

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

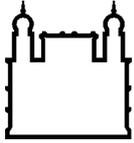
Mestrado do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES IMUNOPATOLÓGICAS DAS LESÕES
CUTÂNEAS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NO MODELO HAMSTER
DOURADO (*Mesocricetus auratus*)**

LARISSA RESENDE VIEIRA

Rio de Janeiro

Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

LARISSA RESENDE VIEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES IMUNOPATOLÓGICAS DAS LESÕES
CUTÂNEAS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NO MODELO HAMSTER
DOURADO (*Mesocricetus auratus*)**

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

Orientadoras: Dra. Alda Maria Da Cruz
Dra. Raquel Peralva Ribeiro-Romão

RIO DE JANEIRO

Março de 2017

Vieira, Larissa Resende .

Avaliação das alterações imunopatológicas das lesões cutâneas por *Leishmania (Viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) / Larissa Resende Vieira. - Rio de Janeiro, 2017.

74 f.; il.

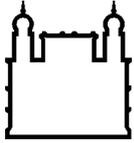
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Alda Maria Da Cruz.

Co-orientadora: Raquel Peralva Ribeiro Romão.

Bibliografia: f. 60-74

1. *Leishmania (Viannia) braziliensis* . 2. *Mesocricetus auratus*. 3. Alterações imunopatológicas . I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

LARISSA RESENDE VIEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES IMUNOPATOLÓGICAS DAS LESÕES
CUTÂNEAS POR *Leishmania (Viannia) braziliensis* NO MODELO HAMSTER
DOURADO (*Mesocricetus auratus*)**

ORIENTADORAS: Dra. Alda Maria Da Cruz
Dra. Raquel Peralva Ribeiro-Romão

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Ester Maria Mota – Revisora e Presidente da banca (IOC/FIOCRUZ)
Profa. Dra. Flávia Ribeiro Gomes (IOC/FIOCRUZ) – Membro da banca
Profa. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (UFRJ)– Membro da banca
Profa. Dra. Fernanda Nazaré Morgado (IOC/ FIOCRUZ) – 1º suplente
Profa. Dra. Cynthia Chester Cardoso (UFRJ) – 2ª suplente

Rio de Janeiro, 14 de Março de 2017

Aos meus pais, José Ivan e Suely por todo amor, apoio e confiança essenciais para que eu me tornasse o ser humano que sou hoje.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me concedeu todas as condições e forças necessárias para que eu chegasse até aqui. Gratidão por todas as experiências vividas.

Aos meus pais, Suely e José Ivan, as pessoas mais importantes da minha vida, pela minha formação humana, pelo amor, carinho, dedicação, paciência, amparo, pelo apoio moral e material e por tudo mais. Minhas vitórias serão sempre de vocês!

À minha orientada Dra. Alda Maria da Cruz, por me abrir as portas do LIPMED, pela receptividade e confiança. Agradeço imensamente pela oportunidade de tê-la conhecido e de poder ser sua aluna, por seus ensinamentos, dedicação, paciência, e, principalmente, por ser a pessoa que aprendi a admirar: exemplo de profissional, competente, humilde, atenciosa, bem humorada e nitidamente apaixonada pelo que faz.

À Dra. Raquel Peralva Ribeiro Romão, minha segunda orientadora, pelos ensinamentos, pela contribuição imprescindível e por me oferecer todo o suporte necessário para a realização desse trabalho.

Aos Doutores Adriano Gomes Silva e Eduardo Fonseca Pinto pela contribuição intelectual e auxílio na análise dos resultados.

Aos doutorandos Andréa Saavedra, Luzinei Couto, Tayany de Deus e Milla Paiva pela ajuda na execução dos experimentos e solicitude.

À Rosa Plácido pelo auxílio em diversos momentos e pelos ensinamentos em biossegurança.

Aos amigos do LIPMED Tayany de Deus, Clébio Eleutério, Luiz Antônio, Tiara Cascais, Maria Fantinatti, Alexandre Bello, Milene Yoko, Lila Araújo, Andressa Durans, Flávia Reis, Luana Rodrigues e demais membros do laboratório pelo agradável ambiente de trabalho e pela contribuição valiosa de cada um nessa etapa da minha vida.

Ao Dr. Otacílio Moreira pelo auxílio nos ensaios de biologia molecular. Agradeço também a Angélica Cardoso e demais membros do LABIMDOE, sempre muito receptivos e dispostos a ajudar.

Ao Dr. Marcelo Pelajo, à Luzia Caputo, à técnica Luciana, e demais membros do Laboratório de Patologia, sempre solícitos e atenciosos em todas as vezes que precisei.

Á Dra. Esther Maria Mota pela ajuda com os cortes de congelamento e pela revisão desse trabalho.

A todos os doutores membros da banca avaliadora dessa dissertação.

Á melhor turma de mestrado do mundo: Agatha Gabriella da Silva Rosa, Melina Pedroso Merlone, Iasmim Silva de Mello, Beatriz Philot Pavão, Taiza Andrade Braga, Leonardo da Silva Lara, Jéssica Ribeiro de Lima, Thiara Manuele Alves de Souza, Jéssica Vasques Raposo, Camila Cardoso Santos, Diana Azeredo Rangel, Arthur da Costa Rasinhas, Lana Bitencourt Chaves, Monique de Melo Costa, Arthur Daniel Rocha Alves, Alessandra Filgueiras Gonzalez Araujo Santos, Stéphanie Silva Campos, Marcelle da Senhora Cappato e Samyra Almeida da Silveira. Pessoas que se tornaram amigos especiais e fizeram toda a diferença, tornando dias difíceis muito mais leves. Amo e agradeço demais!!!

A todas as pessoas que não citei aqui mas que, de alguma forma, contribuíram para que eu trilhasse esse caminho, aos amigos e familiares que fizeram parte desse momento.

Aos animais que contribuíram para realização desse trabalho.

Ao curso de pós-graduação em Biologia Parasitária pela minha formação acadêmica, à plataforma PDTIS/Fiocruz de PCR em Tempo Real, aos funcionários do biotério do Pavilhão Carlos Chagas, ao IOC/Fiocruz pela infraestrutura e á Capes pela minha bolsa de mestrado.

RESUMO

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie associada à leishmaniose tegumentar Americana (LTA), mas é relativamente pouco estudada em modelos experimentais. Nosso grupo vem estudando o hamster (*Mesocricetus auratus*) que se mostrou ser um bom modelo para estudo da LTA. A história natural da infecção demonstrou que o tempo de surgimento das lesões era proporcional ao número de parasitos do inóculo, influenciando também a gravidade da evolução clínica e das alterações histopatológicas. O presente trabalho propõe avaliar momentos precoces da infecção pelos referidos inóculos, com a hipótese de que a modulação da resposta imune que ocorre em fases mais iniciais da infecção poderá influenciar o curso clínico da doença. Para tal, 72 hamster (dois experimentos) foram inoculados na pata com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* e a mensuração da espessura da pata foi realizada semanalmente. Grupos de animais foram eutanasiados com 15, 30 e 50 dias pós-infecção. As alterações histopatológicas da pele foram quantificadas por pontuação atribuída a características do infiltrado e a quantificação de IgG anti-*Leishmania* foi realizada por ELISA. A expressão gênica de IFN γ , IL-10, TGF- β , TNF, IL-4, IL-6, arginase e iNOS, e a carga parasitária foram avaliadas na pele por PCR em tempo real. O tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional à concentração do inóculo. A maioria dos animais infectados por 10^4 desenvolveram lesões mais benignas com menor comprometimento inflamatório em comparação aos animais infectados com 10^5 e 10^6 , que apresentaram lesões de evolução similar, mais graves, com maior dano tecidual. Houve relação direta dos níveis de IgG total com a concentração de parasitos do inóculo e com o tempo de infecção, só havendo produção de IgG aos 30 dias. Houve correlação positiva dos níveis de IgG com o tamanho das lesões, dano tecidual e carga parasitária final, sugerindo que os anticorpos não protegem contra o parasito e que estão relacionados à gravidade da infecção. Aos 15 dias a maioria dos animais não expressou iNOS, havendo grande aumento de expressão dessa enzima nos animais infectados por 10^6 aos 30 dias e aumento substancial nos três inóculos, aos 50 dias. Entretanto, só ocorreu aumento mais pronunciado da expressão de arginase aos 50 dias. No geral, houve um controle mais eficiente da replicação parasitária pelos animais infectados por 10^4 parasitos, havendo correlação da CP com o tamanho das lesões e o dano tecidual. Em todos os tempos estudados observou-se um perfil misto de expressão de citocinas. Aos 15 e 30 dias, os inóculos 10^4 e 10^5 apresentaram perfis de expressão semelhantes com medianas menores que as do inóculo 10^6 . Aos 50 dias, o menor inóculo teve um comportamento mais disperso para a maioria das citocinas, o que pode ser atribuído ao caráter *outbreak* do modelo. Observamos uma baixa modulação de IL-4 e TGF- β nos animais infectados por 10^4 parasitos, fato que pode ter contribuído para o controle mais efetivo da infecção, ao contrário do que ocorreu com o inóculo 10^6 . Nos inóculos 10^5 e 10^6 , houve uma aparente desregulação da resposta imune, com alta expressão de citocinas, provavelmente relacionada ao elevado estímulo antigênico. Nossos resultados sugerem que a baixa indução de IL-4 e TGF- β é consequência da carga infectiva, tendo importante papel no controle da doença.

ABSTRACT

Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species associated with American tegumentary leishmaniasis (ATL), however, there are relatively few experimental models available and most mouse strains are resistant to this species. Our group has been studying the hamster (*Mesocricetus auratus*), which proved to be a good model for the study of ATL. The natural history of the infection demonstrated that the time of onset of the lesions was proportional to the number of parasites inoculated, also influencing the severity of clinical evolution and histopathological changes. Thus, the present work proposes to evaluate the early moments of infection by these inocula, with the hypothesis that the modulation of the immune response occurs in the earliest stages of the infection. To this purpose, 72 hamsters (two experiments) were inoculated in the footpad with 10^4 , 10^5 and 10^6 *L. braziliensis* promastigotes and measuring the paw thickness was performed weekly. Groups of animals were euthanized at 15, 30 and 50 days post-infection. The histopathological changes of the skin were quantified by scoring attributed to the characteristics of the infiltrate and the quantification of anti-*Leishmania* IgG was performed by ELISA. The skin gene expression IFN- γ , IL-10, TGF- β , TNF, IL-4, IL-6, arginase and iNOS, and the parasite load were evaluated by quantitative real-time PCR. The onset time of the lesions was inversely proportional to the concentration of the inoculum. Most of the animals infected by 10^4 developed benign lesions with less inflammatory involvement compared to animals infected with 10^5 and 10^6 , which presented similar lesions evolution, i.e., more severe, with greater tissue damage. There was a direct relationship between the levels of total IgG and the concentration of parasites in the inoculum and the time of infection, with onset of IgG production at 30 days. IgG levels were positively correlated with lesion size, levels of tissue damage and final parasite load, suggesting antibodies do not protect against infection and are related to the severity of infection. At all times studied a mixed profile of cytokine expression was observed. At 15 and 30 days, animals inoculated with 10^4 and 10^5 promastigotes showed similar expression profiles with medians lower than those of inoculum 10^6 . At 50 days, the lowest inoculum had a more dispersed behavior for most of the cytokines, probably because of outbreak character of the model. It was observed a low modulation of IL-4 and TGF- β in animals infected with 10^4 parasites, which may have contributed to the more effective control of the infection, unlike that of inoculum 10^6 . In inocula 10^5 and 10^6 , there was an apparent dysregulation of the immune response, with high expression of cytokines, probable due to the high antigen exposure. At 15 days, most of the animals did not express iNOS, with a great increase in the expression of this enzyme in the infected animals for 10^6 at 30 days and a substantial increase in the three inocula at 50 days. However, there was only a pronounced increase in arginase expression at 50 days. In general, there was a more efficient control of parasite replication by the animals infected with 10^4 parasites, with a correlation between CP and lesion size and tissue damage. Our results suggest that the low induction of IL-4 and TGF- β occurring in lower infective load conditions, plays an important role in determining the benign clinical course of the disease.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Características gerais das leishmanioses.....	1
1.1.1 Aspectos epidemiológicos.....	1
1.1.2 Agente etiológico e ciclo biológico.....	3
1.1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	5
1.2 O modelo experimental hamster dourado (<i>Mesocricetus auratus</i>).....	7
1.3 O hamster dourado como modelo da leishmaniose tegumentar americana.....	8
1.4 Aspectos clínicos e imunopatológicos do hamster dourado como modelo da leishmaniose.....	9
1.5 Resposta imune inicial na LTA.....	14
2. JUSTIFICATIVA	20
3. OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.2 Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Parasitos.....	22
4.2 Animais.....	22
4.3 Infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	23
4.4 Morfometria das lesões cutâneas causadas por infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	23
4.5 Eutanásia.....	23
4.6 Análise histopatológica	23
4.7 Quantificação de Imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i>	24
4.8 Ensaios de PCR em tempo real.....	25
4.8.1 Extração de ácidos nucleicos e transcrição reversa.....	25
4.8.2 Análise da expressão gênica.....	26
4.8.3 Quantificação da carga parasitária.....	27
4.9 Análise estatística.....	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Morfometria das lesões cutâneas causadas por infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	29
5.2 Análise temporal das alterações histopatológicas da pata decorrentes	

da infecção em lesão de pata de hamster infectado com três diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	33
5.3 Quantificação de Imunoglobulinas <i>anti-Leishmania</i>	37
5.4 Quantificação da carga parasitária.....	39
5.5 Análise temporal da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase em lesão de pata de hamster infectado com três diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	41
6. DISCUSSÃO	46
7. CONCLUSÕES	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo.....	3
Figura 2 - Ciclo biológico de <i>Leishmania sp</i>	5
Figura 3: Avaliação de lesões de pele de hamster dourado após infecção por promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em três diferentes concentrações de inóculo (10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas).....	31
Figura 4: Medidas finais da lesão cutânea aos 15 (A), 30 (B) e 50 (C) dias após a infecção por diferentes concentrações de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (10^4 , 10^5 e 10^6).....	32
Figura 5: Gráfico representativo das alterações histopatológicas em pele de hamsters infectados com diferentes concentrações de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (10^4 , 10^5 e 10^6 formas promastigotas) aos 15 (A), 30 (B) e 50 (C) dias após a inoculação.....	36
Figura 6 – Quantificação dos níveis séricos de IgG anti- <i>Leishmania</i> no plasma de hamsters infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas.....	38
Figura 7: Expressão gênica de citocinas, arginase e iNOS na pele de hamsters com 15 (A), 30 (B) e 50 (B) dias após a infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	40
Figura 8: Expressão gênica de IFN- γ (A), IL-10 (B), TNF (C), TGF β (D), IL-6 (E), IL-4 (F), arginase (G) e iNOS (H) na pele de hamsters com 15, 30 e 50 dias após a infecção com 10^4 (●), 10^5 (■) e 10^6 (▲) promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	44
Figura 9: Quantificação da carga parasitária em lesões cutâneas de hamsters infectados com <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alvos e sequências de iniciadores de hamster utilizados nos ensaios de RT-qPCR em Tempo Real.....27

Tabela 2 – Aspecto clínico final das lesões dos hamsters, após 15, 30 e 50 dias após a infecção por diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6).....33

Tabela 3 – Alterações histopatológicas encontradas em pele de hamsters infectados com diferentes inóculos de *Leishmania (V.) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6 promatigotas) em diferentes tempos de infecção (15, 30 e 50 dias).....35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- CCR4 - Receptor de Quimiocina Tipo 4 (do inglês: *C-C chemokine receptor type 4*)
- cDNA - Ácido desoxirribonucléico complementar (do inglês: *Complementary deoxyribonucleic acid*)
- CP - Carga parasitária
- Ct - Do inglês: *CycleThreshold*
- DC - Célula dendrítica (do inglês: *Dendritic cells*)
- DNA - Ácido desoxirribonucléico (do inglês: *deoxyribonucleic acid*)
- ELISA - Do inglês: *Enzyme-linked immuno sorbent assay*
- Foxp3 - Do inglês: *Forkhead box-P3*
- Fw - Do inglês: *Forward*
- IFN- γ - Interferon-gamma
- IgG - Imunoglobulina G
- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- IL-2 – Interleucina 2
- IL-4 - Interleucina 4
- IL-5 - Interleucina 5
- IL-6 - Interleucina 6
- IL-8 - Interleucina 8
- IL-10 - Interleucina 10
- IL-12 - Interleucina 12
- IL12p40 - Subunidade beta da Interleucina 12
- IL-13 - Interleucina 13
- IL-21 - Interleucina 21
- iNOS - Enzima óxido nítrico sintase induzida (do inglês: *inducible nitric oxide synthase*)
- LV - Leishmaniose visceral
- LTA - Leishmaniose tegumentar Americana
- LC - Leishmaniose cutânea
- LCD - Leishmaniose cutâneo-difusa
- LCL - Leishmaniose cutânea localizada
- LM - Leishmaniose mucosa
- LD - Leishmaniose difusa
- LDiss - Leishmaniose disseminada
- LDPK - Leishmaniose dérmica pós-kala-azar
- NETs - Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês: *Neutrophil extracellular traps*)
- NK - Do inglês: *Natural Killer*
- NO - Óxido nítrico (do inglês: *nitric oxide*)

OPD - Do inglês: *O-phenylenediamine dihydrochloride*

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (do inglês: *Peripheral blood mononuclear cells*)

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

PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase chain reaction*)

ROC - Do inglês: *receiver operator characteristic curve*

RNA - Ácido ribonucleico (do inglês: *ribonucleic acid*)

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês: *messenger ribonucleic acid*)

RPMI - Do inglês: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-qPCR - Transcrição Reversa quantitativa da reação em cadeia pela polimerase (do inglês: *Reverse transcription-polymerase chain reaction*)

Rv - Do inglês: *Reverse*

T CD4⁺ - Linfócitos T CD4⁺

T CD8⁺ - Linfócitos T CD8⁺

TGF-β - Fator transformador de crescimento beta (do inglês: *transforming growth factor beta*)

Th1 - Linfócito T auxiliar do tipo 1

Th2 - Linfócito T auxiliar do Tipo 2

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais das leishmanioses

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

A leishmaniose está incluída no grupo de doenças negligenciadas, constituindo um grave problema de saúde pública, pois apresenta ampla distribuição geográfica, além de amplo espectro de manifestações clínicas. O agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido a hospedeiros mamíferos por insetos denominados flebotomíneos, dípteros da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). Existem em torno de vinte espécies de *Leishmania* que infectam o homem e trinta espécies e subespécies de flebotomíneos implicadas na transmissão. O status imunológico e a condição sócio-econômica do hospedeiro são também fatores determinantes para a aquisição da leishmaniose (Reithinger et al. 2007, Antinori et al. 2012, Stockdale & Newton 2013).

O ciclo de transmissão da *Leishmania spp.* é originalmente silvestre, mantendo-se na natureza como epizootia, portanto sem a participação do homem. Nesses casos, a infecção humana é acidental. Entretanto, muitas espécies de *Leishmania* adaptaram-se a ciclos peridomésticos, envolvendo animais domésticos e flebotomínios antropofílicos (Cupolillo et al. 2014). O parasito também pode ser transmitido em um ciclo antroponótico (Garnham, 1971; Lainson, 1983), como é o caso de *L. (Leishmania) donovani*, na Ásia, (especialmente na Índia), onde o homem passa a ser um reservatório capaz de manter o ciclo em atividade (rev. Alvar et al. 2004, Reithinger et al. 2007; Postigo 2010, Cupolillo et al. 2014).

A infecção por *Leishmania spp.* adquiriu um caráter periurbano, em áreas desmatadas (Alvar et al. 2012). O ciclo de transmissão vem se expandindo para áreas não endêmicas em decorrência do desmatamento, da urbanização, fatores socioeconômicos, popularização do ecoturismo, desastres naturais, aquecimento global, além da presença de animais domésticos atuando como potenciais reservatórios. Além disso, a migração de populações suscetíveis para áreas endêmicas de leishmaniose tegumentar pode culminar em epidemias notáveis (Reithinger et al. 2007, Roque & Jansen 2014).

Do ponto de vista clínico, as leishmanioses são agrupadas nas formas: leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kala-azar; e leishmaniose tegumentar. Estima-se que 900.000 - 1,3 milhões de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo, com cerca de 20.000 a 30.000 mortes. Dos novos casos anuais, 200.000 a 400.000 são de leishmaniose visceral, forma mais grave da doença, responsável pela maioria dos casos fatais; e 0,7 a 1,3 milhões são de leishmaniose tegumentar (WHO, 2016).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum, sendo endêmica em regiões tropicais e neotropicais. Cerca de 95% dos casos de LC, ocorrem nas Américas, Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central, sendo que mais de dois terços dos novos casos estão concentrados em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã e da República Árabe Síria (Figura 1). Cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, no Brasil e no Peru (WHO, 2016). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Ministério da Saúde, 2014). No Brasil, a LTA encontra-se difundida em todas as regiões federadas, com número de casos variando de 18 a 35 mil por ano entre os anos de 1990 e 2015 (MS-SVS, 2016).

O Brasil é o país com maior número de casos de LTA na América do Sul. Até a década de 50, a maioria dos casos se concentrou nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Ceará e Pernambuco, e eram associados ao desmatamento e a novos assentamentos. Porém, devido à extensão das atividades rurais, a doença se espalhou para outras áreas, incluindo a região metropolitana de Belo Horizonte. Os picos de transmissão ocorrem de cinco em cinco anos, havendo uma tendência de aumento do número de casos desde 1985 (Alvar et al. 2012).

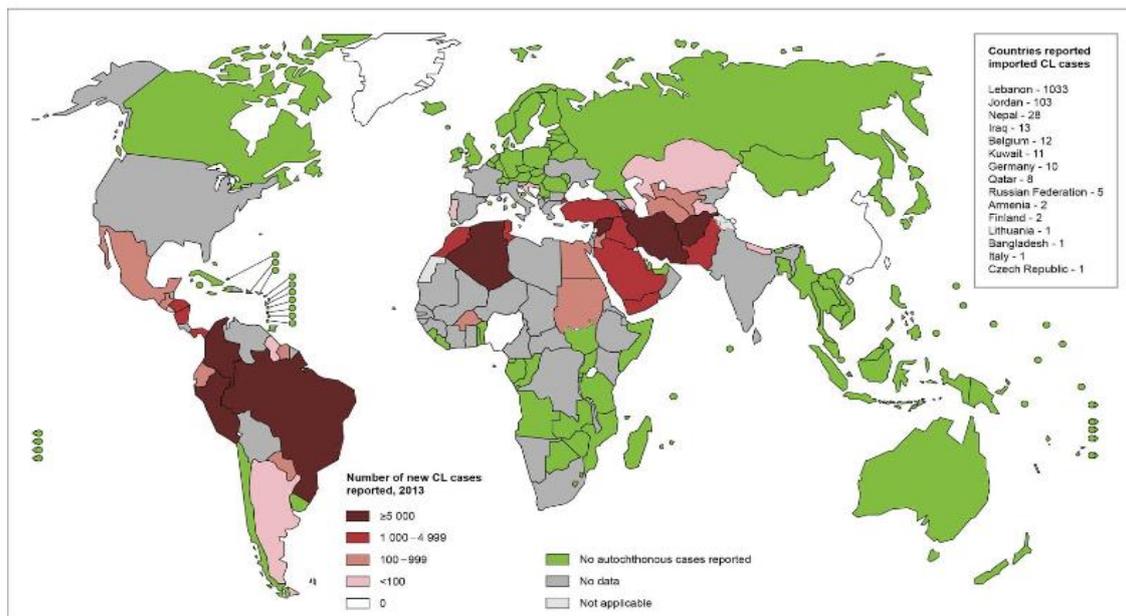


Figura 1- Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo. WHO, 2013

1.1.2 Agente etiológico e ciclo biológico

Os parasitos que causam as leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. São organismos unicelulares, heteroxênicos, contendo uma organela especializada denominada cinetoplasto. Na natureza apresentam-se em duas formas evolutivas: promastigotas, encontradas dentro do trato digestivo do flebotomíneo, e amastigotas, obrigatoriamente intracelulares, encontrados em fagolisossomos de macrófagos e outros fagócitos. As formas amastigotas são constituídas por um corpo ovalado, ou arredondado, contendo fundamentalmente um núcleo deslocado para porção anterior acima do cinetoplasto, próximo ao qual encontra-se um flagelo internalizado. As promastigotas apresentam forma alongada, apresentando um núcleo central, um cinetoplasto anterior ao núcleo e um flagelo longo e livre emergindo da bolsa flagelar na extremidade anterior (revisto por Silva et al. 2014).

No momento em que a fêmea do flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, alguns macrófagos contendo formas amastigotas de *Leishmania* são ingeridos. No trato digestivo do inseto vetor, os parasitos são liberados e, em seguida, diferenciam-se em formas flageladas: promastigotas procíclicas. As formas promastigotas do parasito escapam da matriz peritrófica (malha acelular de quitina e proteína secretada pelo epitélio do intestino médio do

inseto que envolve o sangue a ser digerido) para o espaço exterior à matriz e aderem-se ao epitélio, onde continuam a se dividir rapidamente. Este mecanismo de escape é facilitado pela ação da quitinase secretada pelo parasito e provavelmente pela ação da quitinase endógena do flebotomíneo. As promastigotas passam pelo processo de metaciclogênese, diferenciando-se em promastigotas metacíclicas. Estas são formas infectantes, que migram para a região anterior do intestino médio e se concentram na região da válvula estomodeal (cárdia), promovendo a destruição da mesma. A destruição da válvula faz com que o inseto, ao tentar sugar o sangue de um vertebrado durante a picada, regurgite uma parte do conteúdo intestinal que carrega as formas promastigotas presentes na porção anterior do tubo digestivo, inoculando-as na junção derme-epiderme de um novo hospedeiro vertebrado. Nesse local ocorre a fagocitose dos parasitos que irão se diferenciar em formas amastigotas no interior das células do sistema fagocítico mononuclear, entre elas o macrófago, podendo persistir por toda a vida do hospedeiro, que torna-se uma nova fonte de infecção (figura 2) (Oliveira, 2005; Conceição-Silva & Alves, 2014).

Atualmente, são conhecidas em torno de trinta espécies de *Leishmania*, dentre as quais, cerca de vinte são patogênicas para seres humanos. As espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos são classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. O subgênero *Viannia* inclui apenas espécies encontradas nas Américas, logo, correspondem a maioria das espécies do Novo Mundo. No geral, as espécies desse subgênero apresentam difícil crescimento em meio de cultura e desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo, ficando os parasitos aderidos à parede, na região do piloro. Já o subgênero *Leishmania* inclui espécies circulantes nas Américas, África, Ásia e Europa, podendo ser referenciadas como do Novo ou do Velho Mundo, dependendo da sua distribuição geográfica. Essas espécies, no geral, possuem fácil crescimento em cultura e se desenvolvem no intestino médio e anterior do flebotomíneo (Cupolillo et al. 2014).

Nas Américas, espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia* estão implicadas na ocorrência de LTA, sendo que no Brasil, as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* são as mais frequentemente associadas à doença humana. Esta última tem ampla distribuição, atingindo todas as regiões brasileiras (revisão Azeredo-Coutinho & Mendonça 2014).

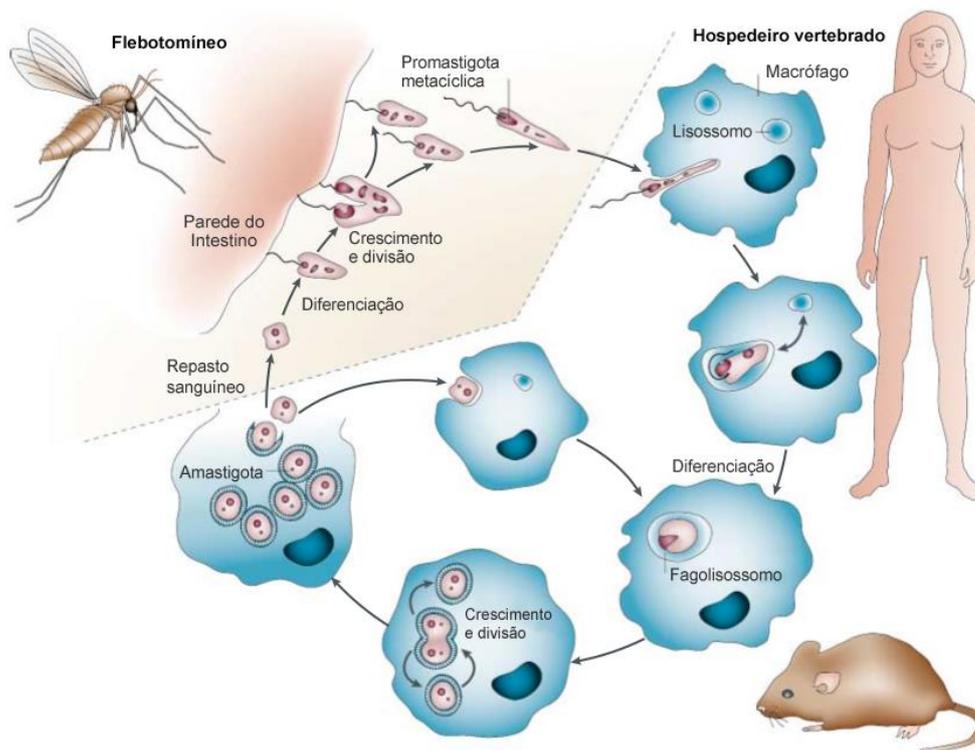


Figura 2 - Ciclo biológico de *Leishmania* sp.. Adaptado de Sacks & Noben-Trauth. 2002

1.1.3 Formas Clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas. Depois de estabelecida a infecção e de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, bem como com a resposta imune do hospedeiro, os eventos subsequentes ocorrerão de forma variada (Pearson & Sousa, 1996).

A forma visceral da doença, também conhecida como kala-azar, quando não tratada é fatal em 95% dos casos. Caracteriza-se por episódios irregulares de febre, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. Uma sequela da doença visceral é o que se conhece por leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LDPK), que se manifesta por erupção macular, papular ou nodular, geralmente na face, parte superior dos braços, troncos e outras partes do corpo. (WHO, 2016).

O termo leishmaniose tegumentar é usado para designar a infecção por *Leishmania* que afeta a pele e mucosas. A leishmaniose cutânea (LC), forma mais comum da doença, é causada por todas as espécies dermatrópicas e o curso clínico varia de acordo com a espécie do parasito, bem como dos fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro. No Velho Mundo a LC é causada por *L. tropica*, *L.*

major e *L. aethiopica* (Reithinger et al. 2007, Bern et al. 2008). Nas Américas temos como agentes etiológicos da LC: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombienseis*, *L. lainsoni*, *L. shawii*, *L. naiffi*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. garnhami*, *L. venezuelensis* e *L. pifanoi* (Azeredo-Coutinho & Mendonça, 2014). As lesões da LC geralmente ocorrem em áreas expostas do corpo, como a face, pescoço e membros, pois estas são acessíveis aos flebotomíneos. Porém, nas regiões do Brasil onde ocorre a transmissão domiciliar ou peridomiciliar, o inseto vetor, em sua atividade noturna, invade o domicílio, podendo picar o indivíduo durante o sono, produzindo lesões em áreas geralmente cobertas como axila, pálpebra superior, nádegas e genitália (Azeredo-Coutinho & Mendonça, 2014, Pace, 2014; WHO, 2016).

O primeiro sinal clínico é um pequeno eritema que se desenvolve após um período de pré-patência variável, no local da infecção. O eritema desenvolve-se em uma pápula, que evolui para um nódulo que pode ulcerar progressivamente durante um período de 2 semanas a 6 meses, podendo culminar em lesão seca ou úmida, crostosa ou nodular. A lesão típica da leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a úlcera com bordas em moldura. A cicatrização dessas lesões pode ser de longa duração, ocorrendo em meses ou até anos, podendo deixar cicatriz e alterações permanentes na pigmentação da pele, que podem implicar em estigmatização social, impactando na qualidade de vida e no psicológico do indivíduo (Yanik et al, 2004). Muitas vezes, as lesões evoluem para a cura espontânea, porém esse processo requer meses ou anos e varia de acordo com a espécie de *Leishmania*. (Pearson & Sousa, 1996, Reithinger et al. 2007, Azeredo-Coutinho & Mendonça 2014, WHO 2016)

Outra forma clínica da LTA é a leishmaniose disseminada (LDiss), onde múltiplas lesões ulceradas, de gravidade variável, disseminam-se a partir do local da infecção, podendo cobrir todo o corpo do paciente. Essa forma clínica, em comparação com a LC, é mais difícil de tratar e os pacientes não evoluem para a cura espontânea. Na leishmaniose cutâneo-difusa (LCD), as lesões também são múltiplas, papulares ou nodulares e sem tendência à ulceração. É uma forma rara e que não responde ao tratamento com as drogas leishmanicidas disponíveis (Person & Sousa 1996, Reithinger et al. 2007, Azeredo-Coutinho & Mendonça 2014).

A leishmaniose mucosa (LM) tende a ser mais grave, e cursa com comprometimento da mucosa em decorrência da disseminação metastática do parasito, ocasionando nódulos, inflamação e ulceração da mucosa nasal, levando a destruição do septo, lábios e palato, com conseqüente mutilação facial e desfiguração grave. Nos casos mais graves pode haver comprometimento respiratório, em função do envolvimento das vias aéreas e infecções secundárias, potencialmente fatais (Marsden, 1986; Pearson & Sousa, 1996; Pace, 2014). É comumente associada à infecção por *L. braziliensis* (Marsden, 1986; Davies et al. 2000), mas vêm sendo descritos casos causados por *L. guyanensis* (Guerra et al. 2011). A LM pode manifestar-se anos após a ocorrência da LC ou da infecção primária e a remissão clínica só ocorre após tratamento (Azeredo-Coutinho & Mendonça 2014).

1.2 O modelo experimental hamster dourado (*Mesocricetus auratus*)

Os primeiros hamsters a serem utilizados em experimentação de laboratório foram os hamsters chineses (*Cricetus griseus*) e sua susceptibilidade a *Leishmania* foi descrita já em 1919 (Yong, 1919). Porém, diante da dificuldade de reprodução e manutenção desses animais em cativeiro e por não fornecerem dados satisfatórios nos estudos da leishmaniose mediterrânea, mais tarde, por volta de 1930, foi estabelecida em laboratórios da França e Inglaterra, uma nova criação de hamsters oriundos da Síria. Essa criação foi posteriormente estendida para os Estados Unidos. Inicialmente, esses animais foram denominados hamsters sírios (*Syrian hamsters*), devido à sua origem, mais tarde, juntou-se a denominação dourado (*golden*), devido à sua cor de sua pelagem. Estima-se que o número de hamsters utilizados na experimentação, atualmente, seja igual ao de cobaias e coelhos. Embora, outras espécies continuem a ser usadas, a eleição do hamster dourado deve-se ao seu tamanho mediano; ao fato de adaptar-se muito bem ao cativeiro e; ao seu comportamento mais dócil, em relação a outras espécies. Sua taxonomia é definida como: Classe Mammalia, Ordem Rodentia, Família Cricetidae, Gênero *Mesocricetus*, Espécie *Mesocricetus auratus* (Santos 2002, Sirois 2008).

O hamster dourado é comprovadamente um excelente modelo para o estudo de diversas doenças infecciosas que acometem seres humanos, tais como sífilis,

leishmaniose visceral, infecções micobacterianas, fúngicas e arbovirais (Revisto por Melby et al. 1998), além da doença de Chagas, clostridiose e ancilostomose (Mendez et al. 2005, Bilate et al. 2007, Goulding et al. 2009). Devido à alta susceptibilidade do hamster dourado a diversos organismos intracelulares, essa espécie tem sido utilizada no isolamento de vários agentes infecciosos humanos, tais como *Leishmania* (Melby et al. 1998).

1.3 O hamster dourado como modelo da leishmaniose tegumentar americana

L. braziliensis é o principal agente etiológico da LTA, por ser mais amplamente distribuído nas Américas. No entanto, esta espécie é relativamente pouco estudada nos modelos experimentais, uma vez que, além da dificuldade no crescimento desse parasito em cultura, a maioria das linhagens de camundongo é resistente à infecção por espécies do subgênero *Viannia*, particularmente *L. braziliensis* (Neal & Hale 1983, De Moura et al. 2005). Tal fato, se deve, possivelmente, à incapacidade destes parasitos de desencadear uma resposta Th2 expressiva (DeKrey et al. 1998, Lima et al. 1999). Mesmo o Balb/c, considerada a linhagem mais susceptível, produz lesão benigna, com curso de evolução rápido, culminando com a cura espontânea em poucas semanas, já que esses camundongos, mediante a infecção por *L. braziliensis* produzem baixos níveis de IL-4, sendo, dessa forma, incapazes de bloquear a capacidade do IFN- γ de ativar macrófagos infectados (Lima et al. 1999). Portanto, o modelo murino não é capaz de reproduzir a fase tardia da infecção natural de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* (Hommel et al. 1995, De Oliveira et al. 2004). Outros modelos experimentais, tais como primatas não humanos (Souza-Lemos et al. 2008) e cães (Pirmez et al. 1988), apesar de demonstrarem susceptibilidade, requerem um alto custo e uma logística complexa para sua manutenção, além das questões éticas que dificultam a utilização desses modelos.

Sabe-se que a escolha de um modelo experimental adequado baseia-se em alguns fatores essenciais como capacidade de manifestar a doença e de mimetizar as características clínicas, fisiológicas e imunológicas do hospedeiro natural, além de permitir estudos por um longo período, bem como disponibilidade e facilidade de manejo do animal (Hommel et al. 1995, Awasthi et al. 2004, Oliveira & Barral-Netto 2005, Garg & Dube 2006). Nesse sentido, o modelo hamster dourado vem demonstrando ser um modelo promissor para o estudo da LTA, já que o mesmo é

altamente susceptível à infecção por espécies do subgênero *Viannia* e reproduz a LC causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (De Oliveira et al. 2004, Gomes-Silva et al. 2013). 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 no hamster reproduz muitos dos aspectos observados na LC humana, como a linfadenopatia, lesões cutâneas muito semelhantes às úlceras observadas em humanos, tendo sido descritos, assim como na forma humana, casos de disseminação metastática para mucosas (Hommel et al. 1995; Almeida et al., 1996, Ribeiro-Romão et al. 2014). Recentemente, o modelo hamster tem sido reconhecido como muito apropriado para estudos envolvendo infecção por *L. braziliensis* (Mears et al 2015, Warner et al. 2016).

Dessa forma, o hamster dourado preenche todos os requisitos necessários, destacando-se como modelo ideal no estudo da LTA. No entanto, o fato dessa espécie de animal experimental não ter linhagens *inbred* disponíveis comercialmente (o que impossibilita manipulações genéticas nesse modelo) e, principalmente, a pouca disponibilidade de reagentes imunológicos específicos, tais como anticorpos, marcadores celulares e citocinas, impedem um estudo imunopatogênico mais detalhado e podem ter contribuído para a não consagração do hamster como principal modelo para o estudo da leishmaniose tegumentar.

Nosso grupo vem investigando o hamster dourado como modelo de infecção por *L. braziliensis* para a avaliação da sua imunopatogênese e o desenvolvimento de candidatos vacinais na LTA. Gomes-Silva e colaboradores (2013) demonstraram a reprodutibilidade da infecção nesse modelo utilizando 10^6 promastigotas de um mesmo isolado de *L. braziliensis*, onde todos os animais desenvolveram lesão cutânea, embora tenha sido observada grande variação no tamanho das lesões intra e inter-experimento.

1.4 Aspectos clínicos e imunopatológicos do hamster dourado como modelo da leishmaniose

O modelo hamster vem sendo utilizado, principalmente no estudo da leishmaniose visceral (*L. donovani* e *L. infantum*), existindo poucos dados na literatura sobre uma caracterização do curso da infecção por espécies dermatólicas

de *Leishmania* nesse modelo. Na infecção por *L. donovani* ocorre replicação descontrolada do parasito no fígado, baço e medula óssea do hamster, apesar de uma intensa resposta Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF) nestes órgãos. Esse fato sugere que a doença progressiva esteja relacionada ao comprometimento da função efetora dos macrófagos uma vez que, ao longo do curso da infecção, não se detectou o RNAm ou a atividade enzimática da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) no fígado ou no baço (Melby et al. 2001). Os macrófagos ativados do hamster expressam significativamente menos iNOS do que os macrófagos de camundongos nas mesmas condições, o que contribui para a susceptibilidade do hamster a patógenos intracelulares, já tendo sido relatado o mesmo fenômeno em seres humanos (Perez et al. 2006; Saldarriaga et al. 2012). A redução na produção de NO na infecção por *L. donovani* no hamster também pode estar relacionada ao aumento da expressão da enzima arginase. Isso porque a arginase compete com a iNOS pela L-arginina, mesmo substrato necessário para a síntese de NO. Dessa forma, o aumento na expressão de arginase culmina em diminuição na produção de NO. Além disso, a metabolização da L-arginina pela arginase leva à formação de L-ornitina, precursor da síntese de poliaminas, o que favorece o crescimento dos parasitos (Osório et al. 2012).

Em relação à LTA, foram descritas, na infecção de hamsters por espécies do subgênero *Viannia*, lesões de curso lento, crônico e progressivo (De Oliveira et al. 2004, Ribeiro-Romão et al. 2014), que 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). No entanto, sabemos que vários parâmetros influenciam o curso da infecção por *Leishmania*, como a espécie e a cepa utilizada na infecção experimental (Wilson et al. 1979, Rey et al. 1990, Kahl et al. 1991), tamanho do inóculo (Wilson et al. 1979, Martinez et al. 1991, Ribeiro-Romão et al. 2014), via de inoculação (Wilson et al. 1979, Osorio et al. 2003), sexo e idade do animal (Wilson et al. 1979, Travi et al. 2002) e características biológicas dos parasitos inoculados tais como o número de passagens *in vitro*, fase de crescimento, o estágio de desenvolvimento ou a taxa de formas metacíclicas (Rey et al. 1990, Gamboa et al. 2008).

O modelo hamster dourado é capaz de reproduzir a metástase cutânea observada na doença humana, sendo que o comportamento metastático pode variar entre diferentes espécies de *Leishmania*, bem como entre diferentes isolados (Travi

et al. 1988). Além da metástase cutânea observada nas infecções com espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA, a visceralização dessas espécies é um achado frequente no referido modelo (Kahl et al. 1991, Martinez et al. 1991, Almeida et al. 1996, Gomes-Silva et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014).

A fase inicial da infecção é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, constituído principalmente por macrófagos, neutrófilos e eosinófilos e formação de granuloma a partir do trigésimo dia de infecção (Laurenti et al. 1990). As principais características histopatológicas em lesões crônicas de hamsters infectados com *Leishmania* do subgênero *Viannia* são a presença de uma reação granulomatosa, com macrófagos vacuolizados em arranjos epitelióides e com número variável 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, Ribeiro-Romão et al. 2014). 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, 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). Já foi sugerido que a formação de granulomas com ativação de macrófagos é um mecanismo para lise e destruição do parasito (Ridley & Ridley, 1986). Os padrões histopatológicos nas lesões de hamsters podem variar conforme o estágio de evolução da doença (Gherstich et al. 1999, Mehegan et al. 1999, Choi & Lerner 2001).

Outra característica histopatológica inerente ao modelo hamster em infecções com *Leishmania* é a presença de estruturas basofílicas em formato lamelar concêntrico, de aparência calcificada, denominadas corpúsculos de Schaumann (Wilson et al. 1979, Laurenti et al. 1990, Kahl et al. 1991, Gomes-Silva et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014). 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).

Os recentes avanços da biologia molecular vêm permitindo o desenvolvimento de ferramentas para o estudo da imunologia do modelo hamster (Melby et al. 1998; Espitia et al. 2010; Ribeiro-Romão et al. 2016, Warner et al. 2016). Inicialmente, foram descritas na literatura análises moleculares do padrão de citocinas na LC em hamsters infectados por *L. panamensis*. Aos dois meses de evolução da doença, Osório e colaboradores (2003) verificaram co-expressão de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e IL-12) e de algumas citocinas do tipo 2 (IL-10 e TGF- β) nas lesões cutâneas e baço, além disto o nível de expressão de cada uma dessas citocinas correlacionou-se com o tamanho da lesão. Mais recentemente, um ensaio duplex de RT-qPCR em tempo real foi desenvolvido para a quantificação relativa do RNAm de citocinas, quimiocinas e moléculas relacionadas à resposta imune na fase inicial da infecção (sete dias) por *L. panamensis* . Comparando a expressão do RNAm em pele e linfonodo de hamsters infectados, verificou-se uma maior expressão basal no linfonodo em comparação com a pele para a maioria dos transcritos (IL-4, CCR4, IL-21, TNF, TGF- β , IFN- γ , IL-12p40, IL-10, e Foxp3). Nessa fase inicial da infecção foi observada regulação concomitante por citocinas do tipo 1 (IFN- γ e IL-12p40) e tipo 2 (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21) no local da infecção cutânea, não sendo verificado, mais uma vez, um padrão de polarização para o tipo 1 ou tipo 2 de resposta. Estes resultados sugerem que uma resposta mista de citocinas do tipo 1 e do tipo 2 contribui para o curso crônico não progressivo da doença (Espitia et al. 2010).

Ribeiro-Romão e colaboradores (2016) descreveram pela primeira vez um ensaio molecular sensível e reprodutível para quantificar, a partir do mesmo fragmento de tecido, a expressão gênica de marcadores imunológicos e a carga parasitária em lesões cutâneas. Os autores observaram que modelo hamster infectado por *L. braziliensis* também apresenta um perfil de resposta imune misto, com aumento de expressão de citocinas anti- e inflamatórias. Este estudo verificou que após 110 dias de infecção houve um aumento da expressão gênica de todos os alvos testados - IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-4, iNOS e arginase - tanto na pele quanto no linfonodo - em comparação com animais não infectados. Um fenômeno similar já tinha sido observado na infecção por *L. panamensis* (Osório et al. 2003, Espitia et al. 2010) e por *L. donovani* (Melby et al. 1998, 2001). De forma interessante, a expressão gênica de arginase e iNOS na infecção por *L. braziliensis*, foi contrária ao que ocorre no modelo hamster de LV (infecção por *L. donovani*). Enquanto na LC foi observado um aumento da expressão de arginase de até dez

vezes em relação aos controles não infectados, na forma visceral foi demonstrado um aumento substancial, mais de mil vezes em relação aos controles não infectados. O estudo mostrou que na infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster houve maior expressão de iNOS na pele (cerca de mil vezes em relação aos controles não infectados), diferente da observada em estudos anteriores, nos quais a expressão nos baços de hamsters infectados com *L. donovani* foi baixa, semelhante ao controle não infectado (Melby et al. 2001, Perez 2006, Osorio et al. 2012).

A resposta humoral em hamsters infectados por *L. braziliensis* é caracterizada pelo aumento nos níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*, correlacionando-se positivamente com o tamanho da lesão e com a gravidade da doença (Gomes-Silva et al. 2013). Na infecção por *L. panamensis*, maiores títulos de IgG total anti-*Leishmania* foram observados em hamsters infectados no focinho (que desenvolveram lesões mais graves), do que nos animais infectados na pata (com lesões mais brandas). Importante salientar que esta diferença nos níveis de IgG total foi observada no período inicial da infecção, mas que desapareceu aos seis meses pós infecção (Osorio et al. 2003).

Investigando a resposta imune a diferentes concentrações do inóculo (10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis*) foi demonstrado que, na fase crônica, os animais infectados com o menor inóculo (10^4) desenvolveram lesões menores e menor dano tecidual, embora não houvesse diferença em termos de carga parasitária final, níveis de IgG ou expressão de IFN- γ e IL-10 em comparação com os animais infectados com os inóculos de 10^5 e 10^6 parasitos (Ribeiro-Romão et al. 2014). Esses achados levaram a hipótese de que a resposta imunológica inicial induzida pode ser dependente da concentração do inóculo e que na fase inicial da infecção, durante a resposta imunológica inata, é determinado o estabelecimento e a magnitude da resposta imune adaptativa, o que determina o desfecho da doença crônica. Existe também a hipótese de que haja um limite de quantidade de macrófagos infectados ou de parasitos liberados na derme, que não foi atingido na fase inicial em animais infectados com inóculos menores. Esse período inicial foi caracterizado como uma “fase silenciosa” da infecção, observando-se em camundongos infectados com *L. major* que havia uma fase anterior ao surgimento das lesões (entre quatro e cinco semanas de infecção), caracterizada pelo aumento

da carga parasitária, porém sem manifestação da doença ou alteração histopatológica (Belkaid et al. 2000).

1.5 Resposta imune inicial na leishmaniose tegumentar Americana

O controle bem sucedido da infecção por *Leishmania* depende principalmente da capacidade do sistema imune de direcionar a resposta aos sítios de infecção. Dessa forma, citocinas e, particularmente, quimiocinas são essenciais nesse processo, atuando como moduladoras da resposta imune. No entanto, nos últimos anos, tem-se evidenciado a importância da imunidade inata, sendo sugerido por alguns autores que eventos ocorridos nos primeiros momentos de infecção podem ser determinantes no estabelecimento e desenvolvimento da infecção (Conceição-Silva et al. 2014).

Os parasitos do gênero *Leishmania* utilizam a pele como porta de entrada no organismo do hospedeiro, através da picada do inseto vetor. Assim, a pele desempenha um importante papel na imunopatogênese da LC, atuando não só como apenas uma barreira física, mas também como um órgão imunológico muito importante. A epiderme, a camada mais externa da pele, forma a interface com o ambiente exterior e é composta principalmente de queratinócitos. A derme subjacente é formada predominantemente por fibroblastos e matriz extracelular. Esta é innervada e altamente vascularizada com vasos sanguíneos e linfáticos, fornecendo nutrientes necessários para a homeostase epidérmica (Nylén & Eidsmo, 2012). Após a invasão parasitária, os componentes imunes inatos da pele induzem duas vias de respostas: o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão e a ativação da resposta imune adaptativa (Conceição-Silva et al. 2014).

A resposta imune ao parasito no local da inoculação envolve diferentes componentes do sistema imune, como fatores do sistema complemento, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos, macrófagos e células dendríticas (Papadogiannakis & Koutinas, 2015). Deste modo, a atuação conjunta do sistema imune inato com o sistema imune adaptativo culmina com a eliminação do parasito e com a indução de reparação tecidual e cura das lesões (Baldwin et al. 2007). Pacientes com lesões tardias (aproximadamente 60 dias de doença, lesão ulcerada) apresentam um infiltrado inflamatório mais exuberante em comparação com os pacientes com lesões precoces (aproximadamente 15 dias de doença, lesão não ulcerada) e, embora tanto as lesões precoces como tardias apresentem infiltrado predominantemente

mononuclear, as lesões precoces apresentam maior quantidade de neutrófilos e eosinófilos (Faria et al. 2009). Geralmente, os eosinófilos não estão implicados na resposta imune contra protozoários, porém, evidências crescentes suportam o envolvimento dessas células na infecção por *Leishmania*. Estudos *in vitro* verificaram que eosinófilos são quimioatraídos por promastigotas *L. amazonensis*. *In vivo*, demonstrou-se o recrutamento de eosinófilos para o sítio de infecção por *L. amazonensis* e *L. major*. Durante as primeiras horas de infecção por *L. mexicana*, os eosinófilos são encontrados no tecido juntamente com mastócitos normais e degranulantes, sugerindo um papel na remoção dos parasitos. Também já foi demonstrado que os eosinófilos têm atividade antimicrobiana contra os promastigotas de *L. mexicana* e *L. donovani* (revisto por Rodríguez & Wilson, 2014).

Embora os macrófagos sejam a principal célula hospedeira para *Leishmania*, os monócitos, as células dendríticas (DC) e os neutrófilos recrutados para o local da infecção também são parasitados, desempenhando papéis importantes e distintos na resposta imunológica ao patógeno (Scott & Novais 2016).

Os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção e os parasitos depositados na derme são imediatamente capturados pelos neutrófilos infiltrantes (Peters et al. 2008). Os monócitos e macrófagos formam a segunda onda de células infiltrantes e, dentro de dois dias após a infecção, os parasitos são encontrados principalmente nas células monocíticas (Ribeiro-Gomes et al. 2004, van Zandbergen et al. 2004, Peter et al. 2007). Os monócitos são recrutados do sangue para as lesões e são eficientes na morte de parasitos através da produção de espécies reativas de oxigênio. Essas células também se diferenciam em DCs, migram para os linfonodos e promovem a diferenciação de células Th1, produzindo IL-12 (Scott & Novais 2016).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue e desempenham um papel crucial na resposta imune inata. Eles são as primeiras células a chegar ao local da infecção, sendo que já se demonstrou que durante as duas horas iniciais de infecção, os neutrófilos que se acumulam no local de inoculação de *L. major* fagocitam prontamente os parasitos. Dessa maneira, durante as primeiras 18 horas de infecção, a maioria das células infectadas é de neutrófilos, sendo, portanto, esses as primeiras células hospedeiras (Peters et al. 2008). Estas células são dotadas de potentes mecanismos microbicidas. Um desses mecanismos é a liberação de um arcabouço de cromatina associado a diferentes proteínas granulares intracelulares,

denominadas armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). *Leishmania* induz a liberação das NETs em apenas 10 minutos após a interação neutrófilo-parasito (Rochael et al. 2015). Além disso, os neutrófilos secretam citocinas como IFN- γ e TNF, e quimiocinas responsáveis pelo recrutamento e ativação de DCs, macrófagos e linfócitos B (Nathan, 2006). Os neutrófilos sofrem apoptose em locais inflamatórios e são ingeridos por macrófagos (Savill et al. 1989, Lagasse & Weissman 1994). Assim, a fagocitose de neutrófilos apoptóticos inibe a liberação de mediadores inflamatórios (Savill et al. 1989), tais como IL-1 β , IL-8, TNF, entre outros, e, em contrapartida, a produção de TGF β é aumentada (Fadok et al. 1998). O TGF β é importante na reparação e manutenção da homeostase tecidual, mas inibe a ativação macrofágica, favorecendo o crescimento dos parasitos (Barral-Netto et al. 1992, Lopes et al. 2000, Maspi et al. 2016). Acredita-se que uma vez que os neutrófilos funcionam como células hospedeiras intermediárias e sendo fagócitos de curta duração, possam atuar como verdadeiros “cavalos de Tróia”, podendo ser “usados” pelos parasitos para entrarem silenciosamente no interior do macrófago, sem que haja a ativação do mesmo (Laufs et al. 2002; van Zandbergen et al. 2004).

Uma vez que os macrófagos são recrutados, eles fagocitam parasitos livres e neutrófilos apoptóticos e tornam-se as células hospedeiras definitivas do parasito, bem como as principais células efetoras responsáveis pela destruição dos mesmos (Liu & Uzonna 2012). Entre 48 horas e sete dias após a infecção, a proporção de neutrófilos infectados diminui e macrófagos tornam-se as células infectadas predominantes (Peters et al. 2008). Os macrófagos produzem diversos mediadores inflamatórios como TNF (desempenha papel crucial na redução da carga parasitária através do aumento da atividade macrofágica e da síntese de NO), IL-12 (citocina essencial para a diferenciação das células Th1), entre outros (Maspi et al. 2016).

A ativação clássica macrofágica é mediada pelos produtos das células Th1 e das células *Natural Killer* (NK), principalmente o IFN- γ , que estimula os macrófagos a expressar a enzima iNOS, culminando na produção de NO (Liew et al. 1990), uma molécula tóxica que possui uma importante ação microbicida. Na ausência de IFN- γ ou de produtos microbianos tais como LPS, a iNOS, bem como seus transcritos são indetectáveis nos macrófagos (Santos et al. 2006), sugerindo um papel crucial do IFN- γ na ativação desses fagócitos. É interessante citar também que linhagens de camundongos normalmente resistentes à infecção por *L. major*, tornam-se altamente susceptíveis quando são deficientes de iNOS, apesar de desenvolverem

forte resposta Th1 (Seger & Krebs1995, Stenger et al. 1996). Em oposição à ativação clássica, a ativação alternativa dos macrófagos é induzida por citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-13 (Gordon, 2003). Foi demonstrado que a biossíntese de poliaminas induzida por IL-4 (através da regulação positiva da arginase) favorece a sobrevivência de *L. major* em macrófagos (Kropf et al. 2005). Este achado reforçou a noção de que a arginase codificada pela *Leishmania* é um fator de virulência e a sua expressão promove a inibição dos macrófagos favorecendo a sobrevivência parasitária (Iniesta et al. 2002, Kropf et al. 2005).

No modelo de infecção experimental camundongo/*L. major*, nenhuma alteração patológica aparente na epiderme ocorre durante esta fase aguda e precoce da infecção. Após a inflamação aguda inicial, se segue uma fase caracterizada como “silenciosa”, que teria duração de 4 a 5 semanas, que favorece a replicação do parasito na derme, porém ainda sem desenvolvimento de lesão. A fase silenciosa é seguida de extensa inflamação tecidual, culminando no desenvolvimento de uma lesão cutânea associada a uma infiltração aguda de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos na derme, que coincide com a morte dos parasitos no local (Belkaid et al. 2000). Também já foi sugerido que a formação de lesões cutâneas se correlaciona com o desenvolvimento de imunidade adaptativa (Rodríguez & Wilson 2014).

Na infecção experimental por *L. major*, a maior carga parasitária foi observada imediatamente antes do desenvolvimento da lesão e o início do desenvolvimento da patologia correlacionou-se com o aparecimento de células positivas para IL-12 e IFN- γ no compartimento epidérmico (Belkaid et al. 2000). Na LC humana, foi demonstrado, através de estudos conduzidos em pacientes infectados com *L. tropica*, que as maiores cargas parasitárias são encontradas nas lesões precoces (dois meses ou menos), sendo substancialmente mais baixas em infecções crônicas (lesões tardias – dois meses ou mais). Além disso, a expressão gênica intralesional de IL-4 foi significativamente maior em pacientes com lesões precoces, correlacionando-se fortemente com a alta carga parasitária, o que pode estar relacionado a uma inibição de uma resposta imunitária protetora, por essa citocina (Kumar et al. 2009).

A resposta imunológica precoce é importante para determinar se a infecção por *Leishmania* evoluirá para a cura espontânea ou para um curso crônico da doença (Scott & Novais 2016). Além disso, existem evidências crescentes de que o microambiente local durante a fase precoce da infecção fornece os gatilhos iniciais

para a diferenciação subsequente das células TCD4⁺ auxiliares, células efetoras mais importantes durante a resposta contra a infecção por *Leishmania* (Sacks & Noben-Trauth 2002).

Ehrchen e colaboradores (2010) estudaram a expressão gênica diferencial na pele infectada de camundongos resistentes (C57BL/6) e susceptíveis (BALB/c) 16 horas após inoculação de promastigotas de *L. major*. Verificou-se que a epiderme foi a principal fonte de imunomoduladores relevantes para o combate à infecção e a geração de resposta Th1 / Th2, expressos precocemente no local da infecção. Os autores observaram também que a regulação positiva de genes conhecidos por promover a diferenciação de células Th1 (IL-12, IL-1 β , osteopontina) foi significativamente mais forte em camundongos resistentes. Esse mesmo trabalho revelou, ainda, que queratinócitos são uma fonte essencial e precoce de quantidades significativas de IL-12 e IL-1 β em camundongos C57BL/6 infectados por *L. major*. Também já foi demonstrado que a aplicação de IL-12 ou IL-1 α no local da infecção durante os três primeiros dias após a inoculação de *L. major*, foi capaz de promover a diferenciação Th1 e de inibir a progressão da doença em camundongos BALB / c susceptíveis (Von Stebut et al. 2003).

Já é bem estabelecido no modelo murino de infecção por *L. major* que algumas linhagens de camundongos desenvolvem resistência mediada por células Th1, com predominância de IFN- γ , IL-12 e TNF, que leva à cura das lesões e proteção contra reinfecções, ao passo que outras linhagens desenvolvem uma resposta do tipo Th2, com predominância de IL-4, IL-5 e IL-10 e são extremamente susceptíveis à infecção, desenvolvendo infecção grave, visceralizante e muitas vezes fatal (Ehrchen et al. 2010, Scott & Novais, 2016). No entanto, esse modelo Th1 x Th2 não é tão bem caracterizado na leishmaniose humana, em virtude de sua complexidade (Reis et al. 2006, Conceição-Silva et al. 2014), bem como em alguns modelos experimentais de leishmaniose visceral (Melby et al. 2001). Em casos humanos ocorrem os dois tipos de resposta, com predominância de resposta do tipo 1 nos pacientes com evolução benigna e do tipo 2 naqueles com dificuldades de responder ao tratamento. Os pacientes de leishmaniose mucosa apresentam exacerbados ambos os tipos de resposta, o que parece estar relacionado à gravidade das lesões (revisto por Conceição-Silva et al. 2014).

As DCs dérmicas iniciam a resposta imune antígeno-específica a *Leishmania* e são a principal fonte de IL-12. Essas células tem um papel importante no

reconhecimento, captação, processamento e apresentação antigênica às células T, transportando componentes estranhos da pele infectada para os linfonodos drenantes para, então, iniciar respostas imunes. As DCs epidérmicas e dérmicas também têm importantes funções de evitar e controlar danos teciduais (Nylén & Eidsmo 2012, Scott & Novais 2016). Conforme citado anteriormente, as células CD4⁺ Th1 são essenciais para o controle do parasito, pois após a infecção estas células são recrutadas para as lesões cutâneas onde produzem IFN- γ , que ativará os macrófagos.

As células T CD8⁺ também podem modular a resposta imune adaptativa precoce direcionada para *Leishmania*, produzindo IFN- γ nos linfonodos (Scott & Novais 2016). Por outro lado, Faria e colaboradores (2009) observaram um aumento de cinco vezes de células TCD8⁺ nas lesões de pacientes em estágios tardios (aproximadamente 60 dias de doença, lesão ulcerada) em comparação com as lesões de pacientes em estágios precoces (aproximadamente 15 dias de doença, lesão não ulcerada) de LC. Os autores verificaram, ainda, que as percentagens de células CD4⁺ foram ligeiramente mais elevadas em pacientes com lesão tardia. Da-Cruz e colaboradores (2005) também verificaram uma correlação positiva entre o tempo de evolução das lesões e o percentual de células TCD8⁺ e também de células TCD4⁺, sugerindo que o recrutamento de células TCD8⁺ esteja envolvido na progressão da lesão na LC humana. Por outro lado, as percentagens de células positivas para IFN- γ e IL-10 foram mais elevadas nas lesões tardias do que nas precoces, sugerindo a associação do IFN- γ com a progressão da doença, ao mesmo tempo em que o aumento da expressão de IL-10 em fases mais tardias da LC pode ser importante para o controle da resposta inflamatória e posterior cicatrização da lesão, considerando o fato de que, pacientes com LM não respondem a IL-10, apresentando, dessa forma, inflamação mais intensa do que os pacientes com LC (Gaze et al. 2006).

2 Justificativa

Nos últimos anos, alguns autores têm sugerido que eventos ocorridos nas fases mais precoces da infecção podem ter grande influência no estabelecimento da infecção podendo determinar, inclusive, se esta última evoluirá para a cura espontânea ou para um curso crônico de doença. Nesse cenário, o estudo em modelos experimentais se mostra extremamente importante, uma vez que a avaliação dos primeiros momentos de infecção é difícil de ser realizado em seres humanos, já que, normalmente, o paciente procura o serviço de saúde quando a doença já está estabelecida.

Nosso grupo demonstrou a reprodutibilidade da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster (Gomes-Silva et al. 2013) e investigou a resposta imune a diferentes concentrações do inóculo (10^4 , 10^5 e 10^6) (Ribeiro-Romão et al 2014). Como esperado, na fase crônica (105 dias após a infecção), os animais infectados com o menor inóculo (10^4) desenvolveram lesões mais benignas em comparação aos demais. Curiosamente, os animais infectados com os inóculos de 10^5 e 10^6 parasitos tiveram curso clínico semelhante, apesar da grande diferença de número de parasitos existente entre os dois inóculos. Além disso, não houve diferença, entre os três grupos, em termos de carga parasitária final, níveis de IgG e expressão de IFN- γ e IL-10. Esses achados levaram a hipótese de que a resposta imunológica inicial induzida pode ser dependente da concentração do inóculo e que na fase inicial da infecção, durante a resposta imunológica inata, é determinado o estabelecimento e a magnitude da resposta imune adaptativa, o que direciona o desfecho da doença crônica. Com isso, o presente trabalho propõe a investigação de etapas precoces da infecção, levando em consideração sua grande relevância (já discutida anteriormente), além de uma tentativa de elucidar os fenômenos anteriormente observados.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Descrever as alterações imunopatológicas que ocorrem nas fases mais precoces de lesões cutâneas no modelo hamster causadas pela infecção por *L. braziliensis* e analisar diferenças no perfil inflamatório induzidas por diferentes concentrações do inóculo.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Descrever a dinâmica de formação do infiltrado inflamatório em termos de alterações da arquitetura da derme e da epiderme, através de estudos histopatológicos.
- ✓ Avaliar se a indução da resposta humoral, por quantificação de anticorpos IgG anti – *Leishmania*, nas fases mais precoces da infecção, é modulada pela carga infectiva.
- ✓ Avaliar se o perfil de expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imune da leishmaniose tegumentar, induzido na fase precoce da infecção exerce influencia na evolução da lesão em termos de tamanho e de grau de parasitização, através da técnica PCR em tempo real.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parasitos

Para as avaliações propostas neste estudo foi utilizada a cepa Thor de *L. (V.) braziliensis*, provenientes do mesmo lote de congelamento, cuja infectividade foi mantida através de passagens sucessivas em hamster (*M. auratus*). Foram utilizados parasitos mantidos até a terceira passagem. Os parasitos foram cultivados em meio Schneider (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, EUA) acrescido de L-glutamina (1mM/ml), antibiótico (penicilina: 200u/ml; estreptomicina: 200µg/ml), soro fetal bovino (20%) (Cultilab, Campinas, BR) e 2% de urina humana masculina filtrada, em temperatura de 27°C até atingirem a fase estacionária de desenvolvimento.

4.2 Animais

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA-Fiocruz) sob licença número IOC 032/15. Utilizou-se hamsters (*M. auratus*) do sexo feminino, com idade entre 6 e 8 semanas e peso aproximado de 90 g, oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) – FIOCRUZ (RJ).. Os animais foram alocados no biotério de experimentação animal do Pavilhão Carlos Chagas IOC/Fiocruz, em gaiolas apropriadas para hamsters em número de quatro animais por gaiola. Foram realizados dois experimentos independentes, sendo que cada experimento foi constituído por 44 animais divididos em 5 grupos experimentais (n=4 animais por grupo) de acordo com os momentos da infecção investigados, para cada inóculo utilizado, além dos grupos controles não-infectados.

- Grupo 1: controle não infectado (15 dias) - n = 4;
- Grupo 2: controle não infectado (50 dias) - n = 4;
- Grupo 3: 15 dias após infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitos - n = 12;
- Grupo 4: 30 dias após infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitos - n = 12;
- Grupo 5: 50 dias após infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitos - n = 12.

4.3 Infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*:

Após o período de adaptação e aclimatação dos animais (1 semana), estes foram inoculados no dorso da pata posterior direita com formas promastigotas de *L.braziliensis* na fase estacionária de crescimento, suspensas em PBS (phosphate buffer saline) estéril, nas concentrações de 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas por inóculo, num volume de 30µl por via intradérmica, com o auxílio de seringa e agulha *Ultra-fine* de 8 mm x 0,3 mm (30 G) (Becton, Dickinson and Company, EUA).

4.4 Morfometria das lesões cutâneas causadas por infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Para acompanhamento da evolução das lesões cutâneas após a infecção, procedeu-se, semanalmente, a coleta dos dados de morfometria das patas. Para tanto, foi realizada a mensuração da espessura da pata inoculada, com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Brasil). A pata contralateral não inoculada também foi mensurada para que fosse obtida, por diferença das medidas, a espessura da lesão gerada pela infecção.

4.5 Eutanásia:

A eutanásia dos animais foi realizada pela administração de medicações pré-anestésicas associadas: Cloridrato de Cetamina e Cloridrato de Xilazina (nas doses de 200mg/Kg e 10mg/Kg, respectivamente), injetadas por via intraperitoneal no abdômen inferior quadrante esquerdo, com o auxílio de uma seringa de 1 ml e agulha de 24G (12 mm), inserida em um ângulo de 45°. Após a sedação dos animais, foi injetado Tiopental Sódico na dose de 150 mg/Kg, também por via intraperitoneal. A morte do animal foi confirmada pela parada cardíaca.

4.6 Análise histopatológica

Fragmentos de pele obtidos do local de inoculação foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% e, posteriormente, incluídos em O.C.T. (ornithine

carbamyl transferase compound; Tissue Tek, Illinois, EUA) e armazenados em Ultrafreezer (-80°C). Os tecidos congelados foram cortados na espessura de 5 µm em criostato (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), na temperatura média de -22°C. Os cortes foram aderidos em lâminas de vidro silanizadas (DakoCytomation, Carpinteria, CA, EUA) e então corados por 20 minutos com Hematoxilina de Mayer (Merck) e por 2 minutos em Eosina (Merck), com posterior desidratação em concentrações crescentes de álcool e diafanização em três banhos de xilol para posterior montagem com lamínula. As análises foram feitas em microscópio de luz em objetivas de 20, 40 e 100 X pela avaliação semiquantitativa em scores (intensidade de ocorrência) de alterações histopatológicas, variando desde a não ocorrência (score=0), leve (score=1), moderada (score=2) e intensa ocorrência (score=3) (Yang et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014). As seguintes alterações histopatológicas foram avaliadas: presença de infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão de vasos, macrófagos vacuolizados, amastigotas, granuloma, necrose e Corpúsculos de Shaumann.

4.7 Quantificação de Imunoglobulinas anti-*Leishmania*

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

Os níveis de anticorpos IgG total anti-*Leishmania* foram quantificados em amostras de plasma por Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Para esta avaliação, antígeno solúvel de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) (40µg/ml) foi adicionado (50µl/poço) em placas de 96 poços de poliestireno (Nunc-immuno Plate, Roskilde, Dinamarca) e incubadas *overnight* em câmara úmida. Após as lavagens, foi adicionado 50µl/poço de amostras de plasma diluídos (1:50) de animais infectados e controles negativos (animais não infectados), em duplicata e as placas foram incubadas à temperatura ambiente. Foi utilizado o anticorpo conjugado anti-

IgG de hamster biotilado(1:5000) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), streptoavidina-peroxidase; e o cromógeno solúvel OPD (Invitrogen, EUA). Os resultados foram obtidos por espectrofotometria em absorvância de 490nm e expressos em índice ELISA, obtido pela razão entre a média das absorvâncias das amostras e a média das absorvâncias dos controles negativos. A linha de corte foi determinada pela curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) baseado na melhor relação entre sensibilidade e especificidade.

4.8 Ensaio de PCR em tempo real

4.8.1 Extração de ácidos nucleicos e transcrição reversa

Os fragmentos de pele obtidos do local da infecção foram conservados em RNA later (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e armazenados em freezer (-20°C) até o momento da extração dos ácidos nucleicos. Para obtenção do RNA, as amostras de tecido foram lisadas em 1 ml de Trizol[®] (Life Technologies, California, EUA), com auxílio do homogeneizador de tecidos Ultra-Turrax Dispenser (IKA, Wilmington, EUA). Os lisados de tecido foram tratados com Proteinase K (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) a 56°C por 30 minutos. Após a adição de 200µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas, para a separação das fases orgânica e aquosa. O RNA total foi extraído a partir da fase aquosa, utilizando o RNeasy mini Kit (Qiagen, Austin, Texas, EUA), conforme as especificações do fabricante. Após remoção da fase aquosa, a precipitação sequencial com etanol extraiu o DNA a partir da fase orgânica, para quantificação da carga parasitária. O DNA foi precipitado em 0,3 ml de etanol a 100%. Após precipitação por centrifugação, o DNA foi lavado duas vezes em 1 ml de solução de citrato de sódio (0,1 M) em etanol a 10% (com intervalo de 30 minutos entre cada lavagem). Em seguida, o DNA foi lavado em 1,5 ml de etanol a 75%, e o pellet foi seco ao ar e dissolvido em 400 µl de solução de hidróxido de sódio (8 mM). O RNA e DNA foram armazenados a -80 ° C e -20 ° C, respectivamente até a sua utilização. O RNA foi quantificado por espectrofotometria no Picodrop P200 (Astranet Systems, UK) e, posteriormente, tratado com DNase I (Promega Corporation, Madison WI, EUA). A transcrição reversa foi realizada a partir de 2,0 µg de RNA tratado, utilizando o *High Capacity Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme especificações do fabricante. O

cDNA resultante foi dosado por fluorimetria, no equipamento Quibit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA), utilizando o kit *single strand* DNA (ssDNA).

4.8.2 Análise da expressão gênica

A quantificação da expressão gênica por RT-qPCR foi previamente padronizada por nosso grupo para sequências de citocinas e moléculas já descritas para a espécie (*M. auratus*) e consideradas importantes na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar humana, listadas a seguir: IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-10, arginase, iNOS, IL-4, IL-6 e os genes de referência GAPDH e γ -Actina, através do método do Ct comparativo ($\Delta\Delta$ Ct), utilizando iniciadores já descritos na literatura (Ribeiro-Romão et al 2016). (Tabela 1).

Para a reação de PCR em Tempo Real, para cada alvo foram utilizados 20ng de cDNA (10ng/ μ l) por poço, utilizando Power SYBR Green[®] PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), em volume final de 10 μ l por poço, em duplicata. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços, no equipamento ViiA[™] 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), que integra a plataforma PDTIS/FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), em colaboração com o Dr. Otacilio Moreira (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas - IOC/FIOCRUZ). As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da presença de um único pico nas curvas de dissociação. Os iniciadores foram utilizados nas concentrações 100nM Fw X 100nM Rv, exceto IL-4, que foi utilizado 200nM X 200nM. Os resultados foram expressos em $2^{-\Delta\Delta$ Ct (*fold change*), e amostras provenientes de animais controles (não infectados) foram utilizadas como calibradores.

Tabela 1 – Alvos e seqüências de iniciadores utilizados para quantificação de citocinas, iNOS e arginase de hamster utilizados nos ensaios de RT-qPCR em Tempo Real.

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

4.8.3 Quantificação da carga parasitária

A mensuração da carga parasitária por qPCR foi realizada por quantificação absoluta, com base numa curva padrão produzida a partir da contaminação artificial com formas promastigotas de *L. braziliensis*. de amostra de fragmento de pele de hamster (não infectado). Para isso, à 3 mg de pele obtida do dorso da pata posterior direita do hamster foi adicionado 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*, e o DNA de ambos foi extraído como descrito anteriormente. Diluições seriadas de 1:10 foram feitas com tampão Tris-EDTA (TE) para produzir os sete pontos da curva padrão variando de 10^5 a 0,5 equivalentes de parasitas, e de 3 a 3×10^{-6} mg equivalentes de pele, respectivamente. Para a quantificação do parasito, foram utilizados iniciadores que amplificam a região conservada dos minicírculos de kDNA (O kDNA representa a informação genética mitocondrial dos kinetoplastídeos), a 50 nM e 50 nM (iniciadores direto e inverso, respectivamente) e iniciadores que amplificam o gene de referência GAPDH, a 100 nM e 100 nM. Antes do ensaio qPCR, amostras de DNA de hamster foram diluídas 1: 500 para

melhor adaptarem-se a curva padrão do parasita. As reações foram realizadas no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que integra a plataforma PDTIS/FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), em colaboração com o Dr. Otacilio Moreira (LABIMDOE - IOC/FIOCRUZ), com 5 µl do Power SYBR Green® PCR Master Mix (Life Technologies, CA, EUA), em um volume final de 10 µl por poço. As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 64°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C. Os resultados foram obtidos a partir da razão kDNA/GAPDH e expressos em equivalentes de parasitas/mg de tecido.

4.9 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Grupos experimentais foram comparados utilizando teste ANOVA. Testes paramétricos ou não paramétricos foram selecionados de acordo com a distribuição dos dados, seguidos pela aplicação de pos testes de múltiplos grupos, quando apropriado. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil. Diferenças estatísticas significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Morfometria das lesões cutâneas causadas por infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

O acompanhamento da evolução das lesões cutâneas após a infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* procedeu-se semanalmente através da morfometria das patas, onde o tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre a pata infectada e a pata contralateral não infectada do mesmo animal. O aspecto clínico final das lesões foi definido como pápula, lesão nodular, ou lesão nodular ulcerada (esta última indica maior dano tecidual) (figura 3C). Na cinética de evolução das lesões cutâneas, representada na figura 3A, podemos observar que diferenças de evolução mais expressivas entre os três inóculos começam a surgir após os 20 dias de infecção e que as lesões causadas pelos inóculos 10^5 e 10^6 apresentam evolução bastante similar. Além disso, foi observado que o tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional à concentração de parasitas do inóculo: os animais infectados com 10^4 promastigotas apresentaram maior tempo de início das lesões (média = $28,6 \pm 4,9$ dias após a infecção) do que os animais infectados com 10^5 (média = $23,2 \pm 5,4$ dias após a infecção) ou 10^6 parasitas (média = $20,5 \pm 6,6$ dias após a infecção). Houve diferença estatística significativa entre os inóculos 10^4 e 10^6 ($p < 0,05$) (figura 3B).

Aos 15 dias pós-infecção um único animal infectado com 10^6 parasitos apresentou edema no local da inoculação e somente um animal, também infectado pelo inóculo 10^6 apresentou lesão nodular (12,5%). Não foram observados sinais de lesão nos demais animais, em nenhum dos inóculos analisados. As médias das mensurações das patas infectadas foram de $0,17 \pm 0,08$ mm para o inóculo de 10^4 ; $0,20 \pm 0,10$ mm para o inóculo de 10^5 e $0,20 \pm 0,16$ para o inóculo de 10^6 (média e desvio padrão, respectivamente). Não houve diferença estatística significativa entre os três inóculos, em relação ao tamanho das patas (figura 4A).

Aos 30 dias pós-infecção, a maioria dos animais infectados com o inóculo de 10^4 parasitos não desenvolveu lesão, com exceção de um único animal, que apresentou edema no local de inoculação. Os demais animais infectados com 10^5 parasitos e todos os animais infectados com 10^6 parasitos apresentaram lesão. Foi registrado um aumento de pata médio de $0,39 \pm 0,21$ mm para o inóculo de 10^4 , de $0,44 \pm 0,19$ mm para o inóculo de 10^5 e de $0,64 \pm 0,26$ mm para o inóculo de 10^6 . Não

houve diferença estatística significativa entre os inóculos em relação ao tamanho das patas (figura 4B). Em relação ao aspecto clínico das lesões, dos oito animais infectados com o inóculo 10^4 (quatro por experimento), dois (25%) apresentaram apenas edema no local da inoculação, dois animais (25%) apresentaram lesões nodulares e quatro (50%) permaneceram sem lesão. Dos oito animais infectados com 10^5 parasitas, apenas um animal (12,5%) persistiu sem lesão, quatro (50%) desenvolveram apenas uma pápula no local da inoculação e três animais (37,5%) desenvolveram lesões nodulares. Todos os animais infectados com o inóculo 10^6 apresentaram lesão, sendo que cinco animais (62,5%) apresentaram lesões nodulares, dois animais (25%) apresentaram pápula e um animal (12,5%) desenvolveu lesão nodular e ulceradas (tabela 2).

Aos 50 dias após a infecção, observou-se que os tamanhos de lesão dos animais infectados com 10^4 parasitas foram significativamente menores quando comparados com 10^5 ($p < 0,05$) e 10^6 parasitas ($p < 0,001$) (figura 4C). Houve uma média de aumento de pata de $0,47 \pm 0,54$ para o inóculo de 10^4 ; de $1,18 \pm 0,40$ para o inóculo de 10^5 e de $1,56 \pm 0,44$ para o inóculo de 10^6 . Em relação ao aspecto clínico das lesões, dos oito animais infectados com o inóculo 10^4 , três animais (37,5%) não desenvolveram lesão, dois animais (25%) apresentaram pápula, dois (25%) apresentaram lesões nodulares e um animal (12,5%) desenvolveu lesão nodular e ulcerada. Em relação aos animais infectados com 10^5 parasitas, todos desenvolveram lesão, sendo que seis animais (75%) desenvolveram lesões nodulares e dois (25%) desenvolveram lesões nodulares e ulceradas. Assim como no inóculo de 10^5 , todos os animais infectados com o inóculo 10^6 desenvolveram lesão. Desses animais, quatro (50%) apresentaram lesões nodulares e quatro (50%) apresentaram lesões nodulares e ulceradas (tabela 2).

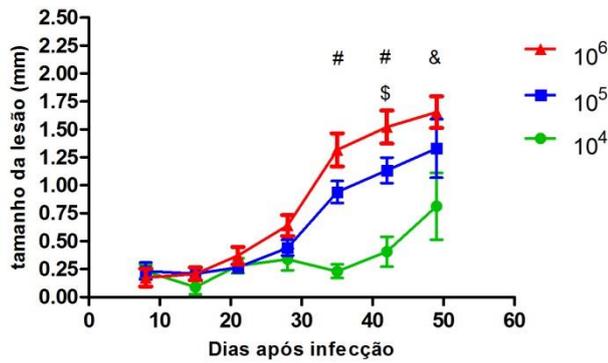
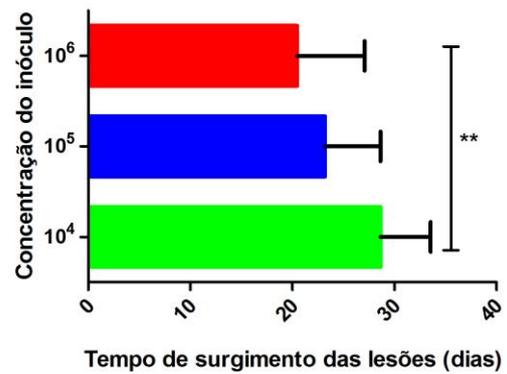
A**B****C**

Figura 3: Avaliação de lesões de pele de hamster dourado após infecção por promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em três diferentes concentrações de inóculo (10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas). O tamanho das lesões foi definido pela diferença de espessura dorsal-ventral entre a pata infectada e a contralateral não infectada (expresso em milímetros). Os gráficos representam dois experimentos independentes ($n=72$). (A) Cinética de desenvolvimento das lesões cutâneas ao longo de 50 dias após a infecção (média e erro padrão; # representa $p < 0,001$ comparando os inóculos 10^4 e 10^5 , \$ representa $p < 0,05$, comparando os inóculos 10^5 e 10^6 , & representa $p < 0,001$ comparando 10^4 e 10^5). (B) Tempo para início de surgimento das lesões clínicas cutâneas para cada inóculo, expressas em dias após a infecção (Média \pm DP, ** $p < 0,01$). (C) Aspectos clínicos finais das lesões (1 - lesão nodular, 2 - lesão nodular e ulcerada).

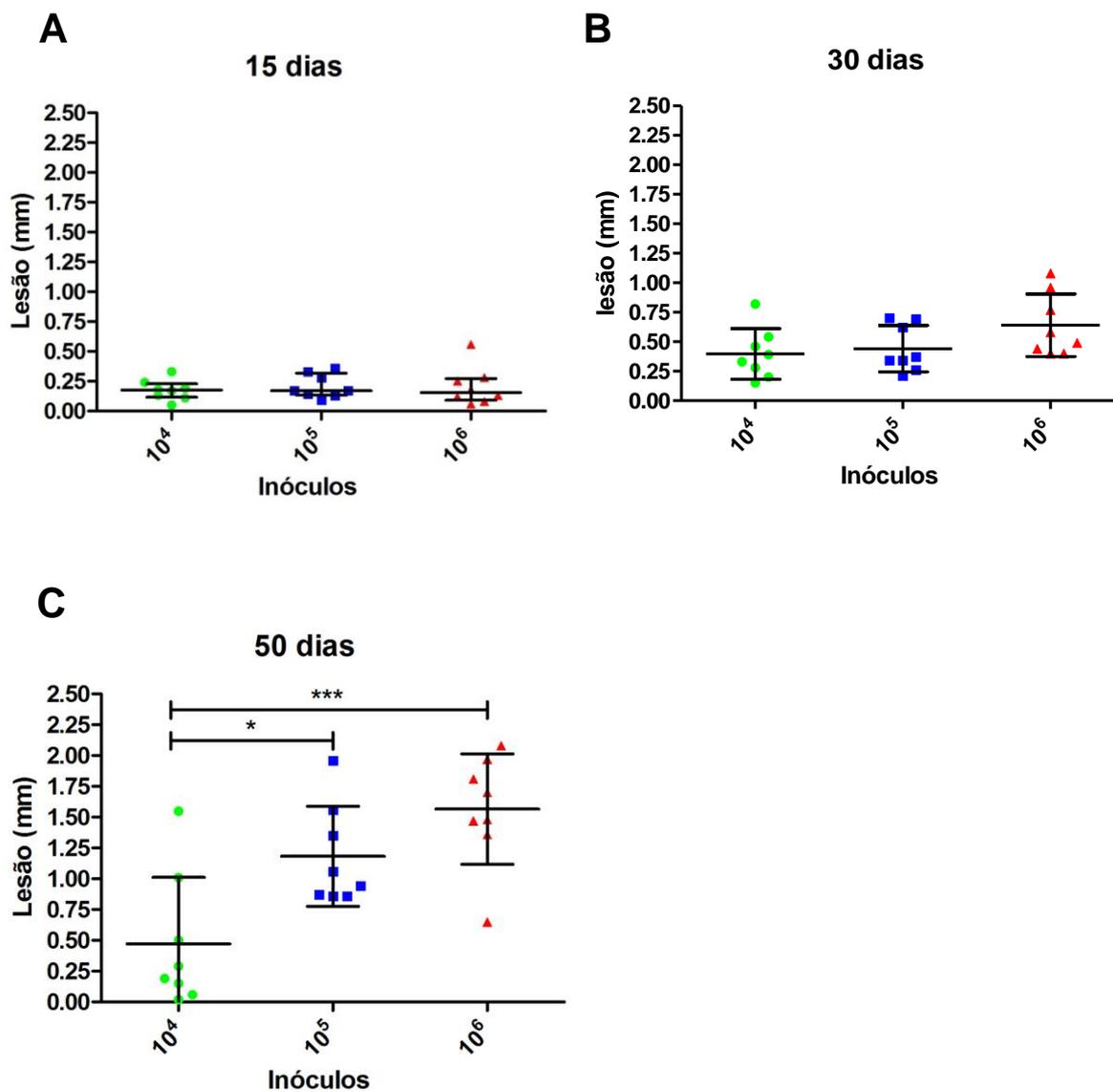


Figura 4: Medidas finais da lesão cutânea aos 15 (A), 30 (B) e 50 (C) dias após a infecção por diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6). O tamanho das lesões foi dado pela diferença de espessura dorsal-ventral entre a pata infectada e não infectada e expresso em milímetro. Gráficos relativos a dois experimentos independentes (n=72). Cada símbolo corresponde a um animal e as linhas horizontais representam a média e o desvio padrão. (*p<0,05; ***p<0,001, ANOVA).

Tabela 2 - Aspecto clínico final das lesões dos hamsters, após 15, 30 e 50 dias após a infecção por diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6).

Tempo após a infecção	Aspecto clínico final das lesões								
	Pápula			Nodular			Nodular e ulcerada		
	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6	10^4	10^5	10^6
15 dias	-	-	-	-	-	12,5%	-	-	-
30 dias	-	50%	25%	25%	37,5%	62,5%	-	-	12,5%
50 dias	25%	-	-	25%	75%	50%	12,5%	25%	50%

Legenda: percentuais calculados considerando n = 8 animais por grupo (2 experimentos independentes). Animais com edema ou sem sinal de lesão estão representados por (-).

5.2 Análise temporal das alterações histopatológicas da pata decorrentes da infecção em lesão de pata de hamster infectado com três diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Aos 15 dias após a inoculação de 10^4 formas promastigotas de *L. braziliensis*, a derme dos animais inoculados apresentou, como única alteração histopatológica, uma discreta hemorragia na derme profunda (em todos os animais analisados). Nesse mesmo período pós-inoculação, os animais infectados com 10^5 parasitos apresentaram, além da hemorragia, a presença de infiltrado inflamatório discreto. Por sua vez, nos animais inoculados com 10^6 parasitos, foram observados nesse período pós-inoculação, a presença de hemorragia e congestão de vasos na derme profunda, além de infiltrado inflamatório discreto (2/4) ou moderado (2/4) (tabela 3). Aos 30 dias de infecção, infiltrado inflamatório discreto (4/4) e hemorragia e congestão dos vasos (3/4) foi observado nos animais inoculados com 10^4 , enquanto os animais infectados com o inóculo de 10^5 exibiram infiltrado inflamatório moderado (3/4) além de hemorragia e congestão de vasos. Os animais inoculados com 10^6 parasitos também apresentaram hemorragia e congestão de vasos, além de intensidades variadas de infiltrado inflamatório, variando de leve (1/4), moderado (1/4) a intenso (2/4). Em três de quatro animais, foi observada a presença de formas

amastigotas de *Leishmania* (tabela 3). Finalmente aos 50 dias de inoculação, os animais inoculados com 10^4 parasitos permaneceram com discreto infiltrado inflamatório e moderada hemorragia e congestão de vasos, enquanto nos animais inoculados com 10^5 parasitos foi observado, além de hemorragia e congestão de vasos, a presença de infiltrado inflamatório, que variou de moderado (1/3) a intenso (2/3). Em dois dos três animais analisados (houve perda de um dos fragmentos de pele), foram observadas amastigotas, de intensidades variando de leve a moderada. Os animais inoculados com 10^6 parasitos mostraram infiltrado intenso (3/4) a moderado (1/4), além da presença de amastigotas em todos os animais analisados, variando de leve (1/4) a moderada presença (3/4). Em nenhum dos inóculos, nos tempos analisados, foi observada a formação de granuloma e também não foram observados corpúsculos de Schaumann (tabela 3).

O gráfico (figura 5) representa os score de intensidade (média e desvio padrão) de ocorrência das alterações histopatológicas analisadas, que aos 15 dias foi de 1,0 ($\pm 0,0$) para o inóculo de 10^4 , 2,25 ($\pm 0,50$) para o inóculo de 10^5 e 3,50 ($\pm 1,29$) para 10^6 (figura 5A). Aos 30 dias após a inoculação, os score foram de 1,75 ($\pm 0,50$) para o inóculo de 10^4 , 3,33 ($\pm 0,58$) para o inóculo de 10^5 e 4,50 ($\pm 1,73$) para o de 10^6 (figura 5B). Já aos 50 dias de inoculação, os score variaram de 2,75 ($\pm 0,50$) para o inóculo de 10^4 , 5,67 ($\pm 0,58$) para o inóculo de 10^5 e 6,25 ($\pm 0,96$) para o de 10^6 (figura 5C). Diferenças estatísticas significativas foram observadas entre os inóculos de 10^4 e 10^6 aos 15 dias de inoculação ($p < 0,05$), entre 10^4 e 10^6 e entre 10^5 e 10^6 ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente), aos 30 e 50 dias de inoculação.

Foi observada correlação positiva entre as alterações histopatológicas e o tamanho das lesões ($n=36$, $r = 0,62$, $p < 0.0001$).

Tabela 3 - Alterações histopatológicas encontradas em pele de hamsters infectados com diferentes inóculos de *Leishmania (V.) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas) em diferentes tempos de infecção (15, 30 e 50 dias).

Tempo após infecção	Inóculo	Hemorragia/Congestão de vasos	Infiltrado inflamatório	Amastigotas
15 dias	10^4	+ (4/4)	-	-
	10^5	+ (2/4) ++(2/4)	+(4/4)	-
	10^6	++ (4/4)	+(2/4) ++(2/4)	-
30 dias	10^4	- (1/4) + (3/4)	+(4/4)	-
	10^5	++ (4/4)	- (1/4) ++ (3/4)	-
	10^6	++ (4/4)	+(1/4) ++(1/4) +++ (2/4)	+ (3/4)
50 dias	10^4	++ (4/4)	+(4/4)	-
	10^5	++ (3/3)	++(1/3) +++ (2/3)	+ (2/3) ++ (1/3)
	10^6	++ (4/4)	++(1/4) +++ (3/4)	+ (1/4) ++ (3/4)

Legenda: Score semiquantitativo das alterações histopatológicas: (-) ausência; (+) leve presença; (++) moderada presença; (+++) intensa presença. Entre parênteses: (número de animais observados/número total de animais analisados).

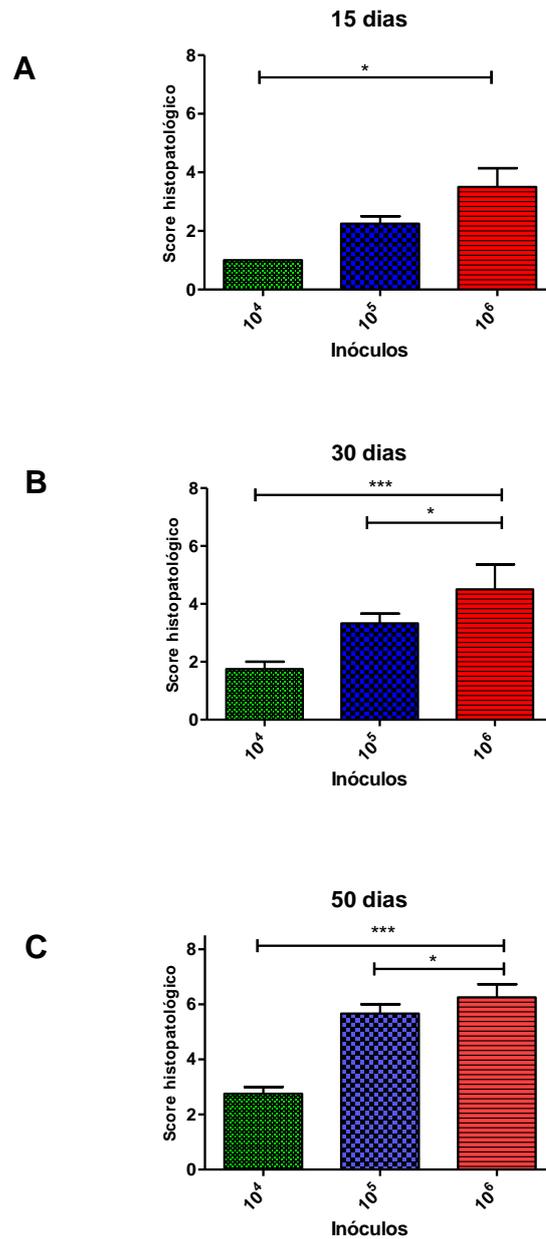


Figura 5: Gráfico representativo das alterações histopatológicas em pele de hamsters infectados com diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10^4 , 10^5 e 10^6 formas promastigotas) aos 15 (A), 30 (B) e 50 (C) dias após a inoculação. Avaliação semiquantitativa em *score* (intensidade de ocorrência) de alterações histopatológicas, variando desde a não ocorrência (*score*=0), leve (*score*=1), moderada (*score*=2) e intensa ocorrência (*score*=3). As seguintes alterações histopatológicas foram avaliadas: presença de infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão de vasos, macrófagos vacuolizados, amastigotas, granuloma, necrose e Corpúsculos de Shaumann. Resultado representativo de um experimento independente (n=36); média e desvio padrão, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

5.3 Quantificação de Imunoglobulinas anti-*Leishmania*

Ao final do acompanhamento da lesão, os níveis de IgG anti-*Leishmania* foram quantificados em amostras de plasma dos animais infectados pelos três inóculos. A linha de corte foi determinada pela curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) baseado na melhor relação entre sensibilidade e especificidade.

Aos 15 dias de infecção não foi observada produção de IgG anti-*Leishmania* em nenhum dos grupos infectados com os diferentes inóculos. As médias dos índices ELISA foram de $0,84 \pm 0,36$ (mediana = 0,84) para o inóculo de 10^4 ; $0,57 \pm 0,20$ (mediana = 0,50) para o inóculo de 10^5 e $0,78 \pm 0,45$ (mediana = 0,75) para o inóculo de 10^6 (figura 6 A).

Aos 30 dias de infecção, os animais infectados por 10^4 e 10^5 parasitos não produziram IgG (exceto um único animal infectado por 10^5). No entanto, a maioria dos animais infectados por 10^6 parasitos já produziram IgG a partir dos 30 dias após a infecção. Foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os inóculos 10^4 e 10^6 ($p < 0,01$). As médias dos índices ELISA foram de $0,59 \pm 0,23$ (mediana = 0,63) para o inóculo de 10^4 ; $1,13 \pm 0,69$ (mediana = 0,92) para o inóculo de 10^5 e $2,89 \pm 2,10$ (mediana = 2,33) para o inóculo de 10^6 (figura 6B)

Aos 50 dias, verificou-se diferença significativa entre os grupos infectados por 10^4 e 10^5 parasitos ($p < 0,05$) e entre os grupos infectados por 10^4 e 10^6 parasitos ($p < 0,05$), não havendo diferença significativa nos níveis de IgG entre os inóculos de 10^5 e 10^6 . As médias dos índices ELISA foram de $2,59 \pm 1,87$ (mediana = 1,79) para o inóculo de 10^4 ; $5,05 \pm 2,02$ (mediana = 6,02) para o inóculo de 10^5 e $5,63 \pm 1,60$ (mediana = 5,32) para o inóculo de 10^6 (figura 6C).

Foi observada uma correlação positiva entre o tamanho de lesão e anticorpos IgG anti-*Leishmania* ($n=72$; $r=0,61$; $p < 0,0001$). Também houve correlação dos níveis de IgG com as alterações histopatológicas ($n=36$, $r= 0,62$, $p < 0,002$).

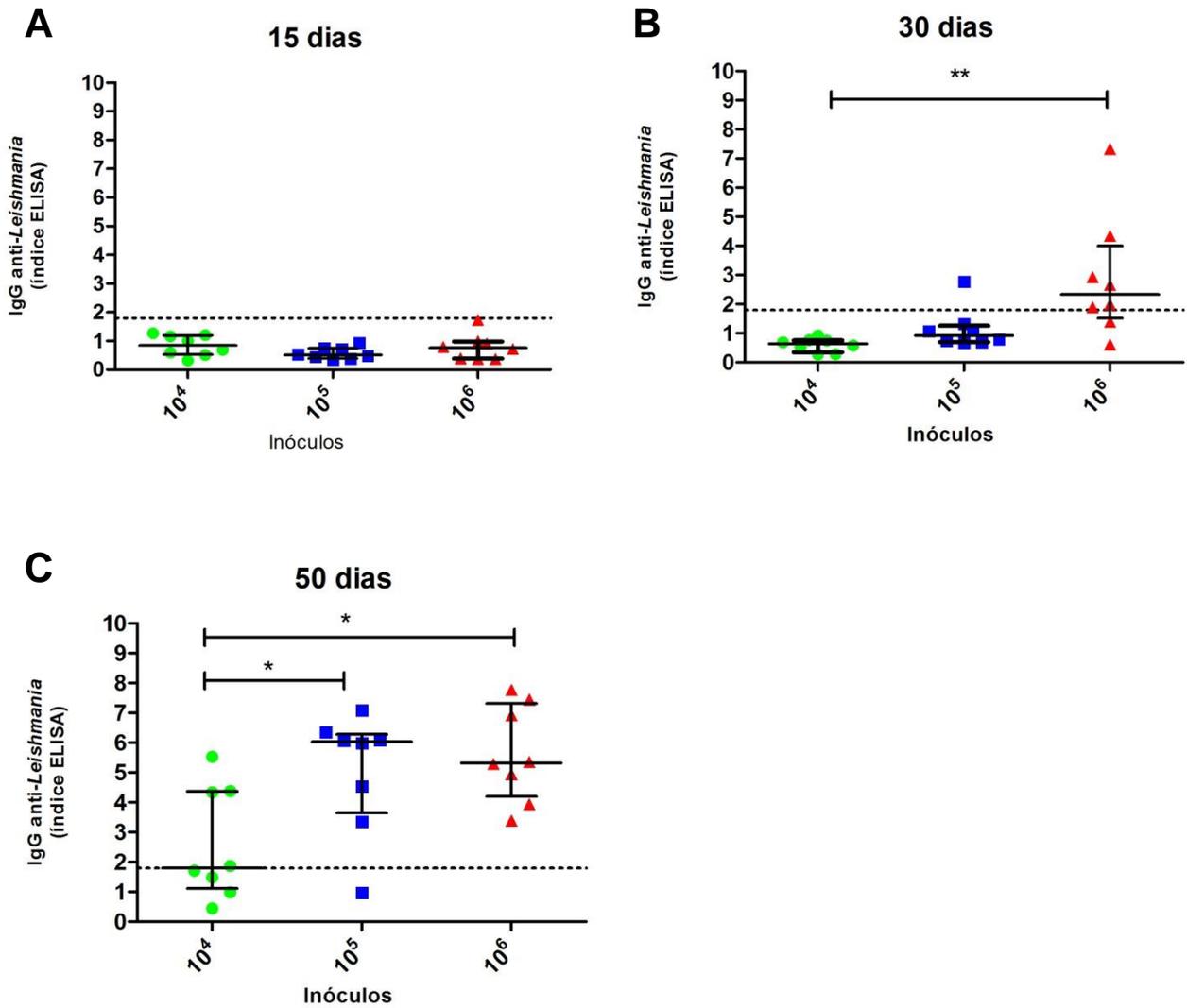


Figura 6 – Quantificação dos níveis séricos de IgG anti-*Leishmania* no plasma de hamsters infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas. A dosagem foi realizada após 15 (A), 30 (B) e 50 (C) dias de infecção. A linha pontilhada representa o valor de corte (1.794). Gráficos relativos a dois experimentos independentes. Cada símbolo corresponde a um animal e as linhas horizontais representam medianas com intervalo interquartil (n = 72, * p<0.05, ** p<0.01).

5.4 Quantificação da carga parasitária

A mensuração da carga parasitária (CP) final na pele de animais infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* após os períodos de 15, 30 e 50 dias de infecção (n=72) foi realizada pela técnica qPCR. Todos os animais tiveram CP quantificável nos três tempos de estudo.

Aos 15 dias, os inóculos 10^4 e 10^5 apresentaram um perfil similar de CP, como níveis abaixo de 500 eq parasitos/mg. Entretanto, dentre os animais inoculados por 10^6 parasitos, dois de oito animais já apresentavam uma carga acima deste valor. O inóculo 10^4 apresentou mediana de 13,6 [2,15- 86,7] eq.parasitos/mg pele; o inóculo 10^5 apresentou 39,4 [3,8- 88,6] eq.parasitos/mg pele e o inóculo 10^6 apresentou 223,1 [5,8 – 687] eq.parasitos/mg pele (mediana e intervalo interquartil, respectivamente) (Figura 7A).

Aos 30 dias, os animais infectados pelos inóculos 10^4 e 10^5 apresentam perfis bem parecidos em termos de carga parasitária final, sendo observada uma grande dispersão entre os animais. O inóculo 10^4 apresentou mediana 63,1 [21,98– 798,3] eq.parasitos/mg pele; os animais infectados por 10^5 apresentaram 76,3 [13,5 – 468] eq.parasitos/mg pele e os animais infectados por 10^6 apresentaram 543 [347 – 1.212] eq.parasitos/mg pele (Figura 7A).

Aos 50 dias, os animais infectados por 10^5 e 10^6 tiveram perfis de distribuição de CP similares e as medianas foram mais elevadas do que as apresentadas pelos animais infectados por 10^4 . Por outro lado, os animais infectados por 10^4 mantiveram uma grande dispersão da carga parasitária final, com animais apresentando níveis tão elevados quanto os de 10^6 . Os animais infectados pelo inóculo 10^4 apresentaram 43,5 [10,2 – 937,4] eq.parasitos/mg de pele; os animais infectados por 10^5 apresentaram 258,6 [108– 446] eq.parasitos/mg de pele e os animais infectados por 10^6 apresentaram 605 [251,8– 1.145] eq.parasitos/mg de pele (Figura 7A).

Não foi observada diferença estatística de CP entre nenhum dos inóculos em nenhum dos tempos analisados.

Houve correlação positiva entre a carga parasitária final e os tamanhos de lesão ($r= 0,52$, $p< 0,0001$, $n=72$) (figura 9B), (figura 7C) e os score das alterações histopatológicas ($r=0,56$, $p<0,001$, $n=36$). Embora as correlações entre carga parasitária e níveis de IgG anti-*Leishmania* ($r= 0,32$, $p<0,01$, $n=72$) e arginase

($r=0,45$, $p<0,01$, $n=36$) sejam significativas, o coeficiente de correlação pode ser considerado baixo, o que enfraquece a associação.

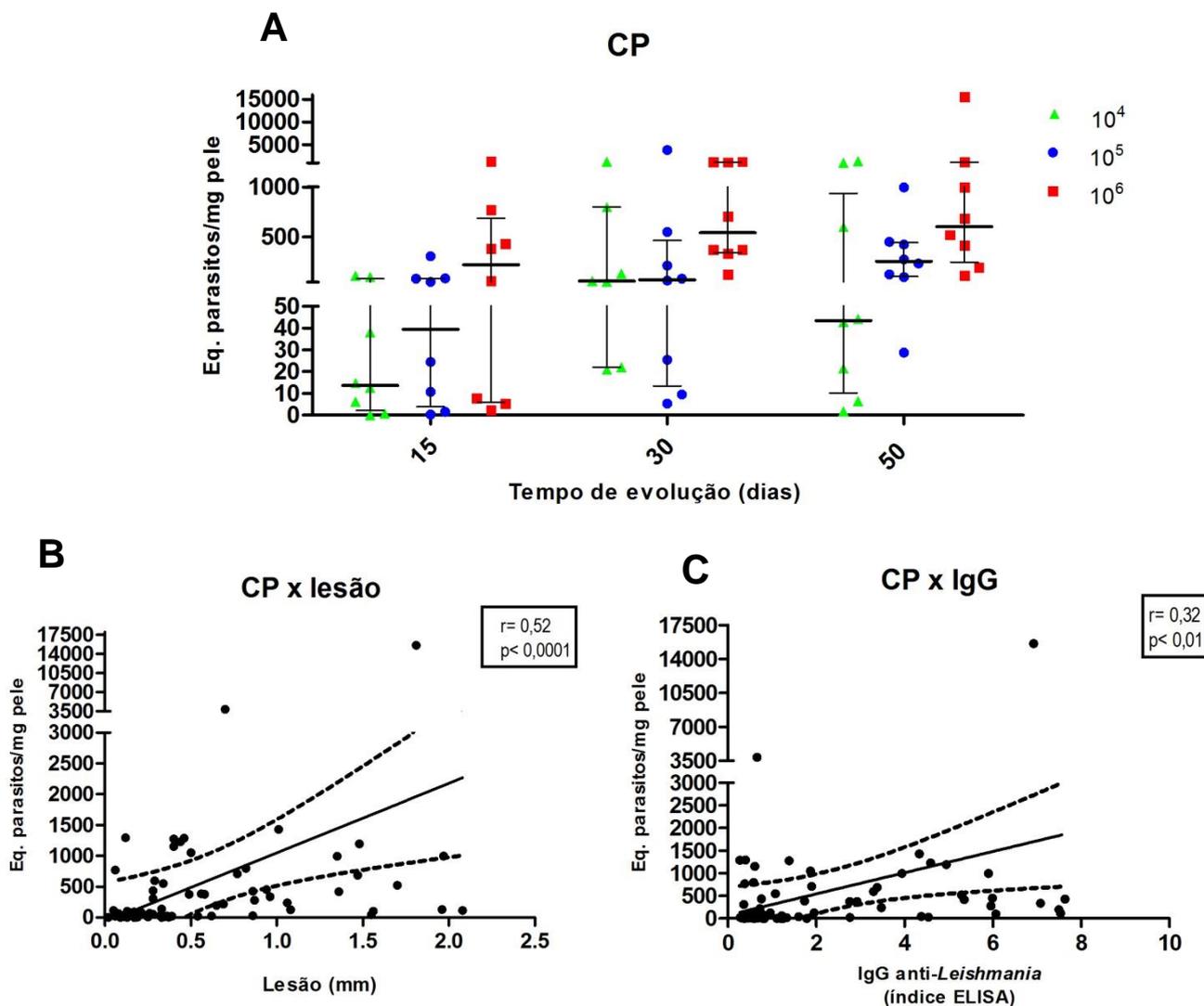


Figura 7: Quantificação da carga parasitária em lesões cutâneas de hamsters infectados com *Leishmania (V.) braziliensis*. Gráficos relativos a dois experimentos independentes ($n=72$). A carga parasitária é expressa em equivalentes de parasita / massa de pele de hamster (mg), o tamanho da lesão é expresso em milímetros e os níveis de IgG em índice ELISA. (A) O Gráfico mostra a carga parasitária de hamsters infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, aos 15, 30 e 50 dias após a infecção. Cada símbolo representa um animal. As linhas horizontais representam mediana com intervalo interquartil. (B) O gráfico mostra a correlação (Spearman) entre carga parasitária e tamanho da lesão. Os valores r e p são indicados no gráfico. (C) O gráfico mostra a correlação (Spearman) entre carga parasitária e os níveis de IgG anti-*Leishmania*. Os valores r e p são indicados no gráfico.

5.5 Análise temporal da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase em lesão de pata de hamster infectado com três diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

O ensaio de RT-qPCR foi aplicado para avaliar a expressão gênica na pele de animais infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* após os períodos de 15, 30 e 50 dias de infecção (n=36). Os fragmentos da pele de animais não infectados foram utilizados como calibradores da reação.

Aos 15 dias de infecção foi observado aumento na expressão na maioria das moléculas analisadas, em todos os animais infectados, com os três inóculos, quando comparados aos animais não infectados. A exceção foi iNOS, que não foi expressa na maioria dos animais, como acontece nos animais controles não infectados. Somente um animal de cada grupo experimental apresentou expressão de iNOS: um animal infectado com 10^4 parasitos teve um aumento de expressão dessa molécula de 2,75 vezes, um animal infectado com 10^5 , de 1,4 vezes, e um animal infectado com 10^6 , de 15,4 vezes. A expressão de IFN- γ apresentou-se aumentada em até 4 vezes nos animais infectados com 10^4 e 10^5 , sendo que o aumento mais expressivo ocorreu nos animais infectados com 10^6 , que variou de 17 a 68 vezes (três de quatro animais analisados). Em contrapartida, o único animal que apresentou sinal de lesão (edema) no local de inoculação, mostrou um aumento de mais de 400 vezes na expressão de IFN- γ . Nos animais infectados com 10^4 promastigotas houve aumento de 1,6 [0,95 – 3,38] vezes na expressão de IFN- γ (mediana e intervalo interquartil); 0,38 [0,11- -1,83] vezes na de IL-10; 1,55 [1,2 – 1,8] vezes na de TNF; 3,2 [2,8 - 3,9] vezes na de TGF- β ; 1,2 [0,8 - 2,5] vezes na de IL-6; 3,4 [2,2 - 6,6] vezes na de IL-4 e 2,3 [0,9 - 3,3] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^5 houve aumento de 1,9 [1,6 - 2,6] vezes na expressão de IFN- γ ; 0,91 [0,24 - 1,4] vezes na de IL-10; 1,44 [1,2 - 2,1] vezes na de TNF; 3,15 [2,7 - 3,9] vezes na de TGF- β ; 1,29 [1,2 - 1,7] vezes na de IL-6; 3,49 [2,1 - 5,6] vezes na de IL-4 e 1,24 [0,5 - 2,5] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^6 houve aumento de 44,7 [18,4 -353] vezes na expressão de IFN- γ ; 5,31 [1,08 - 10,7] vezes na de IL-10; 2,14 [1,4 - 4,1] vezes na de TNF; 5,8 [3,4 - 7,3] vezes na de TGF- β ; 3,16 [1,7 - 5,7] vezes na de IL-6; 20,8 [5,8 - 29,6] vezes na de IL-4 e 2,24 [1,7 - 3,3] vezes na de arginase (Figura 7A). Foi observada diferença estatística significativa somente na expressão de IFN- γ , entre os inóculos 10^4 e 10^6 ($p < 0,05$) (figura 8A).

Aos 30 dias de infecção, nos animais infectados com 10^4 promastigotas, houve aumento de 9,94 [1,6 - 192] vezes na expressão de IFN- γ ; 1,91 [0,44 - 4,5] vezes na de IL-10; 0,96 [0,6 - 2,5] vezes na de TNF; 1,76 [1,4 - 2,8] vezes na de TGF- β ; 1,86 [0,8 - 7,2] vezes na de IL-6; 2,46 [2,1 - 6,8] vezes na de IL-4 ; 2,45 [1,5 - 3,4] vezes na de iNOS e 2,27 [0,8 - 4,3] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^5 houve uma média de aumento de 107,4 [0,9 - 111] vezes na expressão de IFN- γ ; 6,77 [6,1 - 7,5] vezes na de IL-10; 1,91 [1,9 - 3,5] vezes na de TNF; 2,23 [2,16 - 3,34] vezes na de TGF- β ; 2,54 [0,43 - 3,16] vezes na de IL-6; 13,49 [11,93 - 13,57] vezes na de IL-4; 3,08 [2,67 - 3,50] vezes na de iNOS e 3,06 [0,02 - 4,37] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^6 houve aumento de 420 [194 - 1610] vezes na expressão de IFN- γ ; 2,93 [0,56 - 15,6] vezes na de IL-10; 9,14 [6,8 - 13,96] vezes na de TNF; 4,02 [3,5 - 5,4] vezes na de TGF- β ; 11,9 [5,5 - 18,4] vezes na de IL-6; 151 [72,4 - 331] vezes na de IL-4; 571 [358 - 886] vezes na de iNOS e 3,83 [1,9 - 12,3] vezes na de arginase. Foi observada diferença estatística significativa na expressão de IFN- γ , TNF e TGF- β ($p < 0,05$) e IL-4 ($p < 0,01$), entre os inóculos 10^4 e 10^6 (figura 8B).

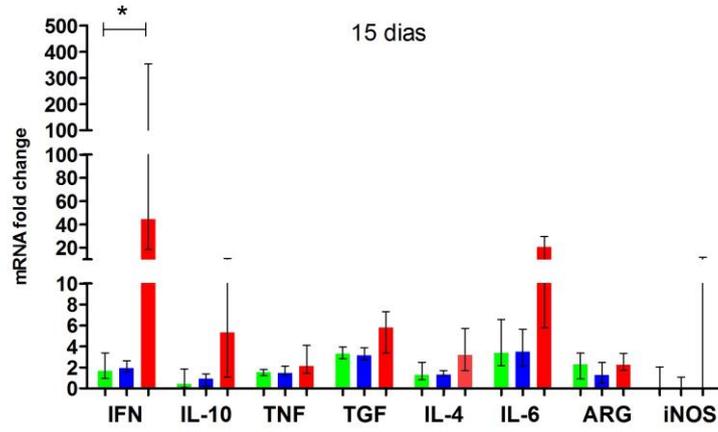
Aos 50 dias de infecção, nos animais infectados com 10^4 promastigotas houve uma média de aumento de 158 [6,9 - 1162] vezes na expressão de IFN- γ ; 9,6 [3,5 - 40,7] vezes na de IL-10; 2,32 [0,9 - 12,6] vezes na de TNF; 1,78 [1,3 - 2,8] vezes na de TGF- β ; 5,9 [1,6 - 34,9] vezes na de IL-6; 6,73 [3,2 - 10,3] vezes na de IL-4; 869 [12,3 - 1725] vezes na de iNOS e 5,9 [3,8 - 13,1] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^5 houve uma média de aumento de 1690 [1258 - 2081] vezes na expressão de IFN- γ ; 72,8 [66 - 79] vezes na de IL-10; 9,0 [6,0 - 13] vezes na de TNF; 3,1 [2,4 - 4,5] vezes na de TGF- β ; 25,8 [13,3 - 34,5] vezes na de IL-6; 95,5 [56 - 132] vezes na de IL-4; 1374 [1299 - 1605] vezes na de iNOS e 29,1 [19,6 - 31,8] vezes na de arginase. Nos animais infectados com o inóculo de 10^6 houve uma média de aumento de 2388 [2267 - 2924] vezes na expressão de IFN- γ ; 128 [81,3 - 156] vezes na de IL-10; 13,5 [8,4 - 21,4] vezes na de TNF; 4,3 [3,9 - 5,5] vezes na de TGF- β ; 23,76 [20,2 - 57,3] vezes na de IL-6; 80,83 [37,4 - 132] vezes na de IL-4; 3504 [2343 - 4844] na de iNOS e 35,89 [22,8 - 50,1] vezes na de arginase. Foi observada diferença estatística significativa na expressão de IFN- γ ($p < 0,01$), IL-10, TGF- β , arginase e iNOS entre os inóculos 10^4 e 10^6 ($p < 0,05$) e na expressão de IL-4, entre os inóculos 10^4 e 10^5 ($p < 0,05$) (Figura 8C).

Foi observada uma correlação positiva entre o tamanho de lesão e a expressão de IFN- γ (n = 36, r=0,75, p<0,0001); IL-10 (n = 36, r=0,60, p<0,005); TNF (n = 36, r=0,78, p<0,0001); IL-4 (n = 36, r=0,72, p<0,0001); IL-6 (n = 36, r=0,71, p<0,001), arginase (n = 36, r=0,52, p<0,01) e iNOS (n=36, r=0,38, p<0,05).

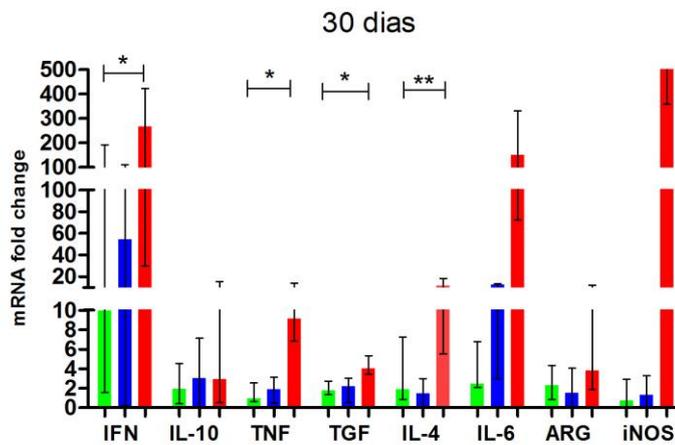
Também houve correlação entre as alterações histopatológicas e a expressão de IFN- γ (n = 36, r=0,68, p<0,0001); IL-10 (n = 36, r=0,69, p< 0.0001); TNF (n = 36, r=0,53, p< 0,0013); IL-4 (n = 36, r= 0,66, p<0,0001); IL-6 (n = 36, r= 0,60, p< 0,001), arginase (n = 36, r= 0,49, p<0,01) e iNOS (n=36, r=.0,74, p< 0,001).

Observamos, ainda, correlação entre a CP e a expressão de IFN- γ (r=0,69, p<0,0001, n=36), IL-10 (r=0,50, p<0,01, n=36) TNF (r=0,68, p<0,0001 n=36), IL-4 (r=0,73, p<0,0001, n=36) e IL-6 (r=0,71, p<0,0001, n=36).

A



B



C

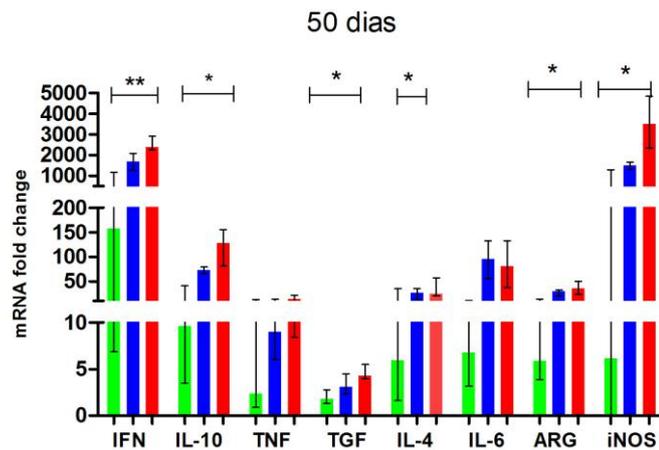


Figura 8: Expressão gênica de citocinas, arginase e iNOS na pele de hamsters com 15 (A), 30 (B) e 50 (B) dias após a infecção com 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Amostras de pele de animais não infectados foram utilizadas como calibradores da reação. Mediana com intervalo interquartil (Kruskal-Wallis, $n=36$ * $p<0.05$, ** $p<0.01$).

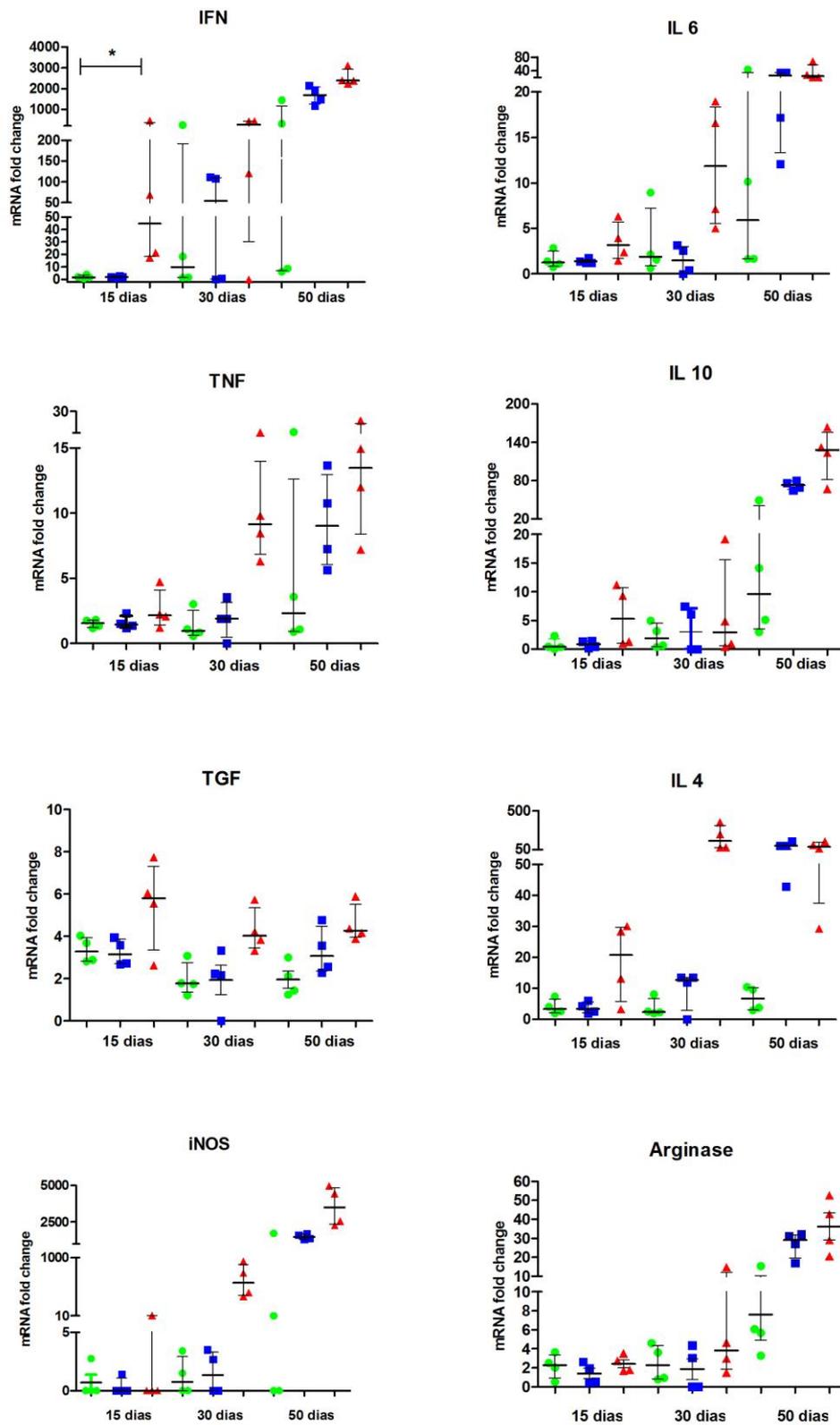


Figura 9: Expressão gênica de IFN- γ (A), IL-10 (B), TNF (C), TGF β (D), IL-6 (E), IL-4 (F), arginase (G) e iNOS (H) na pele de hamsters com 15, 30 e 50 dias após a infecção com 10^4 (●), 10^5 (■) e 10^6 (▲) promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Amostras de pele de animais não infectados foram utilizadas como calibradores da reação. Cada símbolo representa um animal. Mediana com intervalo interquartil, * $p < 0.05$.

6 DISCUSSÃO

O estudo da leishmaniose em modelos experimentais é de suma importância para o melhor entendimento de mecanismos que podem influenciar o curso clínico-imunológico da doença e melhor manejo da mesma. Esse conhecimento se faz necessário para a avaliação de novas drogas e candidatos vacinais, uma vez que a leishmaniose é negligenciada, não havendo uma vacina com eficácia comprovada e sendo o antimonial o fármaco de escolha preconizado, ainda nos dias de hoje, havendo muitos casos de falha terapêutica (Romero et al. 2001, Costa et al. 2009). Nesse sentido, o hamster dourado se mostra como um excelente modelo, sobretudo para a leishmaniose visceral e para a infecção por espécies do subgênero *Viannia* (De Oliveira et al. 2004, Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014).

Já é bem estabelecido na literatura que a concentração de parasitos no inóculo inicial é determinante para o curso da infecção, tanto no modelo murino (Brestcher et al. 1992, Doherty & Coffman 1996, Belkaid et al. 1998, Kimblin et al. 2008) como no modelo hamster de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* (Wilson et al. 1979, Ribeiro-Romão et al. 2014). Em estudos conduzidos no modelo hamster realizados por nosso grupo, os resultados obtidos 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 o curso crônico da infecção (Ribeiro-Romão et al. 2014). Além disso, tem sido demonstrado por alguns autores, que eventos ocorridos nas fases iniciais da infecção podem ter grande influência no curso de evolução e estabelecimento da doença (Launois et al. 1995, Laskay et al. 1995, Belkaid et al. 2000). Dessa forma, o trabalho desenvolvido nessa dissertação objetivou avaliar a influência de diferentes inóculos de *L. braziliensis* na resposta imune em etapas mais precoces da infecção.

Os resultados do presente estudo mostraram a influência do inóculo no início do desenvolvimento das lesões e no aspecto clínico das mesmas aos 15, 30 e 50 dias de evolução. Durante o acompanhamento dos animais infectados para mensuração do período pré-patente, foi possível observar que, conforme esperado, o tempo de surgimento das lesões foi inversamente proporcional à concentração de parasitos de cada inóculo analisado. O menor inóculo (10^4) formou lesões mais tardiamente, enquanto que os inóculos 10^5 e 10^6 apresentaram um aumento no tamanho de pata mais precoce e uma cinética de evolução bastante similar

(reproduzindo os resultados de Ribeiro-Romão e colaboradores, 2014). Experimentos realizados por Wilson e colaboradores (1979) no modelo hamster de infecção por *L. braziliensis* já demonstraram uma relação direta entre o tempo médio de início das lesões e a quantidade de parasitos inoculados, numa gama de 10^0 a 10^6 parasitos. Isto é, inóculos maiores, produzem lesões mais precoces.

Com relação aos tamanhos finais das lesões, somente aos 50 dias de acompanhamento observou-se que as lesões dos animais infectados com o inóculo 10^4 foram significativamente menores quando comparadas às lesões causadas pelos inóculos 10^5 e 10^6 , que apresentam tamanhos finais de lesão bastante próximos. Nos tempos de 15 e 30 dias não houve diferença significativa nos tamanhos finais das patas, entre nenhum dos três inóculos. É interessante salientar que somente um animal infectado com o inóculo 10^6 , já aos 15 dias após a infecção, desenvolveu lesão nodular, se destacando dos demais com maior aumento da pata, mas, ainda assim, não houve diferença estatística. Na infecção por *L. major* em camundongos Balb/c, utilizando diferentes inóculos, também foram observadas similaridades nas cinéticas de desenvolvimento das lesões e nos tamanhos finais das mesmas, em animais infectados com 10^5 e 10^6 parasitos, enquanto que animais infectados com 10^4 parasitos apresentaram lesões menores e os infectados com 10^2 e 10^3 parasitos desenvolveram uma resposta imune protetora (Brestcher et al.1992).

No presente trabalho, o aspecto clínico das lesões também foi influenciado pelo inóculo e pelo tempo de infecção. Aos 15 dias de infecção a maioria dos animais não apresentou lesão, exceto por um animal que apresentou edema no local de inoculação e por outro que apresentou lesão nodular, ambos infectados por 10^6 parasitos. No entanto, aos 30 dias, a maioria dos animais (75%) infectados pelo menor inóculo persistiu sem lesão e 25% apresentou lesão nodular. Somente um animal infectado por 10^5 não desenvolveu lesão aos 30 dias, sendo que 50% dos animais infectados por esse inóculo persistiram com a forma mais benigna (pápula). Todos os animais infectados com 10^6 apresentaram lesão já aos 30 dias, sendo que a maioria (62,5%) desenvolveu lesão nodular e um animal desenvolveu lesão nodular e ulcerada. Aos 50 dias após a infecção, três animais (37,5%), infectados por 10^4 não desenvolveram lesão, É interessante observar que dois animais (25%) infectados por 10^4 parasitos persistiram com lesão do tipo pápula, forma clínica mais branda, e apenas um animal desse grupo evoluiu para a forma nodular e ulcerada (12,5%), que indica maior dano tecidual. Todos os animais infectados por 10^5 e 10^6

apresentaram lesão nesse período, sendo que a maioria dos animais infectados por 10^5 parasitos desenvolveu lesão nodular (75%) e 25% evoluiu para a forma mais grave de lesão (nodular e ulcerada) e, finalmente, os animais infectados por 10^6 , apresentaram igual proporção de lesões nodulares (50%) e nodulares e ulceradas (50%). Não foi observada em nenhum dos animais a presença de lesões ulceradas (forma que indica maior comprometimento tecidual, ainda mais grave que a forma nodular e ulcerada) descritas nos achados de Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), o que já era esperado, considerando que nestes experimentos analisou-se a fase crônica da infecção e, no presente estudo tratou-se de momentos mais precoces.

Em conjunto, esses resultados nos mostram a tendência do inóculo de 10^4 a causar lesões mais benignas (maioria dos animais desenvolveu pápulas e lesões nodulares) e tardias em comparação com os outros inóculos estudados, que tendem a causar lesões mais graves e precoces, principalmente o inóculo 10^6 (maior proporção de animais infectados pelo maior inóculo apresentou lesão nodular e ulcerada). Resultados similares foram gerados por nosso grupo (Ribeiro-Romão et al. 2014), em estudos da fase crônica da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster, onde os animais infectados por 10^4 parasitos apresentaram lesões nodulares, enquanto que os infectados com 10^6 parasitos exibiram frequentemente lesões ulceradas.

Para a quantificação das alterações histológicas utilizamos a medida por *score*, onde a intensidade da alteração tecidual é pontuada de 0 a 3, e o somatório reflete o grau do conjunto das alterações histopatológicas observadas (Yang et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014). Portanto, *score* mais altos, são indicativos de maior dano tecidual. Nos três tempos pós-infecção estudados, a análise histopatológica das lesões mostrou diferenças bem definidas de grau de dano tecidual entre os diferentes inóculos, isto é, os *score* histopatológicos foram diretamente proporcionais ao tamanho do inóculo, havendo correlação positiva com o tamanho das lesões. Também é possível observar que existe uma relação direta entre o grau de dano tecidual e tempo de infecção, já que os *score* aumentam com o tempo para os três inóculos. Já tendo sido mostrado, na literatura, que pacientes de LC com lesões tardias apresentam um infiltrado inflamatório mais exuberante em comparação com os pacientes com lesões precoces (Faria et al. 2009). Houve diferença significativa no dano histopatológico entre os inóculos de 10^4 e 10^6 aos 15 dias, entre 10^4 e 10^6 e

entre 10^5 e 10^6 , aos 30 e 50 dias de inoculação. Aos 50 dias, apesar da diferença significativa observada, verificamos que existe uma tendência do inóculo de 10^5 a se equiparar ao inóculo de 10^6 . Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), onde foi observado um comprometimento inflamatório pouco intenso da pele em animais infectados com 10^4 parasitos, ao passo que extensa lesão tecidual ocorreu nos animais infectados com 10^5 e 10^6 parasitos. Nesses experimentos houve, inclusive, visceralização dos parasitos para o baço em animais infectados pelos inóculo 10^6 . Estes achados, em conjunto com os resultados do presente trabalho, nos levam a pensar que a resposta aos parasitos desencadeada, tanto durante a fase silenciosa (resposta anterior ao surgimento das lesões), como após essa fase (resposta gerada concomitantemente ao início lesões), pelos inóculos mais altos (10^5 e 10^6), gera uma resposta inflamatória inicial mais intensa, que se mantém até a fase crônica da infecção.

O menor comprometimento inflamatório tecidual observado nas lesões dos animais infectados com 10^4 parasitos em comparação com as lesões teciduais dos infectados com 10^5 e 10^6 também foi observado 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 graves foram observadas (Kimblin et al. 2008).

Acredita-se que exista um limite de infecção dos macrófagos ou de parasitos liberados na derme para desencadear uma resposta adaptativa e o surgimento da lesão. Em inóculos menores, esse limite demoraria um período maior para ser atingido (Belkaid et al. 2000), o que poderia ser uma explicação para o fato de animais infectados com o menor inóculo (10^4) demorem mais tempo para desenvolver lesão. Da mesma forma, em hipótese, animais infectados com 10^5 e 10^6 provavelmente atingiriam esse limite de macrófagos infectados em menos tempo, desencadeando mais precocemente a resposta adaptativa, com consequente produção de citocinas e desenvolvimento de lesão e dano tecidual. Não obstante, é curioso o fato de que ainda que os animais inoculados com 10^5 demorem mais tempo pra desenvolver as lesões que os de 10^6 , ambos evoluam com tamanho similar após 50 dias.

A presença de corpúsculos de Schaumann observados à histopatologia é muito comum no modelo hamster, estando associadas a infecções que levam a uma

reação granulomatosa (Kahl et al. 1991, Essayag et al. 2002), sendo particularmente frequente na infecção por *L. braziliensis* (Wilson, 1979, Laurenti et al. 1990, Sinagra et al. 2007, Gomes-Silva et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014). No entanto, no presente trabalho não foi observada a formação de granuloma e nem de corpúsculos de Schaumann em nenhum dos inóculos, nos tempos analisados, devido, provavelmente, ao fato de os tempos analisados serem, ainda, precoces para a formação destas estruturas, sugerindo que a presença das mesmas possa estar associada à cronicidade da doença.

Foi possível observar a presença de amastigotas na análise histopatológica das lesões dos animais infectados com 10^6 parasitos aos 30 dias e nas lesões geradas por 10^5 e 10^6 aos 50 dias. Achados semelhantes demonstraram a presença mais frequente de amastigotas nos inóculos de 10^5 e 10^6 em comparação com o inóculo de 10^4 , na fase crônica da infecção (Ribeiro-Romão et al. 2014). Embora tenha sido detectado parasitos na pele dos animais infectados pelo menor inóculo por qPCR, não foram observados amastigotas á histopatologia, o que indica um controle mais eficiente da carga parasitária. Animais infectados por inóculos maiores, podem ter atingido o limite de macrófagos infectados (conforme mencionado anteriormente), o que poderia explicar a presença de amastigotas livres na derme. Aos 30 dias, a maioria dos animais infectados por 10^6 parasitos, supostamente, já teria atingido esse limite, sendo importante lembrar que esses animais apresentaram carga parasitária final superior em relação aos outros dois inóculos menores. Aos 50 dias, a presença de amastigotas observada também nos animais infectados por 10^5 parasitas, poderia ser explicada pelo mesmo raciocínio, lembrando que, nesse período pós-infecção, as cargas parasitárias finais dos animais infectados por 10^5 e 10^6 tiveram perfis parecidos. Desta forma, os resultados aqui obtidos mostraram controle parasitário menos eficiente por parte dos animais inoculados com 10^5 e 10^6 parasitos.

Não foi detectada produção de anticorpos IgG anti-*Leishmania* aos 15 dias de infecção por nenhum animal, o que já era esperado, uma vez que já foi sugerido que a fase de formação das lesões se correlaciona com o início do desenvolvimento da resposta adaptativa (Rodríguez & Wilson, 2014) e que a grande maioria dos animais não desenvolveu lesão nesse tempo de infecção. Aos 30 dias, os animais infectados por 10^4 não produziram, ainda, IgG anti-*Leishmania*. Houve produção de IgG em apenas um animal infectado por 10^5 , enquanto que na maioria dos animais

infectados por 10^6 parasitos já foi detectada a produção de IgG. Aos 50 dias ocorre produção de IgG pela maioria dos animais, havendo diferença significativa entre os inóculos 10^4 e 10^5 e 10^4 e 10^6 .

Acredita-se que a concentração de anticorpos específicos seja diretamente proporcional à quantidade de parasitos e ao tempo de exposição aos antígenos de *Leishmania* (Gutierrez et al. 1991). Os resultados no presente trabalho reforçam essa hipótese, sugerindo que existe uma relação direta da produção de IgG total anti-*Leishmania* tanto com a concentração de parasitos do inóculo, quanto com o tempo de infecção, nos levando a pensar que a participação da resposta imune adaptativa de linfócitos B só irá ocorrer com frequência substancial dessas células a partir dos 30 dias de exposição ao parasito e que o tamanho do inóculo reflete na quantidade de antígeno que irá estimular o sistema imunológico.

Houve correlação positiva dos níveis de IgG anti-*Leishmania* com os tamanhos das lesões e *score* histopatológicos. É válido comentar que os animais infectados por 10^4 que não produziram IgG nem aos 50 dias, também não desenvolveram lesão. Em estudos anteriores da infecção por *L. braziliensis* no modelo hamster, já foi observada a correlação entre os níveis de IgG anti-*Leishmania* e o tamanho das lesões (Gomes-Silva et al. 2013, Ribeiro-Romão et al. 2014). Na infecção por *L. panamensis* no mesmo modelo, animais que desenvolveram lesões mais graves, apresentaram maiores títulos de IgG do que os animais com lesões mais brandas (Osorio et al. 2003). No ser humano, uma alta produção de IgG pode ser considerada como um biomarcador da infecção cutânea ativa (Castellano et al. 2009, Gomes-Silva et al. 2009). Esses achados em conjunto com os resultados do presente estudo sugerem que os níveis de IgG total anti-*Leishmania* possam estar relacionados à gravidade da infecção.

É importante ressaltar que as diferenças nos níveis de IgG anti-*Leishmania* detectada entre os animais com lesões mais e menos graves, nos trabalhos de Osorio e colaboradores (2003) foi observada no período inicial, desaparecendo após seis meses de infecção. Nos resultados de Ribeiro-Romão e colaboradores (2014) não foi detectada diferença na produção de IgG anti-*Leishmania* entre os animais infectados com 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitos, na fase crônica, aos 105 dias após a infecção. Isso nos mostra que a carga infectiva inicial é impactante no início da resposta imune adaptativa. Brestcher e colaboradores (1992) observaram na infecção por *L. major* no modelo murino, que a inoculação com doses elevadas (10^5

e 10^6) de parasitos induziu a produção de IgG anti-*Leishmania* que foi detectável aos dois meses após o desafio, enquanto que inóculos menores (10^2 e 10^3 parasitos), induziram quantidades muito menores de anticorpos que eram pouco detectáveis nesse período pós-infecção. Além disso, os animais infectados com o inóculo mais baixo mostraram-se resistentes a novas infecções, o que mostra que desenvolveram resposta protetora.

Embora o real papel das imunoglobulinas na LTA ainda não seja totalmente compreendido, muitos autores demonstraram uma diminuição nos títulos de IgG total anti-*Leishmania* após o controle da infecção parasitária, havendo níveis significativamente mais elevados de anticorpos específicos em pacientes com manifestações clínicas mais graves, como a LM. Além disso, pacientes que mantêm níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* após a cura clínica, são considerados casos de maior risco de recidivas e/ou evolução para formas clínicas mais graves (revisto por Gomes-Silva et al, 2014). Além disso, já foi visto que camundongos susceptíveis a *L. major* desenvolvem uma forte resposta de anticorpos específicos, que se mostra ineficaz na proteção contra o patógeno (Bretscher et al. 1992). Esses achados, em conjunto com os resultados aqui obtidos reforçam a idéia de que a resposta mediada por anticorpos não é eficaz na proteção contra o patógeno, podendo, talvez, até mesmo favorecer a sua entrada na célula.

No presente trabalho, analisamos o perfil de expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imune da LC, de modo a investigar como esse perfil pode influenciar na patogênese dessa infecção, no modelo hamster. Para tanto, utilizou-se um ensaio molecular padronizado por nosso grupo em colaboração com Dr. Otacílio Moreira, que permite quantificar RNA e DNA em um mesmo fragmento, possibilitando avaliar a expressão gênica de marcadores imunológicos e a carga parasitária nas lesões cutâneas (Ribeiro-Romão et al. 2016). As moléculas avaliadas foram IFN- γ , IL-10, TNF, TGF β , IL-6, IL-4, arginase e iNOS. É importante salientar que, para a interpretação correta dos resultados do presente estudo é preciso levar em consideração a expressão basal dos alvos aqui analisados, isto é, a expressão gênica dos mesmos em animais não infectados. O IFN- γ , IL-10 e iNOS apresentam uma baixa expressão basal (Ct maior do que 31), TNF, IL-6 e IL-4, apresentam uma expressão basal intermediária (Ct entre 23 e 30) e, finalmente, TGF- β e arginase apresentam uma alta expressão basal (Ct menor que 21) (Ribeiro-Romão, et al, 2016).

No geral, houve uma relação direta entre a expressão de IFN- γ , IL-10, TNF, IL-6 e IL-4 e o tempo de infecção, isto é, há uma tendência do aumento da expressão dessas citocinas com o tempo. Nos três tempos estudados, verificou-se um padrão de resposta misto, isto é, com co-expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, sem polarização de resposta para o tipo 1 ou 2. O perfil misto de resposta do hamster dourado na LC já foi documentado na literatura. Aos dois meses de infecção por *L. panamensis* foi observado co-expressão de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e IL-12) e do tipo 2 (IL-10 e TGF β) em lesões cutâneas (Osorio et al. 2003). Estudos da resposta imune inicial, aos sete dias após a infecção, também por *L. panamensis*, demonstraram expressão concomitante de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e IL-12p40) e tipo 2 (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21) na pele infectada. Na infecção por *L. braziliensis*, no hamster, também foi observado um perfil de resposta imune misto, com aumento da expressão gênica de todos os alvos testados (IFN- γ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- β , IL-4, iNOS e arginase) na pele, aos 110 dias de infecção (Ribeiro-Romão et al. 2016). Esses fatos sugerem que uma resposta, provavelmente desregulada, de citocinas do tipo 1 e 2 contribui para o curso crônico observado na infecção.

Aos 15 dias após a infecção, já é detectado aumento de expressão de todos os alvos analisados. No entanto, nos animais infectados por 10^6 parasitos, houve um maior incremento da expressão de todas as citocinas, sobretudo de IFN- γ , com diferença significativa entre os inóculos 10^4 e 10^6 na expressão deste último. Parte dos animais infectados pelo maior inóculo se destacou dos demais animais do seu grupo, em termos de aumento de expressão de IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β . Ainda, em relação ao inóculo de 10^6 parasitos, podemos frisar que mesmo mediante a alta expressão de IFN- γ , IL-4 e TGF- β também tiveram um incremento importante na sua expressão o que pode contribuir para a carga parasitária final mais alta desses animais.

Aos 15 e 30 dias, houve uma tendência do inóculo 10^5 a induzir um aumento de expressão mais baixo, se equiparando ao inóculo 10^4 , em relação a todas as moléculas estudadas. Em contrapartida, aos 50 dias, o inóculo 10^5 se aproximou do inóculo de 10^6 . Conforme já foi discutido anteriormente, animais infectados com 10^5 e 10^6 parasitos tendem a desencadear uma resposta mais precoce por, hipoteticamente, atingirem um limite de macrófagos infectados em menos tempo, com conseqüente produção de citocinas e desenvolvimento de lesão.

Aos 50 dias, nos inóculos 10^5 e 10^6 , podemos sugerir que, independente da modulação inicial, há uma desregulação da resposta imune, com intensa ativação de citocinas pro e anti-inflamatórias, devido à alta carga parasitária presente no inóculo inicial. Já o menor inóculo (10^4 parasitos) teve um comportamento mais heterogêneo para a maioria das citocinas. Isto é, alguns animais aumentaram substancialmente a sua expressão ao ponto de se equiparar aos inóculos maiores e outros mantiveram uma expressão mais baixa. Isso nos leva a pensar que um inóculo mais baixo pode induzir uma resposta mais ou menos intensa de acordo com características inerentes ao indivíduo, levando em consideração o caráter *outbreak* do modelo, assim como ocorre com o ser humano.

No presente trabalho, verificamos uma baixa indução de IL-4 e TGF- β nos animais infectados por 10^4 parasitos, em todos os tempos analisados, ao contrário do que ocorreu com o inóculo 10^6 . É bem documentado que essas citocinas exercem um papel importante na deativação dos macrófagos e que sua produção pode culminar em aumento da carga parasitária.

A IL-4 desempenha um papel-chave na diferenciação de células Th0, em células Th2 e na regulação positiva da arginase e da biossíntese de poliaminas, inibindo a atividade leishmanicida de macrófagos, favorecendo a sobrevivência parasitária (revisito por Maspi et al. 2016). Sadick e colaboradores (1990) demonstraram no modelo murino de infecção por *L. major* que a neutralização da IL-4 levou à cura completa em 85% dos camundongos susceptíveis infectados e atenuação da infecção em 100% dos animais. Também já foi sugerido, em estudos da infecção por *L. mexicana*, também no modelo murino, que a IL-4 tem papel relevante no início do desenvolvimento das lesões. Esse mesmo trabalho demonstrou que o início precoce do crescimento da lesão era dependente da presença de linfócitos que respondem a IL-4 e / ou IL-13 (Alexander et al. 2002).

Launois e colaboradores (1995) mostraram que o tratamento com IFN- γ exógeno suprimiu a produção precoce de IL-4 induzida por *L. major* em camundongos BALB/c e que o pré-tratamento de camundongos C57B/6 resistentes com anti-IFN- γ levou a um aumento no mRNA de IL-4, atingindo níveis iguais aos observados em camundongos BALB/c susceptíveis. Estes achados sugeriram que nos camundongos C57BL/6, o IFN- γ endógeno regula negativamente a expressão gênica de IL-4 em resposta a infecção por *L. major*. No entanto, no presente

trabalho, observamos uma baixa modulação da expressão de IL-4 no menor inóculo, independente da quantidade de IFN- γ .

É válido ressaltar também que é bem documentado que a IL-4 induz a proliferação e diferenciação de células B, estimulando a produção de anticorpos (revisto por Le et al. 1988). No presente trabalho, os animais infectados com o menor inóculo, que exibiram uma baixa indução de IL-4, também apresentaram, conforme esperado, uma produção de IgG mais baixa, sendo que alguns animais não produziram níveis detectáveis desses anticorpos mesmo aos 50 dias pós-inoculação e revelaram controle mais eficaz da infecção, com cargas parasitárias finais mais baixas.

O TGF β já é muito expresso constitutivamente na pele de animais não-infectados (Ribeiro-Romão et al. 2016), desempenhando um papel central na homeostase do sistema imunitário e na tolerância imunológica. É uma citocina imuno-reguladora que inibe a resposta Th1 contra *Leishmania* por inativação de macrófagos, supressão da produção de NO, TNF e IFN- γ (revisto por Maspi el al. 2016). Estudos no modelo murino de infecção por *L. major* mostraram que o tratamento local com anti-TGF- β levou a uma diminuição do número de parasitos e a uma cicatrização mais rápida das lesões, apesar de esse tratamento não ter alterado significativamente o padrão de produção de IL-4 e IFN- γ . Ensaio imunohistoquímico mostraram que o tratamento com anti-TGF- β resultou em aumento da produção de NO em lesões parasitadas. Esses estudos também sugeriram que na ausência de TGF- β , mesmo os níveis relativamente baixos de IFN- γ observados em camundongos com resposta Th2 predominante, são suficientes para ativar macrófagos, promovendo a destruição de amastigotas no interior das lesões (Li et al. 1999). Além disso, o TGF- β e a IL-10 parecem estar associados a formas clínicas de leishmaniose sem tendência a cura. Estudos conduzidos em lesões de pacientes de LC infectados por *L. mexicana* sugeriram, em função da expressão intralesional de TGF- β e IL-10, que estas podem contribuir para a patogênese da doença de longa duração (Melby et al. 1994). Resultados obtidos por imunofluorescência, em fragmentos de lesões de pacientes de LC infectados por *L. major* também sugeriam o papel dessas citocinas na patogênese de lesões crônicas (Hejazi et al. 2012).

Considerando os achados documentados na literatura e os resultados do presente estudo, sugerimos que a baixa modulação de IL-4 e TGF- β presente nos animais infectados por 10^4 propicia um controle mais eficiente da infecção, podendo

influenciar o fato de esses animais desenvolverem lesões mais brandas e tardias, considerando que, animais sem lesão ou com lesões mais brandas, infectados por esse inóculo, apresentaram menor carga parasitária final. Houve correlação tanto entre os tamanhos das lesões como entre o grau de dano tecidual e a carga parasitária.

A maioria dos animais não expressou iNOS aos 15 dias. Curiosamente, somente um animal infectado por cada inóculo expressou essa enzima, sendo válido comentar que o único animal infectado por 10^6 que expressou essa enzima, foi o único do mesmo experimento que apresentou edema no local de inoculação, enquanto os outros não apresentaram sinal de lesão nesse período. Aos 30 dias há um aumento notável desse alvo nos animais infectados por 10^6 , de até mais de 900 vezes e, aos 50 dias, ocorre grande aumento da expressão de iNOS nos três inóculos (aumento de até cerca de 5000 vezes), sendo que há diferença estatística entre os inóculos de 10^4 e 10^6 . Em contrapartida, ocorre aumento mais pronunciado na expressão de arginase, somente aos 50 dias (aumento de até cerca de 50 vezes), quando também há diferença estatística entre os inóculos de 10^4 e 10^6 . Resultado semelhante foi visto no modelo hamster de infecção por *L. braziliensis*. Foi demonstrando um aumento expressão de arginase na pele bem mais baixo do que o aumento da expressão de iNOS (Ribeiro-Romão et al. 2016). Tanto os resultados obtidos no presente trabalho como por Ribeiro-Romão e colaboradores são opostos ao que ocorre na infecção por *L. donovani*: na forma visceral, na qual a expressão da arginase aumenta substancialmente (mais de mil vezes), ao passo que a expressão de iNOS no baço de hamsters infectados é muito baixa, sendo próxima a expressão basal, dos animais não-infectados (Melby et al. 2001, Perez et al. 2006, Osorio et al. 2012).

Houve correlação tanto entre o tamanho de lesão, quanto entre as alterações histopatológicas e a expressão de IFN- γ , IL-10, TNF, IL-4; IL-6, arginase e iNOS. No hamster, assim como no ser humano, a dicotomia Th1 x Th2 não é bem definida como no modelo camundongo de infecção por *L. major*. Essa resposta mista, relacionada à lesão ativa e ao dano tecidual é bem documentada, em pacientes com LC humana. Verificou-se a produção simultânea de IFN- γ , TNF e IL-10 por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente ao estímulo com antígenos de *L. panamensis*, de pacientes com lesões ativas (Trujillo et al. 2002) e mRNAs de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- γ foram detectados em amostras de fragmentos de lesões

ativas de pacientes de LC (Pirmez et al. 1993, Louzir et al. 1998, Bourreau et al. 2001).

Aos 15 dias e 30 dias os inóculos 10^4 e 10^5 apresentam um perfil parecido em termos de carga parasitária final e aos 50 dias as cargas parasitárias finais da maioria dos animais infectados com 10^5 e 10^6 se equiparam (fenômeno similar ocorreu com a expressão de citocinas). A maioria dos animais infectados pelo inóculo 10^6 teve um maior incremento na carga parasitária, de forma similar em todos os tempos analisados, o que nos leva a pensar na dificuldade no controle da infecção, desde os estágios iniciais, devido à alta carga parasitária, mesmo diante da alta expressão de IFN- γ .

Resultados de Ribeiro-Romão e colaboradores também mostraram a alta expressão de IFN- γ concomitante com a presença de parasitos na pele infectada, sugerindo uma ineficiência da resposta efetora dos macrófagos na morte dos parasitos, apesar da presença de IFN- γ , tal qual observado no modelo de leishmaniose visceral da doença. A progressão da doença, mediante a alta expressão de IFN- γ , também já foi atribuída à diminuição da atividade biológica desta citocina na ativação de macrófagos devido à presença de uma cauda adicional de aminoácidos que leva a uma ligação ineficiente com o receptor de IFN- γ nas células-alvo, compensada pelo aumento da expressão do mesmo (Melby et al. 1998, Melby et al. 2001, Zhao et al. 2006, Perez et al. 2006). No entanto, no presente trabalho, uma explicação possível para o controle ineficiente da replicação dos parasitos seria a ativação alternativa de macrófagos mediadas por citocinas do tipo 2 (Gordon & Martinez 2010).

Na fase crônica da infecção pelos diferentes inóculos, a diferença entre as cargas parasitárias desaparece (Ribeiro-Romão et al. 2014), o que mostra a tendência da infecção a evoluir de forma a buscar um “equilíbrio” entre parasito e hospedeiro, contribuindo para o curso crônico da doença.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados do presente trabalho reafirmaram a susceptibilidade do modelo hamster a infecção por *L. braziliensis*, bem como a semelhança da infecção no modelo com a doença humana, tanto no quadro clínico, quanto no perfil imunológico.
- ✓ A concentração de parasitos do inóculo influenciou a duração do período pré-patente ao surgimento das lesões, os tamanhos finais das mesmas, bem como seu aspecto clínico, a magnitude do infiltrado inflamatório e as alterações histopatológicas, ratificando que a carga infectiva é um dos fatores determinantes para a evolução da doença. Os animais infectados pelo menor inóculo, no geral, apresentaram controle mais efetivo da infecção, apresentando lesões mais brandas e menos parasitadas.
- ✓ A indução da produção de IgG total anti-*Leishmania*, nas fases iniciais foi modulada pela concentração do inóculo. O fato dos animais inoculados 10^4 parasitos produzirem níveis mais baixos de IgG que os demais sugere que a resposta de anticorpos está relacionada à gravidade da infecção.
- ✓ Nos animais infectados pelos inóculos 10^5 e 10^6 , independente da modulação inicial, parece haver uma desregulação da resposta imune, com intensa ativação de citocinas pró- e anti-inflamatórias e controle ineficiente da carga parasitária, provavelmente devido à grande quantidade de parasitos presentes no inóculo inicial.
- ✓ Os animais inoculados com 10^4 parasitos apresentaram uma grande variabilidade no perfil de aumento de indução de citocinas, sobretudo aos 30 e 50 dias. Curiosamente, a infecção com 10^5 parasitos inicialmente se comporta semelhante a 10^4 , parecendo controlar a infecção, mas ao final se assemelha a 10^6 . Isto indica que no modelo hamster *outbreak*, mesmo nos inóculos mais baixos, a indução da resposta imune vai depender de características genéticas inerentes ao indivíduo, semelhante ao que ocorre na doença em humanos.
- ✓ Apesar de altamente induzido, o IFN- γ não foi capaz de controlar a infecção e a IL-10, mesmo tendo sido baixa na fase inicial, foi regulada para cima aos 50 dias após a infecção, principalmente nos animais inoculados com 10^5 e 10^6 parasitos.

- ✓ A IL-4 e TGF- β parecem ser as citocinas que desempenham um papel relevante na modulação da resposta imune, favorecendo a progressão da infecção, uma vez que, nos animais inoculados 10^4 parasitos, foram moduladas para baixo nos três períodos de análise.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander J, Brombacher F, McGachy HA, McKenzie AN, Walker W, Carter KC. An essential role for IL-13 in maintaining a non healing response following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol*. 2002;32(10):2923-33.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, Team WHOLC. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol*. 2004;57:1-88.
- Almeida M, Cuba-Cuba C, Moraes M, Miles M. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol*. 1996;115(3):311-16.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(2):109-18.
- Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res*. 2004;119(6):238-58.
- Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SCF. Formas clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas. In: Conceição-Silva F, Alves, CR, editor. *Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 311-326.
- Baldwin T, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, Handman E. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol*. 2007;29(10):501-13.
- Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*. 1992;24;257(5069):545-8.
- Belkaid Y, Kamhawi S, Modi G, Valenzuela J, Noben-Trauth N, Rowton E, Ribeiro J, Sacks DL. 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. 1998;188(10):1941-53.
- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. J Immunol. 2000;165(2):969-77.
- Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2008;2(10):e313.
- Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Russo M, Fonseca SG, Faé KC, Martins DG, Silva AM, Mady C, Kalil J, Cunha-Neto E. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. Microbes Infect. 2007 ;9(9):1104-13.
- Bourreau E, Prévot G, Gardon J, Pradinaud R, Launois P. High intralesional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis is associated with unresponsiveness to treatment. J Infect Dis. 2001;184(12):1628-30.
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. Science. 1992;257(5069):539-42.
- Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessen H, Prata A, Dessen A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. Hum Immunol. 2009;70(6):383-90.
- Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. J Investig Dermatol Symp Proc. 2001;6(3):175-82.
- Conceição-Silva F, Alves CR. Leishmanioses: uma apresentação. In: Conceição-Silva F, Alves, CR, editor. Leishmanioses do Continente Americano. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 17-26.

- Conceição-Silva F, Morgado FN, Coutinho SG. A Resposta imune na leishmaniose tegumentar ativa. In: Conceição-Silva F, Alves, CR, editor. Leishmanioses do Continente Americano. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 357 – 379.
- Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira et al. 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesions in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). Parasitol Res. 2007; 100: 1227-1232.
- 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. Gazeta Médica da Bahia 2009; 79:70-83.
- Cupolillo E, Boité MC, Porrozzi R. Considerações sobre a taxonomia do gênero *Leishmania*. In: Conceição-Silva F, Alves CR editor. Leishmanioses do Continente Americano. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. Br J Dermatol. 2005;153(3):537-43.
- Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. Cad Saude Publica. 2000;16(4):925-50.
- DeKrey GK, Lima HC, Titus RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. Infect Immun. 1998;66(2):827-9.
- De Moura T, Novais F, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, De Oliveira C. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. Infect Immun. 2005; 73(9):5827-34.
- De Oliveira C, Teixeira M, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. Drug Discovery Today: Disease Models. 2004;1(1):81-86.
- Doherty TM, Coffman RL. *Leishmania major*. effect of infectious dose on T cell subset development in BALB/c mice. Exp Parasitol. 1996;84(2):124-35.

- Ehrchen JM, Roebrock K, Foell D, Nippe N, von Stebut E, Weiss JM, Münck NA, Viemann D, Varga G, Müller-Tidow C, Schuberth HJ, Roth J, Sunderkötter C. Keratinocytes determine Th1 immunity during early experimental leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 2010;6(4):e1000871.
- Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, Travi BL, Melby PC. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol.* 2010;11:31.
- Essayag SM, Landaeta ME, Hartung C, Magaldi S, Spencer L, Suárez R, García F, Pérez E. Histopathologic and histochemical characterization of calcified structures in hamsters inoculated with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycoses.* 2002;45(9-10):351-7.
- Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL, Henson PM. Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem Soc Trans.* 1998;26(4):653-6.
- Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31(8):432-9.
- Gamboa D, Torres K, De Doncker S, Zimic M, Arevalo J, Dujardin JC. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology.* 2008;135(3):319-26.
- Garg R, Dube A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006;123(3):439-54.
- Garnham, PC. The genus *Leishmania*. *Bull World Health Organ.* 1971;44(4):477-89.
- Gaze ST, Dutra WO, Lessaz M, Lessaz H, Guimaraes LH, de Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol.* 2006;63(1):70-8.

- Ghersetich I, Menchini G, Teofoli P, Lotti T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):333-8.
- Gomes-Silva A, Da Cruz AM, Pirmez C, Pinto EF, Pereira-Oliveira M. Resposta Imune Celular no Processo de Cura da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Conceição-Silva F, Alves CR editor. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
- Gomes-Silva A, Pereira-Carvalho R, Fagundes-Silva GA, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM. Homeostasis of specific immune response in clinically cured cutaneous leishmaniasis subjects due to *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 2009;42:147–150.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Placido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*. 2013;140(6):771-9.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003 ;3(1):23-35.
- Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*. 2010;32(5):593-604.
- Goulding D, Thompson H, Emerson J, Fairweather NF, Dougan G, Douce GR. Distinctive profiles of infection and pathology in hamsters infected with *Clostridium difficile* strains 630 and B1. *Infect Immun*. 2009;77(12):5478-85.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa Md, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(3):e980.
- Gutierrez Y, Salinas GH, Palma G, Valderrama LB, Santrich CV, Saravia NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;45(3):281-9.
- Hejazi Sh, Hoseini S, Javanmard Sh, Zarkesh Sh, Khamesipour A. Interleukin-10 and Transforming Growth Factor- β in Early and Late Lesions of Patients with

- Leishmania major* Induced Cutaneous Leishmaniasis. Iran J Parasitol. 2012;7(3):16-23.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Dermatol. 2000;25(5):363-70.
- Hommel M, Jaffe C, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. Ann Trop Med Parasitol. 1995;89(1):55-73.
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Molano I, Mohedano A, Carcelén J, Mirón C, Alonso C, Corraliza I. Arginase I induction in macrophages, triggered by Th2-type cytokines, supports the growth of intracellular *Leishmania* parasites. Parasite Immunol. 2002;24(3):113-8.
- Kahl L, Byram J, David J, Comerford S, Von Lichtenberg F. *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. 1991;44(2):218-32.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, Fay MP, Kamhawi S, Sacks D. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(29):10125-30.
- Kropf P, Fuentes JM, Fähnrich E, Arpa L, Herath S, Weber V, Soler G, Celada A, Modolell M, Müller I. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. FASEB J. 2005;19(8):1000-2.
- Kumar R, Bumb RA, Salotra P. Correlation of parasitic load with interleukin-4 response in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009;57(3):239-46.
- Lagasse E, Weissman IL. bcl-2 inhibits apoptosis of neutrophils but not their engulfment by macrophages. J Exp Med. 1994;179(3):1047-52.
- Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983;77(5):569-96.

- Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. Eur J Immunol. 1995;25(8):2220-7.
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, Solbach W, Laskay T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. Infect Immun. 2002;70(2):826-35.
- Launois P, Ohteki T, Swihart K, MacDonald HR, Louis JA. In susceptible mice, *Leishmania major* induce very rapid interleukin-4 production by CD4+ T cells which are NK1.1-. Eur J Immunol. 1995;25(12):3298-307.
- Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CE, da Matta VL, Duarte MI. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. Int J Exp Pathol. 1990;71(6):791-7.
- Le HV, Ramanathan L, Labdon JE, Mays-Ichinco CA, Syto R, Arai N, Hoy P, Takebe Y, Nagabhushan TL, Trotta PP. Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells. J Biol Chem. 1988;263(22):10817-23.
- Liew FY, Li Y, Millott S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. J Immunol. 1990;145(12):4306-10.
- Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. J Immunol. 1999;162(2):974-9.
- Lima HC, DeKrey GK, Titus RG. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(1):71-6.
- Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. Front Cell Infect Microbiol. 2012;2:83.

- Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(1):1-11.
- Lopes MF, Freire-de-Lima CG, DosReis GA. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. *Immunol Today*. 2000;21(10):489-94.
- Louzir H, Melby PC, Ben Salah A, Marrakchi H, Aoun K, Ben Ismail R, Dellagi K. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J Infect Dis*. 1998;177(6):1687-95.
- Magalhães A, Moraes M, Raick A, Llanos-Cuentas E, Costa J, Cuba C, Marsden P. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1986;28:253-62.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1986;80(6):859-76.
- Martinez J, Travi B, Valencia A, Saravia N. Metastatic capability of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *J Parasitol* 1991;77(5):762-68.
- Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*. 2016;110(6):247-260.
- Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(9):e0003889.
- Melby PC, Andrade-Narvaez FJ, Darnell BJ, Valencia-Pacheco G, Tryon VV, Palomo-Cetina A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994;62(3):837-42.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. 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*. 2001;166(3):1912-20.

- Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 1998;66(5):2135-42.
- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 1999;17(3):297-304.
- Mendez S, Valenzuela J, Wu W, Hotez P. Host cytokine production, lymphoproliferation, and antibody responses during the course of *Ancylostoma ceylanicum* infection in the golden syrian hamster. *Infect Immun*. 2005;73(6):3402-07.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11324-descricao-da-doenca>>. Acesso em 08 de janeiro de 2017.
- MS-SVS (Secretaria de Vigilância em Saúde- Ministério da Saúde-Brasil) . Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, grandes regiões e unidades federadas. 1990 a 2015. 2016. Sinan/SVS/MS.
- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(3):173-82.
- Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. *Parasitology*. 1983;87 (1):7-13.
- Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2012;34(12):551-61.
- Oliveira CI, Barral-Netto M. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *GM Bahia*. 2005;75:35-45
- Oliveira RL. Insetos vetores e mecanismos de transmissão. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. *PLoS Pathog.* 2012;8(1):e1002417.
- Osorio Y, Melby PC, C, Chandrasekar B, Guarin N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol.* 2003;25(3):139-48.
- Pace D. Leishmaniasis. *J. Infect.* 2014; 69, S10eS18.
- Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163(3-4):94-102.
- Pearson RD, Sousa AQ. Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996;22(1):1-13.
- Perez LE, Chandrasekar B, Saldarriaga OA, Zhao W, Arteaga LT, Travi BL, Melby PC. 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.* 2006;176(9):5519-28.
- Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrout RH, Zörnig M, Lynch DH. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell.* 2007;129(3):447-50.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* 2008;321(5891):970-4.
- Pirmez C, Marzochi MC, Coutinho SG. Experimental canine mucocutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83(2):145-51.
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1390-5.

- Postigo JA. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36 Suppl 1:S62-5.
- Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Pereira VRA. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Patol Trop*. 2006;35:103-15.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(9):581-96.
- Rey J, Travi B, Valencia A, Saravia N. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43(6):623-31.
- Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2004;172(7):4454-62.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun*. 2014;82(12):5203-13.
- Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors*. 2016;9(1):361.
- Ridley MJ, Ridley DS. Monocyte recruitment, antigen degradation and localization in cutaneous leishmaniasis. *Br J Exp Pathol*. 1986;67(2):209-18.
- Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MT, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia e Souza LF, Oliveira MF, Saraiva EM. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep*. 2015;5:18302.
- Rodríguez NE, Wilson ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res*. 2014;59(1-3):129-41.

- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. 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.* 2001;65(5):456-65.
- Roque ALR, Jansen AM. Hospedeiros e reservatórios de *Leishmania* sp. e sua importância na manutenção dos ciclos de transmissão nos ambientes silvestre e sinantrópico. In: Conceição-Silva F, Alves, CR, editor. *Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 233 – 257.
- Ross R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. *Br Med J.* 1903;2(2237):1261-2.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845-58.
- Sadick MD, Heinzl FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med.* 1990;171(1):115–27
- Saldarriaga OA, Travi BL, Choudhury GG, Melby PC. Identification of hamster inducible nitric oxide synthase (iNOS) promoter sequences that influence basal and inducible iNOS expression. *J Leukoc Biol.* 2012;92(1):205-18.
- Santos BF. Criação e Manejo de Hamsters. In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS, editor. *Animais de Laboratório Criação e Experimentação*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. p. 123-126.
- Santos JL, Andrade AA, Dias AA, Bonjardim CA, Reis LF, Teixeira SM, Horta MF. Differential sensitivity of C57BL/6 (M-1) and BALB/c (M-2) macrophages to the stimuli of IFN-gamma/LPS for the production of NO: correlation with iNOS mRNA and protein expression. *J Interferon Cytokine Res.* 2006;26(9):682-8.
- Savill JS, Henson PM, Haslett C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J Clin Invest.* 1989;84(5):1518-27.

- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(9):581-92.
- Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995;9(9):726-35.
- Silva CG, Silva RMM, Diniz VA, Corte-Real. Ultraestrutura de parasitos do gênero *Leishmania*. In: Conceição-Silva F, Alves, CR, editor. *Leishmanioses do Continente Americano*. 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014. p. 53 – 67.
- Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella Mdel C, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(6):627-30.
- Sirois M, editor. *Medicina de animais de laboratório princípios e procedimento*. São Paulo: Roca; 2008
- Souza-Lemos C, de-Campos S, Teva A, Côte-Real S, Fonseca E, Porrozzi R, Grimaldi GJ. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced selflimiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol* 2008;216(3):375-86.
- Stenger S, Donhauser N, Thüring H, Röllinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med*. 1996;183(4):1501-14.
- Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(6):e2278.
- Travi B, Osorio Y, Melby P, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia N. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp*. *Infect Immun*. 2002;70(5):2288-96.
- Travi B, Rey-Ladino J, Saravia N. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. *J Parasitol* 1988;74(6):1059-62.
- Trujillo CM, Robledo SM, Franco JL, Velez ID, Erb KJ, Patiño PJ. Endemically exposed asymptomatic individuals show no increase in the specific *Leishmania*

- (*Viannia panamensis*-Th1 immune response in comparison to patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2002;24(9-10):455-62.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004;173(11):6521-5.
- Von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Molle K, Knop J, Sunderkotter C, Udey MC. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med.* 2003;198(2):191-9.
- Warner BM, Safronetz D, Kobinger GP. Syrian Hamsters as a Small Animal Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. *Adv Exp Med Biol.* 2016; 1-15.
- WHO. Leishmaniasis. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 08 janeiro 2017.
- WHO. Leishmaniasis control programma. Annual country reports, 2013. Disponível em: < [gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_ CL.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png) >. Acesso em 08 janeiro 2017.
- Wilson H, Dieckmann B, Childs G. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: Experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp Parasitol.* 1979;47:270-83
- Yang XQ, Zhao YG, Chen XQ, Jiang B, Sun DY. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile*-infected animal model. *BMC Gastroenterol.* 2013;13:117.
- Yanik M, Gurel MS, Simsek Z, Kati M. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2004;29(5):464-7.
- Yong C. Experimental cala-azar a hamster (*Cricetus griseus*, M.Edv). *Nat Met J China.* 1919;20:357-59.

Zivcec M, Safronetz D, Haddock E, Feldmann H, Ebihara H. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). J Immunol Methods. 2011;368(1-2):24-35.

