note, seven out of 19 in both groups presented spleens weight equal or larger than 0.500 g. There was positive correlation among spleen weight and lesion size (Spearman,  $r = 0.57$ ,  $p < 0.0001$ ) (Figure 3B and 3C).



**Figure 3:** Spleen weight in grammas (g) of *golden hamsters* infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes in three different inocula load ( $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites) after 105 days of infection. A- Macroscopic aspect of enlarged spleen with parenchyma nodules (representative of a  $10^6$  infected animal); B- Spleen weights in the control and in the three inoculum groups, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ; C- Spearman correlation between spleen weight and lesion thickness ( $r = 0.57$ ,  $p < 0.0001$ ). Each point represents one animal; horizontal bars represents median.

**Despite different inocula burden, *Leishmania* infection leads to high production of Interferon gamma in skin lesions and popliteal lymph node but does not modulate IL-10 expression in these compartments**

High expression of IFN- $\gamma$  was observed in skin of animals infected with *L. braziliensis* compared with control group ( $p < 0.0001$ ), independent of inocula burden. However, no statistical difference was observed between the three groups infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites (Table 1, Figure 4A). Adjacent lymph node also presented high levels of IFN- $\gamma$  expression when compared with control group ( $p < 0.01$  with  $10^5$  group and  $p < 0.0001$  with  $10^4$  and  $10^6$  groups) (Figure 4B), with no difference between the inocula groups. Of note, IFN- $\gamma$  expression in lymph nodes was at least ten times lower than IFN- $\gamma$  expression in skin. The fold increase of IL-10 expression in the skin of animal infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites was similar to that presented by uninfected control group (Figure 4C). In comparison to skin, adjacent lymph nodes also presented lower levels of IL-10 expression. Statistical difference was observed only in lymph nodes from  $10^6$  infected group, when compared with control group ( $p < 0.05$ ) (Figure 4D). Positive correlation was observed between IFN- $\gamma$  expression in lymph node and parasite load in lymph node (Pearson,  $r = 0.46$ ,  $p < 0.007$ ), and parasite load in skin (Pearson,  $r = 0.41$ ,  $p < 0.008$ ) (data not shown).



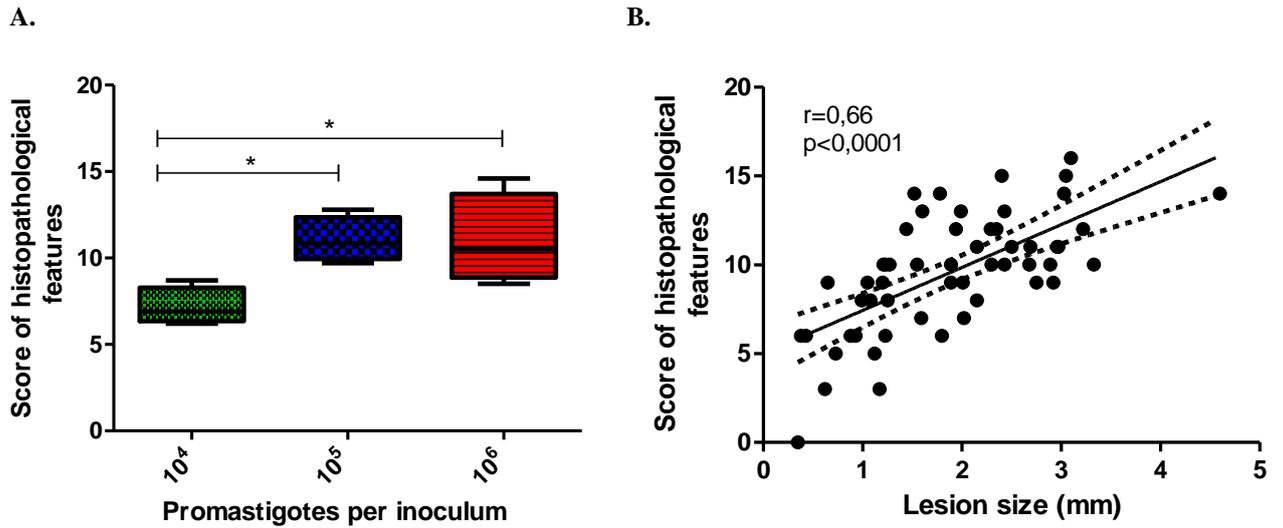
**Figure 4:** Cytokine mRNA expression in organs of *goldenhamsters* infected with different parasite burden of *Leishmania (Viannia) braziliensis* 105 days post infection determined by RT qPCR. Results are expressed as relative fold change between experimental samples and skin or lymph node of an uninfected animal to which the value 1 was arbitrarily assigned. Interferon gamma mRNA expression in skin lesions (A) and lymph nodes (B); IL-10 mRNA expression in skin lesions (C) and lymph nodes (D). Each point represents one animal and horizontal bar represents the medians (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.0001)

## **Different parasite burden in inoculum contributes to higher tissue damage and is associated with spleen visceralization of dermatropic *Leishmania***

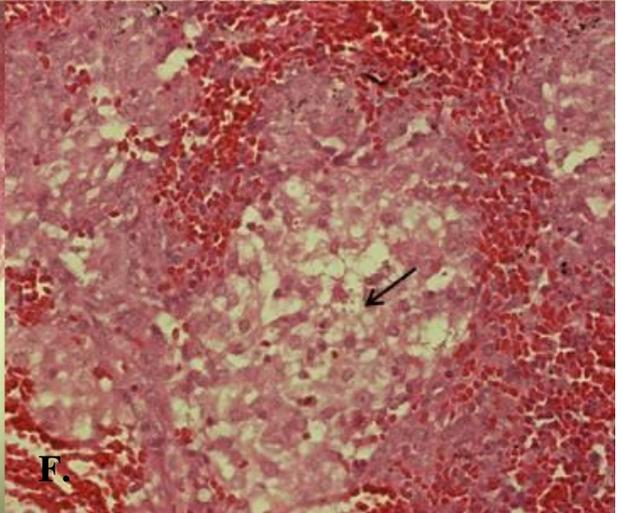
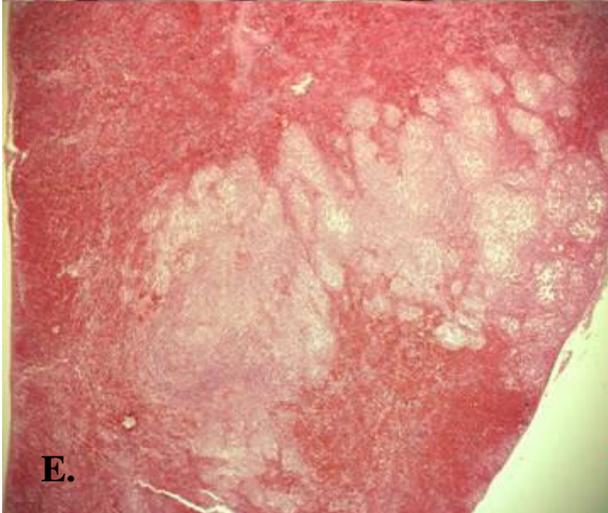
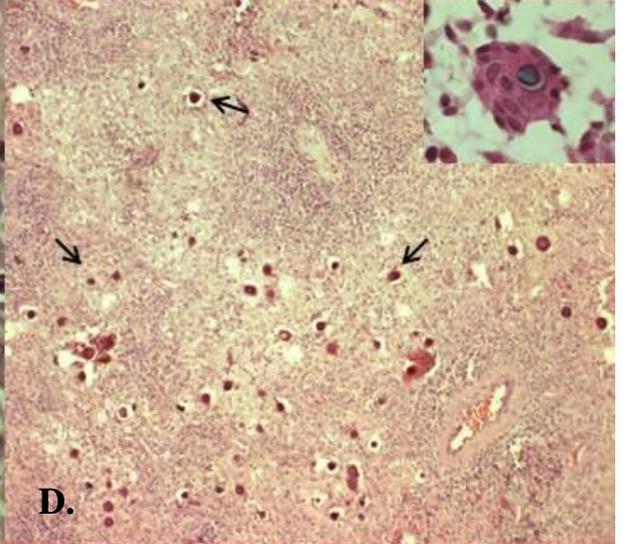
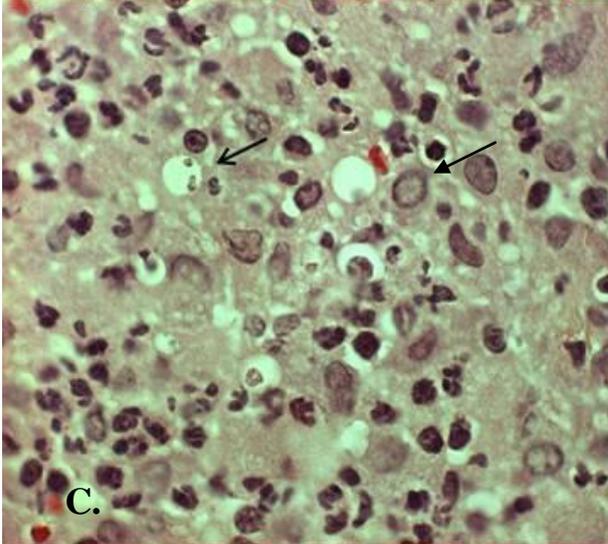
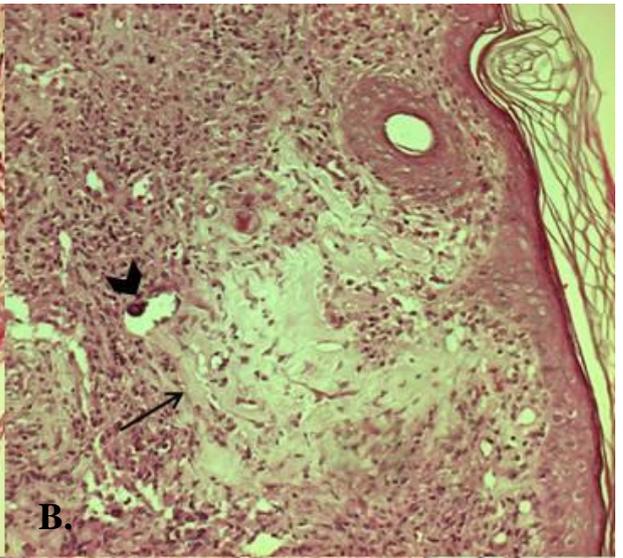
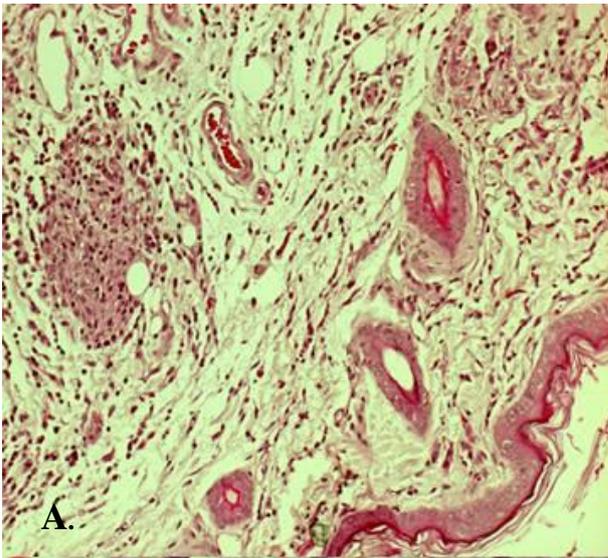
Pathological parameters of *Leishmania* infection and tissue damage were semiquantitatively evaluated and ranked in scores. These scores of histopathological features of each inoculum in four independent experiments are shown on Figure 5A. Statistical differences were observed between groups  $10^4$  and  $10^5$  ( $p < 0.05$ ) and between  $10^4$  and  $10^6$  ( $p < 0.05$ ) (Figure 5B). Positive correlation was observed between lesion increment and histopathological features score, associating higher tissue damage with greater lesion size (Figure 5C) and between skin parasite load and histopathological features (Pearson,  $r = 0.47$ ,  $p < 0.008$ ), (data not shown).

Animals infected with the three different inocula showed a similar histopathological pattern, represented by a granulomatous reaction surrounded and/or interspaced by neutrophils, eosinophils, lymphocytes and plasma cells. Intensity of *Leishmania*, in majority of animals, was scarce. The main difference at histopathological level between the three different inocula was the extension of granuloma and the degree of tissue damage, represented by the parameters analyzed, usually greater as higher inocula. Parameters such as granuloma extension (Figure 6A and B), intensity of vacuolated macrophages (Figure 6C), presence of amastigotes (Figure 6C), Schaumann's bodies (Figure 6D) were considered as pathological alterations due to *Leishmania* infection.

The histopathological analysis of spleen showed, in enlarged organs with nodules in parenchyma (Figure 2D), extensive areas presenting granulomas (Figure 6E), which some granulomas showed vacuolated macrophages with *Leishmania* inside (Figure 6F arrow). The visceralization of *Leishmania* was observed in 16% of  $10^4$  infected animals (4/25 animals), in 23.3% of  $10^5$  infected animals (7/30 animals) and in 69.2% of  $10^6$  infected animals (18/26 animals).



**Figure 5:** Histopathological analysis of skin lesions of *golden hamsters* infected with different parasite burden of *Leishmania braziliensis* 105 days post infection. A- Histopathological features measured by scores in the groups of animals infected with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites (Median and interquartile range, four independent experiments, Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ); B- Correlation between score of histopathological features and lesion sizes of animals infected  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  parasites ( $r = 0.66$ ,  $p < 0.0001$ ). Each point represents one animal.



**Figure 6:** Photomicrography of organs from hamsters infected with different parasite burden of *Leishmania braziliensis* 105 days post infection. A- Localized granuloma in dermis from a  $10^4$  representative infected animal (Hematoxilin and Eosin, 10X); B- Spread granulomatous reaction in dermis of a  $10^6$  representative infected animal (arrow- necrosis; arrow head- Schaumann's Bodies), (Hematoxilin and Eosin, 20X); C- Macrophage vacuoles with amastigotes (arrow) inside a granuloma (Hematoxilin and Eosin, 100X); D- Schaumann's bodies inside granuloma (arrows) (Hematoxilin and Eosin, 10X), Schaumann's bodie inside Multinucleated Giant Cell (square, 40X); E- Granulomas in spleen parenchyma (Hematoxilin and Eosin, 10X); F- Vacuolated macrophage in spleen with *Leishmania* inside (Arrow),(Hematoxilin and Eosin, 100X).

**Table 1:** Data from *golden* hamsters infected with different parasite burden of *Leishmania (V.) braziliensis* 105 days post infection.

	Control	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Skin lesion parasite load (parasites per g/tissue)	--	1 x 10 <sup>6</sup> [8 x 10 <sup>3</sup> -7.7 x 10 <sup>5</sup> ]	3.6 x 10 <sup>5</sup> [1.8 x 10 <sup>5</sup> -2.0 x 10 <sup>6</sup> ]	1.1 x 10 <sup>6</sup> [2.0 x 10 <sup>4</sup> -3.0 x 10 <sup>6</sup> ]
Lymph node parasite load (parasites per g/tissue)	--	7.4 x 10 <sup>5</sup> [300-1.9 x 10 <sup>7</sup> ]	2.9 x 10 <sup>5</sup> [2850-1.9 x 10 <sup>6</sup> ]	2.6 x 10 <sup>5</sup> [2.7 x 10 <sup>4</sup> -2.4 x 10 <sup>6</sup> ]
Spleen weight (g)	0.240g [0.204-0.265]	0.289 [0.257-0.361]	0.326 [0.273-0.697]	0.380 [0.270-0.547]
Skin IFN- $\gamma$ expression (fold change)	1.0 [0.1-3.1]	229 [137.8 – 1158]	723.6 [357,4 – 1502]	454.8 [247 – 975]
Lymph node IFN- $\gamma$ expression (fold change)	1.5 [0.9-1.6]	39.3 [28.6 – 55.9]	30.2 [20.6 – 45]	41.1 [24.1 – 46.9]
Skin IL-10 expression (fold change)	1.0 [0.2-2.7]	7.3 [1.9-14]	3.7 [2.4-8.8]	5.3 [1.6-12.8]
Lymph node IL-10 expression (fold change)	0.9 [0.7-2.3]	1.2 [0.7-2.5]	2.6 [0.57-5.5]	3.2 [2.0-8.2]

Note: Data are median (interquartile range) values

## DISCUSSION

The *golden* hamster model presents many advantages to be applicable to study *L. braziliensis* infection, especially due to clinical and immunopathological similarities to human disease. Previous results of our group have shown that experimental infection with  $10^6$  parasites produced a considerable variability on the final lesion size as well as spleen *Leishmania* visceralization that is not observed in human cutaneous leishmaniasis (Gomes-Silva et al, 2013). Taking these facts into account and hypothesizing that this inoculum also can mask a possible protective effect in vaccine candidate trials and the effectiveness of new drugs in development, this study aimed to diminish visceralization by using lower and standardized inocula. Besides, we investigated the immune mechanism involved in the infection and lesion development when animals were infected with lower inocula burden. We showed that in the chronic phase, infected animals with lower parasite inoculum ( $10^4$ ) assured disease development producing smaller lesions and less histopathological damage, although no difference in terms of tissue parasite load, IgG levels or IFN-g and IL-10 production in comparison to  $10^5$  or  $10^6$  inocula.

The number of parasites in the infection dose is proven to be essential to the outcome of disease in both murine (Doherty & Coffman, 1996; Belkaid et al, 1998; Kimblin et al, 2008) and hamster model (Wilson et al., 1979). In the present study *L. braziliensis* infection was performed using three different inocula and in a standardized protocol of infection, controlled for the following parameters: the same batch of frozen parasites, 3<sup>rd</sup> (third) *in vitro* passage, known metacyclogenesis percentage and inocula pH. The time onset of lesions was inversely proportional to inoculum load which can reflect the ability of immune response to control higher or lower *Leishmania* infective burdens. Our results reproduced previous reports showing that hamsters infected with  $10^6$  *L. braziliensis* last around 10 to 15 days to develop lesions while longer period is required when  $10^4$  inoculum is used (25 to 30 days) (Wilson et al. 1979, Kahrl et al. 1991). The kinetic of lesion development observed in our animals were quite similar to that of *L. major* mice infection, in which  $10^5$  and  $10^6$  inoculum produced the same pattern of curve increment and final lesion size. Interestingly,  $10^4$  produced small lesion size while  $10^2$  generated a protective immunity, leaving mice resistant to a further *Leishmania* infection. Then, immunomodulated effector response can be dependent on the initial parasite inocula burden (Brestcher et al. 1992), influencing the establishment of the chronic phase of infection. However, why  $10^5$  and  $10^6$  inoculum lead to similar clinical course clearly differing from  $10^4$  inoculum is not clearly understood.

The mechanisms triggered in the initial phase of infection, i.e. before lesion onset, characterized as silent phase, seems to shape the progression of the disease. It was hypothesized that a threshold limit of dermal infected macrophages or parasites released was not reached in the early phase of infection in animals infected with lower inoculum. It may renders a quiescent development of parasites restricted to macrophages of the inoculation site without stimulation of IL 12 and IFN production by lymph node T cells and then lesion development (Belkaid et al. 2000). This phenomenon could explain the longer onset of lesions in  $10^4$  infected animals observed in the present work. From this same point of view  $10^5$  and  $10^6$  infected animals, on the other hand could have reached this threshold limit earlier, eliciting cytokines production with an earlier lesion development.

Final lesion size also presented significant difference between  $10^4$  and  $10^5$  or  $10^6$  lesions, although  $10^5$  and  $10^6$  had no differences in lesions sizes. The variance coefficient of lesions size showed a heterogeneous pattern in  $10^4$  inoculum while  $10^5$  and  $10^6$  tended to an intermediary variability in lesions size. Once differences in lesions size could be present even in inbred mice (Brestcher et al. 1992, Pereira et al. 2009), it seems that the *outbred* genetic background of the hamster model is not contributing for this variability.

Despite differences in the onset and size of lesions, it was observed that in the chronic phase of disease, the same final parasite load was observed in lesions and lymph nodes of animals infected with the three inocula. This phenomenon was also observed in *L. major* mice infected with low and high inoculum dose. Skin of inoculation site and draining lymph node of animals infected with low dose presented more parasite load than the high dose inoculated animals in the chronic phase of infection (Kimblin et al. 2008). It seems that an equilibrium is established on the chronic phase between the parasite and the host, which neither parasites nor the cellular infiltrate induces any additional tissue damage (Belkaid et al. 2000).

Clinical aspect of lesion and histopathological features also varied according to inocula. The nodular ulcerated lesions were the most common clinical presentation in all groups (around 60%). However, animals infected with  $10^4$  parasites presented a higher percentage of nodular lesions (37%) while the group  $10^6$  presented a higher percentage of more severe ulcerated lesions (32%). A reduced *in situ* inflammatory commitment was observed in the  $10^4$  animals group in comparison to  $10^5$  or  $10^6$  groups. In accordance, only minor skin pathology was seen in mice infected with low number of *L. major* parasites while severe pathologies resulted of a very high inoculum (Klimbin et al 2008). It prompt us to think that parasite replication during the silent phase of infection also dictates the magnitude of inflammatory reaction in the infection site. In accordance, the onset of lesion was more

precocious in animals infected with higher inoculum. Afterward, the parasite-specific effector response triggered by the highest inoculum ( $10^5$  or  $10^6$ ) should sustain a unregulated inflammatory response until the chronic phase. On the other hand, we can hypothesize that the longer onset of clinical lesions and less tissue damage observed in  $10^4$  animals can be explained by the longer time to achieve the parasite replication threshold, consequently recruiting less inflammatory cells to the inoculation site.

Another possible explanation for this difference in tissue damage, lesion onset and clinical presentation could be the cytokine profile. Previous reports in human *L. braziliensis* infection related a positive correlation between larger and ulcerated lesions and IFN- $\gamma$  and TNF levels, suggesting that these cytokines were contributing for tissue injury (Antonelli et al. 2005). Recent results also have shown that tissue damage in cutaneous lesions is attributed to CD8<sup>+</sup> Granzyme B T cells, while CD4<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$  is not correlated with lesion size but with parasite killing (Santos et al. 2013).

Given the known importance of Th1 cytokines in the pathogenesis of *L. braziliensis*, there was high level expression of IFN- $\gamma$  in the period of chronic phase in the three inocula used. Skin lesion had no differences in IFN- $\gamma$  or IL-10 cytokine expression according to lesion size or clinical presentation and inocula burden. Besides, IFN- $\gamma$  or IL-10 expression was not associated with different inocula. Of note, there was no detectable IFN and IL-10 expression in skin of the only  $10^4$  animal which presented no lesion, suggesting the role of IFN- $\gamma$  in lesion development and in the innate immune response in the resolution of infection in the early phase.

This high IFN- $\gamma$  expression in comparison to uninfected animals, despite the number of final parasite load in the infection site gave rise to think that IFN- $\gamma$  was not sufficient to control parasite replication, because an inefficient effector cell response elicited by this cytokine, rather than absence of cytokine production. In hamster visceral leishmaniasis, a diminished IFN- $\gamma$  activity in macrophages activation was attributed to a limited well binding with IFN receptor, compensated by an increasing in the IFN expression (Melby et al. 1998, Zhao et al. 2006). Later studies proved that this impairment in parasite killing was not due to IFN- $\gamma$  activity but to a diminished production of NO due to a low expression and activity of iNOS, despite the strong Th1 response observed (Melby et al. 2001, Perez et al. 2006). A non polarized mixed type 1 and type 2 cytokine pattern conferred by high levels of IFN and IL-12p40 as well as IL-4, IL-10, IL-13 and IL-21 was detected in skin in the early phase experimental *L. panamensis* infection (Espitia et al. 2010). The co expression of type 1 and type 2 cytokines was also observed in chronic lesions of hamsters infected with *L. panamensis*

(Osorio et al. 2003). This inflammatory response can contribute to the skin tissue damage but the role of another cytokines has to be taken into account.

Increased levels of IL 17 were observed in lymphocytes from patients with CL and ML, but not in healthy subjects, suggesting the participation of this cytokine in pathogenesis (Bacellar et al. 2009). IL 17 play a pivotal role in recruitment of neutrophils in early stages of infectious diseases, as well as autoimmunity and chronic inflammatory diseases In ML, there was found elevated levels of IL 17 and neutrophils recruitment that could be associated with tissue injury. These studies showed that regulated production of IL 17 is related to *Leishmania* control and exacerbated production is associated with neutrophil influx and tissue damage (Melby et al 2012). Studies in murine model of *L. major* infection attributed to neutrophils the generation of necrotic lesions in IFN and iNOS deficient mice (Belkaid et al. 2000). Hamsters infected with *L. panamensis* in the snout presented more severe lesions, when compared with foot lesions, and a prominent local infiltration of polimorphonuclear cells, suggesting their participation in the pathological process (Osorio et al. 2003).

Another important mechanism of parasite killing impairment by macrophages is the alternative activation of macrophages (AAM) (Gordon and Martinez 2010). It was shown that impairment of NO production in the hamster model of VL is mediated by alternative activated macrophage (AAM) in which arginase production, that compete with the same substrate of iNOS to generate NO, was stimulated by *L. donovani* via STAT6 with no participation of Th2 cytokines (Osorio et al. 2012).

Visceralization of dermatropic *Leishmania* distant from inoculation site is considered a common finding in hamster and mice experimentally infected with high inoculum of parasites (Kahl et al. 1991, Almeida et al. 1996, Abreu-Silva et al. 2004, Soliman, 2006, Gomes-Silva et al 2013), correlated with lesion size and consequently with severity of infection (Gomes-Silva et al. 2013). Herein, spleen involvement was observed in only 16% of  $10^4$  animals against 70% of spleen commitment in  $10^6$  infected animals.

Curiously, well organized granulomas with amastigotes inside are easily detectable in these spleens, while no granulomatous reaction is observed in spleen of mouse model of *L. donovani* infection. Although granulomatous reaction is related to an effective resolution of *Leishmania* infection, it seems that this response in the hamster model is attributed to a type of granuloma which presents normal structure but no function, since it is considered a well organized granuloma but has amastigotes, suggesting no effective response of macrophages in killing *Leishmania* (Kaye et al. 2004). It reinforce the presence of the Th1 response generated

by the hamster, since granuloma formation requires IL-12, INF gamma and TNF alfa (Murray 2001), but a deficiency in generation of NO, required to kill parasites within granulomas.

The high anti-*Leishmania* IgG production and its positive correlation with lesion size observed in animals infected in response to *Leishmania* infection is a common find in dermatropic *Leishmania* infection in the hamster model (Osorio et al. 2003, Gomes-Silva et al. 2013) and in human been (Gomes-Silva et al. 2009) and could be considered an biomarker of the active cutaneous disease. The similar production observed between inoculum groups could be attributed to the established chronic phase, maybe in precocious moments of infection lower antibodies production were present in  $10^4$  infected animals, given the longer onset of lesions. In hamsters infected with *L. infantum*, there was observed increased levels of anti-*Leishmania* IgG with the time of infection (Requena et al. 2000).

In summary, different inocula influences disease outcome, clinical presentation, final lesion size and degree of tissue damage but not final parasite load, cytokine expression and IgG anti-*Leishmania* levels, which  $10^4$  inoculum generated more benign lesions and less systemic commitment. These results indicates that in the early phase of infection, during the innate immune response, differences observed between different parasite inocula burden dictates the establishment and magnitude of the adaptative immune response thus determining the chronic phase of disease.

## REFERENCES

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187.
- Almeida M, Cuba-Cuba C, Moraes M, Miles M 1996. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 115:311-316.
- Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101:226-230.
- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM 2009. IL-17 production in patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 200: 75–78.
- Belkaid Y, Kamhawi, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188:1941-1953.
- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D 2000. 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* 165:969-977.
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257.
- Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 4: 3:301.
- Costa JM, Saldanha AC, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Silva ML, Barral A 2009. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil. *Gazeta Médica da Bahia* 79:70-83.

- Coutinho S, Pirmez C, Mendonça S, Conceição-Silva F, Dórea R 1987. Pathogenesis in immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 214-228.
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73: 5827-5834.
- Dekrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 66: 827- 829.
- Doherty M, Coffman R 1996. *Leishmania major*: Effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. *Exp. Parasitol.*84: 124-135.
- Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, Travi BL, Melby PC 2010. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol* 22: 11-31.
- Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin JC 2008. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology* 135:319-326.
- Gomes-Silva A., Souza MA, Afonso-Cardoso SR, Andrade LR, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto Júnior S, Ferreira MS 2008. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 135–141.
- Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva GA, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM 2009. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 147–150.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
- Gordon S, Martinez FO 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.

- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, Pontes NN, Lacerda HG, Queiroz PV, Gomes CE, Pearson RD, Blackwell JM, Beaty TH, Wilson ME 2007. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 196: 1261-1269.
- Kahl L, Byram J, David J, Comerford S, Von Lichtenberg F 1991. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Comparative pathology of *Golden* hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*44:218-32.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201: 239-253.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D 2008. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *PNAS* 105:10125-10130.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.
- Melby CP, Chandrasekar B, Zhao W, Coe E 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166: 1912-1920.
- Murray HW 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Path* 82: 249-267.
- Neal RA, Hale C 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World leishmaniasis. *Parasitology*, 87: 7-13.
- Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 1: 81-86.
- Oliveira CI, Barral-Netto M 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *GMBahia* 75: 35-45.

- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol* 25:139-148.
- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC 2012. Progressive Visceral Leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host Arginase 1 expression. *PLoS Pathog* 8: 1-17.
- Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio EC, Souza RA, Ribeiro-Romão RP, Rezende RJ, Pena JD, Beletti ME, Souza MA 2009. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Vet Parasitol* 165: 231–240.
- Perez L, Chandrasekar B, Saldarriaga O, Zhao W, Arteaga L, Travi B e Melby P 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176:5519-5528.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the goldenhamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 269-271.
- Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 43: 623-631.
- Santos CS, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133: 1533-1540.

- Soon L, Henard C, Melby PC 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 34:735-751.
- Soliman MFM 2006. The persistence, dissemination and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146-150.
- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect and Immun* 72: 508-514.
- Stockdale L, Newton R, 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *Plos Negl Trop Dis* 7: e2278.
- Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7: 545-555.
- Wilson H, Dieckmann B, Childs B 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in Golden hamsters. *Experimental Parasitology* 47: 270-283.
- Xiao-qiang Yang, Ya-gang Zhao, Xue-qing Chen, Bo Jiang, Da-yong Sun 2013. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile*-infected animal model. *BMC Gastroenterology* 13:117.
- Zhao W, Valencia AZ, Melby PC 2006. Biological activity of hamster interferon-gamma is modulated by the carboxyl-terminal tail. *Cytokine* 34:243-251.

## DISCUSSÃO

O uso de modelos experimentais no estudo de doenças infecciosas é de suma importância para o entendimento dos mecanismos imunopatogênicos, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (Awasthi et al. 2004, Oliveira et al. 2005, Hommel et al. 1995). Particularmente no contexto das leishmanioses, a aplicabilidade de modelos experimentais é fundamental dada a crescente resistência às drogas observada nos últimos anos (Kedzierski, 2010) e a falha na resposta terapêutica de algumas espécies de *Leishmania* (Romero et al. 2001). Além disso, a antiga prática da leishmanização aponta para a possibilidade de se estabelecer uma resposta de memória protetora à doença (Kedzierski, 2010).

A escolha do animal experimental ideal baseia-se na sua capacidade em reproduzir os aspectos patológicos e a resposta imunológica observados na doença humana. Nesse contexto, o *goldenhamster* apresenta-se como um modelo bastante adequado para ser utilizado por apresentar alta susceptibilidade a *Leishmania*, em particular a espécies do subgênero *Viannia*, de grande importância epidemiológica no Brasil, e por apresentar várias das características observadas na doença humana (Hommel et al. 1995, Awasthi et al. 2004, Garg & Dube, 2006). Contudo, poucos são os trabalhos que abordam a infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster, em grande parte devido à falta de insumos imunológicos e moleculares disponíveis para o modelo, que auxiliariam na elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção.

Em estudos recentes de nosso grupo o modelo *goldenhamster* mostrou-se bastante aplicável ao estudo da leishmaniose causada por *L. braziliensis* uma vez que reproduziu muitos dos aspectos clínicos e imunopatológicos observados na doença humana (Gomes-Silva et al. 2013). Porém, apesar da utilização de um protocolo de infecção bem padronizado, foi observada uma grande variância na medida final das lesões quando experimentos independentes foram comparados. Essa grande variância pode ser atribuída em parte ao background genético do modelo, uma vez que ele é *outbreed*. Além disso, a utilização do inóculo de  $10^6$ , considerado muito alto se comparado à infecção natural, foi associado à visceralização da *Leishmania* para o baço e o fígado, fenômeno que não é observado na leishmaniose cutânea humana. A partir desses estudos, hipotetizou-se que a utilização de um inóculo com um elevado número de parasitos poderia mascarar um possível efeito protetor de um candidato vacinal ou mesmo a eficácia de novas drogas em desenvolvimento.

Diante desses fatos, o presente estudo teve como objetivo investigar o inóculo ideal de *L. braziliensis* a ser utilizado no modelo hamster de infecção com *L. braziliensis* que não só garantisse a infecção e o desenvolvimento da lesão, mas que não evoluísse para uma doença exacerbada com conseqüente visceralização do parasito. Para isso, foram realizados quatro experimentos independentes onde grupos de cinco animais foram infectados com três diferentes inóculos:  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas na fase estacionária de *L. braziliensis*. Na tentativa de diminuir as possíveis variações entre os experimentos, o inóculo foi padronizado utilizando-se uma cepa proveniente do mesmo lote de congelamento, além do conhecimento da taxa de metaciclogênese e do pH do meio de cultura no momento de preparo do inóculo. Os resultados do presente estudo mostraram a influência do inóculo de infecção no início do desenvolvimento das lesões, na cinética de crescimento, no tamanho final e no aspecto clínico das lesões. Na fase crônica da infecção, as diferenças mais marcantes foram observadas nos animais infectados com o menor inóculo ( $10^4$ ), que desenvolveram lesões menores com menor dano tecidual, apesar de não ter havido diferença em termos de carga parasitária final, produção de citocinas e de IgG anti-*Leishmania* quando comparados com os animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos.

Já é sabido que o número de parasitos no inóculo inicial de infecção é essencial para o estabelecimento da doença tanto no modelo murino (Doherty & Coffman, 1996, Belkaid et al. 1998, Kimblin et al. 2008) como no modelo hamster de infecção experimental por espécies de *Leishmania* (Wilson et al. 1979). No presente estudo, foi observado que o aparecimento das lesões clínicas foi inversamente proporcional ao número de parasitos inoculados, o que pode refletir a habilidade da resposta imune inata em controlar a carga de parasitos no início da infecção. Nossos resultados reproduziram trabalhos anteriores que mostraram que animais infectados com  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* levaram cerca de 10 a 15 dias para desenvolver lesões aparentes, enquanto períodos maiores foram necessários para o surgimento de lesões em animais infectados com  $10^4$  parasitos (25 a 30 dias) (Wilson et al. 1979, Kahl et al 1991).

A cinética de desenvolvimento das lesões ao longo de 105 dias de acompanhamento mostrou diferença marcante entre as medidas dos animais infectados com  $10^4$  com as dos animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$ , enquanto estes apresentaram cinéticas similares. Em infecção com *L. major* em modelo murino utilizando diferentes inóculos, também foram observadas similaridades nas cinéticas de crescimento de lesão entre animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos, com tamanhos finais de lesão também iguais. Nesse mesmo estudo, animais infectados com  $10^4$  apresentaram lesões pequenas enquanto que o inóculo de  $10^2$

levou a uma resposta imune protetora, tornando-os resistentes à infecção subsequente (Brestcher et al., 1992). Portanto, parece que uma resposta imune inicial efetora e modulada influencia no estabelecimento e na fase crônica da doença. Porém, o motivo pelo qual os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  apresentaram curso clínico e tamanho de lesão final igual apesar da grande diferença de parasitos (900.000) em comparação com  $10^4$  e  $10^5$  (90.000), ainda não foi compreendido.

Em outro trabalho utilizando diferentes cargas parasitárias de *Trypanosoma cruzi* em infecção de camundongos, foi observado que o comprometimento inflamatório e o dano tecidual foi diretamente proporcional ao tamanho do inóculo. Porém, diferente do observado no presente trabalho, os inóculos mais baixos (300 e 3.000 parasitos) apresentaram taxa de mortalidade, comprometimento inflamatório e carga parasitária final similares, diferentes do inóculo mais alto (30.000), sugerindo que existe um número mínimo de parasitos para desencadear uma resposta específica, levando a uma resposta descontrolada e ao dano tecidual (Borges et al. 2012).

Os mecanismos desencadeados no início da infecção, antes do surgimento da lesão, caracterizada como fase silenciosa da infecção, parecem ser decisivos na progressão da doença. Acredita-se que exista um limite de infecção dos macrófagos da derme ou de parasitos liberados no meio extracelular para desencadear uma resposta adaptativa e então o início da lesão. Em infecções com baixo inóculo, esse limite não atingido nesta fase inicial leva a um desenvolvimento quiescente desses parasitos nesses macrófagos locais, sem estimulação de IL-12, que levaria à produção de citocinas por linfócitos T do linfonodo drenante, sobretudo IFN- $\gamma$ , com consequente desenvolvimento da lesão. Essa fase, onde tem início a resposta adaptativa com consequentemente início da lesão, é considerada como sendo a de resolução da infecção, uma vez que aí se inicia a morte dos parasitos (Belkaid et al., 2000). Esse fenômeno pode explicar o período de desenvolvimento da lesão mais longo observado nos animais infectados com  $10^4$ . Da mesma forma, os animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  provavelmente atingiram esse limite de macrófagos infectados mais cedo, desencadeando mais precocemente a resposta adaptativa, com consequente produção de citocinas e lesão tecidual.

O tamanho final das lesões dos animais infectados com  $10^4$  apresentou diferenças significativas com o dos animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$ , embora estes não tenham diferido entre si. O coeficiente de variação das lesões dos animais infectados com  $10^4$  mostrou um padrão heterogêneo, evidenciando uma maior variação nas lesões quanto mais baixo o inóculo, enquanto que os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  produziram lesões que tenderam a um padrão

intermediário em termos de variação de tamanho. Uma vez que diferentes tamanhos de lesão também são observados em camundongos *inbred* infectados com *Leishmania* (Brestcher et al. 1992, Pereira et al. 2009) podemos sugerir que a variabilidade observada no presente estudo não se deve ao caráter *outbred* do modelo hamster

Apesar das diferenças observadas no tempo de surgimento das lesões clínicas e no tamanho final dessas lesões, uma vez estabelecida a fase crônica da infecção não foram observadas diferenças na carga parasitária final nos três grupos de inóculos. O mesmo foi visto em camundongos infectados com inóculo baixo e alto de *L. major*. A pele do local de inoculação e o linfonodo drenante da lesão dos animais infectados com os diferentes inóculos apresentaram um período onde as cargas parasitárias se equivaleram (Kimblin et al. 2008). Parece que um equilíbrio é estabelecido na fase crônica da doença entre o parasito e o hospedeiro, onde nem os parasitos nem a resposta inflamatória induzem a danos teciduais adicionais (Belkaid et al. 2000).

O aspecto clínico das lesões também variou de acordo com o inóculo usado. Lesões nodulares e ulceradas foram as apresentações clínicas mais comuns nos três grupos de inóculos (aproximadamente 60% dos animais). Porém, os animais infectados com  $10^4$  apresentaram um alto percentual de lesões nodulares (37%), enquanto os animais infectados com  $10^6$  apresentaram maior percentual de lesões ulceradas mais graves (32%). Uma possível explicação para as diferentes apresentações clínicas seria o perfil de citocinas expresso no local de infecção induzida pelo inóculo na fase inicial de infecção. Em um estudo que avaliou o perfil fenotípico de células presentes em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* em humanos, foi observado que o tamanho das lesões estava positivamente correlacionado com uma maior frequência de células produtoras de IFN- $\gamma$  e TNF, sugerindo que estas citocinas estivessem envolvidas no dano tecidual (Antonelli et al. 2005). No presente trabalho, apesar dos três inóculos utilizados terem levado a diferentes apresentações clínicas, não foram observadas diferenças entre a expressão de IFN- $\gamma$  ou IL-10 entre os grupos de animais, bem como não foi observada correlação destas citocinas com o tipo de lesão. Porém, outras citocinas pró inflamatórias estão envolvidas na resposta imune a *Leishmania*, como a IL-2 e o TNF, além da quimiocina considerada “leishmanicida”, CXCL10 (Kim & Soong, 2013). Estudos recentes atribuem aos linfócitos T CD8 granzyme B<sup>+</sup> como responsáveis pela lesão tecidual observada em lesões cutâneas, enquanto linfócitos T CD4<sup>+</sup> produtores de IFN- $\gamma$  não estariam envolvidos com o tamanho da lesão e sim com a morte dos parasitos (Santos et al. 2013).

A análise histopatológica das lesões geradas pelos diferentes inóculos mostrou um menor comprometimento inflamatório local nos animais infectados com  $10^4$  parasitos em comparação com os infectados com  $10^5$  e  $10^6$ , que apresentaram o mesmo padrão inflamatório. Esse menor comprometimento referiu-se principalmente à extensão da reação granulomatosa, onde a maioria dos animais infectados com inóculo de  $10^4$  apresentou uma reação mais localizada, podendo ser observadas áreas sem granuloma. Em contrapartida, animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos apresentaram granulomas que se estendiam por toda a derme analisada. Além deste parâmetro, a presença de necrose foi outra alteração histopatológica observada com alta frequência em animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos do que nos infectados com  $10^4$ . A presença de corpúsculos de Schaumann e de amastigotas também foi mais frequente nos inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  em comparação com o inóculo de  $10^4$ .

Para a quantificação das alterações histológicas utilizamos a medida por escores, onde a intensidade da alteração é pontuada de 1 a 3, e o somatório reflete o grau do conjunto das alterações teciduais observadas (Yang et al. 2013). Essas alterações observadas à histopatologia conferiram maiores escores às lesões dos animais  $10^5$  e  $10^6$ , que não apresentaram diferenças entre si, e menores scores no inóculo de  $10^4$ . Escores mais altos, portanto, eram indicativos de maior dano tecidual, que correlacionou-se positivamente com o tamanho das lesões. Essas alterações histopatológicas observadas nos três inóculos, caracterizada então pela presença de granuloma, rodeado e/ou intercalado por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, além da presença de corpúsculos de Schaumann, já foram observadas e bem caracterizadas em outros trabalhos envolvendo o modelo hamster na infecção por *L. braziliensis* (Wilson, 1979, Laurenti et al. 1990, Kahl et al. 1991, Sinagra et al. 1997).

A presença de corpúsculos de Schaumann observados à histopatologia merece destaque. Essas estruturas são formadas a partir de debris celulares e micro organismos mortos que sofrem calcificação distrófica, muito comum no modelo hamster, e estão associadas a infecções que levam a uma reação granulomatosa (Kahl et al. 1991, Essayag et al. 2002). Particularmente na infecção por *L. braziliensis*, essas estruturas são frequentemente encontradas (Wilson, 1979, Laurenti et al. 1990, Sinagra et al. 2007, Gomes-Silva et al. 2013) e sua presença no interior de granulomas sugere um sistema fagocítico mononuclear frágil do hamster (Laurenti et al. 1990). No presente trabalho, a maior frequência desses corpúsculos foi associada com um maior parasitismo tecidual, apesar de não observada correlação estatística com a carga parasitária.

A formação de granuloma mediado pela infecção por *L. braziliensis* é o principal achado histopatológico observado na doença humana (Magalhães et al. 1986, Pirmez et al. 1990 em Souza-Lemos et al. 2008), além da presença de infiltrado histiolinfoplasmocitário, podendo haver também células gigantes multinucleadas e necrose (Mehegan et al. 1999, Hepburn 2000). Alguns estudos propuseram uma classificação histopatológica das lesões de leishmaniose cutânea humana em padrões histopatológicos, de acordo com a presença ou ausência de determinados tipos celulares, necrose e célula gigante multinucleada numa tentativa de se prever o prognóstico da doença (Ridley, 1980, Magalhães et al. 1986). Porém, essa classificação foi contestada, uma vez que já foi visto que diversos padrões podem estar presentes em uma mesma lesão (Bittencourt & Barral, 1991). Esses estudos mostram que o ser humano e o hamster compartilham várias características histopatológicas na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

A reação inflamatória tecidual menos intensa observada nas lesões dos animais infectados com  $10^4$  parasitos em comparação com os infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos também foi observada em infecção experimental de camundongos com inóculos baixo e alto de *L. major*, onde as lesões oriundas do inóculo baixo apresentaram poucas alterações histopatológicas enquanto que nas lesões do inóculo alto, alterações mais severas foram observadas (Klimbin et al. 2008). Essas diferentes características inflamatórias observadas entre o inóculo de  $10^4$  e os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  na fase crônica da doença nos levou a pensar que a reação inflamatória gerada durante a fase inicial, ou fase silenciosa de replicação dos parasitos, determina a magnitude da reação inflamatória que perdura na fase crônica da doença. A resposta específica aos parasitos desencadeada após a fase silenciosa pelos inóculos mais altos ( $10^5$  ou  $10^6$ ) gerou uma resposta inflamatória mais desregulada, que se manteve até a fase crônica da infecção.

Outra possível explicação para a magnitude do dano tecidual seria o perfil das citocinas presentes nas lesões. Trabalhos prévios em humanos com leishmaniose cutânea localizada causadas por *L. braziliensis* relacionou lesões mais graves com maiores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF (Antonelli et al. 2005). Pacientes com lesões mucosas também apresentaram uma relação IFN- $\gamma$ /IL-10 mais elevada, com alta produção de IFN- $\gamma$  e baixa de IL-10, sugerindo que a incapacidade em modular uma produção exacerbada de IFN- $\gamma$  contribuem para maior dano tecidual (Gomes-Silva et al. 2007).

Corroborando a importância dessas citocinas na patogênese da *L. braziliensis*, o presente trabalho mostrou uma alta expressão de IFN- $\gamma$  nas lesões durante a fase crônica da infecção, nos três diferentes inóculos, apesar de não ter havido diferença na expressão entre os

inóculos. Embora algumas lesões de alguns animais tenham apresentado diferenças no tamanho e no aspecto clínico, sugerindo uma relação entre uma maior expressão de IFN- $\gamma$  e/ou menor expressão de IL-10 nas lesões mais ulceradas e portanto consideradas mais graves, como observado na doença humana, não houve diferença na expressão de IFN- $\gamma$  ou IL-10 nem com relação ao tamanho nem à apresentação clínica. Isso nos levou a concluir que talvez, nesse caso ou nesse momento da infecção, o IFN- $\gamma$  não seja o mais fator mais determinante para o dano tecidual, uma vez que os animais infectados com  $10^4$  parasitos tiveram menor dano tecidual comparados aos animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos, porém apresentou expressão de IFN- $\gamma$  semelhante aos demais inóculos.

Estudos recentes mostraram o papel de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mais especificamente células CD8 granzima B<sup>+</sup>, no dano tecidual em lesões cutâneas de *L. braziliensis* em humanos. A presença dessas células foi correlacionada com a necrose tecidual e a apoptose das células-alvo, porém não foi correlacionada com a diminuição da carga parasitária. A morte dos parasitos foi atribuída às células TCD4<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  (Santos et al. 2013). O papel dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> já foi associado a cura na leishmaniose cutânea (Da-Cruz et al. 2005), embora a resposta citotóxica exacerbada esteja envolvida na patogênese da leishmaniose mucosa (Brodskyn et al. 1997).

Curiosamente, o único animal que não desenvolveu lesão no presente estudo, inoculado com  $10^4$  parasitos, apresentou níveis indetectáveis de expressão de IFN- $\gamma$  e de IL-10. Isto também ocorre na pele sadia, cuja expressão dessas citocinas é muito baixa ou, na maioria das vezes, indetectável. Diante desses fatos, concluiu-se que a infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster leva à alta expressão de IFN- $\gamma$  na fase crônica da doença, independente de diferenças de inóculo utilizado ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ), apresentação clínica ou tamanho da lesão. O não desenvolvimento da doença, observado em um dos animais, não foi associado à expressão de IFN- $\gamma$ . Pode ser que na fase inicial da infecção tenha havido diferença na expressão dessas citocinas e que esta tenha tido participação na evolução da doença até a fase crônica.

A alta expressão de IFN- $\gamma$  observada na pele e linfonodo dos animais infectados com os diferentes inóculos, comparados com os animais controle, concomitante com a presença de parasitos nesses órgãos, parece ser contraditória uma vez que essa citocina está relacionada à ativação de macrófagos, com consequente produção de óxido nítrico e morte dos parasitos (Awashti et al. 2004, Cummings et al. 2010). Esses achados sugerem uma resposta efetora ineficiente e insuficiente para controlar a replicação dos parasitos a despeito da presença desta citocina.

Poucos são os trabalhos que abordam o perfil de citocinas no modelo hamster dada a escassez de insumos imunológicos. O primeiro estudo molecular da imunopatogenia da leishmaniose visceral em hamsters mostrou um controle parasitário ineficiente apesar da forte resposta Th1, com alta expressão gênica de IL-2, IL-12 e TNF, além da expressão substancial de IL-10 e TGF beta, indicando um perfil misto e não polarizado de resposta imune. A progressão da doença, a despeito da alta expressão de IFN- $\gamma$ , foi atribuída à diminuição da atividade biológica do IFN- $\gamma$  na ativação de macrófagos devido à presença de uma cauda adicional de aminoácidos que leva a uma ligação ineficiente com o receptor de IFN- $\gamma$  nas células-alvo, compensada pelo aumento da expressão desta citocina. Estudos posteriores do mesmo grupo mostraram que esse controle parasitário deficiente não era decorrente da baixa capacidade biológica do IFN- $\gamma$ , uma vez que a cascata de sinalização desta citocina encontrava-se intacta. Na verdade, a baixa expressão de NO era consequente a uma baixa expressão e atividade da iNOS, provavelmente devido a uma falha na região promotora do gene (Melby et al. 1998, Melby et al. 2001, Zhao et al.2006, Perez et al. 2006).

Osorio e colaboradores (2003) observaram lesões de hamsters infectados com *L. panamensis* apresentaram coexpressão de citocinas do tipo 1 (IL12p40, IFN- $\gamma$ ) e do tipo 2 (IL-10 e TGF- $\beta$ ) na fase crônica da infecção. Em um estudo mais recente que avaliou a expressão de citocinas em lesões de hamsters após sete dias de infecção por *L. panamensis*, onde foram estabelecidas sequências gênicas de outras citocinas e quimiocinas, também foi observado um padrão misto de resposta nessa fase inicial de infecção. Essa não polarização para o tipo 1 ou tipo 2 de resposta foi caracterizada por alta expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12p40 assim como de IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21, atribuindo a esse perfil inicial de resposta inflamatória o caráter crônico da doença observado neste modelo (Espitia et al. 2010).

No presente trabalho, a alta expressão de IFN- $\gamma$  concomitante com a presença de parasitos, tanto no linfonodo quanto na pele infectada, reforça a teoria da ineficiência da resposta efetora dos macrófagos na morte dos parasitos, apesar da presença de IFN- $\gamma$ , como observado no modelo de leishmaniose visceral da doença (Melby et al.2001, Melby et al. 2006). Porém, o fato de só termos avaliado IFN- $\gamma$  e IL-10, de uma certa forma limita o raciocínio a respeito da imunopatogenia da doença no modelo, não permitindo conclusões mais robustas. Assim, seria necessária a avaliação de outras citocinas, especialmente TNF, que podem estar envolvidas na resposta imune a *L. braziliensis* no modelo hamster. Além disso, o estudo tanto da fase inicial de infecção quanto da fase crônica poderá elucidar não só os mecanismos que desencadearam o processo inflamatório, bem como os que possibilitam a perpetuação da infecção.

Outro mecanismo importante que pode contribuir para a morte ineficiente dos parasitos por macrófagos é a ativação alternativa de macrófagos (Gordon & Martinez 2010). Foi mostrado que a diminuição na produção de óxido nítrico no modelo hamster de leishmaniose visceral foi mediada pela produção de arginase por *L. donovani*, estimulada diretamente via STAT-6, sem a participação de citocinas do tipo 2. A produção de arginase compete com o mesmo substrato necessário para a síntese de iNOS, a L-arginina, ou seja, com a síntese de arginase, não ocorre a síntese de iNOS. Além do mais, durante a síntese de arginase, ocorre o aumento de poliaminas, que também favorecem o crescimento dos parasitos (Osorio et al. 2012).

Estudos recentes relacionados à imunopatogênese da LC e LM chamaram a atenção para outra citocina que pode estar envolvida no dano tecidual. Além de altos níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, níveis aumentados de IL-17 também foram observados em pacientes com LC e LM ativa. Estes foram maiores no PBMC de pacientes com lesões mucosas em relação às lesões cutâneas, sugerindo sua participação na patogênese e no dano tecidual (Bacellar et al. 2009). A IL 17 estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de exercer papel fundamental no recrutamento de neutrófilos na fase inicial de infecção, conforme demonstrado também em doenças autoimunes e doenças inflamatórias crônicas (Hirota et al. 2010).

Em estudo com o modelo murino de infecção por *L. major*, Belkaid e colaboradores (2000) já haviam apontado a importância dos neutrófilos na patogênese da lesão tecidual. Camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  ou iNOS mostraram lesões mais graves quando comparados com animais selvagens, e esse maior dano tecidual foi atribuído aos neutrófilos, uma vez que foi observado maior influxo dessa célula nas lesões desses animais (Belkaid et al. 2000).

Na imunopatogênese da leishmaniose mucosa, níveis elevados de IL 17 e o maior recrutamento de neutrófilos podem estar associados com a injúria tecidual. Por outro lado, além deste papel deletério, outros estudos mostraram níveis mais altos de IL-17 em pacientes com infecção subclínica comparados com pacientes com leishmaniose visceral ativa, sugerindo um papel protetor desta citocina. Esses estudos mostraram que uma produção regulada de IL-17 está relacionada ao controle de *Leishmania* e a produção exacerbada dessa citocina estaria associada ao influxo de neutrófilos, contribuindo com o dano tecidual (Melby et al. 2012).

A visceralização de *Leishmania* dermatrópica no modelo hamster e murino de leishmaniose cutânea é um achado comum (Kahl et al. 1991, Almeida et al. 1996, Abreu-Silva

et al. 2004, Soliman 2006), sendo correlacionada com o tamanho da lesão e conseqüentemente com a gravidade da doença (Gomes-Silva et al. 2013). A esplenomegalia presente em alguns animais no presente trabalho, conferida pela presença de nódulos no parênquima do órgão que levaram a um conseqüente aumento do seu peso, foi indicativa da visceralização da *Leishmania*, confirmada pelos achados histopatológicos do baço. Foi observada uma maior tendência à visceralização quanto maior o número de parasitos no inóculo. Quase 70% dos animais infectados com  $10^6$  apresentaram *Leishmania* no baço, enquanto somente 16% dos animais infectados com  $10^4$  parasitos apresentaram visceralização.

A confirmação da presença dos parasitos no órgão foi feita através da análise histopatológica, cujos nódulos observados macroscopicamente constituíam-se em aglomerados de macrófagos epitelióides, formando granulomas organizados, com a presença de números variados de amastigotas no interior de vacúolos. Curiosamente, hamsters infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* apresentam esplenomegalia, porém a presença de nódulos no baço nunca foi relatada (Requena et al. 2000, Dea-Ayuela et al. 2007) bem como a presença de granulomas. Nestes, as principais alterações histopatológicas foram a hipoplasia da polpa branca e a presença de macrófagos parasitados isolados ou em pequenos agregados dispersos em todo o órgão (Binhazim et al. 1993, Almeida et al. 1996, Riça-Capela et al. 2003). Em contrapartida, hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* na pele, desenvolveram granuloma no local de inoculação na fase mais tardia da infecção (Laurenti et al. 1990). Essas observações sugerem diferenças na resposta imune específica de cada órgão frente às diferentes espécies de *Leishmania*, provavelmente devido ao tropismo tecidual de cada espécie.

Apesar da reação granulomatosa estar relacionada com a contenção e a resolução da infecção, sua presença no baço concomitante com parasitos sugere uma resposta ineficiente neste sentido. De acordo com a classificação dos diferentes tipos de granuloma proposto por Kaye e colaboradores (2004), os granulomas observados nos baços dos animais do presente estudo se enquadraram como um granuloma que apresenta estrutura normal mas não é funcional, uma vez que se apresenta bem organizado, porém com *Leishmania* no seu interior, sugerindo uma resposta ineficiente dos macrófagos na morte dos parasitos (Kaye et al. 2004). Uma vez que para a formação do granuloma são necessárias citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF (Murray 2001), sua formação poderia ser justificada pela expressão aumentada de IFN e outras citocinas no baço, já que alta expressão de IFN é encontrada na pele e linfonodo desses animais. A presença de *Leishmania* no interior do granuloma, sugerindo uma falha na

atividade microbicida dos macrófagos, pode ser atribuída à baixa expressão de iNOS e óxido nítrico, como observado em hamsters infectados com *L. donovani* (Melby, 2001).

Altos níveis de IgG total anti-*Leishmania* é um achado comum em hamsters infectados por *L. (V.) panamensis* (Osorio et al. 2003), bem como por *L. (V.) braziliensis*, correlacionando-se com o tamanho da lesão e consequentemente com a gravidade da doença (Gomes-Silva et al. 2013). No ser humano, essa alta produção de IgG pode ser considerada como um biomarcador da infecção cutânea ativa (Gomes-Silva et al. 2009). No presente trabalho, altos níveis de IgG total também se correlacionaram com o tamanho da pata, o que pode indicar também um marcador da gravidade da doença.

Apesar da alta produção de IgG em todos os grupos infectados, não houve diferença entre os grupos, que pode ser atribuída à fase crônica em que se encontra a doença. Talvez em momentos mais precoces da infecção, níveis mais baixos de anticorpos estivessem presentes nos animais infectados pelo inóculo de  $10^4$ , uma vez que eles demoraram mais tempo para desenvolver as lesões clínicas. Em hamsters infectados com *L. infantum*, foram observados níveis crescentes de IgG anti-*Leishmania* de acordo com o tempo de infecção (Requena et al. 2000).

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ *Golden* hamsters infectados com diferentes inóculos de *L. braziliensis* foram capazes de desenvolver lesões no local de inoculação, reafirmando sua susceptibilidade à espécie em questão;
- ✓ O número de promastigotas de *L. braziliensis* no inóculo influenciou no tempo de manifestação clínica da doença, no aspecto clínico, no curso evolutivo e no tamanho final das lesões;
- ✓ Independente do número de parasitos de *L. braziliensis* no inóculo, não houve diferença na carga parasitária final na lesão e no linfonodo drenante;
- ✓ Os níveis de IgG anti-*Leishmania* produzidos frente à infecção por *L. braziliensis* foram iguais apesar da diferença no número de parasitos no inóculo inicial;
- ✓ A visceralização dos parasitos para o baço foi mais frequente nos animais infectados com o maior inóculo, e o peso do baço teve correlação direta com o tamanho da lesão e conseqüentemente com a gravidade da doença;
- ✓ A infecção de hamsters com *L. braziliensis* leva a alta expressão de IFN- $\gamma$  na pele infectada e no linfonodo drenante, independente do inóculo inicial utilizado na infecção;
- ✓ O inóculo mais baixo ( $10^4$ ) levou a um menor comprometimento local e sistêmico enquanto os inóculos maiores ( $10^5$  e  $10^6$ ) levaram a um maior dano tecidual;
- ✓ O inóculo a ser preferencialmente utilizado em testes de candidatos vacinais e novos fármacos seria o de  $10^5$  parasitos, uma vez que o inóculo de  $10^4$  pode levar a não manifestação da doença e o inóculo de  $10^6$  a uma doença exacerbada;
- ✓ Em síntese, os resultados obtidos neste presente estudo sugerem que na fase inicial da infecção, durante a resposta imune inata, a diferença no número de parasitos inoculados irá ditar o início do desenvolvimento da resposta imune adaptativa, com conseqüente manifestação clínica da doença, e a magnitude dessa resposta, determinando então a fase crônica da infecção.



## 7. PERSPECTIVAS

Acreditamos que os resultados obtidos no presente trabalho tenham contribuído para um maior entendimento da imunopatogênese da LTA, uma vez que foi pioneiro na caracterização molecular do perfil de citocinas em infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster. Além disso, as alterações imunopatológicas frente aos diferentes inóculos utilizados nos mostraram a importância da fase inicial da infecção para o desfecho da doença. Porém, algumas perguntas a respeito da contribuição de outros fatores, como por exemplo outras citocinas envolvidas na patogênese, ficaram sem respostas. Para solucionar essas questões, hipotetizamos a realização de experimentos futuros que abrangeriam:

- ✓ Avaliação da expressão gênica de um maior painel de citocinas que podem estar relacionadas à imunopatogênese como TNF- $\alpha$ , IL-12, TGF- $\beta$  e IL-4;
- ✓ Investigar os eventos imunopatológicos que ocorrem no início da infecção.

Além dessas conclusões, o presente trabalho contribuiu para a aplicabilidade do hamster como modelo para a avaliação de candidatos vacinais, uma vez que os parâmetros analisados e as técnicas estabelecidas já estão sendo utilizadas por nosso grupo em estudo de candidato vacinal para *L. braziliensis* no modelo hamster, cujos resultados estão em fase final de análise, com publicação de artigo prevista ainda para este ano.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187.
- Alvar J, Veléz ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M., “The WHO Leishmaniasis Control Team” 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7: 1-12.
- Andrade A., Pinto S, Oliveira R, Eds. Animais de Laboratório Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz ed. 2006.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M 2012. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:109–118
- Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101:226-230.
- Almeida M, Cuba-Cuba C, Moraes M, Miles M 1996. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 115:311-316.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. 2004. Immune response to *Leishmania*. *Indian Journal of Medical Research*. 119:238-258.
- Bacellar O, Faria D, Nascimento M, Cardoso TM, Gollob KJ, Dutra WO, Scott P, Carvalho EM 2009. IL-17 production in patients with American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis*. 200: 75–78.
- Belkaid Y, Kamhawi, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL 1998. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. *J Exp Med* 188:1941-1953.
- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D 2000. 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* 165:969-977.

- Bilate AMB, Salemi VM, Ramires FJ, Brito T, Russo M, Fonseca SG, Fae KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E 2007. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes and Infection* 9: 1104-1113.
- Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 51-56.
- Borges DC, Araújo NM, Cardoso CR, Chica JEL 2012. Different parasite inocula determine the modulation of the immune response and outcome of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol* 138: 145–156.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar Americana: diagnóstico clínico e diferencial. 2006. *Série A. Normas e Manuais Técnicos*. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, 136p
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H 1992. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science* 257.
- Carvalho LP, Passos S, Schriefer A, Carvalho EM 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 4: 3:301.
- Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. *J Invest Dermatol* 6: 175-182.
- Costa NC, Peters NC, Maruyama SR, Brito Jr EC, Santos IKFM 2011. Vaccines for the leishmaniasis: proposals for a research agenda. *Plos Negl Trop Dis* 5: 943.
- Costa JM, Saldanha AC, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Silva ML, Barral A. Clinical modalities, diagnosis and therapeutic approach of the tegumentary leishmaniasis in Brazil 2009. *Gazeta Médica da Bahia* 79:70-83.
- Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ 2007. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira et al. 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesions in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitol Res* 100: 1227-1232.
- Coutinho S, Pirmez C, Mendonça S, Conceição-Silva F, Dórea R 1987. Pathogenesis in immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 214-228.

- Da-Cruz AM, Pirmez C 2012. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Coura JR (eds). *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 2<sup>a</sup>. Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Alunda JM, Bolás-Fernandes F 2007. Setting new immunological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for *in vivo* testing of antileishmanial compounds. *Vet Res Comm* 31: 703-717.
- Desjeaux P 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 27: 305-318.
- Doherty TM, Coffman RL 1996. *Leishmania major*: effect of infectious dose on T Cell subset development in BALB/c Mice . *Exp Parasitol* 84: 124–135.
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun* 73: 5827-5834.
- Dekrey GK, Lima HC, Titus RG 1998. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 66: 827- 829.
- Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J 2011. Leishmaniasis impact and treatment access *Clin Microbiol Infect* 17: 1471–1477.
- Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, Travi BL, Melby PC 2010. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol* 22: 11-31.
- Essayag SM, Landaeta ME, Hartung C, Magaldi S, Spencer L, Suárez R, García F, Pérez E 2002. Histopathologic and histochemical characterization of calcified structures in hamsters inoculated with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses* 45: 351–357.
- Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin JC 2008. Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology* 135:319-326.
- Garg R. e A. Dube 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J. Med. Res* 123:439-454.

- Ghersetich I, Mechini G, Teofoli P, Lotti T 1999. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. *Clin Dermatol* 17: 333-338.
- Gomes DCO, Souza BLSC, Guedes HLM, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2011. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitol* :138, 1892-1897.
- Gomes-Silva A., R. De Cássia Bittar, R. Dos Santos Nogueira, V. Amato, M. Da Silva Mattos, M. Oliveira-Neto, S. Coutinho e A. Da-Cruz 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol* 149:440-44.
- Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva GA, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM 2009. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 147–150.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
- Gordon S, Martinez FO 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32: 593-604.
- Goulding D, Thompson H, Emerson J, Fairweather NF, Dougan G, Douce GR 2009. Distinctive profiles of infection and pathology in hamsters infected with *Clostridium difficile* strains 630 and B1. *Infect Immun* 77: 5478–5485.
- Gupta S, Nishi 2011. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* 133: 27-39. Hepburn NC 2000. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 25:363-370.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol* 89:55-73.
- Jeronimo SM, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, Pontes NN, Lacerda HG, Queiroz PV, Gomes CE, Pearson RD, Blackwell JM, Beaty TH, Wilson

- ME 2007. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. *J Infect Dis* 196: 1261-1269.
- Kahl L, Byram J, David J, Comerford S, Von Lichtenberg F 1991. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Comparative pathology of GoldenHamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*44:218-32.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR. 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201: 239-253.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D 1998. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *PNAS* 105:10125-10130.
- Kedzierski L, Zhu Y, Handman E 2006. *Leishmania* vaccines: progress and problems. *Parasitol* 133: 87-112.
- Kedzierski L 2010. Leishmaniasis vaccine: where are we today? *J Glob Infect Dis* 2: 177-185.
- Lainson R, Shaw J 1970. Leishmaniasis in Brazil. V. Studies on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Mato Grosso State, and observations on two distinct strains of *Leishmania* isolated from man and forest animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*64: 654-667.
- Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CEP, Matta VLR, Duarte MIR 1990. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int J Exp Pathol* 71: 791-797.
- Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentras A, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD 1986. Histopatologia da leishmaniose tegumentar Americana por *Leishmania braziliensis braziliensis*: padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop* 28: 253-262.
- Martinez J, Travi B, Valencia A, Saravia N 1991. Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *J Parasitol* 77:762-68.

- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA 1999. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 17: 297-304.
- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe E 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent th1-like cytokine response. *J. Immunol* 166: 1912-1920.
- Mendez S, Valenzuela JG, Wu W, Hotez PJ 2005. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the Golden Syrian hamster. *Infect Immun* 73: 3402–3407.
- Murray HW 2001. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Path* 82: 249-267.
- Naiff R, Freitas R, Naiff M, Arias J, Barrett T, Momen H, Grimaldi Júnior G 1991. Epidemiological and nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 317-21.
- Neal RA, Hale C 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World leishmaniasis. *Parasitology*, 87: 7-13.
- Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. *Drug Discovery Today* 1: 81-86.
- Oliveira CI, Barral-Netto M 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *GM Bahia* 75: 35-45.
- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol* 25:139-148.

- Osorio Y, Bonilla D, Peniche A, Melby P, Travi B 2008. Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production. *J Leukoc Biol* 83:1413-1422.
- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC 2012. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PloS Pathog* 8: 1-17.
- Pereira CG, Silva AL, de Castilhos P, Mastrantonio E C, Souza RA, Ribeiro-Romão RP, Rezende RJ, Pena JD, Beletti ME, Souza MA 2009. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitol* 165: 231–240.
- Perez L, Chandrasekar B, Saldarriaga O, Zhao W, Arteaga L, Travi B, Melby P 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. *J Immunol* 176:5519-5528.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7: 581-596.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the goldenhamster model. *Vet Immunol Immunopathol* 76: 269-271.
- Rey JA, Travi BL, Valencia AZ, Saravia NG 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 43: 623-631.
- Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89: 163-169.
- Rojas E, Scorsa JV 1995. *Leishmania braziliensis*: aislamiento de lesiones por inoculación de hámsters com e sin adición de lisado de glândulas de *Lutzomia youngi*. *Rev Saude Publica* 29: 1-5.

- Romero GAS, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456–465.
- Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barbiéri CL, Rodrigues MM 2007. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1173-1181.
- Samant M, Gupta R, Kumari S, Misra P, Khare P, Kushwaha PK, Sahasrabudde AA, Dube A 2009. Immunization with DNA-Encoding N-Terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-Type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 183: 470-479.
- Santos CS, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI 2013. CD8 (+) granzyme B (+)-mediated tissue injury vs. CD4 (+) IFN $\gamma$  (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133: 1533-1540.
- Saravia N, Hazbón M, Osorio Y, Valderrama L, Walker J, Santrich C, Cortázar T, Lebowitz J, Travi B 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. *Vaccine* 23:984-95.
- Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect and Immun* 72: 508-514.
- Shaw J 2007. The leishmaniasis- survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:541-547.
- Sinagra, A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki A 2007. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop* 40: 627-630.
- Silveira F, Ishikawa E, De Souza A, Lainson R 2002. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil caused by *Leishmania (Viannia)*

- linlindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 9: 43-50.
- Sirois M, Ed. Medicina de Animais de Laboratório Princípios e Procedimento. São Paulo: Rocaed. 2008.
- Souza-Lemos C, De-Campos S, Teva A, Côrte-Real S, Fonseca E, Porrozzi R, Grimaldi GJ 2008. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol* 216: 375-386.
- Soon L, Henard C, Melby PC 2012. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 34:735-751.
- Soliman MFM 2006. The persistence, dissemination and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146-150.
- Stockdale L, Newton R, 2013. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *Plos Negl Trop Dis* 7: e2278.
- SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde-Brasil) 2011. Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2010. Sinan/SVS/MS, 23/08/2011.
- Travi B, Rey-Ladino J, Saravia N 1988. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. *J Parasitol* 74:1059-62.
- Travi B, Martinez J, Zea A 1993. Antimonial treatment of hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. *Trans R Soc Trop Med Hyg*.87: 567-569.
- Travi B, Osorio Y, Melby P, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia N 2002. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.* *Infect. Immun* 70:.2288-2296.

- Wilson H, Dieckmann B, Childs B 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: Experimental cutaneous infections in Golden Hamsters. *Experimental Parasitology* 47: 270-283.
- Zhao W, Valencia AZ, Melby PC 2006 . Biological activity of hamster interferon-gamma is modulated by the carboxyl-terminal tail. *Cytokine* 34:243-251.
- Zeledón R, Blanco E, De Monge E 1969. Comparative experimental infections with Costa Rican strains of *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911. *Acta Trop.*26: 136-155.

## **ANEXO 1:** Artigo (publicado)

**Título:** “*Golden hamster (Mesocricetus auratus) as an experimental model for Leishmania (Viannia) braziliensis infection*”.

*Parasitology*, fevereiro de 2013.

**Autores:** ADRIANO GOMES-SILVA, JOANNA GARDEL VALVERDE, RAQUEL PERALVA RIBEIRO-ROMÃO, ROSA MARIA PLÁCIDO-PEREIRA e ALDA MARIA DA-CRUZ.

### **RESUMO**

A falta de um modelo adequado para infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* infecção é um fator limitante para o estudo da leishmaniose tegumentar Americana. O *golden hamster (Mesocricetus auratus)* é um modelo promissor, pois além de ser altamente susceptível à infecção por *Leishmania* dermatrópica, desenvolve lesões muito semelhantes às observadas na leishmaniose cutânea (CL) humana. No entanto, é sabido que diferentes espécies e/ou isolados de *Leishmania* e também diferentes protocolos de infecção resultam em diferentes evoluções da doença, ao passo que nenhum estudo avaliou a reprodutibilidade da infecção por *L. braziliensis* neste modelo. A história natural da infecção por *L. braziliensis* em 34 hamsters foi avaliada usando um único isolado de parasito em oito experimentos independentes sob as mesmas condições experimentais. Análises clínica, histológica e imunológica foram realizadas. Os animais apresentaram lesões ulceradas semelhantes às observados na ATL. O tamanho das lesões dos animais infectados mostrou uma tendência para uma variação intermediária intra-experimento. A análise histológica da pele infectada mostrou reação granulomatosa, poucas amastigotas, e a presença de Corpúsculos de Schaumann. Linfócitos do sangue periférico proliferaram em resposta a antígenos de *Leishmania*. A gravidade da infecção foi positivamente correlacionada com o peso do baço e com os níveis de IgG anti-*Leishmania*. Nossos resultados mostraram que o hamster é um modelo adequado para os estudos de imunopatogênese da LC causada por *L. braziliensis* e o seu uso é indicado em protocolos experimentais para avaliação da eficácia de vacinas e novos fármacos.

# Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection

ADRIANO GOMES-SILVA, JOANNA GARDEL VALVERDE, RAQUEL PERALVA RIBEIRO-ROMÃO, ROSA MARIA PLÁCIDO-PEREIRA and ALDA MARIA DA-CRUZ\*

*Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil*

(Received 8 July 2012; revised 14 November 2012; accepted 29 November 2012; first published online 1 February 2013)

## SUMMARY

The lack of an adequate model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection is a limiting factor for studying American tegumentary leishmaniasis (ATL). The golden hamster (*Mesocricetus auratus*) is a promising model because besides being highly susceptible to dermatropic *Leishmania* infection, the lesions are very similar to cutaneous leishmaniasis (CL) in humans. However, different *Leishmania* isolates or species and/or protocols have resulted in different outcomes, whereas no study has evaluated the reproducibility of *L. braziliensis* infection in this model. The natural history of *L. braziliensis* infection in 34 hamsters was evaluated by using a single parasite isolate in 8 independent experiments under similar experimental conditions. Clinical, histological and immunological analyses were performed. The hamsters presented skin ulcers similar to those observed in ATL. The intra-experiment lesion increment tended to show an intermediary variance. Histological analysis of infected skins showed granulomatous reaction, scarce amastigotes, and Schaumann's bodies. Blood lymphocytes proliferated in response to leishmanial antigens. The severity of the infection was positively correlated to spleen weight, and the titres of anti-*Leishmania* IgG antibodies. Our findings indicate that the hamster is an appropriate model for immunopathogenesis studies of CL caused by *L. braziliensis*, supporting its use in clinical, vaccine and chemotherapy experimental protocols.

Key words: golden hamster, American tegumentary leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, immunoglobulin, lymphocyte, clinical outcome, histopathology.

## INTRODUCTION

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most prevalent species associated with American tegumentary leishmaniasis (ATL). ATL is a public health problem with approximately 25 000 cases reported annually in Brazil (SVS-MS, 2011). Nevertheless, there is no vaccine for ATL and only a limited number of drugs are available for treating patients. Most of our knowledge on the immunopathogenesis of *L. braziliensis* infection comes from studies in patients and in asymptomatic individuals (Reithinger *et al.* 2007; Carvalho *et al.* 2012). The lack of an adequate experimental model for *L. braziliensis* is a limiting factor for the development of biological and pharmacological health inputs to ATL.

Although relevant for cutaneous leishmaniasis (CL) studies, murine models (Balb/c and C57Bl/6) are naturally resistant to *L. braziliensis* (DeKrey *et al.* 1998; Rocha *et al.* 2007). When infected by *L. braziliensis*, animals develop small non-ulcerated lesions that show a progression to spontaneous healing (DeKrey *et al.* 1998; Rocha *et al.* 2007).

There are quite a few reports employing a Balb/c model in vaccination studies that successfully obtained chronic ulcerated lesions after infection by *L. braziliensis* promastigotes (Salay *et al.* 2007). Other experimental models such as non-human primates (Souza-Lemos *et al.* 2008) and dogs (Pirmez *et al.* 1988) require complex logistics for their maintenance under experimental conditions.

The hamster is highly susceptible to dermatropic *Leishmania* infection and has been largely used as a model for visceral leishmaniasis (Goto and Lindoso, 2004; Dea-Ayuela *et al.* 2007). The animal develops skin lesions when infected by one of the *Viannia* or *Leishmania* species including *L. (V.) braziliensis* (Brazil, 1976; Wilson *et al.* 1979; Morais-Teixeira *et al.* 2008), *L. (L.) amazonensis* (Figueiredo *et al.* 1999), *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* (Rey *et al.* 1990; Osorio *et al.* 2003), *L. (V.) lainsoni* (Corrêa *et al.* 2007) and *L. (V.) peruviana* (Gamboia *et al.* 2008). Indeed, the skin lesions developed by these animals are very similar to the CL ulcers observed in humans (Hommel *et al.* 1995). This turns the golden hamster into a promising model for the study of ATL.

A number of experimental protocols using *Leishmania*-infected hamsters have been described. These protocols differ on several parameters, including the *Leishmania* strains (Wilson *et al.* 1979;

\* Corresponding author: Av. Brasil 4365, Pavilhão Leônidas Deane 4º andar, Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, ZIP 21040-360, Brazil. Tel: +55 21 3865 8147. Fax: +55 21 2290 0479. E-mail: alda@ioc.fiocruz.br

Rey *et al.* 1990; Kahl *et al.* 1991), number of inoculated parasites (Wilson *et al.* 1979; Martinez *et al.* 1991), route and site of inoculation (Wilson *et al.* 1979; Osorio *et al.* 2003), animal gender or age (Wilson *et al.* 1979; Travi *et al.* 2002) and biological characteristics of inoculated parasites such as the number of *in vitro* passages, growth phase, developmental stages or rate of metacyclic forms (Rey *et al.* 1990; Gamboa *et al.* 2008). Most of the studies using dermotropic strains involved *L. guyanensis*, but the outcome of *L. braziliensis* infection was poorly studied. To date, no study has evaluated the reproducibility of the clinical aspects of the infection in the hamster model for CL caused by *L. braziliensis*.

Here we studied the natural history of *L. braziliensis* infection in a hamster model by using a single parasite isolate in independent experiments under similar experimental conditions. Our findings indicate that the hamster is an appropriate model for *L. braziliensis* infection studies.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Animals and ethics statement*

Outbred golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), adult females (6–8 weeks old), weighing 80–90 g, from the animal facilities at Fundação Oswaldo Cruz, were used. Thirty-four infected animals and 13 uninfected animals were analysed. This study was specifically approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, by the number of protocol P-0281/06.

##### *Parasites for infection and immunological studies*

*Leishmania braziliensis* promastigotes (MCAN/BR/98/R619) in stationary growth phase until the third *in vitro* passages in supplemented Schneider's *Drosophila* medium were used (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). Promastigotes were washed in phosphate-buffered saline, 0.15 M, pH 7.2 (PBS) and  $1 \times 10^6$  parasites were inoculated intradermally in the dorsal hind paw of hamsters. Disrupted antigens of *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) promastigotes (Lb-Ag) were obtained for immunological studies.

##### *Clinical course of Leishmania braziliensis infection*

To determine the natural history of *L. braziliensis* infection in hamsters, 8 independent experiments were performed during a period of 2 years. The lesion increment was monitored weekly from day 7 up to approximately 110 days post-infection. This was done by measuring the paw dorsum-ventral thickness with a digital thickness gauge (Mitutoyo America Corporation, São Paulo, Brazil) with the thickness expressed in millimetres. The lesion increment was

determined as the difference of measurements between the infected and the non-infected paw of the same animal. The discrepancies in lesion increment were determined by the variance coefficient [VC = (standard deviation  $\times$  mean)/100]. For this VC analysis, 5 experiments with 5 or 6 animals per group were used. Once a week animals were checked for skin macroscopic changes and for cutaneous metastasis.

##### *Quantification of anti-Leishmania antibodies*

The anti-*Leishmania* IgG levels were determined in plasma samples by ELISA assay as described elsewhere (Gomes-Silva *et al.* 2008). Plasma samples were diluted 1:200 and horseradish peroxidase-labelled goat anti-hamster IgG was used as detector system (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The results were expressed as optical density (OD).

##### *Lymphocyte proliferative responses to Leishmania antigens*

Peripheral blood mononuclear cells were collected for lymphocyte proliferative response analysis in response to *Leishmania* antigens as described elsewhere (Da-Cruz *et al.* 2002). The cells ( $3 \times 10^5$ /well) were plated in triplicate and cultured *in vitro* with concanavalin A ( $1 \mu\text{g}/\text{well}$ ) (Sigma, USA), Lb-Ag ( $10 \mu\text{g}/\text{well}$ ), or in the absence of any stimulus as the negative control. The cell cultures were maintained for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air. Then 16 h before harvesting, 1 Ci (<sup>3</sup>H)thymidine (Amersham International, UK) was added to each well, and the radioactivity uptake was measured in a scintillation counter (1600CA, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, USA). Results were expressed as stimulation indices (SI = average counts per minute [cpm] of stimulated triplicates with Lb-Ag/ average cpm of negative control) where values equal to or higher than 2.5 were considered as positive.

##### *Macroscopic analysis of lymphoid organs*

The spleens of 30 hamsters were excised and weighed in a precision balance. Spleens were visualized macroscopically and registered by digital photographs. Dissemination of parasites to spleens and other anatomic structures beyond the inoculation site was evaluated by macroscopic inspection (anatomical alterations) and confirmed by visualization of *Leishmania* through histopathological analysis of lymphoid organs. The draining popliteal lymph nodes of 10 animals and the spleens of 14 animals were subjected to microscopic evaluation.

*Histopathological analysis*

Fragments from the skin ( $n=24$ ) and the draining lymph nodes (popliteal,  $n=10$ ) of the infected paw, as well as from spleen ( $n=14$ ) and liver ( $n=14$ ) were fixed in 10% buffered formalin and processed for paraffin embedding. Sections of 2–4  $\mu\text{m}$  thickness were stained with haematoxylin-eosin and then observed by light microscopy (Nikon Eclipse E600 Microscope, Tokyo, Japan). The images were captured in CoolSNAP-Pro<sub>CCF</sub> and edited by Image-Pro Plus program (Media Cybernetics, GA, USA). The results were expressed as a semi-quantitative analysis in which the main histopathological features were scored according to the number of animals in which the features were observed *vs* the number of animals analysed (given in parentheses) and scored according to the intensity of occurrence of the feature, varying from (–) absence; ( $\pm$ ) slight presence of the histopathological feature; (+) moderate presence of the histopathological feature; to (++) full occurrence of the histopathological feature.

*Statistical analysis*

The data were analysed by Mann–Whitney test and Spearman's rank-correlation with the GraphPad Prism software version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation and median. Significant differences were considered when  $P < 0.05$ .

## RESULTS

*Variances for cutaneous lesion increment post-Leishmania braziliensis infection*

All *L. braziliensis*-infected hamsters developed cutaneous lesions during the observational period ( $\sim 110$  days). The observation started at 2 weeks after infection, when characteristic inflammatory signs (erythema and oedema) were observed. After that there was a significant lesion increment. The first mean measure was  $0.30 \text{ mm} \pm 0.30 \text{ mm}$  (median =  $0.22 \text{ mm}$ ,  $n=34$ ); and the final mean measure was  $2.12 \text{ mm} \pm 1.16 \text{ mm}$  (median =  $1.9 \text{ mm}$ ,  $n=34$ ) ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1A). No spontaneous healing was observed in any animal.

A cutaneous ulcerated lesion was the most frequent clinical presentation (Fig. 1B and C). Elevated erythematous borders, granular aspect, with a necrotic surface (Fig. 1B), or recovered by crusts (Fig. 1C) were also commonly seen.

The variable pattern of lesion increment was quantified by a variance coefficient. We observed homogeneous ( $\text{VC} < 15\%$ ,  $n=1$  experiment), intermediary ( $\text{VC} \geq 15\%$  and  $\text{VC} \leq 30\%$ ,  $n=2$  experiments) or heterogeneous ( $\text{VC} > 30\%$ ,  $n=2$  experiments) patterns.

*Histopathological findings of hamster cutaneous lesion*

The skin histopathological findings ( $n=24$ ) are summarized in Table 1. An intense inflammatory infiltrate reaching all over the dermis (Fig. 1D), consisting predominantly of macrophages in epithelioid arrangements, and large amounts of lymphocytes, characterizing a granulomatous reaction (Fig. 1E) was visualized in all animals. Neutrophils, plasma cells and eosinophils (sometimes inside macrophage vacuoles) were also seen (data not shown). Cytoplasmic vacuoles were observed in most macrophages (22/24), whereas *Leishmania* were seen in all of them (Fig. 1F). Areas of necrosis with calcification (11/24) (Fig. 1D) and Schaumann's bodies (lamellar basophilic structures) (22/24) (Fig. 1E and F) were seen. A positive association between lesion increment and the frequency of amastigotes was detected (Table 1).

*Parasite dissemination to other anatomical compartments*

No clinical evidence of cutaneous metastasis was observed. Draining popliteal lymph nodes ( $n=10$  infected animals) were grey, with swollen and enlarged aspects in comparison to non-infected hamsters. They all presented disrupted architecture (10/10) with macrophages in epithelioid arrangement (Fig. 2A). Schaumann's bodies were often seen dispersed through the organ (9/10) (Fig. 2A). Macrophages exhibited vacuoles (10/10), and some of them showed moderate amounts of *Leishmania* (6/10), few amastigotes, or even degenerated parasites (4/10) (Fig. 2B).

Spleens were severely affected and some animals presented nodules ( $n=8$ ) with a consistent aspect upon macroscopic visualization (Fig. 2C). The mean spleen weight was significantly higher ( $P < 0.001$ ) in infected animals ( $0.47 \text{ g} \pm 0.32 \text{ g}$ ; median =  $0.35 \text{ g}$ ;  $n=20$ ) than in non-infected ones ( $0.13 \text{ g} \pm 0.04 \text{ g}$ ; median =  $0.12 \text{ g}$ ;  $n=10$ ). Indeed, a significant positive correlation between the spleen weight and lesion increment was observed in infected hamsters ( $r=0.62$ ;  $P < 0.01$ ;  $n=20$ ) (Fig. 2D). The spleen histopathology ( $n=14$ ) showed mixed inflammatory infiltrate in all animals analysed, white pulp rarefaction (13/14), presence of granuloma (11/14) (Fig. 2E), vacuolated macrophages (11/14) and presence of *Leishmania* amastigotes (6/14) (Fig. 2F).

Although the macroscopic aspect of the liver seemed normal, we observed a number of histological abnormalities. The main findings were the presence of mixed inflammatory infiltrate (10/14), composed predominantly of mononuclear cells, mainly around the perivascular area (Fig. 3A). In these cases *Leishmania* parasites were not seen but vacuolated macrophages with acidophilic contents suggestive of amastigote forms were detected (5/14) (Fig. 3A).

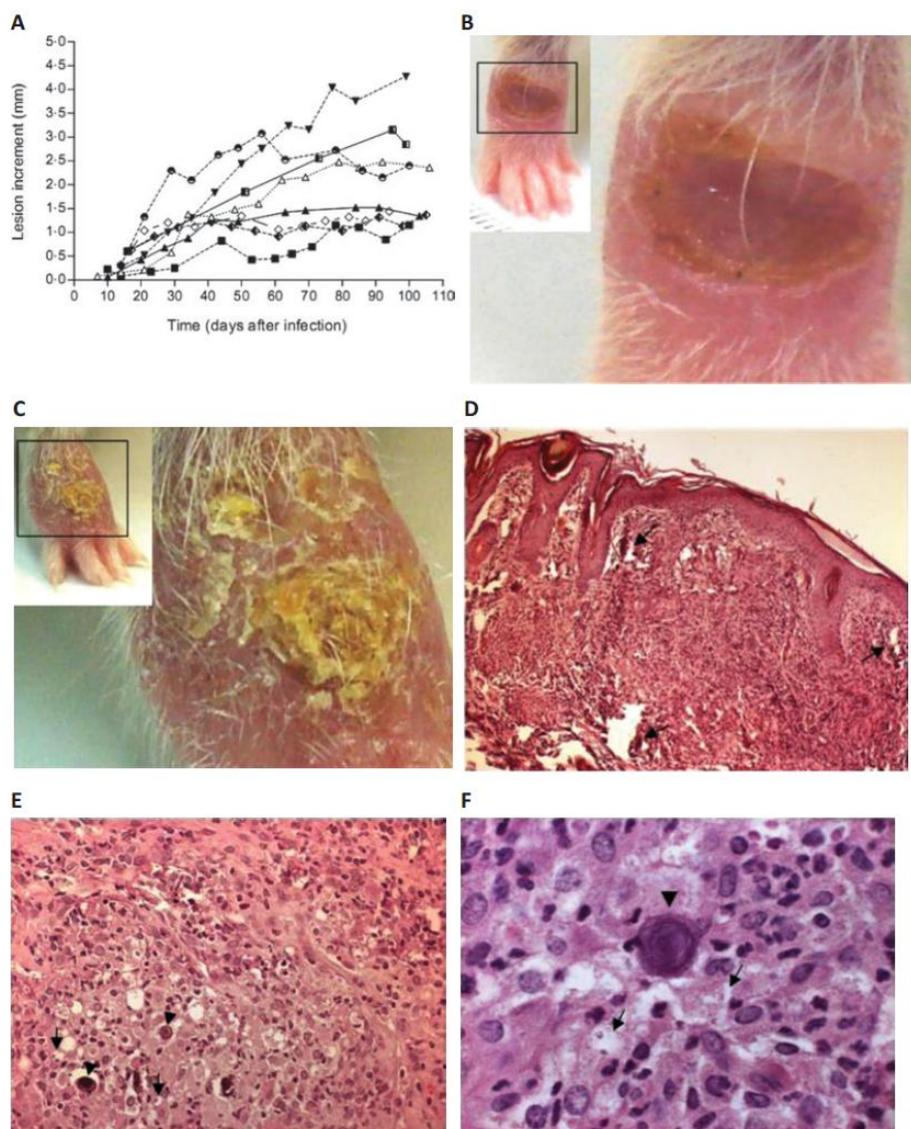


Fig. 1. Evaluation of the clinical course, macroscopic and histopathological aspects of skin lesions from golden hamsters infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (A) Lesion increment development in each of 8 independent experiments. Each line represents 1 experiment and the points indicate the average of lesion increments in each group. (B and C) Macroscopic aspect of the infected paw at approximately 110 days after *Leishmania* infection. Slides of representative lesions localized at the site of parasite inoculation (dorsal face of back right paw) taken at the end of the observational period (110 days). (D) Mixed inflammatory infiltrate reaching all over the dermis; pointed arrows indicate areas with calcification necrosis (skin, 20 $\times$ ). (E) Macrophages in epithelioid arrangement; arrowheads indicate Schaumann's bodies; pointed arrows indicate vacuolated macrophages with *Leishmania* inside (skin, 40 $\times$ ). (F) Granuloma; pointed arrows indicate cytoplasmic vacuoles containing amastigotes inside; arrowheads indicate Schaumann's bodies (skin, 100 $\times$ ).

*Blood lymphocyte proliferation response (LPR) to leishmanial antigens may relate to the skin lesion severity*

A total of 21 out of 22 infected hamsters had a positive LPR. The stimulation index (SI) to Lb-Ag was quite variable and ranged from 4.2 to 137 (mean = 33.8  $\pm$

42.3; median = 15.9;  $n = 22$ ) (Fig. 3B). SI to Lb-Ag were negatively associated with lesion increments of infected animals at the end of the monitoring period ( $P < 0.05$ ;  $r = -0.50$ ) (Fig. 3C). The mean SI to mitogen was similar when infected ( $147 \pm 120$ ; median = 100;  $n = 22$ ) and non-infected hamsters ( $198 \pm 168$ ; median = 199;  $n = 9$ ) were compared (Fig. 3B).

Table 1. Histopathological features of spleen and skin lesions from *Leishmania (Viannia) braziliensis* infected golden hamsters

Histopathological aspects	Tissues	Independent experiments				
		Exp 1 (n=5)	Exp 2 (n=5)	Exp 3 (n=4)	Exp 4 (n=5)	Exp 5 (n=5)
Mixed inflammatory infiltrates	Skin	++ (5/5) <sup>a</sup>	++ (5/5)	++ (4/4)	++ (5/5)	++ (5/5)
	Spleen	na ()	na ()	++ (4/4)	+ (5/5)	+ (5/5)
Granulomatous reactions	Skin	++ (5/5)	++ (5/5)	++ (4/4)	++ (5/5)	++ (5/5)
	Spleen	na ()	na ()	++ (4/4)	+ (3/5)	+ (4/5)
Vacuolated macrophages	Skin	+ (5/5)	+ (5/5)	+ (4/4)	± (4/5)	+ (4/5)
	Spleen	na ()	na ()	++ (4/4)	+ (4/5)	+ (3/5)
<i>Leishmania</i> amastigotes	Skin	+ (5/5)	± (5/5)	++ (4/4)	± (5/5)	± (5/5)
	Spleen	na ()	na ()	± (3/4)	± (2/5)	± (1/5)
Schaumann's bodies	Skin	+ (3/5)	± (5/5)	± (3/4)	+ (3/5)	+ (3/5)
	Spleen	na ()	na ()	± (1/4)	- (5/5)	- (5/5)
Necrosis with calcification	Skin	+ (2/5)	- (5/5)	± (1/4)	± (2/5)	± (1/5)
	Spleen	na ()	na ()	- (4/4)	- (5/5)	- (5/5)
Tissue disarrangement architecture	Skin	++ (5/5)	++ (5/5)	++ (4/4)	++ (5/5)	++ (5/5)
	Spleen	na ()	na ()	++ (3/4)	± (4/5)	+ (4/5)
Clusters of macrophages	Skin	++ (5/5)	++ (5/5)	++ (4/4)	++ (5/5)	++ (5/5)
	Spleen	na ()	na ()	++ (3/4)	± (3/5)	+ (4/5)
White pulp rarefaction	Spleen	na ()	na ()	++ (4/4)	+ (5/5)	+ (4/5)
Paw lesion increment at final measure (mm)		2.30	1.34	4.27	1.36	1.44

n, Number of animals per group.

<sup>a</sup> Number of animals in which the histopathological feature was observed / number of animals analysed.

(-)Absence; (±) slight presence of the histopathological feature; (+) moderate presence of the histopathological feature;

(++) full occurrence of the histopathological feature.

na, Not analysed.

#### Levels of anti-*Leishmania* IgG correlated with infection severity

Anti-*Leishmania* IgG was detected in all infected animals. As expected, the OD values were significantly higher in infected ( $3.41 \pm 0.22$ ; median = 3.47;  $n=29$ ) than non-infected animals ( $0.58 \pm 0.27$ ; median = 0.5;  $n=13$ ;  $P<0.001$ ). The anti-*Leishmania* IgG levels positively correlated with lesion increments in the hamsters' paws ( $r=0.45$ ;  $P<0.05$ ;  $n=25$ ) (Fig. 3D) and with spleen weight ( $r=0.66$ ;  $P<0.01$ ;  $n=20$ ) (Fig. 3E).

#### DISCUSSION

The fact that the golden hamster presents susceptibility to dermatropic *Leishmania (Viannia)* species makes this species a better experimental model for ATL studies than the murine model, as the latter is naturally resistant to these strains (Rey *et al.* 1990; De Oliveira *et al.* 2004). However, different *Leishmania* isolates or species and/or protocols have been used that do not allow prediction of the outcome of infection in this animal model as opposed to other well-established mouse/*Leishmania* models. Herein, all infected animals were susceptible to *L. braziliensis* and developed skin-ulcerated lesions. The severity of the infection in this model correlated to spleen weight, the intensity of lymphocyte proliferation to

leishmanial antigens, and the titres of anti-*Leishmania* antibodies.

The *Leishmania* infection protocol used in this study was able to generate cutaneous lesions in all animals. Thus, it could be recommended for clinical, vaccine or therapeutic studies. The inflammatory signs appeared early in the course of the disease and were already observed within the first 3 weeks after infection. At 60 days post-infection all animals presented signs of disease. Shorter or longer pre-patent periods were observed by others (Wilson *et al.* 1979; Kahl *et al.* 1990, 1991). In our study, ulcerated lesion was the main macroscopic clinical presentation after 4 months of infection. This aspect, together with the chronic state of the disease, closely resembles non-healing human CL and possibly reproduces some of the immunopathological aspects of the human disease.

Although all animals developed skin lesions, the final measures of infected paws differed among intra- or inter-independent experiments. The variability coefficient analysis tended to show an intermediary variance when animals under the same experimental infection conditions were compared. This result is expected to occur in hamsters because of the outbred genetic background. However, variability is also observed even when isogenic mice are used in experimental leishmaniasis (Pereira *et al.* 2009). Therefore, variability in lesion increment has to be taken into

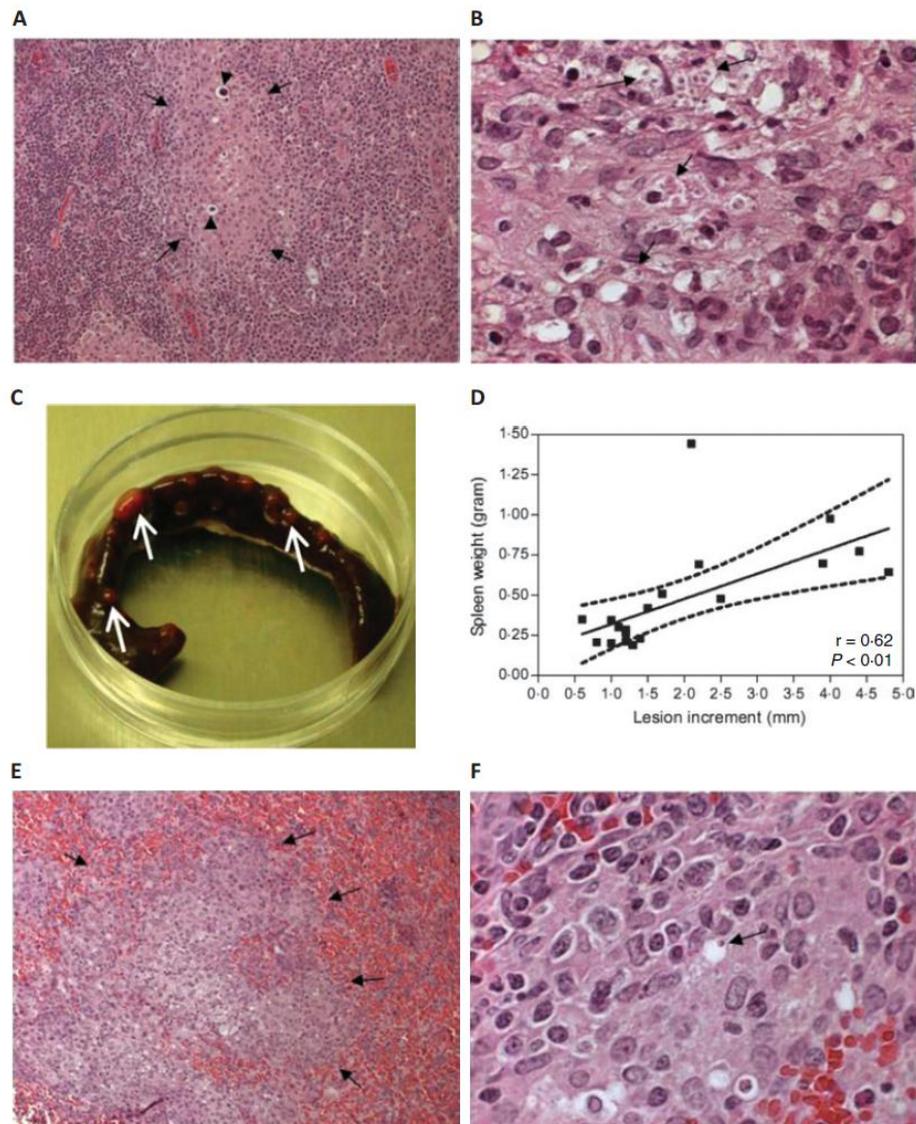


Fig. 2. Macroscopic and histopathological aspects of secondary lymphoid organs from golden hamster infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (A) Pointed arrows indicate macrophages in epithelioid arrangement; arrowheads indicate Schaumann's bodies (lymph node, 20 $\times$ ). (B) Granulomatous reaction; pointed arrows indicate vacuolated macrophages containing amastigotes (lymph node, 100 $\times$ ). (C) Slide of representative picture of spleen from infected animal. White arrows point to some of the several nodules found in infected spleen. (D) Correlation between spleen weight and lesion increment in paws from 20 infected animals after approximately 110 days of infection. The correlation graph shows fit line with confidence curve.  $r = 0.62$   $P < 0.01$ . (E) Pointed arrows indicate epithelioid macrophages characterizing granulomatous reaction (spleen, 20 $\times$ ). (F) Pointed arrows indicate *Leishmania* inside vacuolated macrophage in granuloma (spleen, 100 $\times$ ).

consideration when lesion size is a parameter to evaluate drug response or vaccine protection.

Besides the skin macroscopic aspects, another striking finding is the similarity of the skin histopathological changes when *L. braziliensis*-infected hamsters were compared (Laurenti *et al.* 1990; Kahl *et al.* 1991; Sinagra *et al.* 1997) with human lesions (Magalhães *et al.* 1986). As observed in CL lesions, granulomatous reactions consisting predominantly of

epithelioid macrophages, lymphocytes and moderate amounts of plasma cells and scarce amounts of amastigotes were consistently seen in our experimental model. On the other hand, moderately parasitized macrophages were detected in severely clinically compromised animals. A limitation of this study was not to include the parasitic load results. The high bacterial contamination levels (probably from lesion origin) in the axenic cultures did not enable

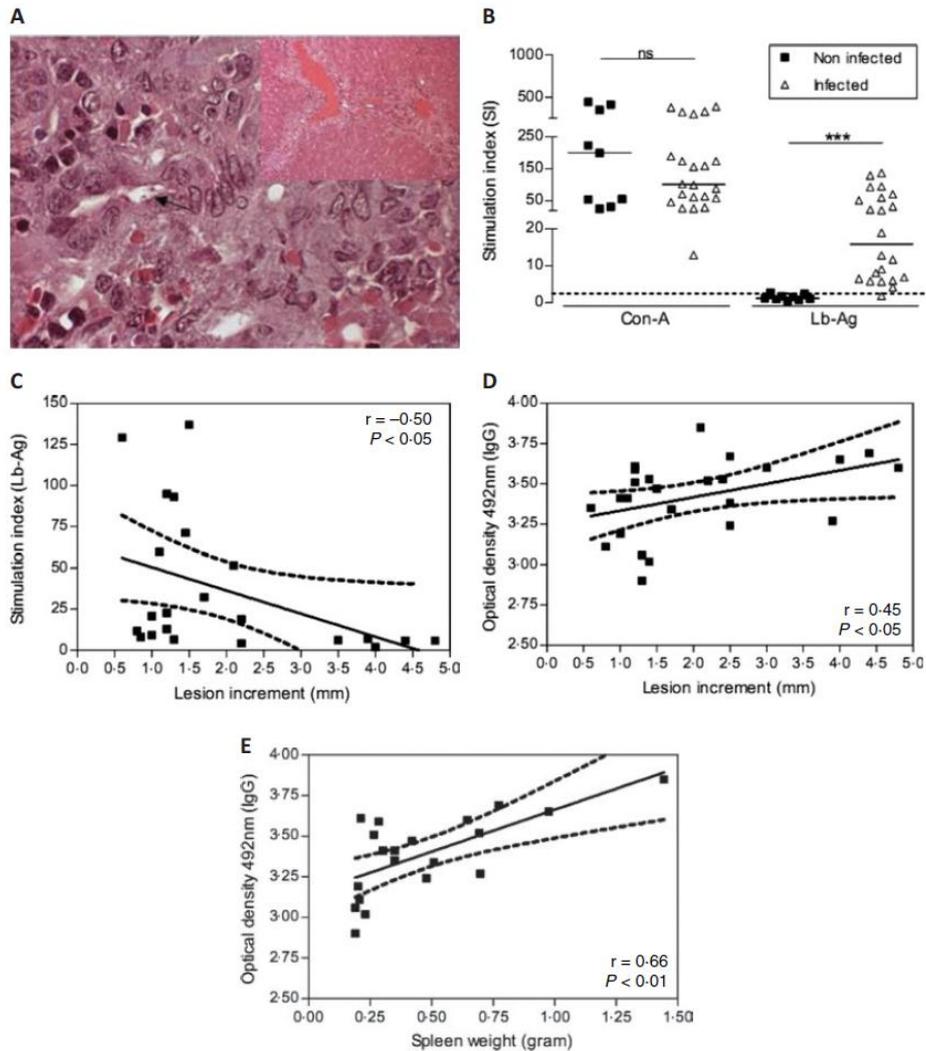


Fig. 3. Histopathological aspects of liver and immunological responses to leishmanial antigens of golden hamster infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (A) Mixed inflammatory infiltrate around perivascular area (window, liver, 20 $\times$ ); macrophages in epithelioid arrangement; pointed arrows indicate forms of amastigotes inside vacuolated macrophage (liver, 100 $\times$ ). (B) Lymphocyte proliferative assays using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from uninfected and infected animals. Cells were stimulated *in vitro* with *L. braziliensis* antigens (Lb-Ag) or mitogen concanavalin A (Con-A). The results were expressed as a stimulation index (SI). \*\*\*  $P < 0.001$ . ns, not statistically significant. Each point represents 1 animal and the horizontal bar indicates the median. Dotted line indicates the cut-off SI = 2.5. (C) Correlation between lesion increment and lymphocyte proliferation intensity (stimulation index) under *Leishmania* antigen (Lb-Ag) stimuli. (D) Association between lesion increment in hamster paws and anti-*Leishmania* IgG levels (optical density values). (E) Correlation between spleen weight (in grams) and the anti-*Leishmania* IgG levels (optical density values). The correlation graphs (C, D and E) show fit lines with confidence curves.  $r$  = correlation coefficient;  $P$  = significance level.

calculation of the frequency of parasites in skin-infected tissues by limited dilution assay. In the future, molecular assays such as real-time PCR to quantify *Leishmania* DNA products can be used.

Schaumann's bodies were a frequent finding especially in skin and lymph nodes, as observed by other authors (Kahl *et al.* 1990, 1991; Laurenti *et al.* 1990). This structure has been associated with a deficient phagocytic macrophage system (Laurenti

*et al.* 1990). Curiously, although Schaumann's bodies are commonly seen in infected hamsters, they are not usually described in humans or in other experimental animals with leishmaniasis (Essayy *et al.* 2002). In any case, the presence of Schaumann's bodies even in the absence of parasites strongly suggests *Leishmania* infection (Ribeiro-Romão *et al.* unpublished data).

In our experimental protocol, a greater cutaneous lesion increment was accompanied by systemic

clinical abnormalities observed in the spleen, lymph nodes, and liver involvement (data not shown). *Leishmania* visceralization has been reported in hamsters infected by *Viannia* and *Leishmania* dermatotropic *Leishmania* species (Rey *et al.* 1990; Almeida *et al.* 1996; Sinagra *et al.* 1997; Soliman, 2006) especially when infective inoculum is high. Although skin metastases were detected in *L. braziliensis* infected hamsters (Brazil, 1976; Wilson and Lollini, 1980), the parasite isolate used herein did not induce metastases, agreeing with previous reports (Travi *et al.* 1988).

The LPR assay has become an alternative for immunological studies in hamster models because of the low availability of anti-hamster monoclonal antibodies against cytokines or surface molecules. Although spleen and lymph node compartments have been frequently used as the source of mononuclear cells for LPR assays (Osorio *et al.* 2003; Dea-Ayuela *et al.* 2007), we have chosen blood cells. Our rationale was to rule out the possibility that *Leishmania* antigens coming from these lymphoid organs may cause *in vitro* cell stimulation, prejudicing stimulation index calculation. As far as we know, blood cells for analysing the immune response to leishmanial antigens have not been previously used in the hamster model.

The intensity of LPR under leishmanial stimuli inversely correlated with disease severity. Similarly, snout infection by *L. panamensis* is accompanied by a low lymphoproliferation intensity (Osorio *et al.* 2003). However, animals with small lesion increments also presented low LPR results whereas CL patients presenting low LPR stimulation indices are at high risk for cutaneous lesions relapses (Mendonça *et al.* 1986). This suggests that any deficiency in the effector cellular immune response could impair the parasite clearance.

The detection of anti-*Leishmania* antibodies has been used as a promising biomarker to assess the clinical course of leishmaniasis (Gomes-Silva *et al.* 2009). Here, we showed an association between IgG anti-*Leishmania* levels and disease severity, similar to the results previously shown in *L. panamensis* infection (Osorio *et al.* 2003). In our study, the anti-*Leishmania* antibody titres directly correlated with lesion increment and also with spleen weight.

Recently a molecular assay based on quantification of RNA transcripts has been used for the detection of cytokines, chemokines and cell-surface markers in hamster models (Espitia *et al.* 2010) as an important strategy for evaluating the immune response. This model may also allow associations between clinical outcome and more reliable immunological findings.

Here we showed that the clinical and immunological reactions can vary among independent experiments even when a single isolate of *L. braziliensis* is used to infect golden hamsters. Also, skin lesion increments, splenomegaly and the proliferative

capacity of lymphocytes reactive to *Leishmania* and IgG anti-*Leishmania* levels correlated with disease severity. Our results indicate that the golden hamster is an appropriate model for immunopathogenesis studies, and support its use in clinical, vaccine and chemotherapy experimental protocols of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis*.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr C.O. Mendes-Aguiar, Mr R.S. Nogueira and Dr E.F. Pinto for their help with the experimental procedures and for their intellectual contribution to our study. We are also grateful to Dr M.A. Souza for a critical revision of our manuscript and to Ms R. Pellegrino for secretarial assistance.

#### FINANCIAL SUPPORT

This work was funded by IOC/FIOCRUZ and by FAPERJ (Jovem Cientista do Nosso Estado E-26/103-111/2008). A.G.-S. and R.P.R.-R. are PhD students sponsored by CNPq and CAPES, respectively. A.M.D.-C. is a CNPq and FAPERJ fellowship researcher.

#### REFERENCES

- Almeida, M. C., Cuba-Cuba, C. A., Moraes, M. A. and Miles, M. A. (1996). Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Journal of Comparative Pathology* **115**, 311–316. doi: 10.1016/S0021-9975(96)80088-0.
- Brazil, R. P. (1976). Metastatic spread of *Leishmania braziliensis braziliensis* to the extremities of hamsters. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **70**, 89. doi: 10.1016/0035-9203(76)90017-1.
- Carvalho, L. P., Passos, S., Schriefer, A. and Carvalho, E. M. (2012). Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* **3**, 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2012.00301.
- Corrêa, J. R., Brazil, R. P. and Soares, M. J. (2007). *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira *et al.* 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesion in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology Research* **100**, 1227–1232. doi: 10.1007/s00436-006-0395-5.
- Da-Cruz, A. M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M. P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R. B. and Coutinho, S. G. (2002). T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9**, 251–256. doi: 10.1128/CDLI.9.2.251-256.2002.
- De Oliveira, C. I., Teixeira, M. J., Gomes, R., Barral, A. and Brodskyn, C. I. (2004). Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis. *Drug Discovery Today: Disease Models* **1**, 81–86. doi: 10.1016/j.ddmod.2004.07.005.
- Dea-Ayuela, M. A., Rama-Iñiguez, S., Alunda, J. M. and Bolás-Fernandez, F. (2007). Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for *in vivo* testing of antileishmanial compounds. *Veterinary Research Communications* **31**, 703–717. doi: 10.1007/s11259-007-0040-5.
- DeKrey, G. K., Lima, H. C. and Titus, R. G. (1998). Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity* **66**, 827–829. PMID: PMC107977.
- Espitia, C. M., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L. M., Cappello, M., Travi, B. L. and Melby, P. C. (2010). Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunology* **11**, 31. doi: 10.1186/1471-2172-11-31.
- Essayag, S. M., Landaeta, M. E., Hartung, C., Magaldi, S., Spencer, L., Suárez, R., García, F. and Pérez, E. (2002). Histopathologic and histochemical characterization of calcified structures in hamsters inoculated with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses* **45**, 351–357. doi: 10.1046/j.1439-0507.2002.00785.x.
- Figueiredo, E. M., Costa e Silva, J. and Brazil, R. P. (1999). Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected

- with *Leishmania (Leishmania) chagasi* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32, 191–193. doi: 10.1590/S0037-86821999000200012.
- Gamboa, D., Torres, K., De Doncker, S., Zimic, M., Arevalo, J. and Dujardin, J. C. (2008). Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology* 135, 319–326. doi: 10.1017/S0031182007003848.
- Gomes-Silva, A., Pereira-Carvalho, R., Fagundes-Silva, G. A., Oliveira-Neto, M. P. and Da-Cruz, A. M. (2009). Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42 (Suppl. II), S147–S150.
- Gomes-Silva, A., Souza, M. A., Afonso-Cardoso, S. R., Livia Resende Andrade, L. R., Dietze, R., Lemos, E., Belli, A., Favoreto Júnior, S. and Ferreira, M. S. (2008). Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41, 135–141. doi: 10.1590/S0037-86822008000200001.
- Goto, H. and Lindoso, J. A. (2004). Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 615–623. doi: 10.1590/S0100-879X2004000400020.
- Hommel, M., Jaffe, C. L., Travi, B. and Milon, G. (1995). Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89, 55–73. PMID:8745928.
- Kahl, L. P., Byra, J. E. and David, J. R. (1990). *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Três Braços, Bahia, Brazil differ in virulence for the golden hamster. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 783–784. doi: 10.1016/0035-9203(90)90078-S.
- Kahl, L. P., Byram, J. E., David, J. R., Comerford, S. A. and Von Lichtenberg, F. (1991). *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Três Braços, Bahia, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44, 218–232. PMID: 1849379.
- Laurenti, M. D., Sotto, M. N., Corbett, C. E., da Matta, V. L. and Duarte, M. I. (1990). Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *International Journal of Experimental Pathology* 71, 791–797. PMID:2002383.
- Magalhães, A. V., Moraes, M. A. P., Raick, A. N., Llanos-Cuentas, E. A., Costa, J. M. L., Cuba, C. C. and Marsden, P. D. (1986). Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania b. braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28, 253–262.
- Martinez, J. E., Travi, B. L., Valencia, A. Z. and Saravia, N. G. (1991). Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *Journal of Parasitology* 77, 762–768. PMID:1919926.
- Mendonça, S. C., Coutinho, S. G., Amendoeira, M. R. R., Marzochi, M. C. and Pirmez, C. (1986). Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 64, 269–276. PMID:21542340.
- Morais-Teixeira, E., Carvalho, A. S., Costa, J. C., Duarte, S. L., Mendonça, J. S., Boechat, N. and Rabello, A. (2008). *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 358–362. doi: 10.1590/S0074-02762008000400008.
- Osorio, Y., Melby, P. C., Pirmez, C., Chandrasekar, B., Guarín, N. and Travi, B. L. (2003). The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunology* 25, 139–148. doi: 10.1046/j.1365-3024.2003.00615.x.
- Pereira, C. G., Silva, A. L., de Castilhos, P., Mastrantonio, E. C., Souza, R. A., Romão, R. P., Rezende, R. J., Pena, J. D., Beletti, M. E. and Souza, M. A. (2009). Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. *Veterinary Parasitology* 165, 231–240. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.019.
- Pirmez, C., Marzochi, M. C. and Coutinho, S. G. (1988). Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83, 145–151. doi: 10.1590/S0074-02761988000200001.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. and Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infectious Diseases* 7, 581–596. [http://dx.doi.org/10-1016/S1473-3099\(07\)70209-8](http://dx.doi.org/10-1016/S1473-3099(07)70209-8).
- Rey, J. A., Travi, B. L., Valencia, A. Z. and Saravia, N. G. (1990). Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 623–631. PMID: 2267967.
- Rocha, F. J., Schleicher, U., Mattner, J., Alber, G. and Bogdan, C. (2007). Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infection and Immunity* 75, 3823–3832. doi: 10.1128/2FIAI.01335-06.
- Salay, G., Dorta, M. L., Santos, N. M., Mortara, R. A., Brodskyn, C., Oliveira, C. L., Barbiéri, C. L. and Rodrigues, M. M. (2007). Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1173–1181. doi: 10.1128/01.00060-07.
- Sinagra, A., Riarte, A., Luna, C., Campanini, A. and Segura, E. L. (1997). *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 57, 115–118. PMID: 9242330.
- Soliman, M. F. (2006). The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97, 146–150. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.09.007.
- Souza-Lemos, C., de-Campos, S. N., Teva, A., Córte-Real, S., Fonseca, E. C., Porrozi, R. and Grimaldi, G. J. (2008). Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *Journal of Pathology* 216, 375–386. doi: 10.1002/path.2403.
- SVS-MS (Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brazil). *Casos de leishmaniose tegumentar Americana, Brasil, grandes regiões e unidades federadas*. [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012\\_11\\_casos\\_de\\_lta\\_entre\\_1990\\_e\\_2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2012_11_casos_de_lta_entre_1990_e_2011.pdf).
- Travi, B., Rey-Ladino, J. and Saravia, N. G. (1988). Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. *Journal of Parasitology* 74, 1059–1062. PMID: 3193329.
- Travi, B. L., Osorio, Y., Melby, P. C., Chandrasekar, B., Arteaga, L. and Saravia, N. G. (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infection and Immunity* 70, 2288–2296. doi: 10.1128/IAI.70.5.2288-2296.2002.
- Wilson, H., Dieckmann, B. and Childs, G. (1979). *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Experimental Parasitology* 47, 270–283. doi: 10.1016/0014-4894(79)90079-1.
- Wilson, H. R. and Lollini, L. O. (1980). *Leishmania braziliensis braziliensis*: metastatic infection in a golden hamster. *Transactions of Royal Society and Tropical Medicine and Hygiene* 74, 833. PMID: 7210144.