

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

ELAINE MARQUES PAULO

Efeitos da associação de aminoglicosídeo ao tratamento antimonial na translocação microbiana decorrente do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral experimental

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

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alda Maria da Cruz

Coorientadora: Dr^ª. Joanna Reis Santos de Oliveira

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

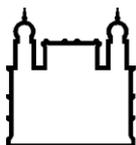
P331 Paulo, Elaine Marques

Efeitos da associação de aminoglicosídeo ao tratamento antimonial na translocação microbiana decorrente do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral experimental / Elaine Marques Paulo. – Rio de Janeiro, 2013.
xv,88 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Bibliografia: f. 81-87

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania (Leishmania) infantum*. 3. Translocação microbiana. 4. Aminoglicosídeos. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

ELAINE MARQUES PAULO

Efeitos da associação de aminoglicosídeo ao tratamento antimonial na translocação microbiana decorrente do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral experimental

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Alda Maria da Cruz

COORIENTADORA: Dr^ª. Joanna Reis Santos de Oliveira

Aprovada em: 29/04/2013

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa – Presidente e Revisor

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida – Membro

Prof. Dr^ª. Silvia Amaral Gonçalves da Silva – Membro

Prof. Dr^ª. Katia da Silva Calabrese – 1º Suplente

Prof. Dr. Jose Ângelo Lauletta Lindoso – 2º Suplente

Rio de Janeiro, 29 de abril de 2013

*E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,
e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes,
e não tivesse amor, nada seria.*

- Coríntios 13:2 -

Aos meus amados pais, Osvaldo e Elenice, a minha irmãzinha
Priscila, por serem os verdadeiros tesouros de minha vida.

Agradecimentos

Sou grata pela família maravilhosa e abençoada, que me deu muito mais que um sobrenome, me deu amor e a oportunidade de sonhar e de realizar os meus sonhos.

O meu muito obrigado vai para uma mulher que me encantou, quando assisti em 2010, seu amor e entusiasmo ao discursar sobre a pesquisa em leishmaniose. Naquele momento, fiquei admirada com sua postura forte, determinada e doce ao falar de uma doença negligenciada, foi quando surgiu meu interesse de trabalhar com essa doença. Um ano mais tarde, ao fazer a prova do mestrado, me deparei novamente com essa incrível mulher e nesse momento me senti reconfortada ao ver um rosto conhecido em meio a todos. Posteriormente, tive a sorte de ser por ela entrevistada. Ao ser aprovada no mestrado, não tive dúvidas, a primeira pessoa que me veio à mente, foi ela, aquela mulher da palestra de 2010. Claro, minha escolha foi mais do que acertada, pois consegui muito mais que uma orientadora, consegui uma oportunidade de trabalhar ao lado de uma grande e respeitada doutora e pesquisadora, Alda Maria Da-Cruz. A ela o meu muito obrigado, por sua paciência e dedicação ao longo desses dois anos, me corrigindo, incentivando e orientando, não somente em assuntos acadêmicos, mas como em alguns momentos de minha vida pessoal.

Agradeço também a minha coorientadora, Dr^a Joanna Reis Santos-Oliveira, minha amiga, companheira de bancada, de viagens e aventuras no mundo que se dividiu entre os pacientes com HIV/LV e o dos hamsters com LV. Agradeço sua confiança depositada, seus ensinamentos incessantes, sua paciência e principalmente compreensão, no contato diário que tivemos ao longo desses anos.

Como todo trabalho de pesquisa é feito em equipe, quero agradecer imensamente a ajuda de todos os membros do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas (LIPMED). Meu muito obrigado vai para Adriano Gomes-Silva, Carolina de Oliveira Mendes-Aguiar, Eduardo Pinto, Giselle Fagundes Silva, Ricardo Gonçalves, Maria Fantinatti, Milene Kitahara, Ricardo dos Santos Nogueira, Rosa Maria Placido Pereira, Samanta Kriss Lima dos Santos, Andrea Saavedra e a amiga egressa Daniele Barbi.

Quero aproveitar a oportunidade e fazer um agradecimento especial ao Luzinei S. Couto e a Raquel Ribeiro-Romão, que além de fazerem parte do grupo LIPMED, me proporcionaram uma ajuda inestimável na execução dos meus experimentos na USP.

Nos meus agradecimentos não poderiam faltar àquele destinados ao Dr José Ângelo Lauletta Lindoso, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia – USP, que aceitou participar deste projeto desafiador e que nos recebeu com um sorriso fraternal e com muito carinho em seu laboratório. Agradeço a equipe de alunos e pesquisadores colaboradores do Dr Ângelo, especialmente a Dr^a Sandra Regina Castro Soares e a Simone Carolina Soares Petri (Sisa), que nos auxiliaram em todos os experimentos em seu laboratório na USP.

Agradeço ao grupo do laboratório de Aids e Imunologia Molecular (LabAIDS), que me permitiu usar o citômetro por inúmeras vezes, para realização dos meus experimentos. Aos amigos que lá tive a oportunidade de fazer e a honra de conviver: a Dr^a Carmem Beatriz W. Giacoia-Gripp, Dr^a Sylvia Lopes Maia Teixeira, Fernanda Heloíse Cortes, Priscila Guimarães, Geane Flores, Andriana Rodrigues Pedro, Gisele Borges, Tatiana Silva, Thaysse Leite, enfim, a todos que direta ou indiretamente estiveram comigo ao longo do mestrado.

Ao Dr. Álvaro Luiz Bertho, a Raquel Ferraz e a Clarissa Cunha, pelo convívio e ensinamentos.

Ao Dr. Filipe Anibal, que além de ser o coordenador da Pós-Graduação em Medicina Tropical, aceitou meu convite para revisar esse trabalho e para participar da minha banca examinadora.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite para avaliar o presente projeto e que certamente irão engrandecer o trabalho.

Aos amigos que tive a oportunidade de fazer longo desse período.

Meus sinceros agradecimentos à Fiocruz e a Pós-Graduação em Medicina Tropical pela oportunidade de realizar meu mestrado em um centro de tão grande excelência, poder conviver com pesquisadores e pessoas tão inspiradoras sejam nas aulas, nas palestras ou mesmo na mesa do almoço.

Aos órgãos de fomento, em especial ao CAPES e o CNPQ que tornaram possíveis a realização desse projeto.

Meu muito obrigado a todos que me auxiliaram nessa jornada, que foi sem dúvidas uma experiência inesquecível e emocionante, pois para mim este é mais que um trabalho, é uma conquista pessoal, que foi regada de muito amor, dedicação e principalmente esperança, de que esse projeto possa um dia auxiliar nas pesquisas futuras sobre a leishmaniose visceral. Esta é minha humilde e singela contribuição à ciência e que ela ao menos sirva como um despertar sobre essa doença tão negligenciada.

Agradeço principalmente a Deus por tudo isso que vivi e por todas as pessoas que convivi, pois certamente ficará um pouco de cada uma em meu coração.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais da leishmaniose	1
1.2 Leishmaniose visceral	2
1.2.1 Ciclo de vida e formas de transmissão de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	6
1.2.2 Manifestações clínicas e imunopatogenia da leishmaniose visceral	9
1.2.3 Leishmaniose visceral experimental	14
1.2.4 Tratamento da leishmaniose visceral	18
1.3 Translocação microbiana	19
2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVO GERAL	25
3.1 Objetivos específicos	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Animais e parasitos	26
4.1.1 Animais de experimentação	26
4.1.2 Obtenção e purificação de amastigotas	26
4.1.3 Infecção dos hamsteres com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	27
4.2 Desenho experimental	28
4.3 Avaliação clínica	30
4.4 Coleta das amostras biológicas para os ensaios laboratoriais	30
4.4.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)	31
4.4.2 Caracterização fenotípica das células mononucleares de sangue periférico por citometria de fluxo	31
4.4.3 Quantificação dos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS)	34
4.4.4 Quantificação de amastigotas do baço	34
4.4.5 Determinação dos níveis de imunoglobulina G (IgG) total nos hamsteres	34
4.5 Análise estatística	36
4.6 Considerações éticas	36

5. RESULTADOS	37
5.1 Evolução clínica dos hamsters com leishmaniose visceral experimental	37
5.2 Avaliação da carga parasitária no baço	47
5.3 Análise macroscópica do intestino delgado dos <i>golden</i> hamsters	50
5.4 Níveis plasmáticos de lipopolisacarídeo (LPS) nos <i>golden</i> hamsters	54
5.5 Níveis de imunoglobulina anti- <i>Leishmania</i> da classe IgG nos hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos aos diferentes tratamentos	56
5.6 Níveis de ativação linfocitária nos hamsters infectados por <i>Leishmania infantum</i> e submetidos aos diferentes tratamentos	61
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÕES	79
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
ANEXO 1	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição mundial da leishmaniose visceral em 2009.	5
Figura 1.2: Distribuição da leishmaniose visceral nos estados brasileiros, pelo numero de casos ocorridos em 2007.	5
Figura 1.3: Macrófagos infectados com <i>Leishmania donovani in vitro</i> .	7
Figura 1.4: Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	8
Figura 1.5: Paciente da Etiópia com leishmaniose visceral e apresentando esplenomegalia.	10
Figura 4.1: Desenho experimental de infecção e acompanhamento do desenvolvimento da doença e tratamento dos hamsters infectados ou não com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	29
Figura 4.2: Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para as moléculas da população de linfócitos T.	33
Figura 5.1: Fotodocumentação dos <i>golden</i> hamsters em diferentes momentos ao longo da infecção experimental por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	37
Figura 5.2: Peso dos grupos de <i>golden</i> hamsters ao longo dos 101 dias de acompanhamento.	38
Figura 5.3: Peso dos <i>golden</i> hamsters infectados ao longo dos 101 dias de acompanhamento.	39
Figura 5.4: Peso dos <i>golden</i> hamsters nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção pelo protozoário <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	39
Figura 5.5: Peso do fígado dos <i>golden</i> hamsters ao longo dos 101 dias de acompanhamento.	41
Figura 5.6: Peso do fígado dos <i>golden</i> hamsters ao longo dos 101 dias de acompanhamento	41
Figura 5.7: Aspectos anatômicos do fígado dos <i>golden</i> hamsters.	42
Figura 5.8: Peso do baço dos <i>golden</i> hamsters ao longo dos 101 dias de acompanhamento.	44
Figura 5.9: Peso do baço dos <i>golden</i> hamsters ao longo dos 101 dias de acompanhamento.	44
Figura 5.10: Aspectos macroscópicos do baço dos <i>golden</i> hamster sem infecção (G1) e dos animais infectados com 2×10^7 formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (G2).	45
Figura 5.11: Aspectos macroscópicos do baço dos <i>golden</i> hamster no momento 101 dias pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma concentração de 2×10^7 formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	46
Figura 5.12: Carga parasitária em <i>golden</i> hamsters infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	48
Figura 5.13: Carga parasitária em <i>golden</i> hamsters infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	49
Figura 5.14: Aspecto macroscópico do intestino delgado dos hamsters estudados.	51

Figura 5.15: Aspecto macroscópico do intestino delgado dos hamsters sem infecção e aqueles que foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , no momento 101 dias pós infecção.	52
Figura 5.16: Aspecto macroscópico do intestino delgado de hamsters infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , no momento 101 dias pós infecção e tratados com os fármacos propostos no estudo.	53
Figura 5.17: Níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) nos <i>golden hamsters</i> .	55
Figura 5.18: Níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) nos <i>golden hamsters</i> .	55
Figura 5.19: Níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , ao longo dos 101 dias de acompanhamento, mensurados pela metodologia ELISA.	58
Figura 5.20: Níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , mensurados pela metodologia ELISA.	59
Figura 5.21: Correlação entre os níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> e o tempo pós-infecção em que os hamsters foram avaliados.	60
Figura 5.22: Correlação entre os níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> e a contagem esplênicas das formas amastigotas de <i>L. infantum</i> nos <i>golden hamsters</i> com leishmaniose visceral.	60
Figura 5.23: Níveis de linfócitos T CD4 ⁺ apresentado pelos <i>golden hamsters</i> , que foram infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	63
Figura 5.24: Níveis de linfócitos T CD4 ⁺ apresentado pelos <i>golden hamsters</i> , que foram infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .	63
Figura 5.25: Níveis de ativação celular através do percentual de linfócitos T CD25 ⁺ dentro da população CD4 ⁺ nos <i>golden hamsters</i> que foram infectados com <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> (G2) e nos animais controles sem infecção (G1), nos diferentes momentos pós-infecção.	65
Figura 5.26: Níveis de ativação celular através do percentual de linfócitos T CD25 ⁺ dentro da população CD4 ⁺ nos <i>golden hamsters</i> sem infecção (G1), nos que foram apenas infectados por <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> e naqueles que foram infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos (G3, G4, G5), nos diferentes momentos pós-infecção.	65
Figura 5.27: Correlação entre os níveis de plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) e a contagem esplênica das formas amastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> , nos <i>golden hamsters</i> com leishmaniose visceral.	66

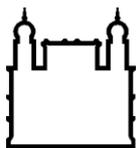
LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	do inglês: <i>acquired immunodeficiency syndrome</i> - Síndrome da imunodeficiência adquirida
CD	do inglês: <i>Cluster of differentiation</i>
CMSP	células mononucleares de sangue periférico
DO	densidade óptica
dpi	dias pós-infecção
DTH	do inglês: <i>delayed type hypersensitivity</i> - reação de hipersensibilidade tardia
ELISA	do inglês: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	do inglês: <i>Food and Drug Administration</i>
FSC	do inglês: <i>forward scatter</i> - tamanho celular
FSC	do inglês: <i>forward scatter</i> - tamanho celular
GALT	do inglês: Tecido linfoide associado à mucosa
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCl	ácido clorídrico
HIV	do inglês: <i>human immunodeficiency virus</i> - Vírus da imunodeficiência humana
HIV-1	do inglês: <i>human immunodeficiency virus type 1</i> - Vírus da imunodeficiência humana tipo 1
IBD	do inglês: <i>intestinal bowel disease</i> - doenças inflamatórias do intestino
IFABP	do inglês: <i>Intestinal fatty acid binding protein</i> , proteína ligadora de ácido graxo intestinal
IFN- γ	interferon-gama
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
IMC	imunidade mediada por células
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea-difusa
LDPK	Leishmaniose dérmica pós-calazar
LM	Leishmaniose mucosa
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MG	Minas Gerais (estado brasileiro)
NK	células natural <i>killer</i>
NO	óxido nítrico
NOS2	óxido nítrico sintase
O.C.T.	do inglês: <i>Optimal cutting temperature compound</i> – produto chamado Tissue Tek®
OPD	ortofenilenodiamina

PBS	do inglês: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	do inglês: Ficoeritrina
PE Cy-5	combinação de ficoeritrina e cianina
RIC	resposta imune celular
RNA _m	RNA mensageiro
SIDA	síndrome da imunodeficiência adquirida (sinônimo de AIDS)
SIV	vírus da imunodeficiência símia
SSC	do inglês: <i>side scatter</i> - granularidade celular
SSC	do inglês: <i>side scatter</i> - granularidade celular
TGF- β	do inglês: <i>transforming growth factor</i> beta - Fator de transformação do crescimento beta
TGI	trato gastrointestinal
Th1	células T <i>helper</i> CD4 ⁺ subtipo 1
Th2	células T <i>helper</i> CD4 ⁺ subtipo 2
TLR-4	receptores <i>Toll-like-4</i>
TM	translocação microbiana
TNF	fator de necrose tumoral

LISTA DE SÍMBOLOS

<	menor que
°C	graus Celsius
cm	centímetro
g	unidades de gravidade
kg	kilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
N	número de animais
pg	picograma
μL	microlitro



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

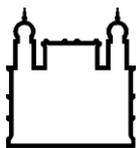
Efeitos da associação de aminoglicosídeo ao tratamento antimonial na translocação microbiana decorrente do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral experimental

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elaine Marques Paulo

A leishmaniose visceral (LV) é causada no Brasil pela *Leishmania (Leishmania) infantum*. A fase ativa da LV é caracterizada por uma imunossupressão parasito-específica acompanhada de baixos níveis de células T CD4⁺. Apesar disso, uma intensa ativação celular e resposta pró-inflamatória são observadas. Em outras doenças deficientes de célula T, tais como o HIV-1/AIDS, o lipopolissacarídeo (LPS), provavelmente oriundos da translocação microbiana são um componente crucial na ativação imune. Resultados recentes do nosso grupo mostraram que o LPS, juntamente com os antígenos parasitários, estão envolvidos na ativação das células T e na produção de citocinas pró-inflamatórias nos pacientes com LV. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar os níveis plasmáticos de LPS na LV experimental, assim como a influência do tratamento específico anti-*Leishmania* e/ou o tratamento com antibiótico para bactérias Gram-negativas na evolução clínica desses animais e nos níveis do LPS plasmático. Além disso, avaliou-se a ocorrência da ativação celular e o desenvolvimento da resposta humoral ao longo do acompanhamento e dos diferentes tratamentos. Para isso, foram utilizados 117 *golden hamsters (Mesocricetus auratus)*, que foram divididos em oito grupos: sem infecção (G1), infectado com *L. infantum* (G2), infectado e tratado com o antimonial pentavalente e/ou com o antibiótico amicacina (G3, G4 e G5, respectivamente). Três grupos sem infecção tratados com os fármacos propostos também foram incluídos (G6, G7 e G8). Na avaliação clínica realizou-se a pesagem dos animais, bem como do fígado e do baço. Os aspectos físicos dos animais infectados e as alterações macroscópicas do intestino delgado também foram avaliados. A carga parasitária esplênica também foi quantificada pelo *imprint*. Os níveis plasmáticos do LPS foram avaliados através de um *kit* comercial. As dosagens do anticorpo IgG total anti-*Leishmania* foram realizadas no soro dos animais pela técnica de ELISA. A avaliação do grau de comprometimento do sistema imune dos hamsters foi feita através da quantificação do percentual de células T CD4⁺ e o grau de ativação celular pela molécula CD25, através da citometria de fluxo. Os hamsters com LV apresentaram parâmetros laboratoriais e imunológicos similares aos da LV humana, exceto pela ausência de sinais clínicos visíveis característicos dessa infecção. Os animais apresentaram um aumento de peso progressivo ao longo dos 101 dias pós-infecção (dpi), mas este foi condizente com seu crescimento e idade. Os tratamentos propostos não influenciaram no peso dos animais avaliados. O fígado e o baço dos hamsters apresentaram também um aumento de peso condizente com seu crescimento, entretanto foram observadas alterações macroscópicas em momentos tardios da infecção pelo parasito, que coincidiram com o aumento da carga parasitária esplênica desses animais. O intestino delgado dos animais infectados mostraram-se mais friáveis à manipulação e observou-se uma diminuição significativa do número de placas de Peyer em toda sua superfície quando comparados ao grupo não-infectado. Elevados níveis de LPS plasmático foram observados nos animais infectados a partir de 15 dpi, como já foi descrito na LV humana. Uma intensa ativação celular foi observada nos animais infectados, tanto através da molécula CD25 nos linfócitos T CD4⁺ quanto pelos níveis de anticorpos IgG total anti-*Leishmania*, ambos aumentaram com o tempo de infecção. Os níveis de LPS se correlacionaram positivamente com a ativação das células T quando todos os animais infectados tratados ou não foram avaliados, sugerindo que o LPS pode contribuir para a ativação já descrita na LV humana. De modo geral, verificou-se nesse trabalho que o tratamento concomitante com o antimonial pentavalente e o antibiótico amicacina foram benéficos em diversos aspectos, como na recuperação do aspecto macroscópico dos órgãos, na diminuição da carga parasitária esplênica e imunológica (redução dos níveis de ativação) nos hamsters com LV, inferindo um possível sinergismo terapêutico entre esses fármacos. Esses resultados permitem sugerir a elegibilidade dessa estratégia terapêutica para o tratamento da LV humana.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Effects of aminoglycoside combination treatment of antimony in microbial translocation due to the involvement of the intestinal mucosa in experimental visceral leishmaniasis

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Elaine Marques Paulo

Visceral leishmaniasis (VL) is caused in Brazil by *Leishmania (Leishmania) infantum*. The active phase of VL is characterized by parasite-specific immunosuppression along with low levels of CD4⁺T cells. Despite this, an intense cellular activation and pro-inflammatory cytokine response is observed. In other T-cell deficient diseases such as HIV-1/AIDS, the lipopolisaccharide (LPS) probably from gut microbial translocation has a crucial role on immune activation. Our recent results showed that LPS along with parasite antigens are implicated in T-cell activation and pro-inflammatory cytokines in VL patients. In this context, our aim was to evaluate whether plasma LPS levels were increased in experimental VL and the influence of the specific treatment anti-*Leishmania* and/or the treatment with gram-negative antimicrobial in the clinical evolution of this animals and in the LPS levels. Also, we investigated the occurrence of the cellular activation and the development the humoral response during the follow up and under the different treatments. For this, 117 golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were divided into eight groups: without infection (G1), infected with *L. infantum* (G2), infected and treated with anti-leishmanial therapy (antimonial) and/or with antibiotic amikacin (G3, G4 and G5, respectively). Three groups without infection treated with the different drugs were also included (G6, G7 and G8). The clinical evaluation included animal weighting as well as spleen and the liver weight. The physical aspects of infected animals and the macroscopic alterations of the small intestine were also evaluated. Parasite load was quantified by the number of stained amastigotes in the spleen imprint. Plasma LPS levels were measured using a commercial kit. The quantification of serum anti-*Leishmania* IgG levels was performed by ELISA. The assessment of immune system impairment was done by quantifying the percentage of CD4⁺ T cells and the degree of cell activation by the CD25 molecule by flow cytometry. The infected hamsters presented laboratory and immunological parameters similar to those of a human VL, except for the absence of visible clinical signs characteristic of this infection. The animals also showed a progressive weight gain over the 101 days post-infection (dpi), but this was consistent with their growth and age. The proposed treatments did not affect the weight of the animals evaluated. The liver and spleen of hamsters also showed an increase in weight consistent with its growth, however anatomical changes were observed at late times of parasite infection, which coincided with the increased splenic parasite load in these animals. In addition, the small intestine of infected animals was more friable to handle and showed a significant decrease in the number of Peyer's patches across its surface compared to uninfected group. Elevated plasma levels of LPS were observed in infected animals from 15 dpi, as previously described in human VL. An intense cellular activation was observed in the infected hamsters using the CD25 molecule on CD4⁺ T lymphocytes and the total IgG anti-*Leishmania* levels, both of which increased with time of infection. LPS levels were positively correlated with the activation of T cells when all infected animals treated or not were evaluated, suggesting that LPS may contribute to the activation already described in VL patients. In general, this study showed that concomitant treatment with pentavalent antimony and the antibiotic amikacin were beneficial in many aspects, such as the recovery of macroscopic aspects of the organs, the decrease of splenic parasite load and reduced levels of immune activation in hamsters with VL, suggesting a possible therapeutic synergism between these drugs. These results suggest the eligibility of this therapeutic strategy for the treatment of human VL.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da leishmaniose

As leishmanioses estão entre as seis doenças endêmicas prioritárias no mundo, sendo considerada uma zoonose, mas que podem acometer os seres humanos quando estes entram em contato com o ciclo de transmissão do parasito, tornando-se assim uma doença antroponozootica (MS 2006b). Apesar de ser considerada a nona doença infecciosa com maior número de casos, ela ainda é uma doença tropical negligenciada (revisto por Alvar et al. 2012), e também um grave problema de saúde pública (Desjeux 2004).

As leishmanioses são doenças causadas por parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*, e sua transmissão ocorre através da picada de um flebotomíneo, no momento em que este faz seu repasto sanguíneo (Desjeux 2004; Harhay et al. 2011). Esses parasitos, no hospedeiro vertebrado, são intracelulares obrigatórios e infectam as células da linhagem fagocítica mononuclear de mamíferos (incluindo os humanos). A epidemiologia da doença é complexa, havendo pelo menos 20 espécies conhecidas de *Leishmania* que são patogênicas para humanos, 30 espécies de flebotomos vetores (Desjeux 2004), e sua transmissão já foi relatada nos cinco continentes, envolvendo um total de 98 países (Alvar et al. 2012).

As leishmanioses são representadas por um complexo de doenças com importância clínica e epidemiológica, e que podem se manifestar de diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de parasito envolvido, hábitos do vetor, além de diferenças na resposta imune e, conseqüentemente, de fatores resultantes da interação parasito-hospedeiro. Assim, as leishmanioses podem ser divididas em: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT). As principais formas clínicas da LT são: cutânea (LC), mucosa (LM), mucocutânea (LMC), e cutânea-difusa (LCD) (Da-Cruz & Pirmez 2005; Saha et al. 2006; Harhay et al. 2011). A LV é a forma mais grave da doença, apresentando alta letalidade quando não tratada adequadamente e em crianças desnutridas (MS 2006b; Harhay et al. 2011). Os indivíduos curados de LV do Sudão e da Índia, muitas vezes desenvolvem a forma denominada leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK), que é uma forma dermatotrópica da infecção pela espécie *L. donovani* (Saha et al. 2006).

1.2 Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar (kala-azar), é uma doença infecciosa grave e que possui uma ampla distribuição mundial, ocorrendo principalmente nos países em desenvolvimento (MS 2006b). O nome kala-azar é originário da Índia e significa febre negra, referindo-se à hiperpigmentação da pele durante o curso da doença, porém ela também pode ter sido derivada da palavra "Kal" que significa "morte", referindo-se à fatalidade ocasionada pela doença (Saha et al. 2006).

A doença é causada por protozoários pertencentes a divisão Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania* (Rey 2008). As espécies causadoras da LV são *L. (L.) donovani* e a *L. (L.) infantum*, anteriormente chamada de *L. chagasi* (MS 2006b; Rey 2008), e ambas pertencem ao complexo *L. donovani* (Sundar et al. 2008). No continente Americano, no Mediterrâneo, no Oriente Médio, na África Ocidental e na Ásia Central a LV é causada pela espécie *L. infantum*, enquanto que na Índia e na África a causadora da doença é *L. donovani* (Harhay et al. 2011; van Griensven & Diro 2012).

O vetor do parasito que causa a LV é o flebótomo, popularmente conhecido como mosquito palha, e pertencente ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (MS 2006b; van Griensven & Diro 2012). Existem mais de 10 espécies de flebátomos envolvidos na transmissão da LV no mundo (van Griensven & Diro 2012). No Brasil a espécie mais envolvida é *Lu. longipalpis* (Marzochi et al. 2009; Harhay et al. 2011), porém, também tem se observado a presença bem adaptada ao ambiente urbano e peri-urbano do vetor *Lu. cruzi* em algumas regiões do Brasil (Harhay et al. 2011; Missawa et al. 2011).

A LV tem sua ocorrência relatada em mais de 70 países, nos cinco continentes, excetuando-se a Austrália e a Antártida, havendo uma ocorrência mundial estimada de 0,2 a 0,4 milhões de casos ao ano (Alvar et al. 2012; van Griensven & Diro 2012) (Figura 1.1). No entanto, apenas dois terços dos países relataram dados sobre a incidência da doença nos últimos cinco anos, podendo desse modo haver uma subestimativa desses dados (revisado por Alvar et al. 2012). A quase totalidade de casos de LV existentes no mundo ocorre em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, sul do Sudão, Etiópia e Brasil (revisado por Alvar et al. 2012).

A região sul da Ásia está em primeiro lugar no *ranking* global de casos relatados de LV, apresentando 42.623 casos relatados por ano (revisado por Alvar et al. 2012). A região leste da África está em segundo lugar, apresentando 8.569 casos relatados de LV por ano (revisado por Alvar et al. 2012). Na Europa a doença concentra-se na bacia do Mediterrâneo

(Itália, França, Portugal e Espanha), havendo uma estimativa de 700 casos ao ano. A doença também já foi relatada em outros 14 países (Afeganistão, Egito, República Islâmica do Irã, Iraque, Jordânia, Líbia, Marrocos, Paquistão, Arábia Saudita, Somália, Sudão, Síria, Tunísia e Iêmen) (revisto por Antinori et al. 2012).

O continente americano está em terceiro lugar no *ranking* global de casos relatados de LV, ocorrendo na Argentina, Brasil, Colômbia, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai e Venezuela (revisto por Alvar et al. 2012). Nos Estados Unidos da América não foram registrados casos de LV em humanos, havendo apenas a ocorrência de casos caninos da doença, causados pela espécie *L. infantum* (revisto por Alvar et al. 2012). Dentre os países deste continente destaca-se o Brasil, devido ao elevado número de casos registrados de LV, estando a doença atualmente distribuída em 21 das 27 unidades federadas (MS 2013), e apresentando uma média anual de 3.894 casos confirmados e uma incidência anual de 2,0 casos por 100.000 habitantes em 2011 (MS 2013). Nesse mesmo período, destacamos uma maior incidência ocorrida na região Norte do país, com 5,2 casos por 100.000 habitantes, e para a região Nordeste, com 3,4 casos por 100.000 habitantes (MS 2013) (Figura 1.2).

No Brasil, a LV tem se propagado para o sul e para o leste do país, onde se observa a ocorrência da doença nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul (revisto por Antinori et al. 2012), além do alto potencial de ocorrência no Rio de Janeiro (Marzochi et al. 2009), caracterizando um fenômeno de urbanização da doença, que anteriormente era vista apenas no ambiente rural (Harhay et al. 2011). Essa expansão da LV para áreas urbanas tem ocorrido devido a diversos fatores sociais e ambientais, entre os quais podemos destacar as alterações ambientais feitas pelo homem, que tem favorecido a introdução dos vetores neste ambiente urbanos. Além disso, mudanças na ecologia e biologia dos vetores têm aumentado a transmissão da LV (Harhay et al. 2011).

No Brasil, até a década de 1970, a doença era considerada como de ambiente rural, porém na década seguinte deu-se o início ao seu processo de urbanização. A primeira grande epidemia registrada no país ocorreu em Teresina, no estado do Piauí, e posteriormente, epidemias foram descritas em Natal (Rio Grande do Norte) e São Luis (Maranhão), e a partir de então a doença disseminou-se para outras regiões do país (Costa et al. 1990; Werneck 2010). Atualmente, cerca de 50% dos casos estão concentrados na região Nordeste (Harhay et al. 2011). Esse aumento no número de casos, principalmente nas áreas urbanas, está relacionado a diversos fatores, como as mudanças ambientais que promovem um aumento na exposição aos vetores da doença. Outros fatores também facilitam a distribuição da doença, tais como: as migrações das áreas rurais para a urbana, precárias condições socioeconômicas das periferias das cidades, onde as populações de baixa renda ficam concentradas devido a

essa migração, facilitando assim, a ocorrência de surtos da doença. Por fim pode-se considerar a desnutrição, que se apresenta como um importante fator de risco, uma vez que contribui para uma debilidade do sistema imunológico do indivíduo (Desjeux 2004; Werneck 2008, 2010). Além disso, fatores como desmatamento, boa adaptação do vetor ao ambiente doméstico, aumento do número de cães infectados e seleção de cepas resistentes à terapia são alguns outros fatores que contribuem para a disseminação e urbanização da LV (Desjeux 2004; Werneck 2008, 2010).

Atualmente, a LV também vem sendo considerada uma doença emergente e oportunista nos indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma doença de suma importância (MS 2006b) devido à sobreposição das áreas de transmissão da *Leishmania* e do HIV.

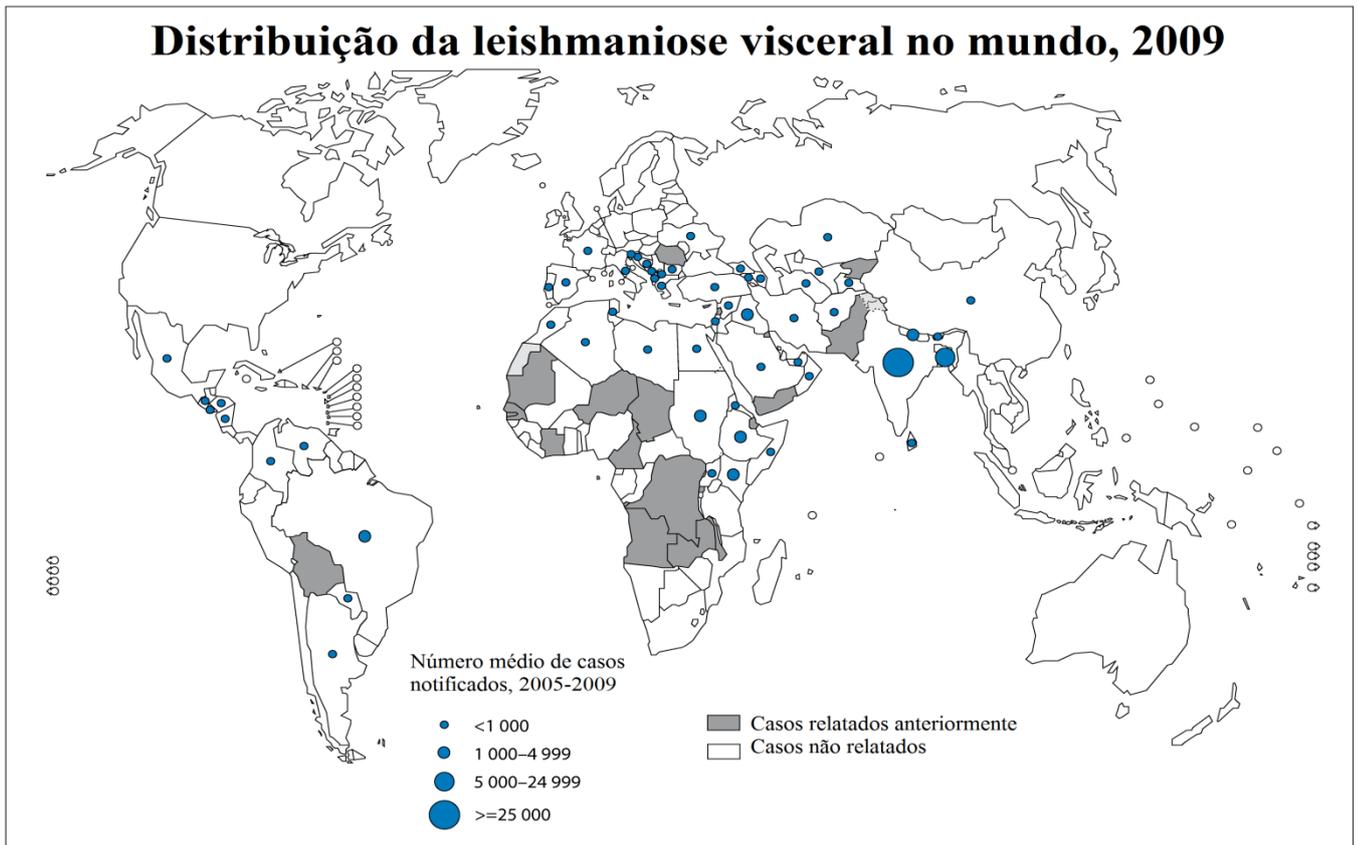


Figura 1.1: Distribuição mundial da leishmaniose visceral em 2009. Adaptado de (WHO 2009).

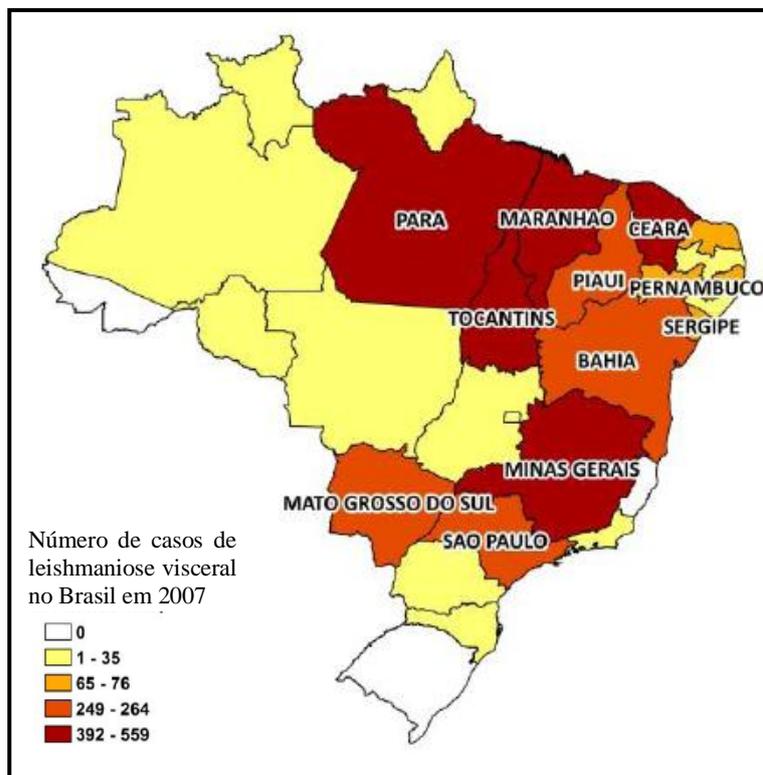


Figura 1.2: Distribuição da leishmaniose visceral nos estados brasileiros, pelo número de casos ocorridos em 2007. Adaptado de (Alvar et al. 2012).

1.2.1 Ciclo de vida e formas de transmissão de *Leishmania (Leishmania) infantum*

O flebótomo, transmissor da leishmânia, é pequeno, possuindo de 2 a 4 mm de comprimento. Este é muito ativo durante o crepúsculo e à noite, e faz seu repouso em locais escuros e úmidos (van Griensven& Diro 2012). A transmissão da LV pode ocorrer de duas formas, a forma zoonótica, causada pela espécie *L. infantum*, onde o cão é o reservatório da doença, e a forma antroponótica, causada pela espécie *L. donovani*, onde a transmissão ocorre de homem para homem, sendo o próprio homem o reservatório da doença (Harhay et al. 2011; van Griensven& Diro 2012). Na América do sul, incluindo o Brasil, observa-se a ocorrência da transmissão zoonótica da doença (van Griensven& Diro 2012). Podem ocorrer também outras formas de transmissão onde não há o envolvimento do vetor, como pelo uso de drogas injetáveis, transfusão de sangue, transplante de órgãos, transmissão congênita e acidentes de laboratório com material biológico infectado (Herwaldt 1999;Harhay et al. 2011; van Griensven& Diro 2012).

O protozoário causador da leishmaniose existe sob duas formas: a promastigota, que é a forma encontrada no inseto vetor, desenvolvendo-se em seu tubo digestivo, e a forma amastigota, encontrada no interior das células fagocíticas mononucleares do hospedeiro vertebrado (van Griensven& Diro 2012) (Figura 1.3). A multiplicação desse protozoário ocorre por meio de divisão binária, tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado.

A infecção do hospedeiro vertebrado se dá após a inoculação das formas promastigotas em sua pele, no momento em que o flebotomíneo faz o seu repasto sanguíneo. Essas promastigotas são internalizadas pelos macrófagos e outras células fagocíticas mononucleares, permanecendo numa estrutura chamada fagolisossomo, formada no interior da célula, onde se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária. Após o rompimento da membrana celular ocorre a disseminação desse protozoário, assim como a infecção de outras células fagocíticas mononucleares de diversos tecidos, havendo um tropismo pelo baço, medula óssea, fígado e linfonodos (Murray et al. 2005; Saha et al. 2006; Harhay et al. 2011; van Griensven& Diro 2012).

O flebótomo infecta-se ao ingerir sangue contendo células fagocíticas infectadas pela forma amastigota. No tubo digestivo do vetor, essas amastigotas transformam-se em promastigotas, que se multiplicam, e em seguida, migram para a região da probóscide do flebótomo, onde permanecem até que sejam inoculadas no hospedeiro vertebrado, no momento em que o flebótomo for realizar um novo repasto sanguíneo. No local da picada do vetor, essas formas promastigotas inoculadas no hospedeiro são fagocitadas pelas células

fagocíticas mononucleares presentes no local, e no interior dessas células o parasito reinicia o ciclo novamente (Harhay et al. 2011) (Figura 1.4).

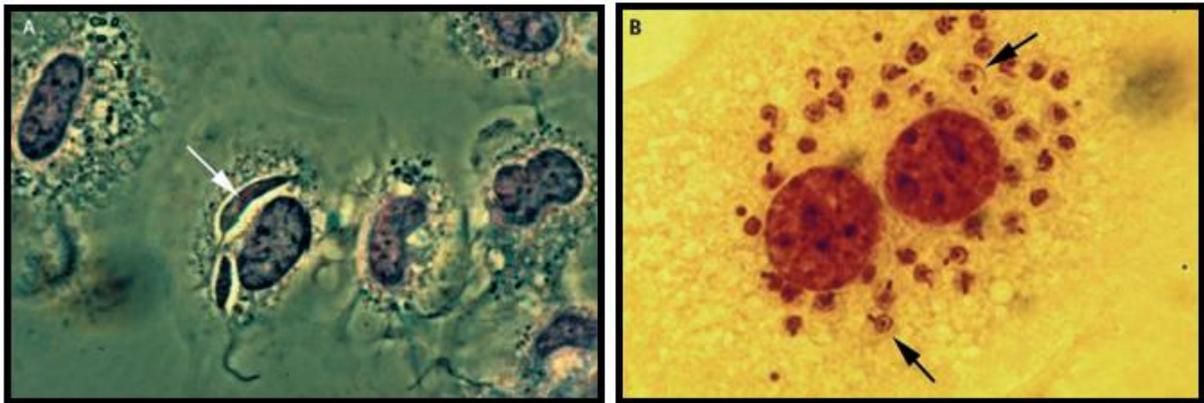


Figura 1.3: Macrófagos infectados com *Leishmania donovani in vitro*. Adaptado de (Murray et al. 2005).
A) ingestão de formas promastigotas flageladas (seta) por macrófagos; B) replicação das formas amastigotas (seta) dentro do macrófago.

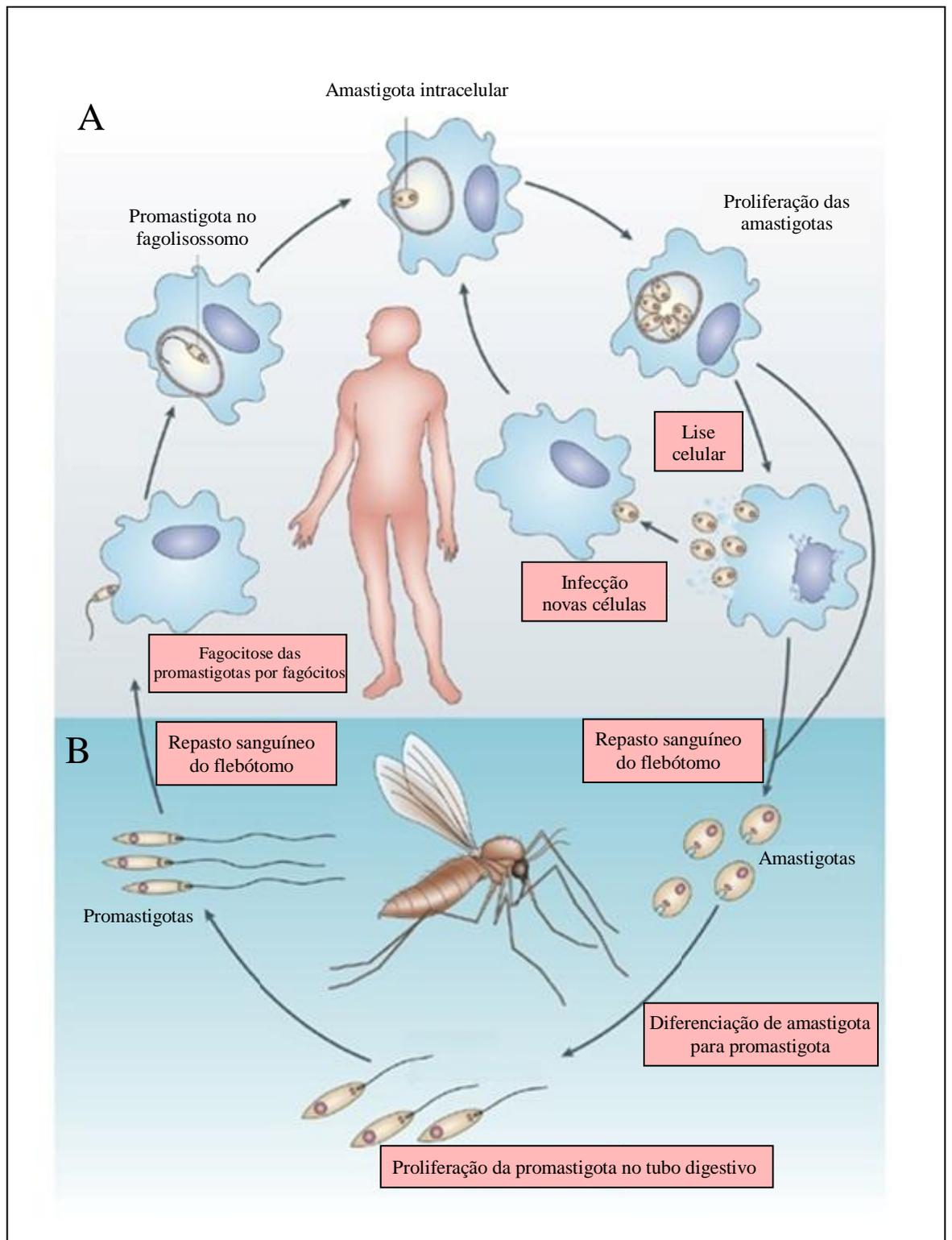


Figura 1.4: Ciclo de vida da *Leishmania* sp. Adaptado de (Chappuis et al. 2007). A) o ciclo biológico no hospedeiro vertebrado (homem); B) o ciclo no hospedeiro invertebrado (flebótomo vetor).

1.2.2 Manifestações clínicas e imunopatogenia da leishmaniose visceral

A imunopatogênese da LV é bastante complexa, já que envolve o comprometimento de diferentes órgãos do sistema imune gerando, conseqüentemente, alterações em muitos compartimentos.

O período de incubação da LV pode variar de 2 a 6 meses, mas também pode levar alguns anos (van Griensven & Diro 2012). Os pacientes apresentam, classicamente, sintomas como febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia (Figura 1.5). Além disso, considerando que inicialmente o intenso parasitismo dos macrófagos pela *L. infantum* leva à destruição dessa linhagem fagocítica, outros sintomas característicos também podem ser observados na LV, tais como: anemia, plaquetopenia e neutropenia. Isso ocorre principalmente devido a um desvio da produção pela medula óssea de células como eritrócitos, plaquetas e neutrófilos, respectivamente. O comprometimento da medula óssea também pode contribuir para uma deficiência na liberação de novos progenitores de linfócitos T que irão maturar no timo, levando a uma diminuição das contagens de células T (linfopenia) nos indivíduos com LV na fase ativa da doença. Outros mecanismos como morte celular por ativação podem contribuir para a linfopenia e, portanto, para o próprio comprometimento funcional da resposta celular (Saha et al. 2006).

A hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e a caquexia também são manifestações clínicas comuns (Saha et al. 2006; Nieto et al. 2011; Kumar & Nysten 2012). Na forma avançada da doença alguns pacientes podem apresentar uma disfunção hepática, icterícia e ascite (van Griensven & Diro 2012). O escurecimento da pele é observado no Sul da Ásia, onde a LV é mais conhecida como kala-azar, que significa febre negra em hindu (van Griensven & Diro 2012).

A hipoalbuminemia observada está relacionada ao edema e à desnutrição, e esses pacientes também podem apresentar quadros de diarreia, devido ao intenso parasitismo do intestino seguido de sua ulceração (Kumar & Nysten 2012). Em adição, a trombocitopenia pode causar uma hemorragia da mucosa, que somado aos danos provocados pelo parasito na mucosa intestinal, podem ser fatores que acabam por facilitar o surgimento de septicemia (Kumar & Nysten 2012). A leucopenia, finalmente, torna esses pacientes infectados com LV imunossuprimidos, deixando-os mais vulneráveis às infecções bacterianas, que, se não tratadas, podem ser fatais (Kumar & Nysten 2012). Pode ocorrer ainda a reativação da doença quando o paciente é submetido a um tratamento mal sucedido ou de forma tardia. Essa reativação pode acontecer de forma espontânea, mas na maioria das vezes ela ocorre quando há uma diminuição no número de células T CD4⁺, após tratamento com corticoides, ou após

tratamento para evitar rejeição em pacientes transplantados (Murray 2004; Murray et al. 2005). Diante das diversas manifestações clínicas apresentadas pela LV, esta pode tornar-se uma doença fatal quando não tratada de forma específica (Saha et al. 2006).



Figura 1.5: Paciente da Etiópia com leishmaniose visceral e apresentando esplenomegalia. Adaptado de (van Griensven& Diro 2012).

Na LV, a resposta imunológica do hospedeiro está diretamente envolvida com a evolução clínica da doença, entretanto, os mecanismos patogênicos subjacentes ainda são controversos (revisito por Santos-Oliveira& Da-Cruz 2012). Durante a fase ativa da LV o parasito multiplica-se dentro das células do sistema fagocítico mononuclear (monócitos circulantes no sangue, macrófagos e células dendríticas), havendo um tropismo pelo baço, fígado e medula óssea (Goto& Prianti 2009). Assim, os macrófagos desempenham um papel fundamental na defesa do hospedeiro e na regulação da ativação das respostas imunes (Saha et al. 2006). Essa interação parasito-hospedeiro que ocorre dentro dos fagolisossomos dos macrófagos é complexa, mas esses antígenos eventualmente escapam desse mecanismo imune de defesa (Saha et al. 2006). Contudo, apenas uma parcela da população desenvolve a forma ativa da doença, a qual é acompanhada por uma expressiva ativação do sistema imunológico, ao lado de uma intensa imunossupressão da resposta imune celular específica (Goto& Prianti 2009; Santos-Oliveira et al. 2011).

Essa supressão da resposta imune celular (RIC) é uma característica da LV ativa e ocorre principalmente para antígenos do parasito (Saha et al. 2006; Goto& Prianti 2009), podendo ser constatada pela não responsividade do paciente ao teste de hipersensibilidade

tardio (DTH – do inglês *delayed type hypersensitivity*, denominado teste de Montenegro) (Saha et al. 2006; Goto& Prianti 2009). Neste teste, antígenos de *Leishmania* são inoculados intradermicamente no paciente e a não responsividade indica que não há uma resposta celular específica a esses antígenos. Consistente com isso, Carvalho e colaboradores (1989) verificaram uma redução da resposta proliferativa de células T auxiliares mediante estímulo com antígenos do parasito *in vitro* em pacientes com LV ativa (Carvalho et al. 1989) e uma diminuição da produção de citocinas importantes como IL-2 e IFN- γ (interferon-gama) (Carvalho et al. 1985).

Os mecanismos que levam a esta imunossupressão ainda são desconhecidos, embora já se tenha o conhecimento de que antígenos do parasito são cruciais neste processo. Outra possível explicação para essa imunossupressão específica poderia ser a presença de citocinas desativadoras como IL-10 e TGF- β que atuam nos macrófagos, permitindo a proliferação desse parasito (Goto& Prianti 2009). Do mesmo modo, essa imunossupressão poderia ser influenciada pelos anticorpos anti-*Leishmania* capazes de opsonizarem as amastigotas e induzirem a produção de IL-10 pelos macrófagos (Goto& Prianti 2009).

Após um tratamento bem sucedido, a resolução da LV se manifesta por meio de uma forte resposta mediada por células, e a redução do número de células T CD4⁺ auxiliares e a imunossupressão são rapidamente reversíveis (Saha et al. 2006). Além disso, a boa resposta ao tratamento está associada a um aumento na produção de IFN- γ e IL-12 (Carvalho et al. 1981; Bacellar et al. 2000). Esses resultados indicam que uma mudança no perfil de resposta para o tipo 1 pode auxiliar a resolução da infecção na LV.

O controle e a proteção na LV, em geral são dependentes do IFN- γ que estimula a resposta imune inata e adaptativa celular, e induzem a morte intracelular dos parasitos por macrófagos ativados (Saha et al. 2006). Esse IFN- γ pode se originar das células natural killer (NK) e é o principal ativador de macrófagos, já sendo bem documentada na literatura sua capacidade de induzir uma atividade microbicida contra as formas promastigotas e amastigotas em culturas de macrófagos humanos derivados de monócitos (Saha et al. 2006).

Assim, uma elevada carga parasitária em pacientes com LV ativa poderia ser explicada pela deficiência de IFN- γ produzido especificamente em resposta ao antígeno durante a doença ativa (Saha et al. 2006). Outra provável origem desta citocina são as células dos órgãos linfoides, nas quais ocorre a proliferação do parasito, uma vez que dados na literatura indicaram um alto nível de RNAm de IFN- γ em amostras de aspirados de medula óssea, de linfonodos e do baço (revisito por Goto& Prianti 2009). Também foi demonstrado que, após a infecção com *L. donovani*, monócitos de pacientes saudáveis, que foram pré-tratados com IFN- γ , são capazes de produzir altos níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e

IL-1, que são dois elementos importantes na resposta do hospedeiro a essa infecção (Saha et al. 2006).

A importância da imunidade mediada por células (IMC) durante a LV é evidente, desempenhando um papel crucial na susceptibilidade ou na resistência, assim como na resposta ao tratamento. No entanto, não podemos excluir o papel da resposta imune humoral como sendo um marcador da doença ativa, uma vez que a presença de elevados títulos de anticorpos específicos e não específicos para *Leishmania* surgem no hospedeiro logo após a infecção e antes do comprometimento da resposta imune celular (Atta et al. 2004; Saha et al. 2006). Tal fato se deve a outro importante mecanismo conhecido por ocorrer na fase ativa da LV, que é a ativação policlonal de células B. Entretanto, o papel desses níveis elevados de anticorpos no que se refere à patogênese ou à proteção ainda não está definido, bem como o fato de alguns desses anticorpos manterem seus títulos aumentados durante a resolução da doença (Anam et al. 1999). Apesar disso, a ocorrência de infecções subclínicas ou assintomáticas em pacientes residentes em áreas endêmicas demonstra o surgimento de anticorpos específicos e/ou de células T específicas para esse antígeno, o que sugere que ocorra uma imunidade adquirida naturalmente contra esses parasitos por esses hospedeiros (Saha et al. 2006).

Dessa maneira, a imunossupressão celular específica observada na LV ativa não reflete outras alterações sistêmicas da resposta imunológica que ocorrem durante a doença ativa, como é o caso da intensa ativação celular (Goto & Prianti 2009). A presença de níveis plasmáticos elevados de citocinas importantes para o controle e eliminação do parasito, entre elas o próprio IFN- γ e o TNF (Melby et al. 2001; Peruhype-Magalhaes et al. 2006) sugerem que o sistema imunológico do paciente não está suprimido, mas sim, altamente ativado, sendo esta ativação provavelmente induzida por antígenos de *Leishmania*, presentes nos órgãos para os quais os parasitos apresentam tropismo (Goto & Prianti 2009). Estes processos de ativação e desativação ocorrem paralelamente e, principalmente, em órgãos como o baço, o fígado e a medula óssea (Goto & Prianti 2009). Apesar disso, a infecção parasitária progride, ratificando a existência de mecanismos capazes de desativar os macrófagos e que permitam, desse modo, a multiplicação da *Leishmania* no interior dessas células (Goto & Prianti 2009).

A função das citocinas na supressão do sistema imune e, portanto, na contribuição para uma infecção progressiva tem sido estudada. Estudos em modelos experimentais usando camundongos isogênicos infectados com *L. major* sugerem que a proteção contra a leishmaniose seja devido a uma resposta imune celular do tipo 1 (Th1) (células Th1 = células T helper CD4⁺ subtipo 1), que se inicia quando a IL-12 atua sobre células apresentadoras de antígeno, estimulando a produção de IFN- γ e TNF pelas células do tipo 1. Em contrapartida, a

susceptibilidade à doença foi atribuída a uma resposta imune do tipo 2 (Th2) (células Th2 = células T *helper* CD4⁺ subtipo 2), caracterizada pela produção de IL-4 e IL-13 (Goto& Prianti 2009). Por atuar na suscetibilidade de camundongos BALB/c no modelo experimental de LC, a IL-4 também teve sua ação explorada na LV humana, e em alguns estudos foi observado um aumento no nível desta citocina no soro e na medula óssea de pacientes infectados com LV (revisto por Goto& Prianti 2009).

Da mesma forma, tendo em vista o seu importante papel na susceptibilidade e na persistência do parasita nas lesões de LC (Belkaid et al. 2001), os níveis de IL-10 vem sendo considerados também na patogênese da LV (revisto por Goto& Prianti 2009). A IL-10 é caracterizada inicialmente como uma citocina imunoregulatória, capaz de modular a ativação de macrófagos induzida pelo IFN- γ durante a LV ativa (revisto por Nylen et al. 2007). Há evidências de que a IL-10 iniba a produção de IFN- γ pelas células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de humanos, por suprimir a síntese de IL-12 por diferentes células, como macrófagos, células B ou células dendríticas (Saha et al. 2006). Desse modo a IL-12 desempenha um efeito contra-regulador da IL-10 na infecção provocada pela *Leishmania* (Saha et al. 2006). Após uma quimioterapia bem sucedida, observa-se uma diminuição dos níveis de RNAm de IL-10, confirmando o fato de que a persistência de elevados níveis de IL-10 nas células hospedeira é benéfica para a sobrevivência do parasito e as patologias apresentadas na doença (Saha et al. 2006).

A produção excessiva de IL-10, por diferentes tipos celulares do sistema imune, talvez seja a responsável pela diminuição da produção de citocinas por células Th1, permitindo assim, o predomínio da resposta imune celular Th2, característico da LV ativa (Saha et al. 2006). Evidências experimentais indicam que ela desempenha um papel regulador importante na progressão da LV, pois já foi relatado que o uso da IL-10 recombinante *in vitro* produz um efeito inibidor na morte mediada por óxido nítrico (NO), meio pelo qual o macrófago induz a morte do parasito no interior de seu fagolisossomo. Esse fenômeno foi observado em macrófagos humanos derivados dos monócitos de indivíduos saudáveis e infectados por *L. infantum*, *L. major* e *L. braziliensis* (Saha et al. 2006). Outra citocina com papel importante na desativação de macrófagos na LV é o TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta - do inglês *transforming growth factor* beta), sendo seu efeito observado, tanto *in vitro* (Nylen et al. 2007) como *in vivo* (Barral-Netto et al. 1992).

De acordo com o que foi descrito acima, pode-se dizer que a resposta imunológica na LV é caracterizada por um perfil misto de citocinas tanto do tipo 1 (Th1) quanto do tipo 2 (Th2). A presença dessas citocinas, principalmente as com funções pró-inflamatórias, é consistente com um sistema imune ativado (Mogensen 2009). De fato, vários estudos

anteriores verificaram a presença de citocinas pró-inflamatórias durante a fase ativa da LV, dentre elas a IL-8, TNF e IL-6 (Barral-Netto et al. 1991a; Peruhype-Magalhaes et al. 2006; Nylen et al. 2007; Santos-Oliveira et al. 2011). Níveis plasmáticos aumentados de IL-10 e IFN- γ também já foram observados em pacientes de LV com doença ativa, levando um determinado tempo para retornar aos níveis basais após o tratamento específico (Caldas et al. 2005).

A supressão da resposta das células Th1 específicas para *Leishmania* na fase ativa da LV é uma das principais razões para a susceptibilidade à doença (Saha et al. 2006). Entretanto, os mecanismos que levam à imunossupressão das células Th1 ainda são desconhecidos, embora se saiba que a presença dos antígenos do parasito são cruciais neste processo. Atualmente, acredita-se que tais antígenos devem apresentar um duplo papel na patogenia da LV, estando direta ou indiretamente envolvidos no processo de ativação e de imunossupressão da resposta efetora (Santos-Oliveira et al. 2011).

Além desses achados, já foi visto que a LV se apresenta clinicamente como uma síndrome inflamatória sistêmica (Costa et al. 2010), na qual o parasito pode acabar contribuindo para a geração de uma intensa resposta inflamatória associada à falência múltipla dos órgãos, fazendo dessa doença algo muito similar ao que ocorre na sepse. Um estudo de caso-controle realizado em pacientes com LV no Piauí revelou que os fatores de risco para morte na LV correlacionavam-se com a ação clínica de várias citocinas pró-inflamatórias (Costa et al. 2010). Entretanto, ainda são necessários mais estudos para investigar os mecanismos precisos que contribuem para essas anormalidades imunológicas verificadas na LV, embora se acredite que o parasito possa estar envolvido direta ou indiretamente neste processo.

1.2.3 Leishmaniose visceral experimental

Apesar dos estudos em humanos nos permitirem inferir a respeito dos mecanismos imunopatogênicos da infecção pela LV, o uso de modelos experimentais fornece informações que podem auxiliar no raciocínio sobre a imunopatogenia da doença no homem, além de permitir a manipulação direta desses animais para o estudo dos parâmetros imunológicos associados (revisto por Goto & Prianti 2009).

Estudos utilizando diversos modelos experimentais têm sido realizados com o objetivo de se entender o funcionamento do sistema imunológico durante a LV. A maioria

destes tem como objetivo principal o teste de vacinas, tendo assim, como foco, a investigação de parâmetros imunológicos envolvidos na resistência à infecção pelas cepas viscerotrópicas. Entretanto, poucos são os trabalhos na literatura que enfocam os aspectos patológicos e histopatológicos relacionados a essa doença (revisto por Nieto et al. 2011).

Em condições experimentais, a progressão da LV vai depender de inúmeros fatores, tais como a via de infecção, a concentração do inóculo do parasito, assim como a cepa de *Leishmania* utilizada (revisto por Nieto et al. 2011). Um pré-requisito necessário para a escolha de um modelo animal é que este apresente características clínico-patológicas e uma resposta imunológica similar à observada nos seres humanos, quando expostos a uma determinada doença (Garg& Dube 2006).

Os cães, por serem considerados hospedeiros naturais de *L. infantum* são um dos melhores modelos animais para estudo (revisto por Kumar& Nylen 2012). Entretanto, a utilização desses animais é dispendiosa, requer grandes espaços para sua manutenção e manipulação, além de envolver questões éticas, o que torna seu uso limitado (revisto por Kumar& Nylen 2012). Assim, o modelo experimental mais utilizado são os camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* ou *L. infantum* (revisto por Goto& Lindoso 2004).

Embora os camundongos BALB/c sejam considerados susceptíveis à LV progressiva, observou-se que a doença é controlada pela resposta imunológica do hospedeiro nas primeiras semanas pós-infecção (Requena et al. 2000; Melby et al. 2001; Goto& Lindoso 2004). Esse controle da infecção foi observado por Murray e colaboradores (1987), onde camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* foram suscetíveis à infecção durante as quatro primeiras semanas, e essa suscetibilidade imunológica foi atribuída a uma falha das células do baço desses animais em responder a esse antígeno, assim como não foi observada a produção das citocinas IL-2 ou IFN- γ pelas células T ativadas. Entretanto, a partir da quarta semana, observou-se uma ativação das células T pelo antígeno e houve a produção dessas duas citocinas, fato que coincidiu com o controle da infecção parasitária nesses animais. Os animais que tinham células T deficientes não conseguiram controlar a infecção e não foram capazes de produzir IL-1 e IFN- γ , e nenhuma alteração no fígado foi observada. Esses dados confirmam a necessidade da resposta das células T contra esse antígeno para que haja uma resposta eficaz contra a infecção por *L. donovani* (Murray et al. 1987). Além desses achados, é descrito na literatura que a utilização desses animais necessita de uma infecção com elevada carga parasitária, fato este que não mimetiza o que ocorre em uma infecção natural (Requena et al. 2000).

A LV humana apresenta um espectro de manifestações clínicas que vão desde uma infecção auto-controlada até uma doença progressiva (Garg& Dube 2006). Baseado nisso, os

camundongos infectados com *L. donovani* ou *L. infantum*, representam a forma oligossomática auto-controlada dessa doença em humanos, e por isso são bons modelos para estudo da resposta imune protetora da LV (Goto& Lindoso 2004). Já o modelo hamster (*Mesocricetus auratus*), quando infectado com *L. donovani* ou *L. infantum*, apresenta manifestações clínicas condizentes com uma LV humana progressiva, tais como hepatoesplenomegalia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (Handman 2001; Melby et al. 2001; Goto& Lindoso 2004; Garg& Dube 2006), mimetizando a forma ativa da doença em cães e no homem, sendo por esse motivo um bom modelo para estudo dos mecanismos imunossupressores dessa doença (Goto& Lindoso 2004; Garg& Dube 2006).

A LV experimental nos hamsters apresenta outras similaridades com a forma humana da doença, como uma intensa multiplicação dos parasitos no baço, na medula óssea e no fígado. Essa intensa multiplicação parasitária ocorreu mesmo tendo sido observada a presença de citocinas do tipo Th1 (IFN- γ , IL2 e TNF) nesses órgãos, levando a uma forma progressiva da doença (Melby et al. 2001). Apesar da expressão de IFN- γ , não foram detectadas a expressão (RNAm) ou a atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS2), fato este que difere do que ocorreu no camundongo (Melby et al. 2001). Além disso, durante o curso da infecção, foi observada a produção das citocinas TGF- β e IL-10, que são conhecidas por suprimir a ativação dos macrófagos e a sua produção de óxido nítrico (NO) (Melby et al. 2001). Esses achados sugerem que a deficiência de NO pode ser um mecanismo importante para a progressão da LV experimental nesse modelo (Melby et al. 2001). Tais resultados são similares aos observados nos seres humanos e nos cães com LV (Requena et al. 2000).

Em contraste com a forma humana da doença, os hamsters desenvolvem algumas características patológicas particulares, tais como hipoplasia da polpa branca do baço, formação de granuloma hepático, deposição de substâncias amiloides no fígado e baço e glomerulonefrite associada à deposição de imunoglobulinas e parasitos nos rins. A amiloidose e a glomerulonefrite causam uma insuficiência renal e uma síndrome nefrótica nesses animais, o que pode lhes causar a morte. Todos esses achados provavelmente contribuem para a ocorrência de uma resposta imunológica desorganizada, o que acaba por levar esses animais ao óbito (revisto por Nieto et al. 2011). A patogênese da glomerulonefrite também já foi estudada na LV canina e a presença de linfócitos T CD4⁺, bem como de antígenos parasitários, foram implicados no processo (Costa et al. 2000; Costa et al. 2003).

Diversos trabalhos na literatura têm relatado o uso do *golden* hamster como modelo de estudo da LV. Dentre eles, Requena e colaboradores (2000) verificaram os parâmetros clínicos e imunológicos relacionados com a infecção desses animais por *L. infantum*, usando diferentes inóculos desse parasito e acompanharam esses animais ao longo de 12 meses. Neste

trabalho, os hamsters foram infectados com inóculos de promastigotas nas concentrações de 10^3 , 10^4 e 10^5 , por via intracardíaca. Os autores observaram que o tempo para desenvolvimento dos sintomas clínicos, assim como a resposta humoral detectada, se correlacionaram com o tamanho do inóculo de parasitos usado na infecção. Entretanto, aproximadamente metade dos animais não apresentou sinais clínicos compatíveis com o quadro de LV, independente do tamanho do inoculo utilizado. Além disso, alguns desses animais não apresentaram elevadas cargas parasitárias nos órgãos alvo durante o acompanhamento, enquanto outros apresentaram sinais de esplenomegalia. Esses dados indicam que a infecção pode ocorrer mesmo na presença de pequenos inóculos e que parte dos animais infectados é capaz de desenvolver uma proteção contra a infecção (Requena et al. 2000).

Fazzani e colaboradores (2011) fizeram uma avaliação da resposta imune e dos níveis de citocinas produzidos por hamsters infectados por *L. infantum*, durante diferentes estágios dessa infecção. Eles observaram um aumento progressivo da carga parasitária, de forma tempo-dependente, no baço desses animais, confirmando mais uma vez a similaridade desse modelo com a forma humana da doença. Também foi observada uma imunossupressão antígeno-específica durante a fase ativa da infecção, e esta foi determinada pela ausência de uma resposta linfoproliferativa frente aos antígenos de *Leishmania*. Contrariamente, a resposta ao mitógeno Concanavalina-A foi preservada ao longo do acompanhamento dos animais. Além disso, foram verificados nesse trabalho os parâmetros qualitativos e quantitativos quanto à expressão de citocinas específicas produzidas pelas células esplênicas. Entretanto, os autores observaram que estas não estavam alteradas quando comparados os animais sem infecção e os infectados. Sendo assim, os autores ainda não puderam demonstrar experimentalmente se esse perfil de citocinas poderia contribuir para o desenvolvimento da imunossupressão na forma ativa da LV (Fazzani et al. 2011).

Sendo assim, diversos são os trabalhos na literatura que utilizam o *golden hamster* (*Mesocricetus auratus*) como modelo de estudo da LV, e que confirmam o fato desse animal ser capaz de mimetizar os achados clínicos observados em um grande número de pessoas infectadas por esse parasito (Requena et al. 2000). Embora haja uma carência de insumos e reagentes imunológicos para esse animal, ele ainda é um excelente modelo experimental para o estudo das características patológicas da LV ativa (Requena et al. 2000; Melby et al. 2001; Nieto et al. 2011; Fazzani et al. 2011; Kumar & Nylén 2012). Por esses motivos expostos, o elegemos para realização do nosso trabalho.

1.2.4 Tratamento da leishmaniose visceral

Os compostos antimoniais foram utilizados pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1912 por Gaspar Vianna, e desde a década de 40 os derivados pentavalentes (Sb^{+5}) têm sido o tratamento de primeira escolha para as leishmanioses (MS 2006b).

Os derivados pentavalentes são encontrados sob duas formulações, estibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina, porém não parece existir diferenças entre elas quanto à eficácia. Os antimoniais pentavalentes são tidos como tratamento base da LV em áreas endêmicas, exceto na Índia, onde foi relatada resistência do parasito a esse composto (Matlashewski et al. 2011). No Brasil, a única formulação disponível e distribuída pelo Ministério da Saúde é o antimoniato N-metil glucamina (Glucantime[®]) (MS 2006b). A anfotericina B também é fornecida pelo MS, mas precisa ser solicitada pelos médicos através de um formulário específico, seguindo critérios pré-estabelecidos de indicação clínica (MS 2006a).

Para o tratamento com o antimonial é recomendada sua administração por via endovenosa ou intramuscular, em uma dose de 20mg de Sb^{+5} /kg/dia por um período mínimo de 20 e no máximo 40 dias, podendo-se usar no máximo 2 a 3 ampolas do medicamento por dia (MS 2006b). Em casos mais avançados da doença, recomenda-se um tempo mínimo de tratamento de 30 dias. A melhora clínica dos pacientes é observada ao final da primeira semana de uso do medicamento (Matlashewski et al. 2011).

O antimonial possui a vantagem de ter baixo custo, entretanto suas desvantagens incluem: longo tempo de hospitalização para sua administração (Murray et al. 2005), diversos efeitos colaterais, dos quais o principal são os distúrbios de repolarização cardíaca, sendo esse efeito dose/dependente. Outros efeitos colaterais observados são artralgias, adinamia, anorexia, dor no local da aplicação intramuscular e aumento da diurese por perda transitória da capacidade de concentração urinária. Após o término do tratamento, o paciente deve ser acompanhado para verificação de seus critérios de cura, aos 3, 6 e 12 meses após o tratamento. Na última avaliação, se permanecer estável, o paciente é considerado curado (MS 2006b). Os critérios de cura após o tratamento são essencialmente clínicos, observados pelo desaparecimento da febre, redução da hepatoesplenomegalia, assim como pela melhora dos parâmetros hematológicos (hemoglobina, plaquetas e leucócitos) (MS 2006b).

Quando o paciente apresenta recidiva da doença, observada pelo recrudescimento da sintomatologia em até 12 meses após cura clínica, recomenda-se a utilização mais prolongada do tratamento (no máximo 40 dias), com a mesma dose, antes de indicar esse paciente como

refratário (MS 2006b). A partir de então, sugere-se o uso de esquemas alternativos com fármacos de segunda linha para o tratamento da leishmaniose.

Outro fármaco usado no tratamento da LV é a anfotericina B lipossomal, que tem sido amplamente utilizada em países de primeiro mundo, sendo este o único tratamento aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos da América (EUA) (van Griensven & Diro 2012). Estudos têm demonstrado que doses menores desse medicamento podem ser utilizadas sem diminuir a eficácia, porém com menor toxicidade ao seu usuário. Sua administração é feita por via endovenosa e para o tratamento da LV a dose recomendada é de 1,0 a 1,5 mg/Kg/dia durante 21 dias, ou uma dose de 3,0 mg/Kg/dia durante 10 dias (MS 2006b). São observados efeitos colaterais ao uso da anfotericina B, sendo todos dose dependente, tais como flebite, devido ao efeito tóxico desse fármaco sobre as células do endotélio vascular, cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão. As complicações renais pelo uso desse medicamento são as mais importantes, sendo estas de diferentes graus e observadas ao longo do tratamento (MS 2006b). A anfotericina B lipossomal apresenta custo elevado, o que impossibilita seu uso rotineiro no tratamento das leishmanioses. Ela está sendo indicada aos pacientes que apresentam leishmaniose visceral grave e para aqueles que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca durante o uso do antimonial e não obtiveram melhora ou cura clínica (MS 2006b).

Apesar da eficácia dos tratamentos, alguns pacientes podem apresentar recidiva da doença, ou mesmo resistência aos fármacos utilizados.

1.3 Translocação microbiana

Os mecanismos envolvidos na intensa imunossupressão e à concomitante ativação celular observadas na leishmaniose visceral ainda não são completamente entendidos. Conforme explicado anteriormente, os antígenos parasitários devem contribuir diretamente para tais características, mas outros mecanismos direta ou indiretamente relacionados ao parasito também já foram investigados, entre eles a ação de moléculas circulantes agindo como receptores solúveis de IL-2, imunocomplexos e lipoproteínas. Entretanto, nenhum deles até o momento demonstrou qualquer tipo de ação imunossupressora em pacientes de LV (Barral-Netto et al. 1991b; Soares et al. 2006). Recentemente, uma molécula de origem microbiana e de provável origem luminal foi implicada na imunopatogênese da LV (Santos-Oliveira et al. 2011).

O trato gastrointestinal (TGI) funciona como uma barreira de contenção da microbiota no interior do lúmen intestinal. Essa microbiota é composta por uma grande diversidade de espécies bacterianas em um complexo ecossistema que estabelece uma relação simbiótica com o sistema imune do hospedeiro e com as células epiteliais. Essa interação permite um bom funcionamento desse ecossistema, reduzindo o risco de uma passagem excessiva de agentes microbianos de origem luminal para a circulação, prevenindo assim uma importante consequência: a ativação imune sistêmica. O termo translocação microbiana (TM) é utilizado para descrever a passagem de bactérias viáveis, assim como as não viáveis, (patogênicas ou não patogênicas), e os produtos bacterianos, tais como o lipopolissacarídeo (LPS), presentes no interior do TGI através da barreira da mucosa para a circulação ([Gatt et al. 2007](#); [D'Ettorre et al. 2012](#)). Diversos são os mecanismos presentes no hospedeiro saudável que estão envolvidos na prevenção e/ou atenuação dessa TM e na ativação imune gerada pela presença desses compostos na circulação ([Brenchley& Douek 2012](#)).

A ativação imune crônica, assim como uma resposta pró-inflamatória intensa podem ser observadas em algumas doenças infecciosas e não-infecciosas, tais como a malária ([Andrade et al. 2010](#)) e as doenças inflamatórias do intestino (IBD, do inglês *intestinal bowel disease*) ([Harrison& Maloy 2011](#)). Tal ativação persistente pode ser dirigida pelo estímulo antigênico e/ou ser independente do antígeno, porém sempre gera consequências importantes para o indivíduo ([Santos-Oliveira et al. 2011](#)).

Um exemplo de doença infecciosa que induz uma ativação crônica do sistema imune, é a infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida tipo 1 (HIV-1). Nesta, ocorre uma supressão grave do compartimento de células T, principalmente pela depleção de linfócitos T CD4⁺ ([Giorgi et al. 1999](#)). Na literatura, já foi relatado que essa depleção de células T CD4⁺ ocorre já na fase aguda da infecção e principalmente, no tecido linfoide associado à mucosa (GALT - do inglês *gut-associated lymphoid tissue*), de pacientes infectados pelo HIV-1. Essa depleção causa danos na integridade desse sistema imune de mucosa, permitindo assim que ocorra a translocação de produtos microbianos de origem luminal para a circulação ([Brenchley et al. 2004](#)). Esses componentes microbianos, tais como os LPS, são capazes de estimular o sistema imune inato e adaptativo, gerando um ambiente inflamatório, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias e promovendo uma intensa ativação da resposta imune celular, e finalmente causando um comprometimento imune sistêmico ([Brenchley et al. 2006](#)).

Um estudo recente mostrou que a TM pode contribuir também para a patogênese de morbidades não relacionadas com a AIDS, incluindo a demência e as doenças cardiovasculares. Por esse motivo, o fenômeno de TM surgiu como um desafio para o

tratamento moderno do HIV-1 (Ancuta et al. 2008; Ceccarelli et al. 2011). Outras doenças, como as hepatites B e C, são caracterizadas pelo aumento nos níveis dos produtos microbianos na circulação. Além disso, foi observado que a inflamação induzida pelo LPS está associada à cirrose e é um preditor da progressão dos estágios finais da doença no fígado nos pacientes com hepatite (Caradonna et al. 2002; Sandler et al. 2011).

O fenômeno da TM pode ser indiretamente detectado pela quantificação dos níveis plasmáticos de LPS. Esta molécula possui a capacidade de estimular as células mononucleares através do reconhecimento dos receptores *Toll-like-4* (TLR-4), e assim promover a secreção de inúmeros fatores inflamatórios solúveis, como o IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α e o MIF (fator de inibição da migração de macrófagos) (Roger et al. 2001; Lu et al. 2008). O MIF é uma citocina liberada por diversos tipos celulares, em resposta a diversos estímulos, dentre eles a própria endotoxemia (Bacher et al. 1997). Já foi relatado que qualquer tipo de dano que possa vir a ocorrer na permeabilidade seletiva do intestino, assim como a perda da regulação imune intestinal, é capaz de permitir a ocorrência da TM para a circulação (revisto por Santos-Oliveira & Da-Cruz 2012), como já foi observado em doenças inflamatórias intestinais (Caradonna et al. 2000) e em transplantes hematopoiéticos (Cooke et al. 2002).

A LV apresenta características patogênicas semelhantes às observadas na infecção pelo HIV/SIDA, onde se observa uma prevalência da resposta pró-inflamatória e depleção linfocitária sistêmica (revisto por Santos-Oliveira & Da-Cruz 2012), permitindo-nos supor que estes mecanismos pudessem estar favorecendo a ocorrência de uma TM em pacientes com LV. Além disso, é sabido que o parasito é capaz de infectar as células do intestino desses pacientes (Muigai et al. 1983) e formas amastigotas podem ser detectadas neste sítio (Luz et al. 2010), causando alterações nas vilosidades e criptas, ou mesmo contribuindo para a oclusão da mucosa. Recentemente, nosso grupo verificou níveis elevados de LPS plasmático em pacientes brasileiros infectados com LV, especialmente na fase ativa da doença, e esses resultados correlacionaram-se com a diminuição da contagem de células T no sangue periférico, com a ativação sistêmica das células T, e com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma, entre elas o MIF. Esses resultados sugeriram que uma molécula de origem bacteriana, não associada com a infecção pela *Leishmania*, pode exercer efeitos deletérios no sistema imune desses pacientes (Santos-Oliveira et al. 2011).

O CD14 é um co-receptor do LPS, atuando em conjunto com o receptor TLR-4 e MD-2, sendo expresso principalmente por macrófagos, mas também por neutrófilos e por células dendríticas. Uma forma solúvel do CD14 (CD14s) é segregada pelo fígado e monócitos, sendo esta capaz de se ligar ao LPS, mesmo quando este encontra-se em baixa concentração. Considerando que os níveis de LPS plasmáticos presentes nos pacientes com

LV correlacionaram-se com o CD14s, pode-se afirmar que essa molécula microbiana estava bioativa *in vivo* e, portanto, capaz de exercer efeitos estimulatórios direta ou indiretamente sobre as células do sistema imune (Santos-Oliveira et al. 2011).

A fonte do LPS plasmático pode ser o lúmen intestinal, já que o dano na mucosa foi sugerido devido à presença no plasma da proteína ligadora de ácido graxo intestinal (IFABP – do inglês *intestinal fatty acid binding protein*). Esta é uma proteína citosólica presente nas células do epitélio do intestino delgado, sendo liberada no plasma quando ocorre algum dano à integridade dessa membrana celular. A presença de níveis aumentados dessa proteína no plasma de pacientes infectados em relação aos indivíduos saudáveis, bem como sua correlação positiva com os níveis de LPS, reforça nossa hipótese de que esses produtos microbianos possam ser originários do lúmen intestinal desses pacientes. Outra possibilidade é a do LPS ser proveniente de infecções microbianas sistêmicas, já que tais complicações são comuns na LV, apesar de serem os Gram-positivos mais implicados. Além disso, o LPS pode ser oriundo de uma consequente falha na sua eliminação pelos macrófagos residentes do trato gastrointestinal ou do fígado, ou da sua eliminação pelo sistema renal (Brenchley & Douek 2012). Desse modo, o fenômeno da translocação microbiana na LV, assim como, a origem desse LPS bacteriano presente na corrente sanguínea dos pacientes precisam ser elucidados. Tal mecanismo se constituiria em um cofator relevante para o agravamento da doença em possível alvo de tratamento.

Sob o ponto de vista terapêutico, tem sido relatada na literatura a avaliação de diferentes intervenções que visam diminuir o processo de TM. Um desses estudos relata que a administração de probióticos bacterianos é capaz de proporcionar benefícios específicos na infecção por HIV-1 (Cunningham-Rundles et al. 2011). Brenchley e colaboradores (2006) observaram que produtos oriundos da TM contribuíram para uma ativação do sistema imune de macacos *rhesus* infectados com o vírus da imunodeficiência símia (SIV). Neste trabalho, os autores mostraram que o LPS presente no plasma desses macacos infectados era oriundo do TGI, e que este estava relacionado à ativação imune crônica nesses animais infectados. Esse fenômeno se tornou mais claro quando os autores esterilizaram toda a microbiota intestinal desses animais através da administração de um antibiótico específico para bactérias Gram-negativas, por duas semanas. Posteriormente, os níveis de LPS monitorados no plasma desses animais mostraram uma importante diminuição já na primeira semana de tratamento com o antibiótico usado. Esses dados sugeriram que a origem do LPS plasmático presente nos animais infectados com SIV foi o TGI, por meio do fenômeno da TM (Brenchley et al. 2006).

Assim, similarmente ao que ocorre na infecção pelo HIV-1 e SIV, o parasito também atinge as células da mucosa intestinal, causando-lhes lesões que podem permitir a TM (Baba

et al. 2006; Luz et al. 2010). Como o tratamento para a LV atua de forma específica sobre o parasito de maneira sistêmica no organismo, somente o tratamento contra o parasito talvez não seja o suficiente para evitar esse fenômeno de TM, pois uma vez ocorridas lesões nas células intestinais, não haveria como impedir a TM de bactérias do lúmen intestinal para a circulação. Além disso, os indivíduos tratados para LV ainda permanecem com altos níveis de citocinas inflamatórias, mesmo após seis meses de tratamento (Santos-Oliveira et al. 2011), sugerindo que o tratamento específico sozinho pode não ser o suficiente para reduzir a intensa ativação imune observada na LV, especialmente se considerarmos a presença de produtos microbianos na circulação provenientes da translocação (Santos-Oliveira et al. 2011).

Logo, todos esses achados nos permitiram hipotetizar que o uso de uma terapia antimicrobiana específica para bactérias Gram-negativas, juntamente com o tratamento específico para *Leishmania*, seria uma boa alternativa para melhorar a condição clínica dos pacientes com LV. Dessa maneira, o uso do modelo experimental nos permitirá observar com mais detalhes a ocorrência desse fenômeno da TM, bem como se a terapia com antibióticos será capaz de reduzir os níveis de LPS e, portanto, a ativação imune sistêmica. Por fim, poderemos inferir a origem desse LPS presente na circulação dos animais.

2. RACIONAL E JUSTIFICATIVA

Tem sido demonstrado que uma grande quantidade de citocinas é liberada na circulação de pacientes com LV, mas os fatores que levam a essa ativação sistêmica ainda são amplamente desconhecidos. Além dos próprios antígenos de *Leishmania*, várias moléculas como receptores solúveis para IL-2 (Barral-Netto et al. 1991b), imunocomplexos e lipoproteínas (Soares et al. 2006) têm sido implicadas na patogênese da LV, embora não tenham sido comprovadas as suas atividades imunossupressoras. Estudos de nosso laboratório sugeriram que o LPS, possivelmente oriundo de translocação microbiana, poderia contribuir para a patogênese da LV. Nesse trabalho pretende-se investigar experimentalmente esse fenômeno.

Uma vez que humanos e hamsters apresentam manifestações similares da doença, no que se refere à sintomatologia, ao curso evolutivo e à imunopatogênese, esses animais representam um modelo adequado para o estudo experimental de LV, permitindo investigar o fenômeno da translocação microbiana e suas consequências sistêmicas. O fato de ter sido identificado que pacientes com LV apresentam aumento de LPS circulante e a liberação de IFABP, relacionados ao dano do epitélio da mucosa intestinal, sugere que a presença de bactérias Gram-negativas, decorrentes de translocação microbiana, possa levar ao agravamento da doença, já que o LPS contribuiria para a ativação celular e a resposta pró-inflamatória sistêmica. O acompanhamento de animais com LV, tratados e os não tratados com antimicrobiano, permitirá identificar se a presença de produtos microbianos influenciaria o curso clínico da LV e se sua associação com a terapia anti-*Leishmania* poderia ser um adjuvante no tratamento da LV.

Desse modo, espera-se como principal benefício deste estudo a possibilidade de se propor uma terapêutica coadjuvante ao manejo da LV, considerando-se que a eliminação de bactérias Gram-negativas reduziria a circulação de produtos microbianos que potencialmente aumentam a ativação celular e a resposta pró-inflamatória sistêmica relacionada ao déficit da resposta imune efetora.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a ocorrência de translocação microbiana e o papel de produtos microbianos no agravamento da leishmaniose visceral experimental em hamsters infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*.

3.1 Objetivos específicos

1- Avaliar a concentração plasmática de LPS para demonstrar a presença de produtos microbianos de bactérias Gram-negativas na circulação.

2- Analisar as características fenotípicas de linfócitos T do sangue periférico dos animais infectados, visando associar o grau de expressão de moléculas relacionadas à ativação celular com a gravidade da infecção.

3- Avaliar o efeito da antibioticoterapia, bem como do tratamento anti-*Leishmania* específico, sobre a liberação de produtos de origem microbiana para a circulação e consequente ativação linfocitária.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e parasitos

4.1.1 Animais de experimentação

Neste estudo foram utilizados hamsters dourados (*golden hamster*, sinônimo de hamster sírio) da espécie *Mesocricetus auratus*. Os animais eram não isogênicos, machos, com idade entre 45 a 60 dias e peso entre 105-120 gramas. Esses animais foram adquiridos de um fornecedor especializado (ANILAB - Animais de Laboratório, Paulínia, São Paulo, Brasil) e posteriormente, mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, localizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os hamsters foram mantidos em gaiolas, as quais comportavam cinco ou seis animais cada, acondicionadas em ambiente com ventilação natural e sendo-lhes fornecido ração em pellets Nuvilab (Nuvital Nutrientes, Paraná, Brasil) e água à vontade.

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa animal da Universidade de São Paulo sob o número CPE-IMT 2011/118 (ANEXO 1).

4.1.2 Obtenção e purificação de amastigotas

A cepa utilizada nesse estudo (MHOM/BR/72/cepa 46) foi isolada pelo Dr. Mayrink da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em 1972 de um caso humano com leishmaniose visceral, proveniente de Mantena (MG). Esta foi caracterizada como *Leishmania (L.) infantum* pela Coleção de Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC.

A virulência da cepa foi mantida através de passagens sucessivas *in vivo* em hamsters da espécie *M. auratus*. A manutenção do parasito foi realizada através da inoculação peritoneal de homogeneizados de baços, rico em amastigotas, oriundos de animais infectados. Após completarem aproximadamente 2 a 3 meses de infecção, estes animais foram eutanasiados em uma caixa de acrílico ligada a um balão de CO₂ (câmara de CO₂) e posteriormente foi feita a retirada do baço, de forma asséptica, de onde foram obtidas as formas amastigotas.

Para isolamento das amastigotas utilizou-se o protocolo de Dwyer (Dwyer 1976) com algumas modificações. Assim, os baços retirados foram macerados e homogeneizados

em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), em temperatura ambiente e os fragmentos tissulares foram filtrados em gaze. O material obtido nessa filtração foi primeiramente aspirado com uma seringa de 20mL, usando uma agulha 21G (30 x 0,8 mm) (Becton Dickinson - BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), e posteriormente, desprezado utilizando uma agulha 25G (15 x 0,5 mm) em um tubo cônico novo e estéril de 50 mL (BD, EUA). Este procedimento de aspirar e desprezar o material tissular, incluindo a troca das agulhas, foi repetido três vezes. Posteriormente, esse filtrado celular foi centrifugado a 300g por 10 minutos, a 20°C (Thermo Scientific IEC/CL40R, Thermo Electron Corporation, Alemanha). O sobrenadante formado após a centrifugação foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico estéril e colocado em um tubo cônico novo e estéril de 50 mL (BD, EUA). Em seguida, este material foi centrifugado a 2800g por 30 minutos a 20°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento formado no fundo do tubo cônico foi ressuspense em 10mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil). As amastigotas presentes nesse sedimento foram coradas com solução de Turk (INLAB- Alamar Tecno Científica, São Paulo, SP, Brasil) diluído 1:20, e contadas em uma câmara de Neubauer (LO-Laboroptik, Lancing, West Sussex, Reino Unido), na diluição de 1:100, utilizando-se o microscópio óptico (Carl Zeiss – Axioskop 2, Jena, Alemanha), com objetiva de 40x e ocular de 10x. Após a contagem, a concentração das formas amastigotas foi ajustada para 2×10^7 parasitos/mL, em um volume final de 100µL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil), para que fosse realizada a infecção dos animais do estudo.

4.1.3 Infecção dos hamsters com *Leishmania (Leishmania) infantum*

Para a infecção, os animais foram previamente anestesiados através da inoculação intramuscular em uma das coxas de 0,4mL do anestésico cloridrato de cetamina, na concentração de 20mg/mL (Ketamin, Itapira, São Paulo, Brasil). Posteriormente, esses animais foram infectados intraperitonealmente com uma concentração de 2×10^7 formas amastigotas, que estavam suspensos em um volume final de 100µL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil).

4.2 Desenho experimental

Neste estudo foi utilizado um total de 117 *golden hamsters*. Os fármacos utilizados para o tratamento foram antimonial pentavalente - antimoniato de meglumina 300 mg/mL (antimoniato de N-metilglucamina - Glucantime®, Sanofi-Aventis, Suzano, SP, Brasil), na dosagem de 100mg/kg por dose e o antibiótico - sulfato de amicacina 250 mg/mL (Teuto, Anápolis, GO, Brasil), na dosagem de 15 mg/kg por dia. Os medicamentos foram administrados por via intraperitoneal por período de 10 dias cada um. Os grupos de animais não infectados e infectados com *L. infantum* (de acordo com o protocolo descrito anteriormente) foram divididos nos seguintes grupos experimentais e submetidos às seguintes condições:

- Grupo 1** – animais sem infecção e que não receberam nenhum estímulo externo (N=30);
- Grupo 2** – animais infectados e que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento (N=36);
- Grupo 3** – animais infectados e tratados com antimonial (N=12);
- Grupo 4** – animais infectados e tratados com antibiótico (N=12);
- Grupo 5** – animais infectados tratados com o antimonial e o antibiótico, de forma concomitante (N=12);
- Grupo 6** – animais sem infecção e que foram submetidos ao tratamento com antibiótico (N =5);
- Grupo 7** – animais sem infecção e tratados com antimonial (N =5);
- Grupo 8** – animais sem infecção e tratados de forma concomitante, com antimonial e antibiótico (N =5).

Este protocolo experimental durou 101 dias, contados a partir da data de infecção dos animais com *L. infantum*. Cada grupo de animais foi eutanasiado em intervalos de tempo pré-determinados, para o acompanhamento da cinética de infecção e da resposta ao tratamento, bem como a evolução dos parâmetros clínicos e imunológicos desses animais no decorrer do tempo. Os intervalos para a realização das eutanásias foram: 48 horas, 72 horas, 15 dias, 45 dias, 55 dias (10 dias pós-início do tratamento) e 101 dias (46 dias pós-finalização do tratamento), contados a partir do momento de infecção dos hamsters, conforme o esquema abaixo (Figura 4.1).

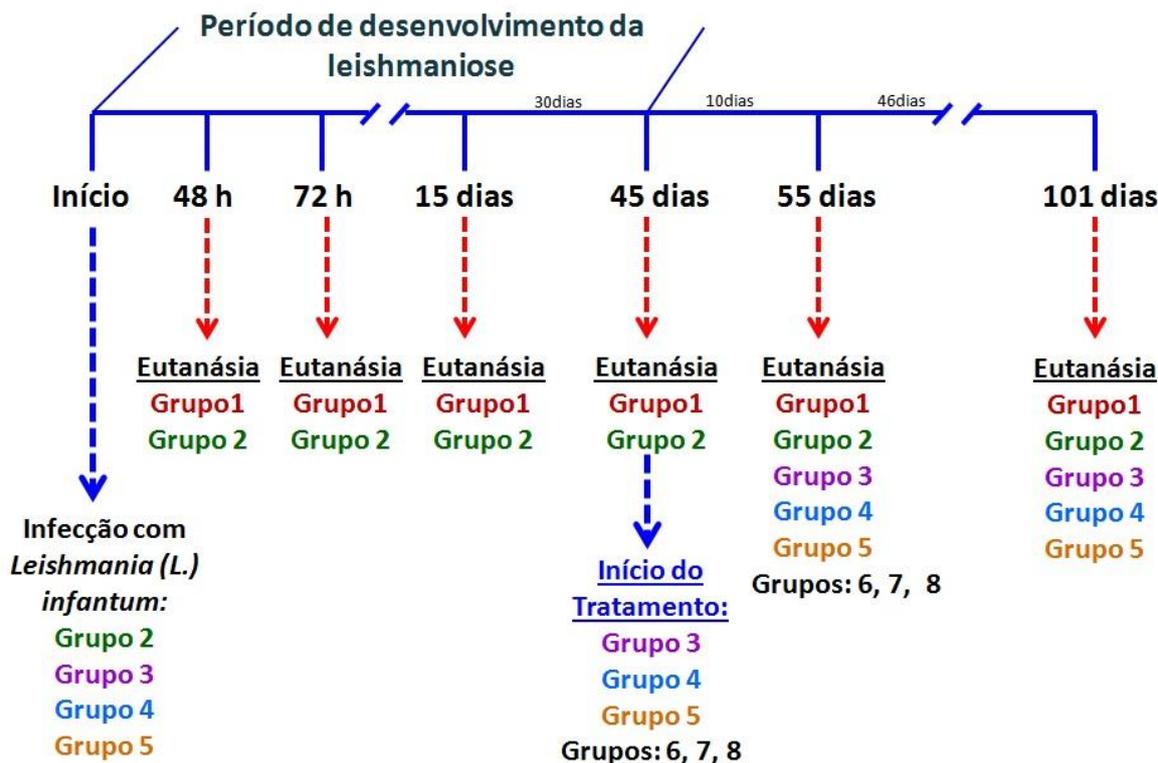


Figura 4.1: Desenho experimental de infecção e acompanhamento do desenvolvimento da doença e tratamento dos hamsters infectados ou não com *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Os animais pertencentes aos Grupos G1 e G2 foram os primeiros a serem eutanasiados nos intervalos de tempo de 48 horas, 72 horas e 15 dias. Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂.

No momento 45 dias pós-infecção deu-se início ao tratamento dos animais, com os respectivos fármacos de cada grupo. No momento 55 dias pós-infecção, os animais de todos os grupos em estudo (G1 ao G8) foram eutanasiados e por fim, no momento 101 dias pós-infecção, apenas os animais restantes e pertencentes aos grupos 1 ao 5 (G1 ao G5) foram eutanasiados.

4.3 Avaliação clínica

Após a infecção dos animais, houve um intervalo de 45 dias para o início do tratamento dos animais. Em todos os momentos pré-estabelecidos no desenho experimental foram feitas análises clínicas dos animais, assim como a visualização de possíveis alterações anatômicas macroscópicas, funcionais e comportamentais. Tais análises foram realizadas através da mensuração do peso e da avaliação dos sinais clínicos como aspecto dos pelos, arqueamento das patas, aparecimento de hepatoesplenomegalia e caquexia. Após a eutanásia dos animais, estes foram imediatamente pesados, utilizando uma balança de precisão (Gehaka, São Paulo, SP, Brasil), da mesma forma que o fígado e o baço.

4.4 Coleta das amostras biológicas para os ensaios laboratoriais

No momento da eutanásia dos animais foi realizada a coleta de aproximadamente 5 mL de sangue, em tubos contendo o anticoagulante heparina (BD Vacutainer®, EUA), por meio de uma abertura torácica, seguida de um corte cardíaco. Para a coleta do sangue foi utilizado uma pipeta Pasteur de plástico, estéril.

O sangue heparinizado coletado foi utilizado para obtenção de células mononucleares de sangue periférico e posterior caracterização fenotípica dessas células por citometria de fluxo. Parte do sangue foi armazenado para posterior realização da quantificação da carga parasitária através da detecção do DNA do parasito, por meio da metodologia de PCR em tempo real. Foram separadas duas alíquotas de 1mL cada de plasma heparina, que foram estocadas a -70°C, até que fossem processadas para a quantificação de imunoglobulinas anti-*L. infantum* e para a dosagem de lipopolissacarídeo (LPS).

Posteriormente, foi realizada a retirada de forma asséptica, do fígado, do baço e do intestino delgado (jejuno e parte do íleo) para análises quanto aos parâmetros macroscópicos, parasitológicos e histopatológicos. Os fragmentos retirados desses órgãos foram adequadamente armazenados em solução de formalina tamponada a 10%, com pH 7,2-7,4 (formaldeído a 37% - Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha) para as análises histopatológicas. Além disso, fragmentos do baço também foram utilizados para a quantificação de amastigotas.

Por fim, fragmentos do intestino foram armazenados na solução de RNA *later* (Ambion by Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e em solução de *Tissue Tek® Optimal cutting temperature compound* – O.C.T. (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA), para análises

posteriores quanto à quantificação do perfil de citocinas (PCR tempo real) e presença de parasitos (imunohistoquímica).

4.4.1 Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Parte do sangue obtido foi utilizado para a separação de células mononucleares, usando diferença de densidade por meio de centrifugação com Ficoll-Hystopaque (Histopaque – 1119, Sigma-Aldrich, EUA). Este foi diluído obedecendo à proporção 1:5 em meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10 mM de hepes, 1,5 mM de L-glutamina, 0,04 mM de 2-mercaptoetanol e antibióticos (penicilina e estreptomicina) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA), doravante designado RPMI completo.

Posteriormente, as CMSP foram obtidas através de centrifugação em Ficoll-Hypaque (Histopaque – 1119, Sigma-Aldrich, EUA) obedecendo à proporção de 1:2 e centrifugado a 1200g por 20 minutos a 20°C. O anel contendo as CMSP foi coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur estéril e as células ali obtidas foram lavadas três vezes em meio RPMI 1640 completo a 670g por 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação observou-se a formação de um *pellet* contendo essas células mononucleares, de modo que o sobrenadante foi descartado e esse *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Brasil). O número de células vivas foi avaliado por exclusão da incorporação do azul de Tripán (Sigma-Aldrich, EUA) diluído a 1%, em diluições de 1:10 ou 1:100. A contagem dessas células foram feitas através da câmara de Neubauer (LO-Laboroptik, Lancing, West Sussex, Reino Unido) em um microscópio óptico (Zeiss Axioskop 2, Carl Zeiss, Alemanha), usando objetiva de 40x e ocular de 10x. Essas CMSP foram novamente centrifugadas a 670g, por 10 minutos a 4°C e o *pellet* ressuspensão em meio PBS (salina tamponada com fosfato) (Sigma-Aldrich, EUA) contendo 0,1% de azida-sódica – PBS-azida – (Sigma-Aldrich, EUA), para posterior caracterização fenotípica das CMSP.

4.4.2 Caracterização fenotípica das células mononucleares de sangue periférico por citometria de fluxo

A marcação de superfície foi realizada após as células serem ajustadas para 3×10^5 por tubo em 100 μ L de PBS-azida e incubadas com 2 μ L dos seguintes anticorpos monoclonais: A) subpopulação linfocitária: CD4⁺ (anticorpo anti-CD4 murino PE-Cy5) e B)

ativação celular: CD25⁺ (anticorpo anti-CD25 murino PE), todos da marca BD (Biosciences PharmingenTM, Califórnia, EUA).

Após a incubação por 30 minutos, as células foram lavadas por centrifugação a 670g por 10 minutos a 4°C, fixadas com PBS a 1% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, EUA) e conservadas a 4°C. Para a aquisição e a análise por citometria de fluxo foi utilizado o citômetro FACSCalibur (BD, EUA), e o software para realização das análises foi o BD Cell Quest Pro (BD, EUA). Para cada amostra foram adquiridos 30.000 eventos dentro da região delimitada para a população de linfócitos.

O protocolo de análise utilizado está ilustrado na figura 4.2. A região que continha a população de linfócitos T, foco de nosso estudo, foi definida de acordo com o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a granularidade (SSC – *side scatter*) das células (**passo A**). A subpopulação linfocitária de células T CD4⁺ foi definida por fluorescência (PE-Cy5) e tamanho (**passo B**). Posteriormente, para se definir a proporção de células que expressavam o fenótipo de ativação celular foram realizados dois tipos de análise. Na primeira, avaliou-se o percentual de células ativadas (CD25⁺) dentro da população de linfócitos T CD4⁺ (**passo C**). Na segunda, avaliou-se o percentual de células simples-positivas CD4⁺ CD25⁺ dentro da população total de linfócitos (**passo D**).

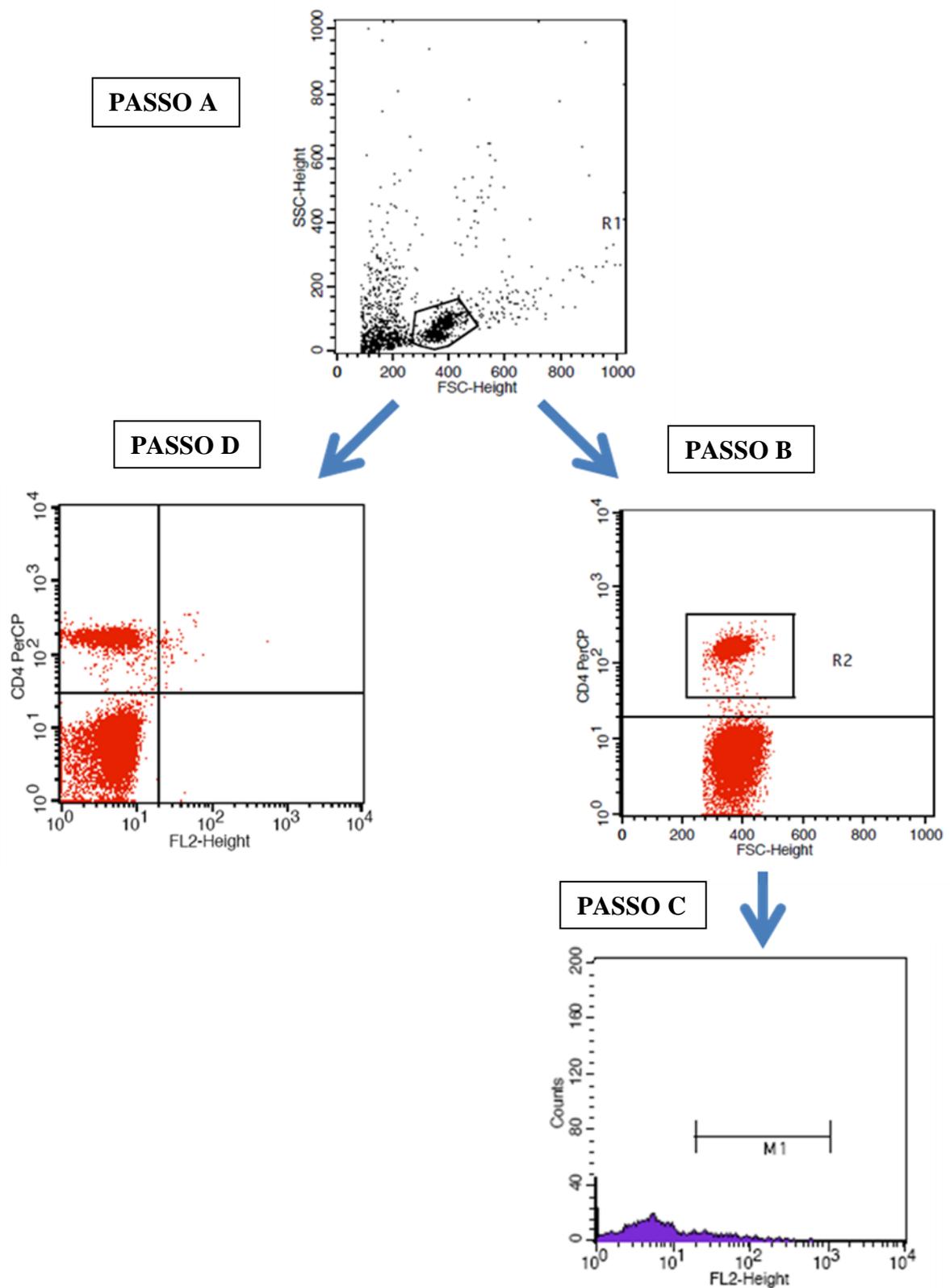


Figura 4.2: Etapas do protocolo de análise citofluorimétrica para as moléculas da população de linfócitos T. Passo A: separação dos linfócitos T de acordo com o tamanho (FSC – *forward scatter*) e a granularidade (SSC – *side scatter*) das células (R1). Passo B: separação da subpopulação linfocitária de células T CD4⁺ por meio da fluorescência (PE-Cy5) e tamanho. Passo C: separação das células ativadas (CD25⁺) que estavam dentro da população de linfócitos T CD4⁺ (R2). Passo D: avaliação do percentual de células simples-positivas CD4⁺ CD25⁺ dentro da população total de linfócitos (R1).

4.4.3 Quantificação dos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS)

O plasma coletado após centrifugação do sangue heparinizado foi aliquoteado e congelado a -70°C até o momento da quantificação dos níveis de LPS. Os ensaios de quantificação foram realizados com um kit comercial (*Limulus amoebocyte lysate* QCL-1000, Cambrex, Milão, Itália), de acordo com as instruções do fabricante. Ao final da análise, os resultados foram expressos em pg/mL. O limite mínimo de detecção e o nível de sensibilidade do teste foi de 10 pg/mL.

4.4.4 Quantificação de amastigotas do baço

Um dos fragmentos retirados do baço foi submetido à impressão por aposição em lâmina de vidro (*imprint*). Em seguida, essas lâminas foram coradas com Panótico (Giemsa), usando o kit comercial *Instant Prov* (NewProv - produtos para laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. Os *imprints* foram analisados quantitativamente sob microscópio óptico, segundo o método de Stauber (Stauber 1958), onde foram contadas até 1000 amastigotas ou células, por lâmina. A carga parasitária no baço foi calculada usando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Número de parasitos}}{\text{Número de células}} \times \text{peso do baço (gramas)} \times 2 \times 10^4$$

Os resultados foram expressos em número de formas amastigotas $\times 10^4$ /mg de baço.

4.4.5 Determinação dos níveis de imunoglobulina G (IgG) total no plasma dos hamsters estudados

Para a determinação dos níveis de imunoglobulina G (IgG) total utilizou-se um ensaio imunoenzimático (ELISA), previamente padronizado em nosso laboratório. Para tal, placas para imunoensaio de 96 poços de fundo chato do tipo MaxiSorp™ (Nunc-Immuno Assay Plates - Sigma-Aldrich, EUA) foram sensibilizadas e incubadas a 4°C por 12 horas em uma câmara úmida, com um antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* (cepa referência IOC/L0579 - MHOM/BR/1974/PP75). Após este período, os poços foram lavados, por duas vezes, com

uma solução de PBS/Tween-20 (*Polyethylene-sorbitan monolaurate*, Sigma-Aldrich, EUA) a 0.05% e bloqueados usando essa solução de PBS/Tween-20 acrescida de 10% de soro fetal bovino (Gibco - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), por uma hora à temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas, por quatro vezes seguidas, como com uma solução de PBS/Tween-20, e foram adicionadas às placas as amostras de plasma dos animais diluídas 1:400, em duplicatas. Elas foram incubadas por três horas em temperatura ambiente, em uma câmara úmida.

Ao término do tempo de incubação, os poços foram lavados, por seis vezes consecutivas, usando uma solução PBS/Tween-20. A essas placas foram adicionadas o anticorpo biotilado para detecção dos níveis de anti-IgG total anti-hamster (*Goat anti-syrian hamster-IgG* HRP, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA), que foram previamente diluídos para a concentração de 1:5000. Esses anticorpos ficaram incubando na placa por 45 minutos, em uma câmara úmida e a temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram novamente lavadas, por seis vezes consecutivas, com uma solução PBS/Tween-20. Posteriormente foi adicionado as placas a solução de substrato OPD (ortofenilenodiamina – Sigma-Aldrich, EUA), que consiste em 5mg de OPD dissolvido em 12,5mL de tampão OPD (composto de 0,0595g de fosfato de sódio (Na_2HPO_4) acrescido de 0,0595g de ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) com um de pH 4,9, onde esses dois compostos foram previamente diluídos em 50 mL de água destilada). A essa solução substrato OPD foi acrescida de 5 μL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%, imediatamente antes do uso. Essa solução de OPD acrescida do peróxido de hidrogênio foi adicionada às placas para que ocorresse a reação colorimétrica, que sucedeu em um intervalo de tempo de 5–10 min. Essa reação colorimétrica foi interrompida com a adição de 25 μL /poço de ácido clorídrico (HCl) na concentração de 2N.

A intensidade da coloração observada nas placas é proporcional à concentração de anticorpos existente nas amostras, e esta foi mensurada com o auxílio de um espectrofotômetro (modelo ELx800 – BioTek *instruments*, Winooski, VT, EUA), usando um comprimento de onda de 490 nm. Os resultados foram analisados utilizando-se o programa Gen5TM (versão 2.01 - BioTek *instruments*, EUA) e estes foram expressos em densidade óptica (DO).

4.5 Análise estatística

As comparações foram feitas entre os grupos de animais (G1 ao G8) nos diferentes momentos e intra-grupos num determinado momento do protocolo experimental (Ex: diferenças observadas em G2 com 48 horas, 72 horas, 15 dias, 45 dias, 55 dias e 101 dias). Para tal, foi utilizado o teste Mann Whitney (não-paramétrico) e quando três ou mais grupos foram comparados simultaneamente, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns . As análises de correlação foram feitas utilizando o teste de Correlação de Spearman. Essas análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, EUA), e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

4.6 Considerações Éticas

As etapas de infecção experimental e obtenção de material biológico desse trabalho foram realizadas no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, que mantém colaboração com o Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ / Rio de Janeiro. Todos os procedimentos envolvendo os hamsters foram feitos respeitando-se os preceitos da ética em pesquisa animal.

5. RESULTADOS

5.1 Evolução clínica dos hamsters com leishmaniose visceral experimental

Neste trabalho, foram avaliados 117 *golden hamsters*, dos quais 72 foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46). Estes animais foram acompanhados clinicamente ao longo de 101 dias pós-infecção (dpi). No decorrer desse período, não foi visualizado nenhum sinal compatível com a leishmaniose visceral, como alterações no aspecto dos pelos, arqueamento das patas, aparecimento de hepatoesplenomegalia e caquexia (Figura 5.1).



Figura 5.1: Fotodocumentação dos *golden hamsters* em diferentes momentos ao longo da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) infantum*. As imagens mostram animais controles sem infecção e aqueles que foram infectados com 2×10^7 formas amastigotas do parasito. Nenhum animal apresentou sinais clínicos visíveis de leishmaniose visceral ao longo do trabalho. A) hamsters sem infecção, no momento inicial dos experimentos; B) hamsters infectados com *L. infantum*, 48 horas pós-infecção; C) hamsters infectados com *L. infantum*, 72 horas pós-infecção; D) hamsters infectados com *L. infantum*, 15 dias pós-infecção; E) hamsters infectados com *L. infantum*, 45 dias pós-infecção; F) hamsters infectados com *L. infantum*, 55 dias pós-infecção.

Com relação ao peso dos animais, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, independente de estarem ou não infectados com *L. infantum*, ao longo dos 101 dias em que foram acompanhados (Figura 5.2). Ao analisarmos somente os grupos de animais infectados com *L. infantum* (G2) verificamos que estes apresentaram um aumento de peso progressivo a partir de 45 dpi, quando comparado com os momentos clínicos iniciais do experimento (Figura 5.2 e 5.3).

A respeito dos animais que foram infectados com *L. infantum* e que receberam tratamento com o antimonial pentavalente e/ou o antibiótico amicacina, observamos que não houve nenhuma diferença de peso significativa entre esses animais, quando comparados com o grupo que estava infectado pelo parasito (G2) (Figura 5.4).

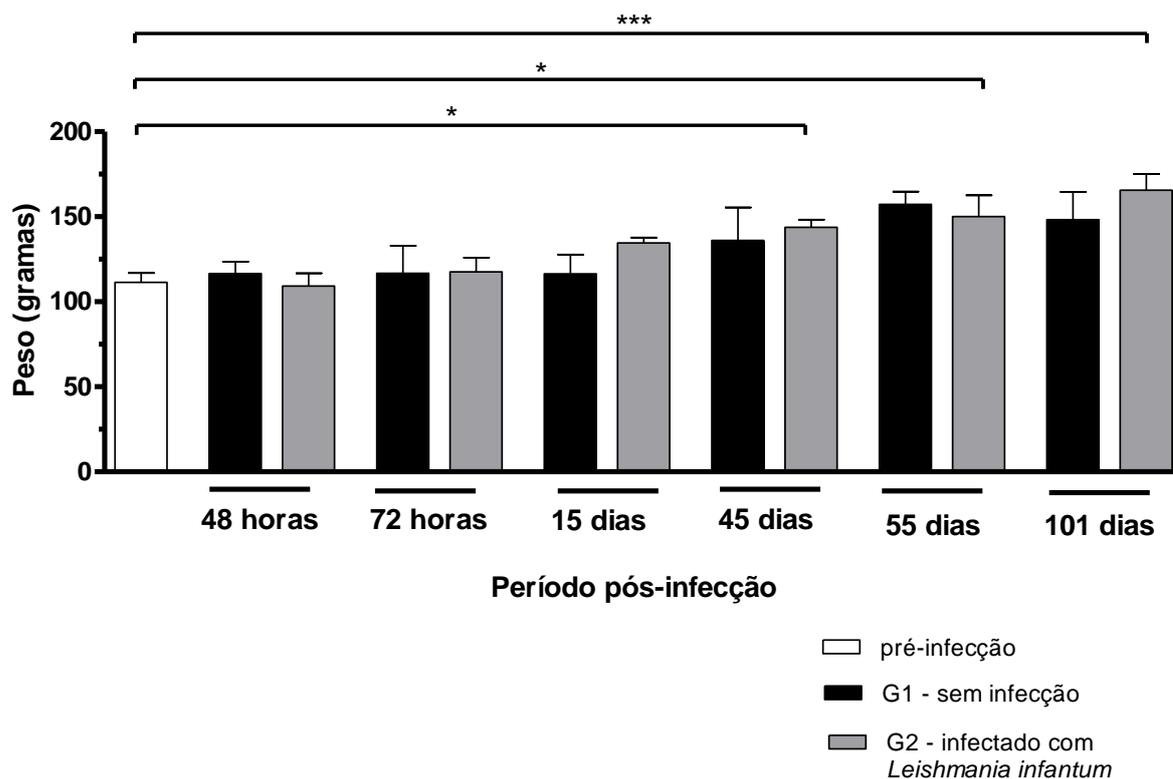


Figura 5.2: Peso dos grupos de *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de acompanhamento. Na figura são apresentados o peso dos animais sem infecção (G1), e dos animais infectados com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2). As colunas representam a mediana e as respectivas linhas horizontais representam o intervalo interquartil superior. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

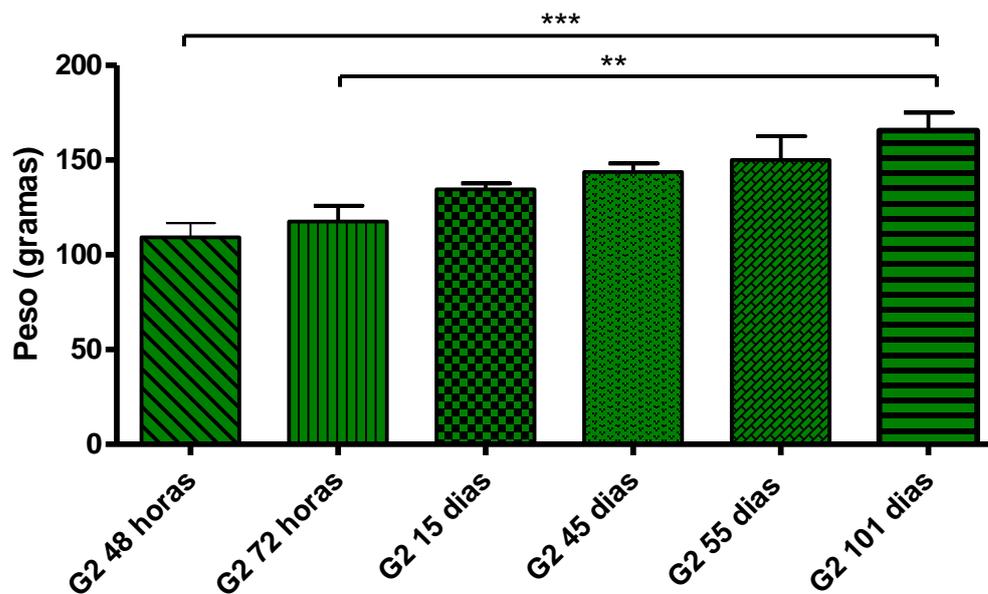


Figura 5.3: Peso dos *golden hamsters* infectados ao longo dos 101 dias de acompanhamento. Os hamsters foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, e pertencem ao grupo G2. Os grupos de animais foram acompanhados e pesados, nos momentos pré-determinados, ao longo dos 101 dias pós-infecção. As colunas representam a mediana e as respectivas linhas horizontais representam o intervalo interquartil superior. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Teste paramétrico Kruskal-Wallis com o pós-teste de Dunns).

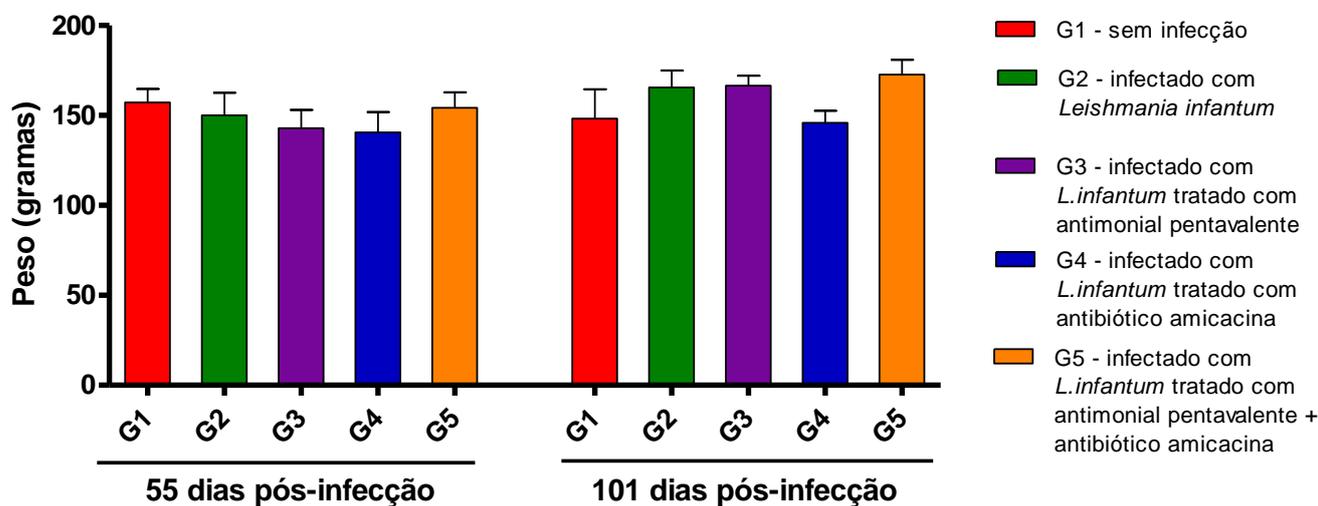


Figura 5.4: Peso dos *golden hamsters* nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) infantum*. Grupos compostos por animais sem infecção (grupo G1), animais infectados com *L. infantum* (grupo G2), e animais infectados e tratados com diferentes fármacos (grupos G3-antimonial; G4-antibiótico; G5-antimonial e antibiótico). Estes grupos de animais foram acompanhados e pesados, nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção. As colunas representam a mediana e as respectivas linhas horizontais representam o intervalo interquartil superior (ANOVA; pós-teste de Dunns).

No intuito de verificarmos outras possíveis alterações morfológicas ocorridas nos *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de experimento, o fígado e o baço desses animais também foram analisados e pesados. Para realizarmos uma análise mais fidedigna em relação ao peso desses órgãos, realizamos uma normalização, onde dividimos o peso do órgão pelo peso do respectivo animal. Na análise do peso dos fígados verificamos que houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) no momento 101 dpi, onde o grupo infectado com *L. infantum* (G2-101 dpi) apresentou um maior peso do órgão, quando comparado com o grupo controle sem infecção (G1) (Figuras 5.5 e 5.6). Além disso, esse mesmo grupo G2-101 dpi apresentou um peso significativamente ($p < 0,05$) maior deste órgão, quando comparado ao grupo G2-15 dpi (Figura 5.5).

No que se refere aos animais que foram submetidos aos diferentes tratamentos, observamos que o grupo que foi submetido ao tratamento com antimonial pentavalente, G3-101dpi, apresentou um aumento de peso significativo ($p < 0,01$) ao compará-lo ao grupo G3-55 dpi (Figura 5.6). Os hamsters do grupo G3-101 dpi também apresentaram um fígado significativamente mais pesado se comparado com o grupo que foi infectado e tratado somente com antibiótico (G4-101 dpi) ($p < 0,01$) e com o grupo submetido ao tratamento com os dois fármacos simultaneamente (G5-101 dpi) ($p < 0,05$). No momento 101 dpi, verificamos também que o fígado dos animais que foram somente infectados pelo parasito (G2-101 dpi) mostrou-se significativamente ($p < 0,05$) mais pesado quando comparado ao grupo de animais infectados e tratados com o antibiótico (G4-101 dpi), e ao grupo de animais controle sem infecção (G1-101 dpi) (Figura 5.6).

Os hamsters infectados com *L. infantum* (G2), assim como aqueles infectados que receberam apenas o tratamento com o antibiótico (G4), apresentaram alterações macroscópicas no fígado, a partir do momento 55 dias pós-infecção, caracterizadas por uma coloração mais pálida, tendendo para o marrom claro, com a presença de focos brancos levemente mais elevados ao longo de toda a superfície do órgão (Figura 5.7).

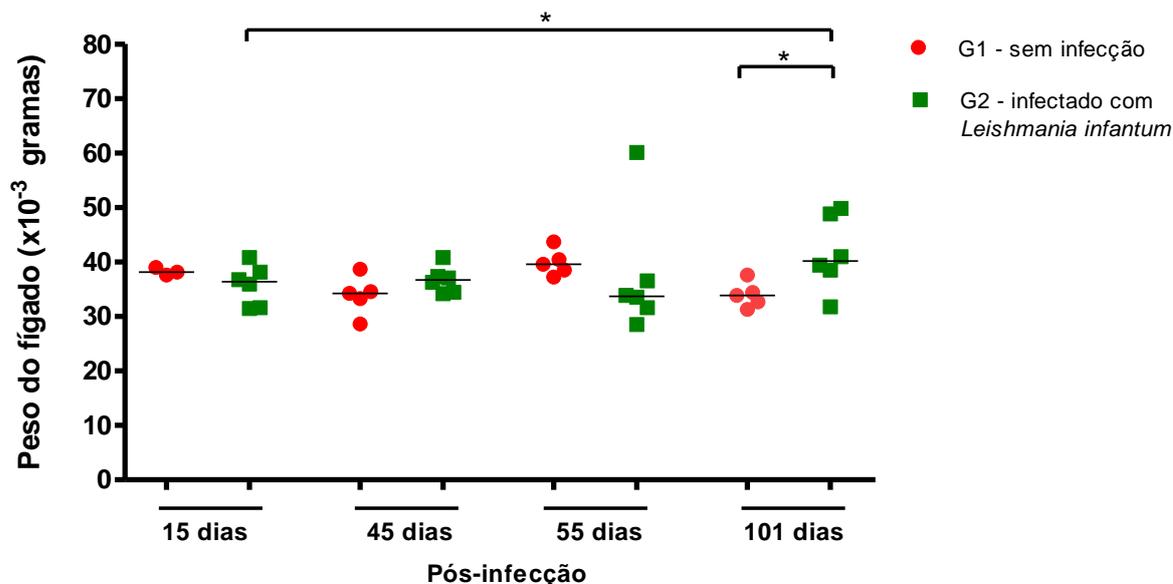


Figura 5.5: Peso do fígado dos *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de acompanhamento. Os grupos controle sem infecção (G1) e os grupos infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2) tiveram seus fígados pesados. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

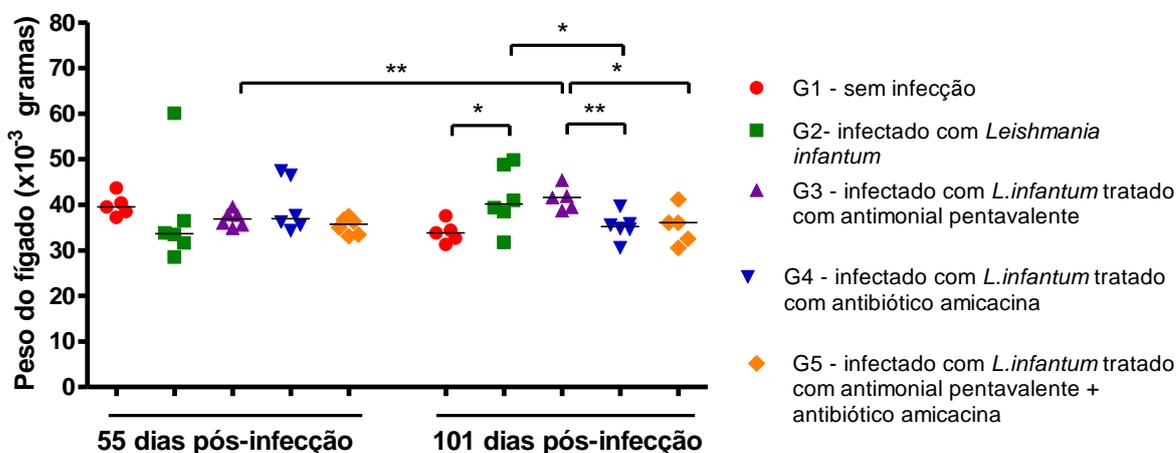


Figura 5.6: Peso do fígado dos *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de acompanhamento. Os grupos de hamsters controle sem infecção (G1), de animais infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2) e dos animais infectados e tratados com diferentes fármacos, tiveram seus fígados pesados nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

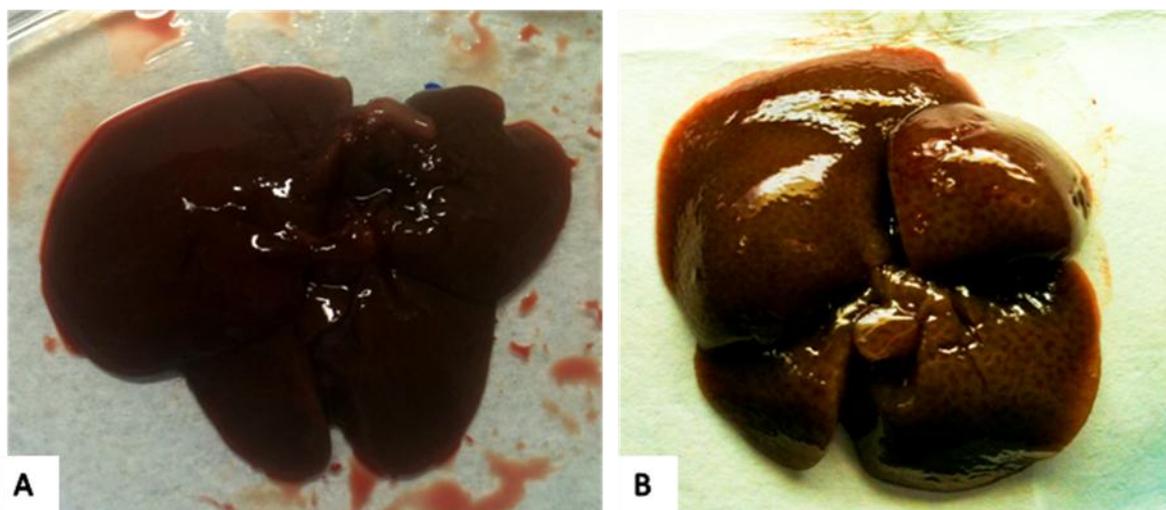


Figura 5.7: Aspecto anatômico do fígado dos *golden hamsters*. A) Fígado de um animal controle sem infecção (G1); B) Fígado de um animal infectados com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2).

Na análise do baço desses animais, observamos a presença de uma similaridade no peso entre os grupos infectados com *L. infantum* (G2) e o grupo não infectado (G1), ao longo do todo o experimento, excetuando-se o momento de 101 dpi, onde o grupo G2 apresentou um aumento de peso significativo ($p < 0,05$) comparado ao grupo G1 desse mesmo momento (Figura 5.8). O mesmo fato pode ser observado com o peso do fígado, como descrito anteriormente. Ao realizarmos uma observação entre os grupos, no momento 101 dpi, verificamos que os animais que foram infectados pelo parasito em questão e que receberam algum dos tratamentos propostos, apresentaram uma tendência a um peso menor (G3, G4 e G5) quando comparado ao grupo que foi somente infectado pela *Leishmania* (G2-101 dpi). No entanto, nessa análise, pode-se destacar que apenas o grupo que foi submetido ao tratamento com os dois fármacos simultaneamente (G5-101 dpi) apresentou um peso significativamente menor ($p < 0,05$) comparado ao G2-101 dpi (Figura 5.9). Esse mesmo grupo G5-101 dpi apresentou um peso significativamente menor ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo que foi tratado somente com antimonial pentavalente (G3-101 dpi), sugerindo uma maior eficácia no tratamento com esses dois fármacos simultaneamente (Figura 5.9). Já os animais infectados e tratados somente com o antibiótico amicacina (G4-101 dpi), apresentaram um maior peso do baço, comparado ao grupo igualmente infectado, mas que foi submetido apenas ao tratamento com o antimonial pentavalente (G3-101 dpi) ($p < 0,05$) (Figura 5.9). Esses resultados sugerem que o uso do antibiótico amicacina de forma concomitante ao antimonial pentavalente (G5), pode ter um efeito positivo quanto ao peso do baço desses animais, pois estes se mantiveram semelhantes nos momentos 55 e 101 dias pós-

infecção. Além disso, o peso do baço dos grupos G5-55 dpi e G5-101 dpi mostraram-se similares ao apresentado pelos grupos controle sem infecção, de cada um dos seus respectivos momentos analisados (G1-55 dpi e G1-101dpi) (Figura 5.9).

A respeito do aspecto macroscópico do baço, observamos que a partir do momento 45 dpi houve uma alteração significativa de sua forma. Os animais controles e sem infecção (G1) apresentaram um baço com um tamanho menor e mais fino, enquanto que nos animais infectados, esse órgão foi maior e mais largo (Figura 5.10). Além disso, os animais que foram infectados pelo parasito, mas que receberam tratamento, seja com o antibiótico e/ou com o antimonial, também apresentaram alterações morfológicas significativas nesse órgão, quando comparados com o grupo controle sem infecção. Esses animais tratados mostraram um baço não tão alongado, porém igualmente largo, ao compará-los com os animais que foram somente infectados com *Leishmania* (G2) (Figura 5.11).

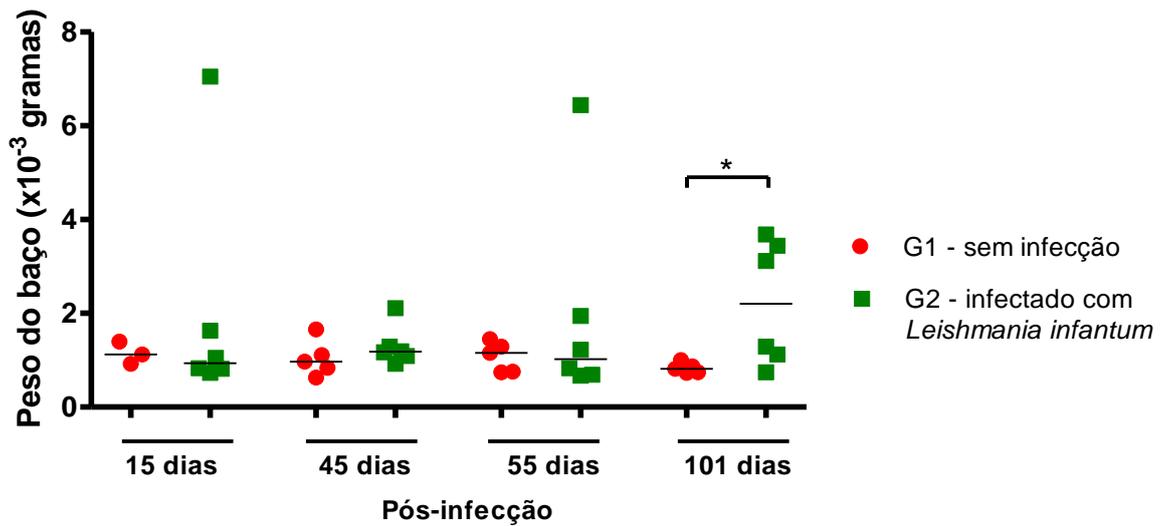


Figura 5.8: Peso do baço dos *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de acompanhamento. O baço dos *golden hamsters* dos grupos sem infecção (G1) e dos infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2), foram pesados em diferentes momentos, ao longo dos 101 dias de acompanhamento. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

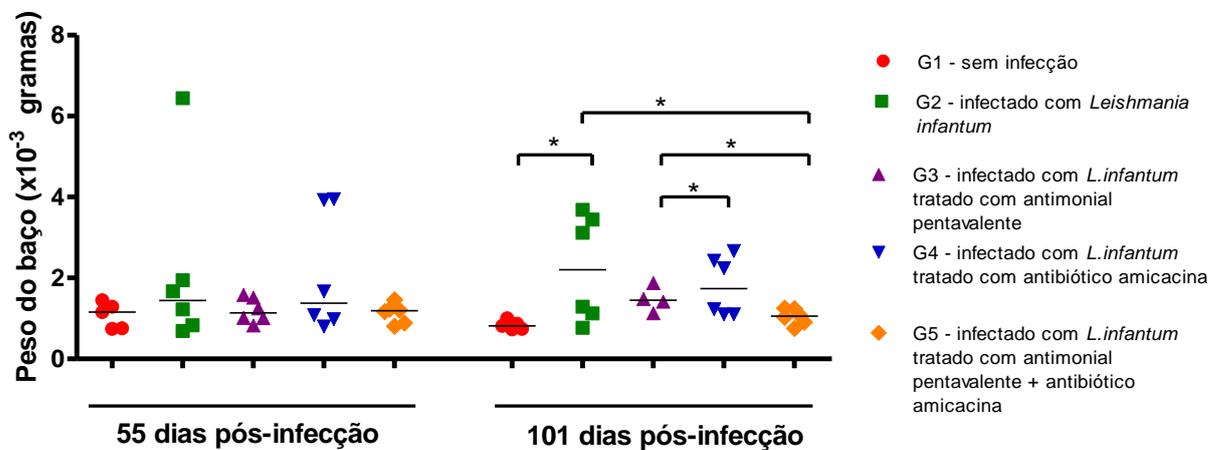


Figura 5.9: Peso do baço dos *golden hamsters* ao longo dos 101 dias de acompanhamento. O baço dos *golden hamsters* dos grupos sem infecção (G1), dos animais infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2), e dos animais infectados e tratados com diferentes fármacos. Esses animais foram acompanhados e pesados, nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).



Figura 5.10: Aspecto macroscópico dos baços dos *golden hamster* sem infecção (G1) e dos animais infectados com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (G2). A) Baço de um animal controle sem infecção (G1) no momento 45 dias pós-infecção. A morfologia desse órgão é fina e seu comprimento aproximado é de 3 cm. B) Baço de um animal do grupo G2 no momento 45 dias pós-infecção. Esse órgão é anatomicamente mais alongado e largo, comparado ao grupo controle (G1), figura (A). C) Baço de um animal controle sem infecção (G1), no momento 55 dias pós-infecção, estando esse com uma forma alongada, e estreita em sua largura. D) Baço de um animal infectado (G2), no momento 55 dias pós-infecção, estando anatomicamente mais comprido, e largo comparado ao animal sem infecção, figura (C). E) Baço de um animal controle sem infecção (G1), no momento 101 dias pós-infecção, apresentando-se de forma alongada, e estreito em sua largura. F) Baço de um animal infectado (G2), no momento 101 dias pós-infecção, apresentando uma forma mais alongada e larga, comparado ao grupo controle desse mesmo período de tempo. A escala métrica utilizada nas fotos foi de centímetros (cm).

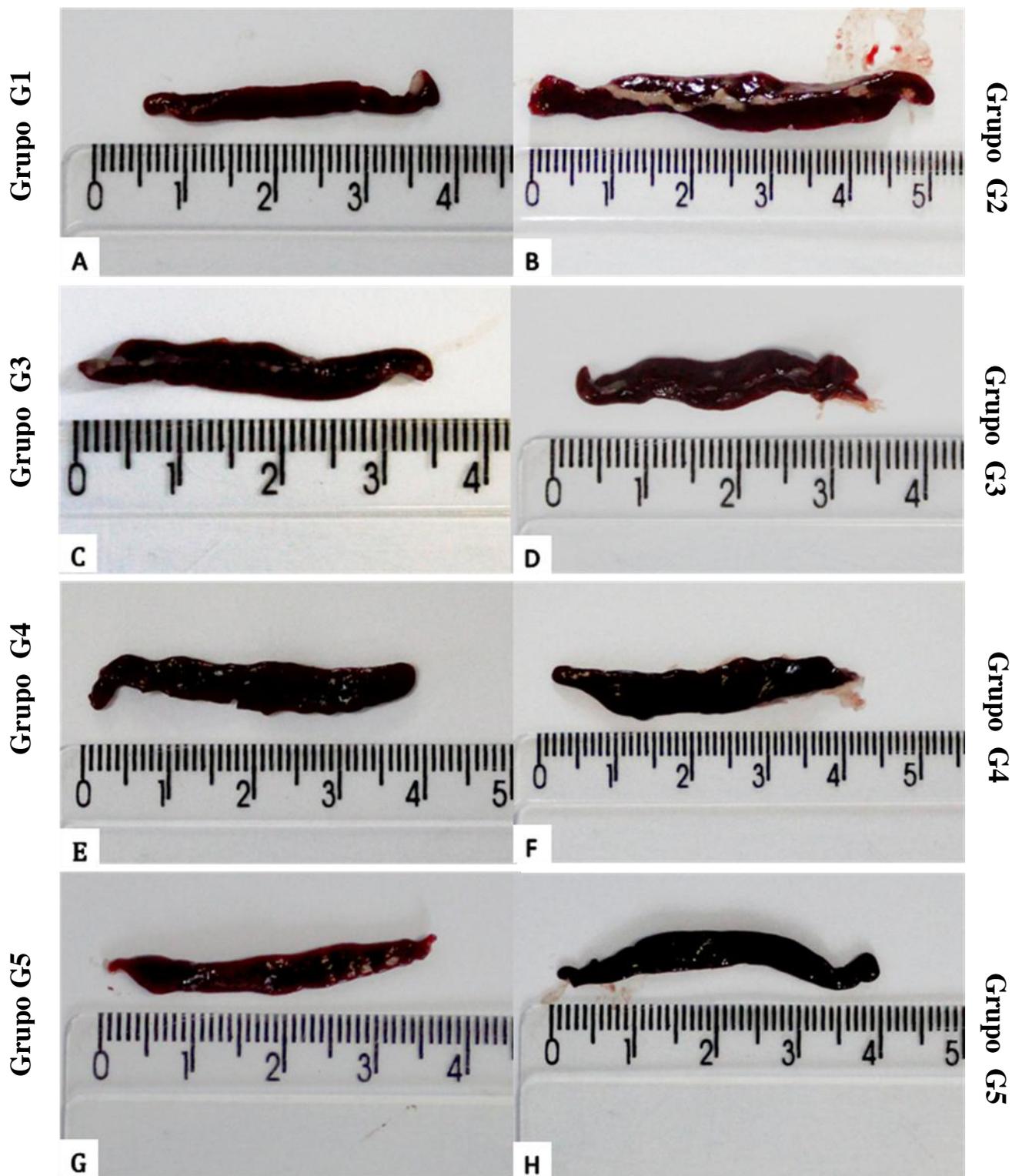


Figura 5.11: Aspecto macroscópico dos baços dos *golden hamster* no momento 101 dias pós-infecção. Os animais foram infectados intraperitonealmente com uma concentração de 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*. A) baço de um animal controle sem infecção (G1). B) baço de um animal infectado com *L. infantum* (G2). (C e D) baços de animais que foram infectados com *L. infantum* e tratados com antimonial pentavalente (G3). (E e F) baços de animais que foram infectados com *L. infantum* e tratados com antibiótico amicacina (G4). (G e H) baços de animais que foram infectados com *L. infantum* e tratados com os dois fármacos em questão, de forma concomitante (G5). A escala métrica utilizada nas fotos foi de centímetros (cm).

5.2 Avaliação da carga parasitária no baço

O baço dos hamsters infectados com *L. infantum*, independente de estarem ou não recebendo tratamento com algum dos fármacos propostos, foi submetido à contagem de formas amastigotas, conforme descrito na metodologia. Ao analisarmos os grupos de animais infectados pelo parasito (G2), ao longo dos 101 dias, observamos uma inconstância quanto a essa carga parasitária. Verificou-se uma diminuição significativa no número de formas amastigotas no decorrer do experimento, até o momento de 45 dias pós-infecção, entretanto, essa carga parasitária começa a aumentar a partir do momento 55 dpi (Figura 5.12).

Ao realizarmos a contagem dessa carga parasitária nos animais infectados pelo parasito, mas que receberam algum tipo de tratamento verificamos uma diminuição significativa desse número ao compará-los com os animais que estavam somente parasitados (G2-55 dpi e G2-101 dpi) (Figura 5.13). Devemos destacar que em ambos os momentos, 55 e 101 dpi, observamos uma diminuição significativa da carga parasitária ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) nos grupos que foram submetidos ao tratamento com o antimonial pentavalente (G3) e com os dois fármacos concomitantes (G5), quando comparados os respectivos grupos que estavam infectados com o parasito, mas que não receberam nenhum tratamento (G2-55 dpi e G2-101 dpi) (Figura 5.13). No momento 55 dpi também se verificou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da carga parasitaria esplênica no grupo tratado com o antibiótico amicacina (G4). No momento 101 dpi esse mesmo efeito foi observado, no entanto, não foi possível observar uma significância estatística nessa comparação (Figura 5.13). Vale destacar que alguns animais submetidos ao tratamento com o antibiótico amicacina, nos momentos 55 e 101 dpi, apresentaram uma carga parasitária esplênica elevada, se destacando dos demais pertencentes ao mesmo grupo.

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas nas cargas parasitárias esplênicas, nos momentos 55 e 101 dpi, na comparação entre três grupos submetidos aos diferentes esquemas terapêuticos propostos neste trabalho (Figura 5.13).

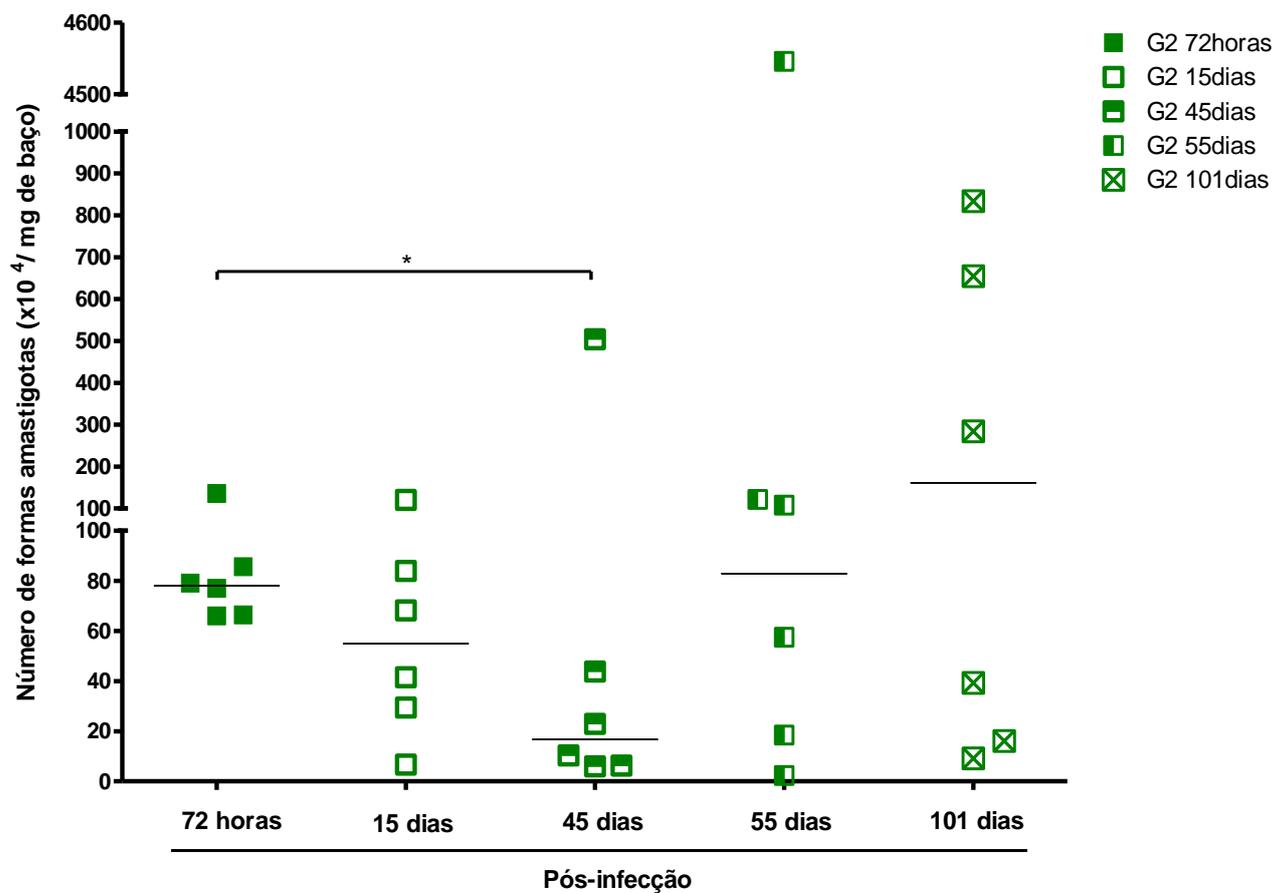


Figura 5.12: Carga parasitária em *golden hamsters* infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Número de formas amastigotas $\times 10^4$ presentes no *imprint* de baço, de hamsters infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *L. infantum* (G2), ao longo dos 101 dias de acompanhamento pós-infecção. As colunas representam a mediana e as respectivas linhas horizontais representam o intervalo interquartil. * $p < 0,05$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

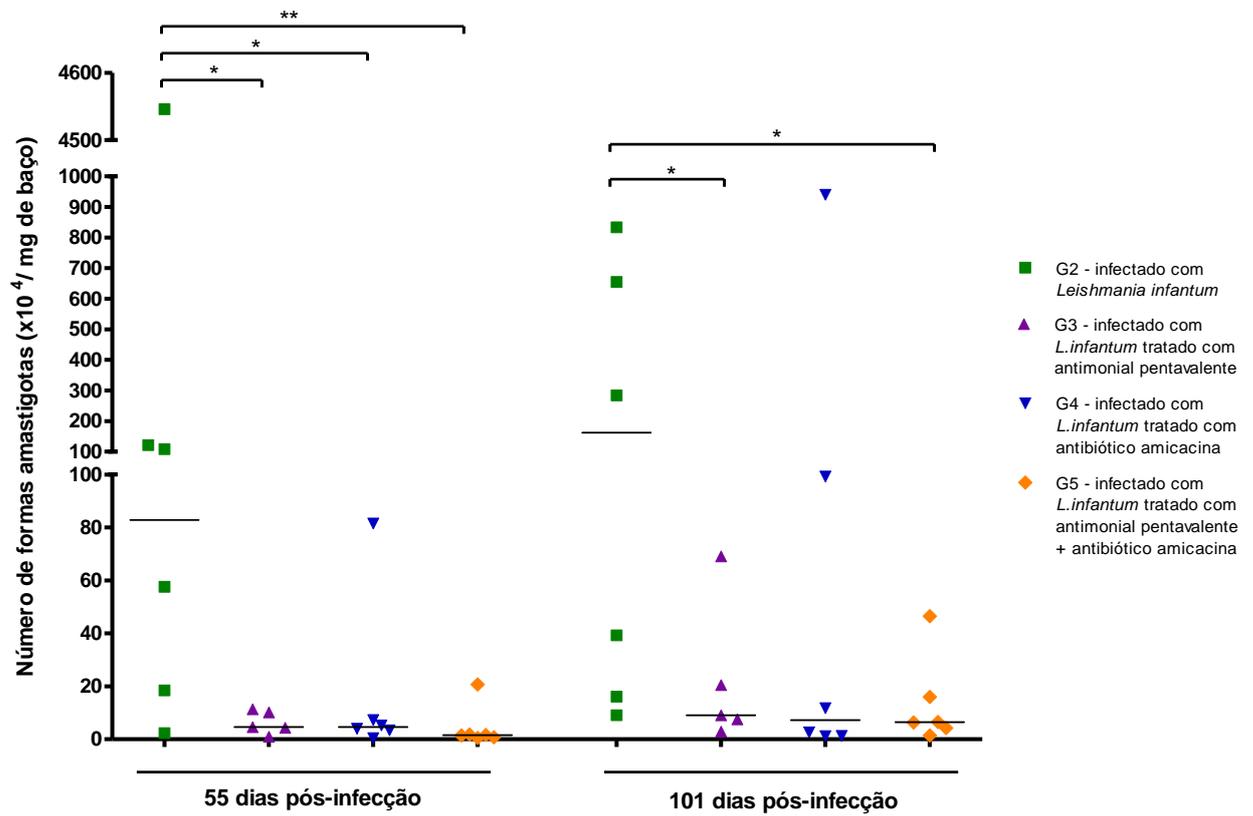


Figura 5.13: Carga parasitária em *golden hamsters* infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Número de formas amastigotas $\times 10^4$ presentes no *imprint* de baço de hamsters infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *L. infantum* (G2), assim como aqueles que foram infectados e tratados com diferentes fármacos, nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção. (G3)-grupo de hamsters infectados com *L. infantum* e tratados com antimonial pentavalente, (G4)-grupo de hamsters infectados com *L. infantum* e tratados com antibiótico ampicilina, (G5)-grupo de hamsters infectados com *L. infantum* e tratados com o antimonial e antibiótico de forma concomitante. As linhas horizontais representam o intervalo interquartil. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

5.3 Análise macroscópica do intestino delgado dos *golden hamsters*

Com o intuito de se avaliar as possíveis alterações morfológicas causadas pela infecção por *L. infantum*, foi realizada a análise macroscópica do intestino delgado (porção final do duodeno e início do íleo) dos hamsters infectados pelo parasito em questão. Observou-se uma diminuição do número de placas de Peyer nos animais infectados com *L. infantum*, quando comparado com os animais controles sem infecção (Figura 5.14 e 5.15). Além disso, o intestino dos animais infectados também estava mais friável à manipulação. Os hamsters infectados e que foram submetidos a algum tipo de tratamento apresentaram uma substancial melhora, no que diz respeito ao número de placas de Peyer, na aparência e na fragilidade desse tecido (Figura 5.15). Aparentemente, o uso concomitante dos dois fármacos, antimonial pentavalente e o antibiótico amicacina, demonstrou promover uma melhor recuperação na mucosa intestinal, quanto aos aspectos visuais e ao número de placas de Peyer (Figura 5.15). As figuras mostram fotos representativas de um animal de cada grupo, mas as observações citadas foram homogêneas em todos os animais pertencentes aquele grupo em questão (Figura 5.14 e 5.15). As análises qualitativas e quantitativas das alterações histopatológicas estão sendo realizadas pelo Prof. Dr. Assis da Universidade Federal do Piauí, com o qual mantemos colaboração.

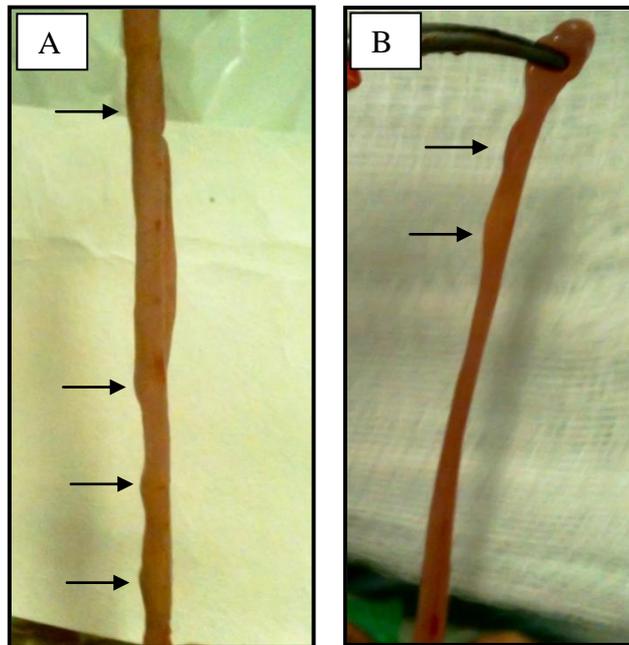


Figura 5.14: Aspecto macroscópico do intestino delgado dos hamsters estudados. Na fotodocumentação são demonstrados o intestino de hamsters sem infecção e infectado intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, no momento 55 dias pós infecção. As setas pretas indicam as placas de Peyer. A) intestino delgado de um animal sem infecção (G1). B) intestino de um animal infectado com *L. infantum* (G2).

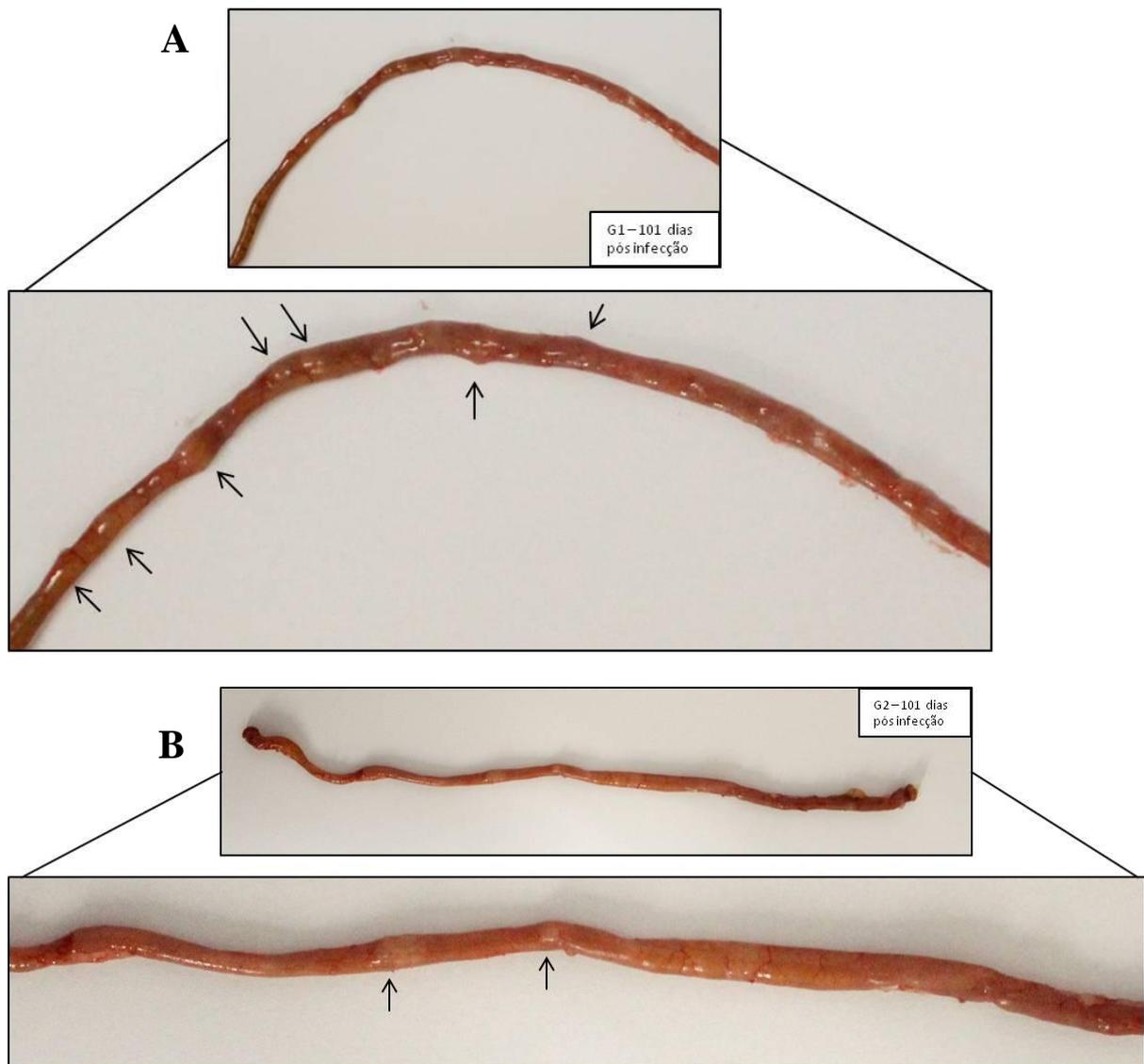


Figura 5.15: Aspecto macroscópico do intestino delgado dos hamsters sem infecção e aqueles que foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, no momento 101 dias pós infecção. As setas pretas indicam as placas de Peyer presentes nesses tecidos. A) intestino delgado de hamsters controles e sem infecção (G1). B) intestino delgado de um hamster infectado com *L. infantum* (G2).

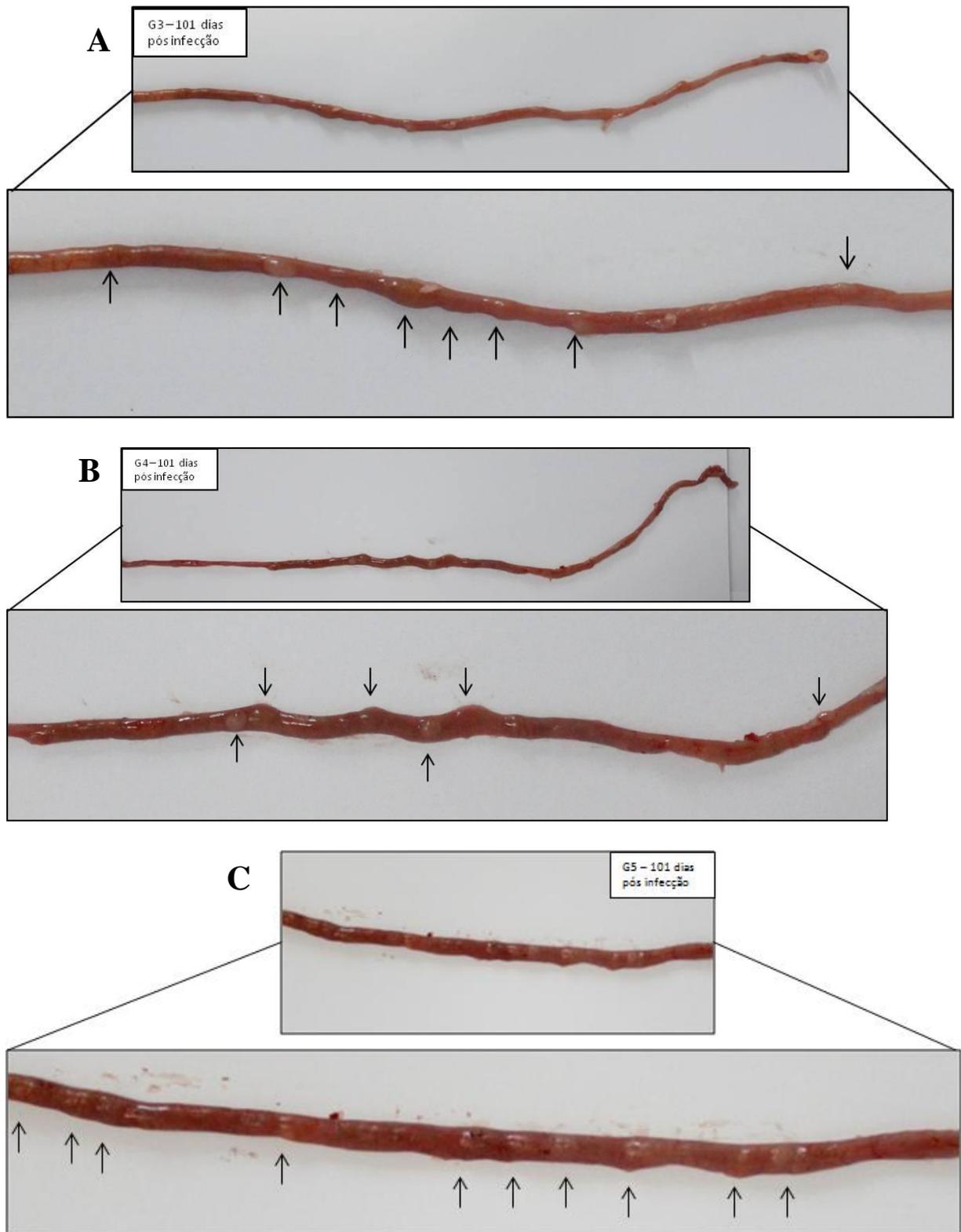


Figura 5.16: Aspecto macroscópico do intestino delgado dos hamsters infectados intraperitonealmente com 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, no momento 101 dias pós infecção e tratados com os fármacos propostos no estudo. As setas pretas indicam as placas de Peyer presentes nesses tecidos. A) intestino delgado de um hamster que foi infectado com *L. infantum* e tratado com antimoniais pentavalente (G3). B) intestino delgado de um hamster infectado com *L. infantum* e tratado com antibiótico amicacina (G4). C) intestino delgado de um hamster infectado com *L. infantum* e tratado com os dois fármacos concomitantemente, antimoniais pentavalente e o antibiótico amicacina (G5).

5.4 Níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo dos *golden hamsters*

A molécula de lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina liberada da membrana celular externa das bactérias Gram-negativas, que constituem a microbiota bacteriana normal do intestino. Essa endotoxina foi dosada no plasma de todos os animais inclusos neste estudo. A presença desse LPS no plasma dos animais pode ser um indicativo de que possivelmente houve algum dano na barreira do trato gastrointestinal, o que permitiu o extravasamento de produto bacteriano para a circulação.

Ao analisarmos os níveis de LPS no plasma dos hamsters do grupo controle sem infecção (G1) e dos animais infectados com *L. infantum* (G2), observamos um aumento no nível desta endotoxina no grupo G2, a partir do momento 15 dpi, e esse nível permaneceu elevado até o momento 55 dpi. Entretanto, no momento 101 dpi observamos uma diminuição nos níveis dessa endotoxina, ficando este similar ao do grupo G1 do mesmo período (Figura 5.17).

Nos animais que foram submetidos ao tratamento com antimonial pentavalente ou com antibiótico amicacina, observamos que a mediana dos níveis de LPS plasmático no momento 55 dpi foi semelhante ao do grupo sem infecção (G1-55 dpi) (Figura 5.18). Já o grupo que foi submetido ao tratamento com esses dois fármacos de forma concomitante (G5-55 dpi), ainda apresentou um nível de LPS mais elevado do que os animais sem infecção (G1-55 dpi), porém mais baixo do que aqueles apenas infectados (G2-55 dpi). Entretanto, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os grupos tratados e o grupo somente infectado pelo parasito, no momento 55 dpi. Apesar disso, o grupo G5 apresentou níveis de LPS significativamente ($p < 0,05$) mais elevados no momento 55 dpi quando comparado ao mesmo grupo com 101 dpi (Figura 5.18). Tais resultados podem estar relacionados ao fato do momento 55 dpi se referir ao um período de 10 dias pós-término do tratamento, enquanto que o momento de 101 dpi refere-se ao período de 46 dias pós-término do tratamento com os fármacos propostos nesse trabalho. O mesmo ocorreu para a comparação entre o grupo G4 nos momentos 55 e 101 dpi (Figura 5.18).

Aos 101 dpi os níveis de LPS dos animais dos grupos G2, G3, G4 e G5 foram mais baixos, comparado aos mesmos grupos do momento 55 dpi. De forma interessante, o grupo G4-101 dpi também apresentou níveis de LPS significativamente inferiores quando comparado aos demais grupos desse mesmo momento (G2, G3 e G5) ($p < 0,01$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 5.18). Esses achados indicam um possível benefício do uso do antibiótico amicacina na redução dos níveis do LPS no plasma desses animais com LV.

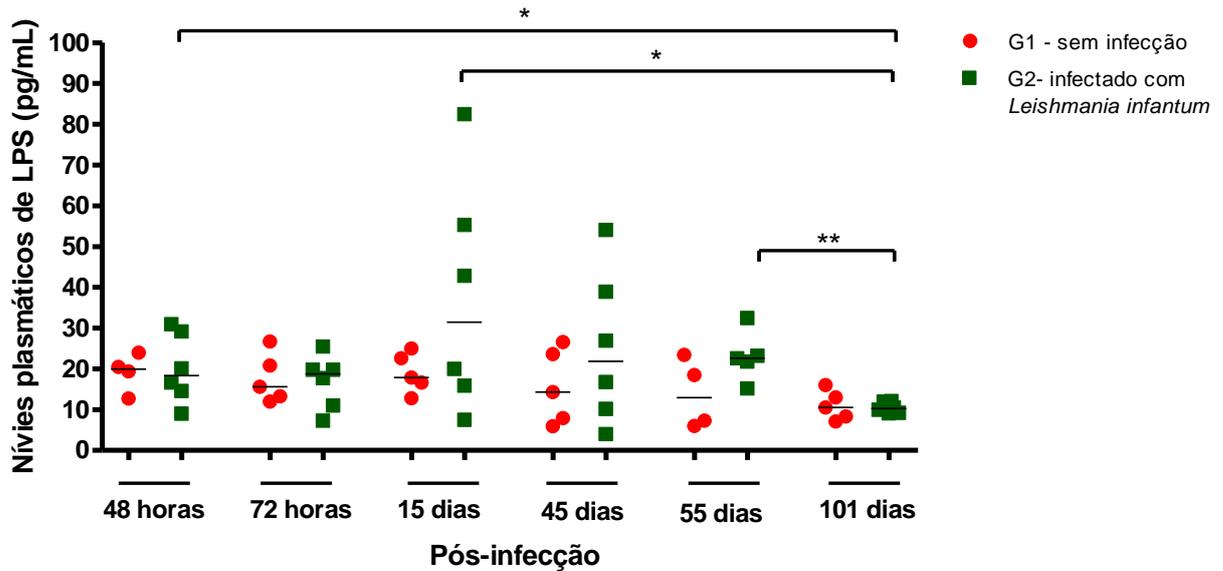


Figura 5.17: Níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) nos *golden hamsters*. Dosagem dos níveis de LPS no plasma dos hamsters sem infecção (G1), dos animais que foram infectados intraperitonealmente 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (G2), ao longo dos 101 dias pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

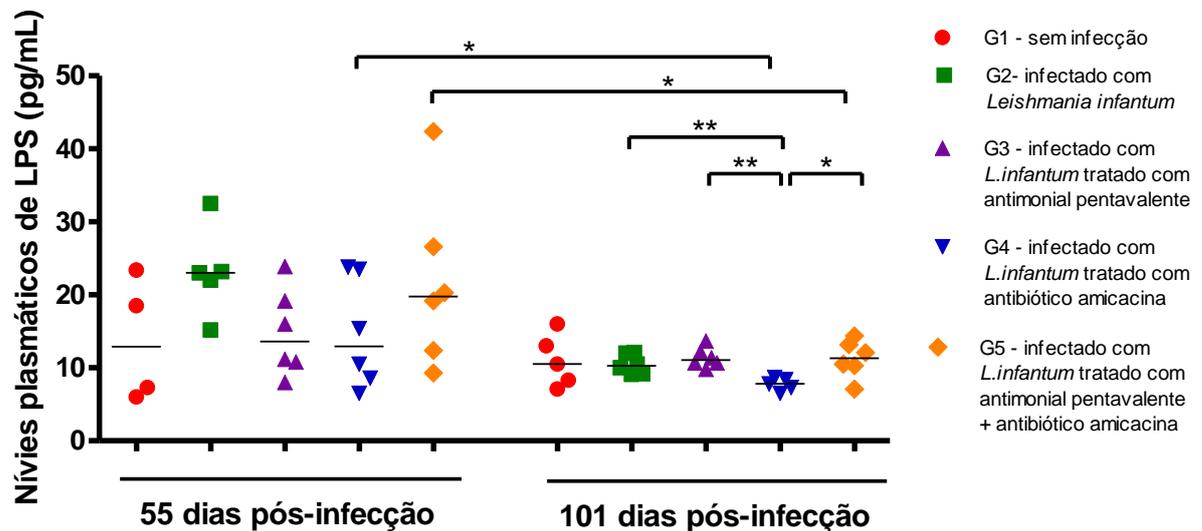


Figura 5.18: Níveis plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) nos *golden hamsters*. Foram avaliados hamsters sem infecção (G1), os animais infectados intraperitonealmente 2×10^7 formas amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* (G2), e naqueles que foram infectados e tratados com antimonial pentavalente e/ou antibiótico amicacina, nos momentos 55 e 101 dias pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

5.5 Níveis de imunoglobulina anti-*Leishmania* da classe IgG nos hamsters infectados por *Leishmania infantum* e submetidos aos diferentes tratamentos

Com o objetivo de se avaliar a evolução da resposta humoral ao longo da infecção, foram feitas dosagens dos anticorpos IgG que reconhecem *L. infantum*, através do ensaio imunoenzimático (ELISA), como descrito na metodologia.

Os níveis desses anticorpos mantiveram-se constantes nos momentos iniciais do acompanhamento independente da presença da infecção, e somente a partir de 45dpi foi possível verificar um aumento significativo dos níveis de IgG total ($p < 0,05$) nos animais infectados (Figura 5.19). Além disso, nos momentos 55 e 101 dpi foi possível verificar um aumento na produção dos níveis de IgG total nos animais infectados, inclusive em relação aos momentos anteriores (48h, 72h, 15 e 45 dias), sugerindo que os níveis desta imunoglobulina aumentam com o decorrer da infecção. Comparado aos animais controles (G1-101 dpi), o grupo infectado G2-101 dpi apresentou níveis significativamente ($p < 0,001$) maiores de IgG anti-*Leishmania* (Figura 5.19).

Em relação aos grupos tratados, os hamsters que foram submetidos ao antibiótico amicacina (G4-55 dpi) apresentaram um baixo nível de IgG anti-*Leishmania*, semelhante ao que ocorreu no grupo controle (G1-55 dpi), apesar de não ter havido diferença estatística entre esses dois grupos (Figura 5.20). Entretanto, esse mesmo resultado não se reproduziu no momento 101 dpi. Vale destacar que os animais do G4-55 dpi não apresentaram uma homogeneidade nos níveis dessa imunoglobulina, o que pode ter contribuído para a ausência de significância em relação ao G1-55 dpi e ficasse diferente do que foi observado com esse mesmo grupo no momento 101 dpi.

Em relação ao grupo tratado com o antimonial pentavalente (G3-55 dpi) e o grupo tratado com os dois fármacos concomitantemente (G5-55 dpi), estes apresentaram uma mediana semelhante ao do grupo infectado (G2-55 dpi).

Ao analisarmos o momento 101 dpi observamos que todos os grupos que receberam tratamento com os fármacos propostos, (grupos G3, G4 e G5) apresentaram títulos significativamente mais elevados ($p < 0,01$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente) de anticorpos IgG anti-*Leishmania*, comparados ao grupo sem infecção (G1-101 dpi) (Figura 5.20). Interessantemente, dois animais do grupo G5-101dpi se destacaram dos demais por mostrarem níveis mais baixos de IgG anti-*Leishmania*.

Os grupos que foram submetidos ao tratamento concomitante com o antimonial pentavalente e o antibiótico amicacina (G5), nos momentos 55 e 101 dpi, mostraram uma tendência a ter níveis de anticorpos menores, quando comparados aos demais grupos

infectados, tratados ou não, de cada um dos respectivos momentos do experimento (G2-55 dpi, G3-55 dpi, G2-101 dpi, G3-101 dpi, G4-101 dpi), salvo o grupo G4-55 dpi.

De forma interessante, os níveis de anticorpos específicos anti-*Leishmania* da classe IgG aumentaram com o tempo de infecção, conforme mostrado na figura 5.21 ($r = 0,63$; $p < 0,05$) quando todos os grupos (G1, G2, G3, G4 e G5) em todos os momentos avaliados (72h, 15, 45, 55 e 101 dpi) foram analisados, ratificando o que já foi mostrado nas figuras 5.19 e 5.20.

Com o intuito de verificar se os níveis de IgG anti- *L. infantum* poderiam estar associados à presença do parasito, uma correlação também foi realizada para esses parâmetros. No entanto, tal correlação só se apresentou positiva (Figura 5.22) para os grupos de animais apenas infectados pelo parasito (G2) ao longo de todo o acompanhamento ($r = 0,32$, $p < 0,05$). Quando os demais grupos tratados foram incluídos na análise, não mais se verificou uma correlação significativa (dados não mostrados), já que os níveis de IgG total permaneceram elevados, enquanto a carga parasitária diminuiu com o tratamento.

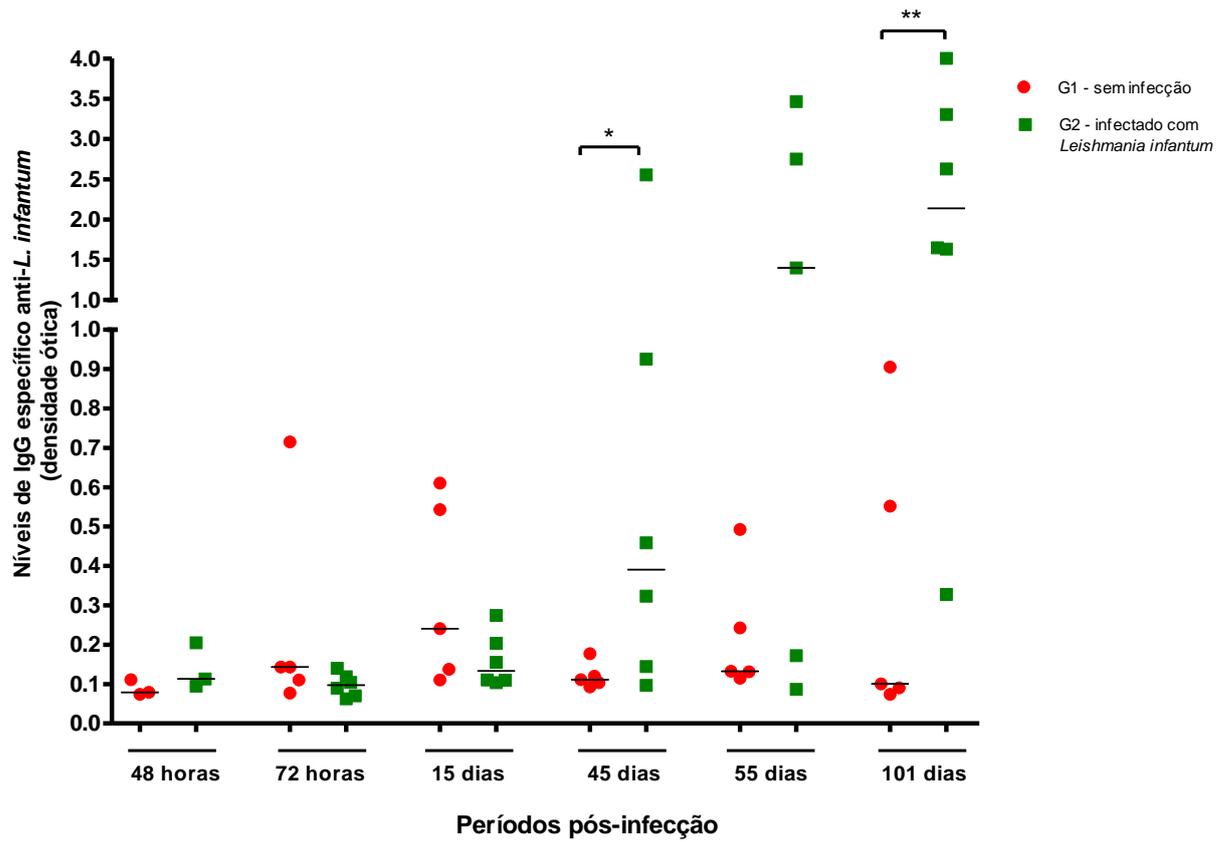


Figura 5.19: Níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum*, ao longo dos 101 dias de acompanhamento, mensurados pela metodologia ELISA. Essa dosagem foi realizada no plasma dos animais infectados com *L. infantum* (G2) comparado com os animais controles sem infecção (G1), nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. O comprimento de onda do espectrofotômetro usado nessa análise foi de 490nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

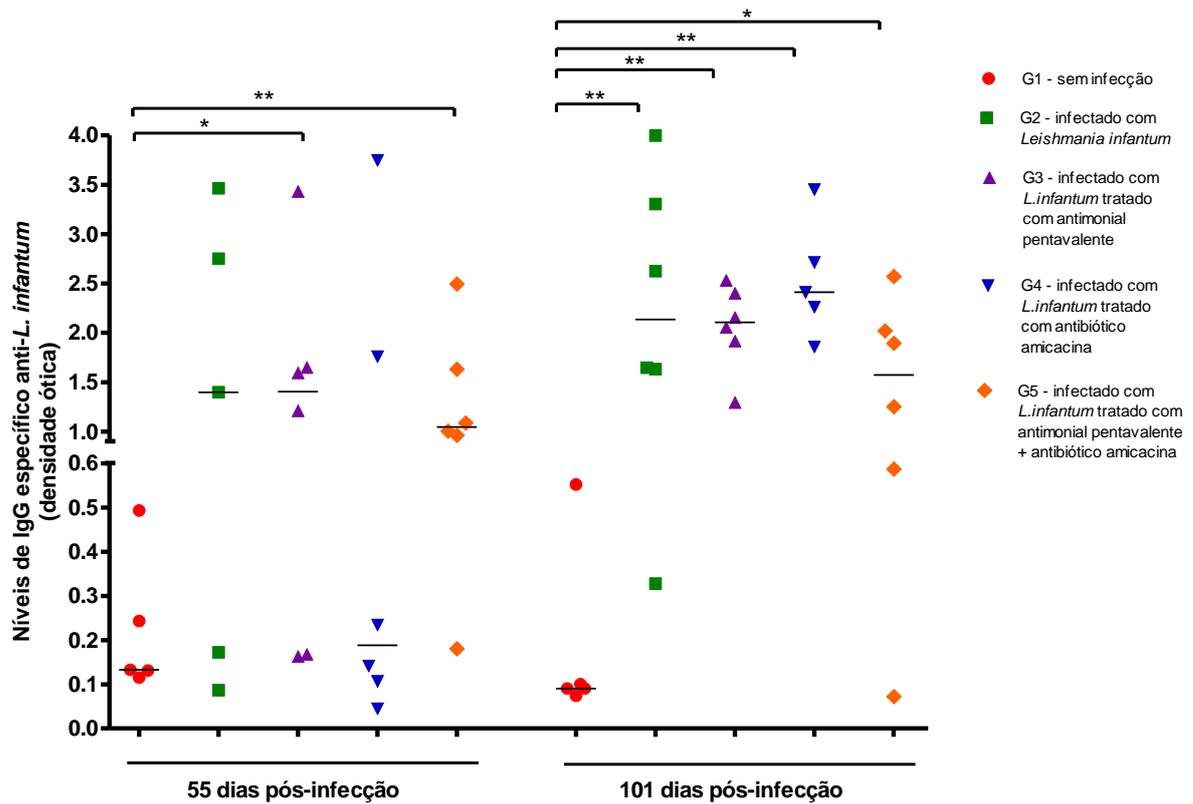


Figura 5.20: Níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum*, mensurados pela metodologia ELISA. Essa dosagem foi realizada no plasma dos animais infectados com *L. infantum* (G2) comparado com os animais controles sem infecção (G1) e com os animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos (G3, G4, G5) nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. O comprimento de onda do espectrofotômetro usado nessa análise foi de 490nm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

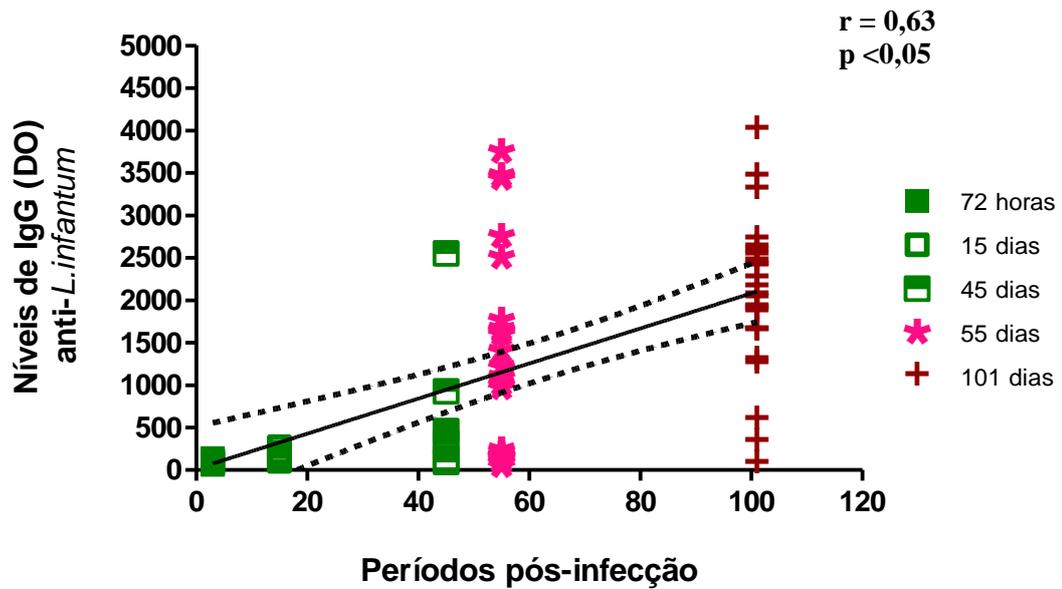


Figura 5.21: Correlação entre os níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum* e o tempo pós-infecção em que os hamsters foram avaliados. Os níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* foi mensurado no plasma dos hamsters, pela metodologia ELISA. No gráfico estão representados os animais infectados com *L. infantum* (G2) e os animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos nos momentos 55 e 101 dpi. Correlação de Spearman's ($r = 0,63$; $p < 0,05$).

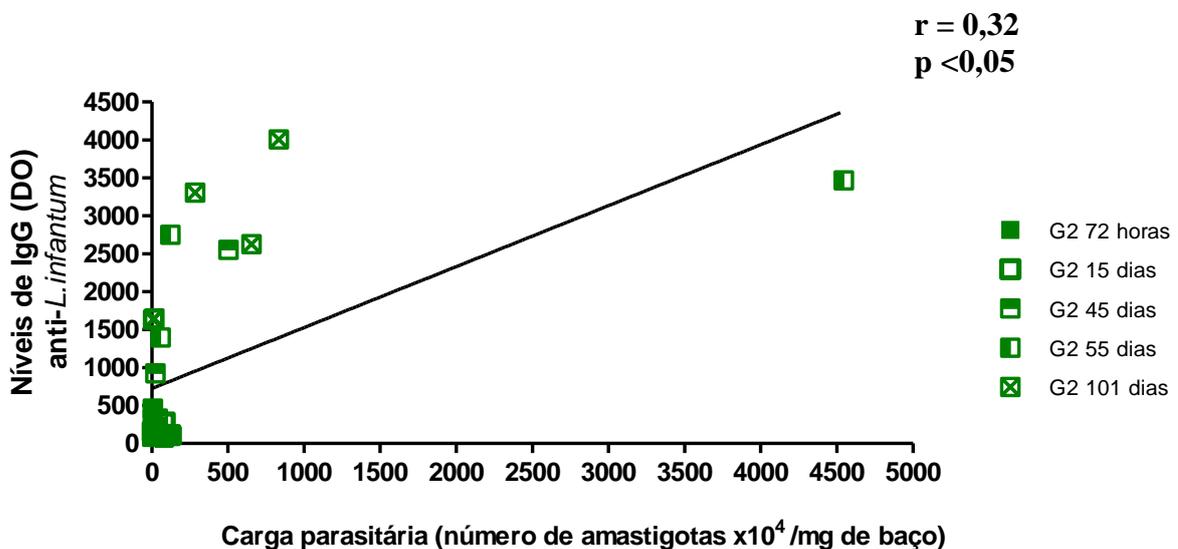


Figura 5.22: Correlação entre os níveis de anticorpos IgG que reconhecem antígenos de *Leishmania (Leishmania) infantum* e a contagem esplênica das formas amastigotas de *L. infantum* nos golden hamsters com leishmaniose visceral. Os níveis de anticorpos IgG totais foi mensurado no plasma dos hamsters, pela metodologia ELISA. O número de formas amastigotas foi avaliada através da contagem das formas amastigotas presentes no *imprint* de baço, de hamsters com leishmaniose visceral. No gráfico estão representados os animais infectados com *L. infantum* (G2), nos diferentes momentos do experimento. Correlação de Spearman's ($r = 0,32$; $p < 0,05$).

5.6 Níveis de ativação linfocitária nos hamsters infectados por *Leishmania infantum* e submetidos aos diferentes tratamentos

A avaliação do grau de comprometimento do sistema imune dos hamsters, aqui acompanhados, foi realizada através da quantificação do percentual de células T CD4⁺, bem como, através do grau de ativação celular pela molécula CD25, por meio da metodologia de citometria de fluxo.

No que se refere aos níveis de linfócitos T CD4⁺, estes se mantiveram semelhantes entre os grupos G1 e G2 até 15 dpi. No momento 45 dpi observou-se uma queda nos níveis dessas células em ambos os grupos (G1 e G2), mas sem diferença significativa entre eles. Nos períodos subsequentes da infecção, o percentual de linfócitos T CD4⁺ voltou a aumentar, entretanto, apenas com 101 dpi é que foi possível verificar que o grupo infectado (G2-101 dpi) apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,01$) nos níveis desse linfócito, quando comparado ao grupo controle desse mesmo momento (G1-101 dpi) (Figura 5.23).

Em relação aos grupos tratados com os fármacos propostos no estudo, verificamos que no momento 55 dpi os grupos que foram submetidos ao antimonial pentavalente (G3) e ao antibiótico amicacina (G4) separadamente, apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos níveis dos linfócitos T CD4⁺, quando comparados ao grupo infectado desse mesmo momento do estudo (G2-55 dpi), mostrando que apesar do tratamento, os níveis dessas células ainda permaneciam baixos. O grupo submetido ao tratamento com o antimonial pentavalente também apresentou níveis significativamente ($p < 0,01$) menores de linfócitos, quando comparado ao grupo controle sem infecção, desse mesmo momento do estudo (G1-55dpi). Entretanto, o grupo que recebeu o tratamento com esses dois fármacos concomitantemente (G5-55 dpi) apresentou níveis de T CD4⁺ mais próximos do grupo controle sem infecção (G1). Outro fato que observamos nesse grupo G5-55 dpi é que seus níveis estavam maiores, quando comparado aos grupos que receberam o tratamento com os fármacos separadamente, apesar desse dado também não ter apresentado nenhuma significância estatística (Figura 5.24).

No momento 101 dpi o grupo infectado (G2-101 dpi) apresentou níveis significativamente ($p < 0,01$) menores de linfócitos T CD4⁺, comparado ao seu grupo controle sem infecção (G1-101 dpi). Ao analisarmos o grupo que foi infectado e que recebeu o tratamento com o antimonial pentavalente, G3-101 dpi, verificamos que seus níveis de linfócitos T CD4⁺ foram menores que o do grupo infectado pelo parasito, G2-101 dpi, apesar de não haver relevância estatística (Figura 5.24). Já em relação aos grupos G4-101 dpi e G5-101 dpi, estes apresentaram níveis de T CD4⁺ semelhantes, entretanto estes foram maiores do

que aqueles apresentados pelo grupo infectado (G2-101 dpi). No entanto, dentre esses dois últimos grupos (G4-101 dpi e G5-101 dpi) somente o grupo G4-101 dpi apresentou níveis significativamente maiores ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo G2 do mesmo momento. Apesar do tratamento usado nos grupos G4 e G5 sugerir uma melhora na recuperação dos percentuais dos linfócitos T CD4⁺, somente o grupo G4-101dpi apresentou níveis significativamente menores ($p < 0,05$), do que o observado no grupo controle (G1-101 dpi). Esses resultados sugerem um possível efeito positivo do uso do antibiótico amicacina no aumento do percentual dos linfócitos T CD4⁺. Ao mesmo tempo, o fato do tratamento já ter terminado há 46 dias (101 dpi) pode não ter sido suficiente para que ocorresse tal recuperação.

Os resultados observados nos grupos G5, nos momentos de 55 e 101 dpi, sugerem que o antimonial não potencializou o efeito positivo do antibiótico amicacina, em relação ao aumento dos níveis de linfócitos T CD4⁺.

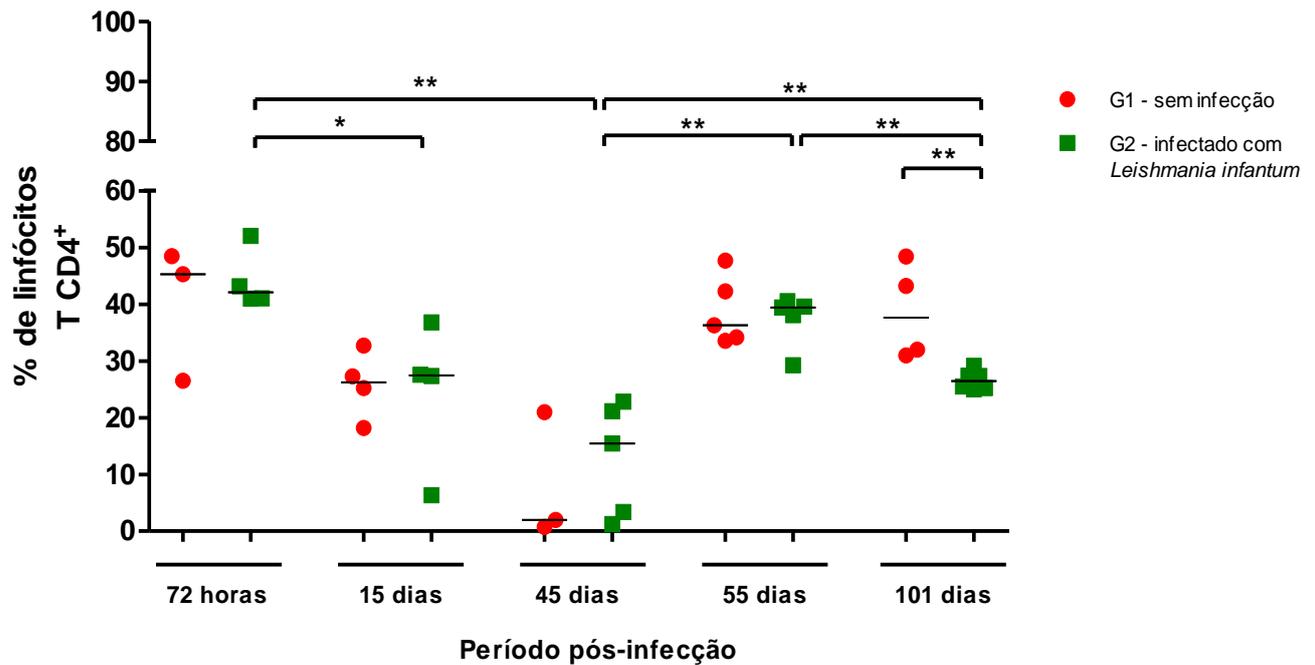


Figura 5.23: Níveis de linfócitos T CD4⁺ apresentado pelos *golden hamsters*, que foram infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Esta quantificação foi realizada nas células do sangue periférico e os resultados foram comparados entre os animais controles sem infecção (G1) e àqueles infectados por *L. infantum* (G2), nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05; **p<0,01 (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

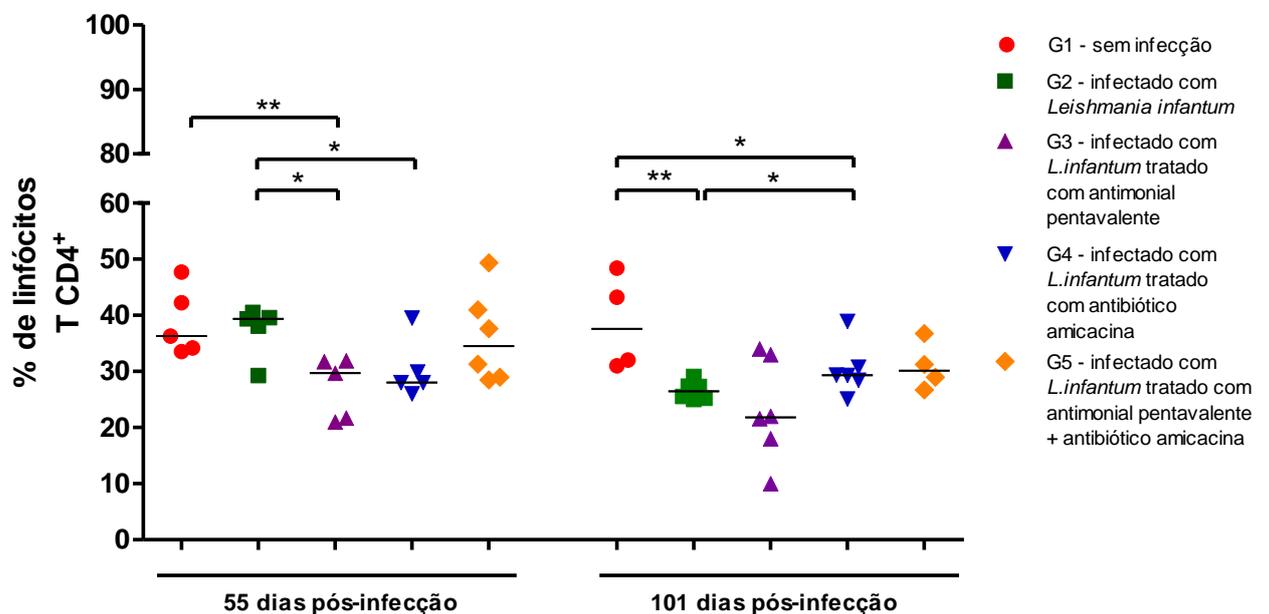


Figura 5.24: Níveis de linfócitos T CD4⁺ apresentado pelos *golden hamsters*, que foram infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*. Esta quantificação foi realizada nas células do sangue periférico e os resultados foram comparados entre os animais controles sem infecção (G1), àqueles infectados por *L. infantum* (G2) e naqueles que foram infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos (G3, G4, G5), nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05; **p<0,01 (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

Posteriormente realizamos a análise dos níveis de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula CD25, associada à ativação linfocitária, nos hamsters que foram infectados por *L. infantum* e naqueles que estavam saudáveis, usados como controles negativos. Nessa análise verificamos que em todos os momentos analisados, ao longo dos 101 dpi, os grupos infectados (G2-72 horas pós-infecção, G2-15 dpi, G2-45 dpi, G2-55 dpi, G2-101 dpi) apresentaram níveis mais elevados de ativação, quando comparados aos seus respectivos grupos controles sem infecção (Figura 5.25). No entanto, esse aumento só foi significativo entre G1 e G2 nos momentos de 15 dpi ($p < 0,05$), 55 dpi ($p < 0,01$) e 101 dpi ($p < 0,01$). Interessantemente, houve um aumento gradativo dos níveis de linfócitos CD25⁺ entre as células T CD4⁺ a partir do momento 72 horas pós-infecção até 45 dpi, e este aumento foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo G2-45 dpi quando comparado aos grupos G2-15 dpi e G2-72 horas pós-infecção (Figura 5.25). Todavia, esses níveis decaíram gradativamente, e foram significativamente menores ($p < 0,01$) nos momentos G2-55 dpi e G2-101 dpi quando comparados ao grupo G2-45 dpi (Figura 5.25).

Ao analisarmos os grupos que foram submetidos aos tratamentos propostos, verificamos que os grupos submetidos aos fármacos separadamente (G3 e G4 55 dpi) apresentaram níveis similares de linfócitos TCD25⁺ (Figura 5.26). No entanto, estes foram significativamente menores ($p < 0,01$) comparados ao grupo G2-55 dpi. Os hamsters que foram submetidos ao tratamento com os fármacos amicacina e antimonial pentavalente concomitantemente apresentaram níveis significativamente ($p < 0,01$) menores de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula CD25⁺ quando comparados aos grupos G4-55dpi, G3-55 dpi, G2-55 dpi e G1-55 dpi (Figura 5.26).

Com 101 dias pós-infecção, todos os grupos infectados, incluindo àqueles que foram tratados, apresentaram níveis significativamente ($p < 0,01$) mais elevados de linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula CD25⁺, quando comparados ao grupo controle sem infecção, desse mesmo momento (G1-101 dpi) (Figura 5.26). Vale ressaltar que o grupo G5-101 dpi, similar ao ocorrido no momento 55 dpi, também apresentou níveis de ativação significativamente menores ($p < 0,01$), do que aqueles apresentados pelo grupo infectado (G2-101 dpi) dpi (Figura 5.26).

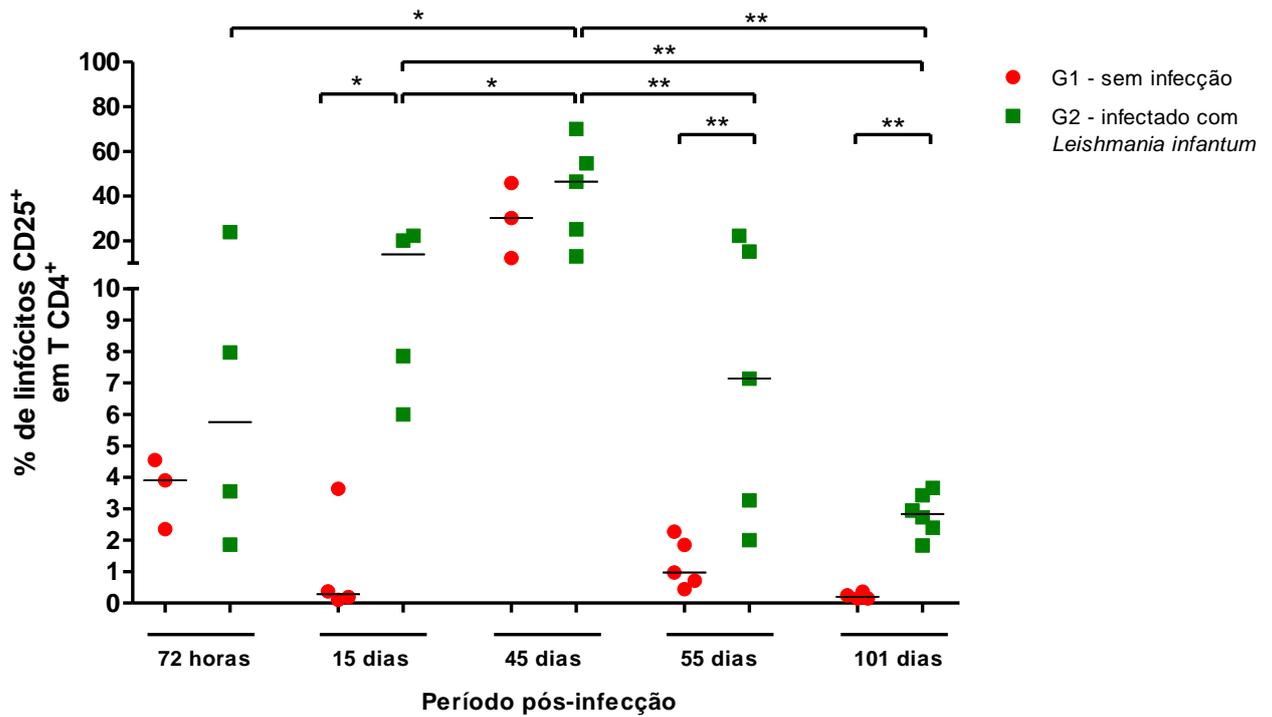


Figura 5.25: Níveis de ativação celular através do percentual de linfócitos T CD25⁺ dentro da população CD4⁺ nos *golden hamsters* que foram infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum* (G2) e nos animais controles sem infecção (G1), nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05; **p<0,01 (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

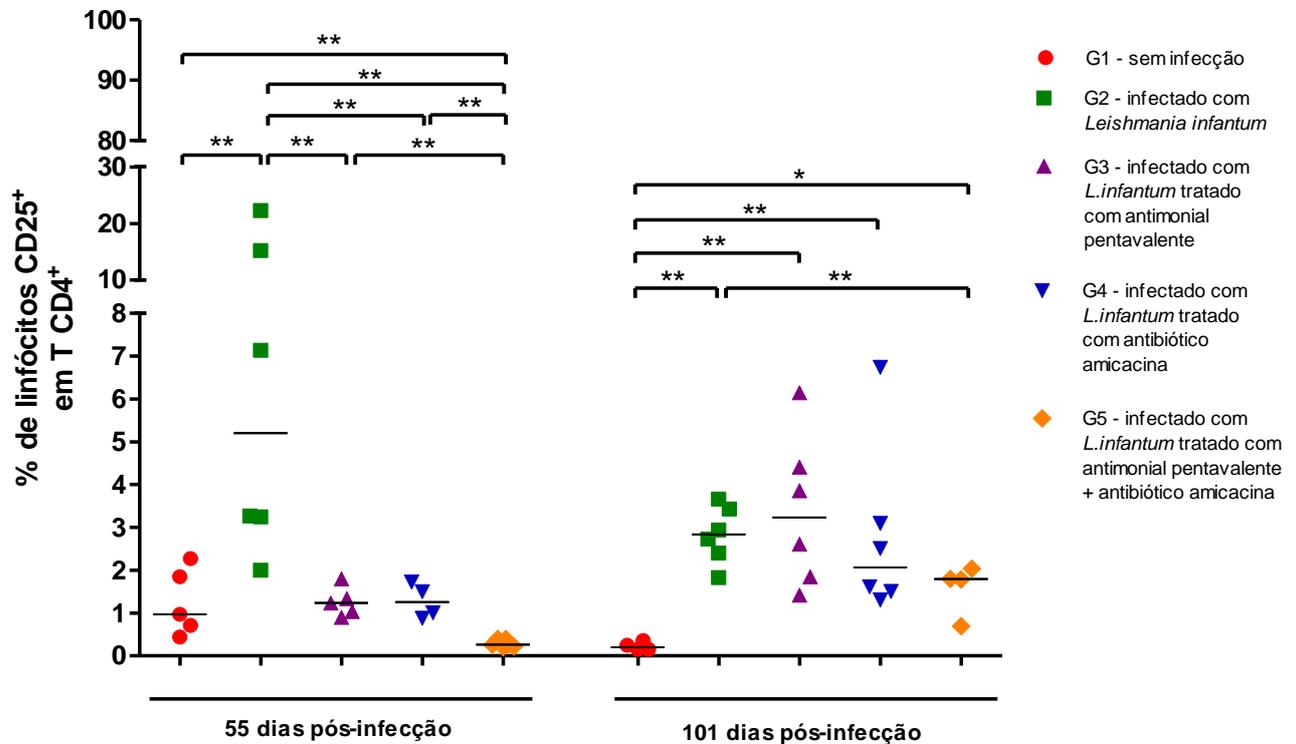


Figura 5.26: Níveis de ativação celular através do percentual de linfócitos T CD25⁺ dentro da população CD4⁺ nos *golden hamsters* sem infecção (G1), nos que foram apenas infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e naqueles que foram infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos (G3, G4, G5), nos diferentes momentos pós-infecção. Cada ponto da figura representa um animal, e a barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05; **p<0,01 (Teste não paramétrico *Mann-Whitney*).

Por fim, uma correlação positiva entre os níveis de CD25⁺ em T CD4⁺ e os níveis plasmáticos de LPS nos sugeriu que tal produto microbiano pode estar contribuindo para a ativação linfocitária nesses animais experimentalmente infectados, aqui acompanhados (Figura 5.27).

Além de todas as análises já citadas até o presente momento, também foram avaliados os animais que não foram infectados pelo parasito em questão, mas que receberam o tratamento com os fármacos propostos no trabalho (G6, G7 e G8, conforme citados na metodologia). Assim, observamos que estes não apresentaram nenhuma diferença estatística quando comparado aos demais grupos de estudo, além disso, estes grupos mostraram-se muito similares ao grupo controle negativo (G1). Por esse motivo, esses dados não foram incluídos nos gráficos apresentados no presente estudo.

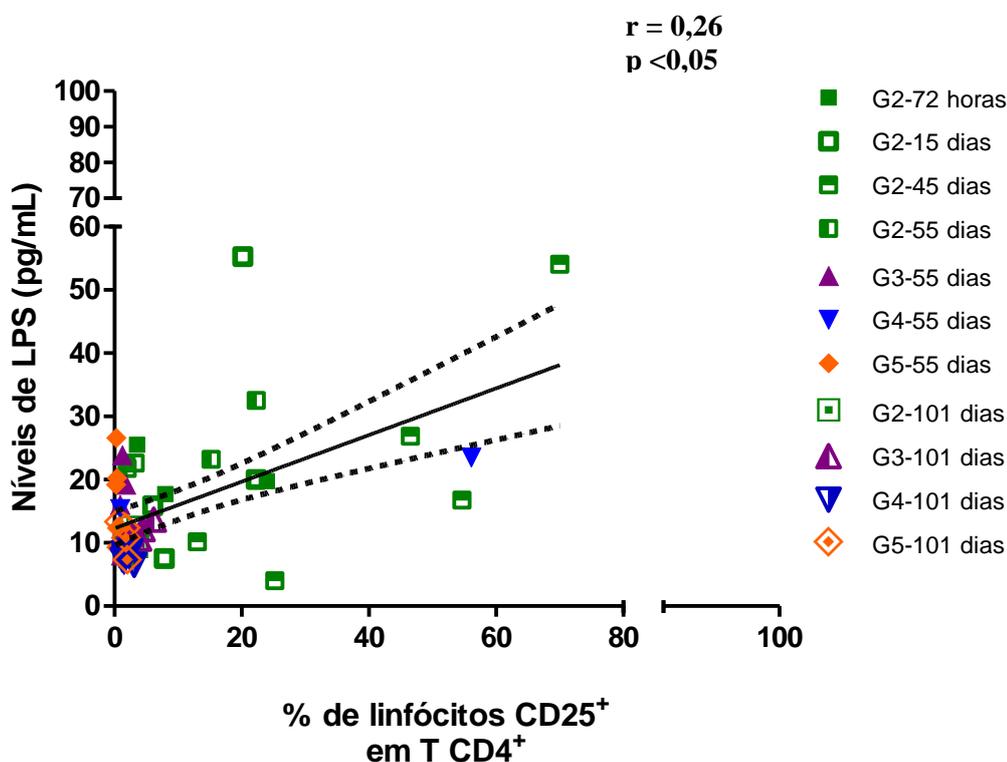


Figura 5.27: Correlação entre os níveis de plasmáticos de lipopolissacarídeo (LPS) e a contagem esplênica das formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*, nos *golden hamsters* com leishmaniose visceral. A carga parasitária foi feita através da contagem das formas amastigotas presentes no *imprint* de baço, dos hamsters com leishmaniose visceral. No gráfico estão representados os animais infectados com *L. infantum* (G2), assim como os animais infectados e submetidos aos diferentes tratamentos propostos (G3, G4, G5), ao longo dos 101 dias em que esses animais foram acompanhados no experimento. Correlação de Spearman's ($r = 0,63$; $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral é uma doença tropical negligenciada, que possui um alto índice de letalidade. A LV, mesmo quando tratada, apresenta uma taxa de casos fatais que varia de 10-20% (Alvar et al. 2012). Estudos prévios de nosso grupo mostraram que o LPS provavelmente oriundo de uma translocação de bactérias Gram-negativas do intestino, poderia também contribuir para o aumento da ativação imune na LV.

O modelo de estudo *in vivo*, até o presente momento, que melhor representa as manifestações clínicas da LV humana é o *golden hamster* (*M. auratus*) (Handman 2001; Melby et al. 2001; Goto& Lindoso 2004; Garg& Dube 2006). Por esse motivo, esse foi o modelo experimental escolhido para a realização desse estudo, que teve como objetivo procurar entender a dinâmica da instalação da imunossupressão, das manifestações clínicas provocados pelo parasito. Além disso, o trabalho também objetivou avaliar os efeitos de uma terapia adicional ao tratamento leishmanicida, no intuito de diminuir os níveis circulantes de lipopolissacarídeo (LPS), que foram previamente relatados em pacientes com LV (Santos-Oliveira et al. 2011).

Para isso, foram avaliados 117 *golden hamsters*, dos quais 72 foram infectados por via intraperitoneal com 2×10^7 formas amastigotas de *L. infantum*. Esses animais foram separados em grupos, onde alguns infectados pelo parasito ou não, foram submetidos ao tratamento com os fármacos antimonial pentavalente e ou com o antibiótico amicacina, por um período de 10 dias. Ao longo de 101 dias pós-infecção (dpi) os hamsters foram acompanhados, e nos momentos de 48 e 72 horas, 15, 45, 55 e 101 dias pós-infecção eles foram eutanasiados para análises de parâmetros como: peso dos animais, assim como do fígado e do baço, análise macroscópica desses órgãos e do intestino delgado, quantificação dos níveis de LPS, imunoglobulinas IgG anti-*Leishmania*, níveis de linfócitos T CD4⁺ circulantes e de ativação celular (CD25), ao longo do curso da infecção.

No presente trabalho, apesar da infecção não ter causado doença clinicamente manifesta, foi observado que os animais estavam parasitados, através da carga parasitária esplênica, além de exibirem um comprometimento dos órgãos linfóides secundários (baço, fígado e placa de Peyer). O efeito do tratamento com antimonial associado à amicacina foi o que propiciou uma redução mais relevante da carga parasitária esplênica, do peso do fígado e do baço, bem como uma recuperação das placas de Peyer, quando comparados aos animais tratados com os fármacos separadamente. Além disso, a diminuição dos níveis de LPS plasmáticos nos animais tratados com a amicacina sugere uma eficácia terapêutica associada ao uso de antibioticoterapia. Os níveis de IgG anti-*Leishmania* aumentaram ao longo da

infecção, bem como os níveis de ativação, que só diminuíram após a introdução da antibioticoterapia e concomitância deste com o tratamento leishmanicida.

Os *golden hamsters* são conhecidamente capazes de se infectar e manifestar clinicamente a LV de maneira similar aos humanos ([Handman 2001](#); [Melby et al. 2001](#); [Goto& Lindoso 2004](#); [Garg& Dube 2006](#)). Na literatura já foi relatado que esses animais manifestam características clínicas visíveis dessa infecção, tais como perda de peso, desidratação, astenia, esplenomegalia, assim como lesões na pele, na presença de diferentes inóculos de parasitos ([Requena et al. 2000](#); [Nieto et al. 2011](#); [Aslan et al. 2013](#)). Recentemente, foi demonstrado que a infecção natural de *golden hamsters* por *L. infantum* através da picada de *Lu. longipalpis* também foi capaz de levar a uma LV progressiva após quatro meses de acompanhamento ([Aslan et al. 2013](#)). No trabalho de Requena e colaboradores ([Requena et al. 2000](#)) foram inoculados 10^3 , 10^4 e 10^5 formas promastigotas de *L. infantum*, pela via intracardíaca em *golden hamsters*, e suas manifestações clínicas ocorreram a partir dos momentos 245, 258 e 181 dpi, de acordo com os respectivos inóculos de parasitos usados. Esses dados sugerem que essa não observação de sinais clínicos nos hamsters do presente trabalho se deu possivelmente pelo curto período de tempo em que estes foram acompanhados, o que provavelmente não permitiu esse desenvolvimento, mesmo levando-se em consideração que o tamanho do inóculo utilizado tenha sido maior que o descrito por Requena e colaboradores.

Em relação às vias de infecção usadas para inocular os parasitos nos hamsters, os trabalhos comumente relatam como as mais utilizadas, a intracardíaca e a intraperitoneal, pois essas são capazes de produzir sintomas clinicopatológicos similares à LV humana ([Requena et al. 2000](#); [Melby et al. 2001](#); [Garg et al. 2005](#); [Fazzani et al. 2011](#); [Nieto et al. 2011](#); [Moreira et al. 2012](#); [Aslan et al. 2013](#)). Entretanto, Moreira e colaboradores ([Moreira et al. 2012](#)) observaram que hamsters infectados por *L. infantum* pela via intracardíaca apresentaram um quadro mais progressivo e fatal, quando comparada às vias intraperitoneal e intradérmica. Isso demonstra que, apesar de ser sabido que essas vias são eficientes em causar infecções experimentais, elas também são capazes de influenciar no tempo de sobrevivência e nas manifestações clínicas dos animais. Contudo, no presente trabalho optou-se por realizar a infecção dos hamsters pela via intraperitoneal, por esta já ser uma metodologia implementada no laboratório com o qual colaboramos em São Paulo.

A virulência da cepa também deve ser considerada como fator capaz de influenciar no desenvolvimento e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, a cepa de *L. infantum* (MHOM/BR/72/cepa 46) utilizada no presente trabalho é conhecidamente virulenta, e esta foi mantida por meio de sucessivas passagens em hamsters. A mesma cepa foi utilizada com

sucesso por Fazzani e colaboradores (Fazzani et al. 2011), para realizar a infecção experimental em hamsters. Similar a esses achados de Fazzani e colaboradores (Fazzani et al. 2011), nós também observamos a presença de amastigotas no baço dos animais, fato que nos permitiu confirmar a ocorrência dessa infecção.

Apesar dos inúmeros mecanismos usados para garantir que a infecção experimental representasse da forma mais próxima possível os achados clínicos de uma LV humana, nenhum dos animais do presente trabalho apresentou sinais clínicos visíveis dessa infecção. Esse fato pode ter ocorrido não somente pelo curto período de tempo em que foram acompanhados no experimento, como dito anteriormente, o qual não permitiu que se observasse o aparecimento das manifestações clínicas usuais, mas também pelo provável desenvolvimento de uma resposta imunológica inicial capaz de impedir tais sinais, normalmente observados. Apesar dessa ausência, todos os animais aqui avaliados apresentaram parasitismo esplênico e, embora alguns destes tenham apresentado uma carga parasitária muito baixa, os infectados apresentaram alterações macroscópicas no baço e no fígado. Similarmente a esses resultados, Requena e colaboradores (Requena et al. 2000) observaram que aproximadamente metade dos animais avaliados, independente do tamanho do inóculo de parasitos usado (10^3 , 10^4 e 10^5 formas promastigotas de *L. infantum*), não apresentou nenhum sinal clínico visível de infecção, e em alguns desses animais não foi possível sequer detectar a presença de formas amastigotas no fígado e/ou no baço. Uma possível justificativa para essa observação de poucas formas parasitárias no *imprint* do baço desses animais se deve a uma limitação da própria técnica. Apesar dessa metodologia do *imprint* ser considerada como padrão ouro para a confirmação da infecção, pois permite a observação pela microscopia óptica da forma amastigota nas células, ela apresenta uma limitação no que se refere a quantificação parasitária. Além disso, ela apresenta interferências como a experiência do microscopista para analisar o material e a dispersão dos parasitos na amostra do tecido usada para realizar o *imprint* que não é de maneira uniforme. Novamente, outra possibilidade pode estar relacionada ao tempo de acompanhamento desses animais conforme observado por Moreira e colaboradores (Moreira et al. 2012). Por esses motivos expostos, pretendemos realizar a quantificação parasitária por PCR tempo real nos animais estudados.

Verificou-se que a detecção de formas amastigotas no baço de hamsters infectados por *L. infantum* é mais difícil em animais assintomáticos (Moreira et al. 2012). Esses autores também demonstraram que um período de tempo longo após a infecção intraperitoneal (seis a nove meses) foi necessário para que se pudesse visualizar o parasito no baço desses animais, em contraste com a via intracardíaca.

Os hamsters aqui avaliados apesar de estarem comprovadamente parasitados, mantiveram-se ativos e com uma aparência física saudável, ao longo dos 101 dias em que foram acompanhados. O ambiente onde eles foram acondicionados era limpo e arejado, comida e água eram ofertadas todo o tempo, fato que torna pouco provável uma possível interferência do ambiente externo, assim como a presença de outros tipos de infecções, que possivelmente poderiam ter ocasionado os achados morfológicos nos órgãos linfóides secundários avaliados. O fígado dos animais infectados, independente da intervenção terapêutica utilizada, apresentou-se com uma coloração mais pálida, com a presença de focos brancos levemente mais elevados ao longo de sua superfície. Tais alterações também foram observadas por Aslan e colaboradores (Aslan et al. 2013), em *golden* hamsters que foram naturalmente infectados com *L. infantum*. Em ambos os trabalhos foram verificadas alterações na morfologia do baço, estando esses mais alongados e apresentando formas amastigotas no interior celular. Entretanto, Aslan e colaboradores observaram que a maioria dos animais infectados naturalmente por esse parasito apresentou uma esplenomegalia grave, perda de peso acompanhada de desidratação, uma postura arqueada e feridas no canto da boca, na pata e nos testículos (Aslan et al. 2013). Nenhuma dessas manifestações clínicas foi vista no presente trabalho, e esse fato se deve possivelmente à via de inoculação parasitária utilizada, pois na via intraperitoneal a disseminação parasitária pode não ocorrer tão rapidamente quanto na via intracardíaca.

Outra observação de Aslan e colaboradores foi a presença de ascite entre os animais que foram infectados pela via intracardíaca, na concentração de 10^8 e 10^7 parasitos, e eles sugeriram que essa ascite pode ter mascarado uma possível perda de peso apresentada pelos hamsters (Aslan et al. 2013). Entretanto, apesar de termos observado no presente trabalho um aumento de peso dos hamsters, acreditamos que esse correlacionou-se com aumento da idade desses animais, pois nenhum deles apresentou sinais clínicos de ascite.

Os pesos do fígado e do baço dos hamsters mantiveram uma similaridade entre os grupos com e sem infecção, até o momento de 55 dpi. No entanto, os animais infectados apresentaram um aumento significativo de peso desses órgãos no momento 101 dpi, quando comparado ao grupo controle. Esse aumento de peso e as alterações morfológicas observadas podem estar associados com o aumento da carga parasitária esplênica que despontou a partir de 55 dpi. Além disso, os animais que foram tratados com ambos os fármacos apresentaram uma redução significativa no peso esplênico e hepático no momento 101 dpi, o que também coincidiu com uma diminuição na carga parasitária. Esses resultados mostram que o uso concomitante do antimonial pentavalente e o antibiótico amicacina foi capaz de proporcionar uma melhora no quadro clínico com relação ao peso dos animais e de seus órgãos, pois estes

tenderam a apresentar pesos semelhantes aos seus respectivos grupos controles sem infecção. Essa melhora clínica observada nos hamsters provavelmente ocorreu devido a um efeito sinérgico desses fármacos agindo de forma direta ou indiretamente sobre o parasito, eliminando-o de uma forma mais eficiente e permitindo assim, que o organismo desses animais voltasse a seu estado homeostático.

Ao longo do experimento, foi observado que o intestino delgado dos hamsters que estavam com LV estavam mais friável e que o número de placas de Peyer visualizadas em sua superfície estava reduzido, quando comparado aos animais saudáveis. Essa fragilidade no tecido intestinal pode ser justificada pela própria infecção parasitária, pois é sabido que a *L. infantum* infecta as células do intestino (Muigai et al. 1983) e que as formas amastigotas podem ser detectadas neste sítio (Luz et al. 2010; Pinto et al. 2011), causando alterações nas vilosidades e nas criptas intestinais. Na literatura já foram relatadas alterações macroscópicas no intestino delgado, como ulcerações e inflamação na região retossigmóide de paciente com LV (Hicks et al. 2009), assim como a presença de uma elevada carga parasitária na região do ceco e do cólon de cães infectados por esse protozoário (Pinto et al. 2011). Entretanto, os animais que receberam o tratamento com o antimonial e o antibiótico de forma concomitante apresentaram uma melhora significativa em relação a essa fragilidade do intestino delgado, assim como na redução do número de placas de Peyer presentes em sua superfície, comparado aos resultados obtidos com o tratamento com esses fármacos em separado, assim como ao grupo infectado e que não recebeu nenhum tratamento.

Essas alterações morfológicas no intestino delgado podem provocar alterações na permeabilidade seletiva desse tecido, permitindo assim a passagem de produtos microbianos de origem luminal para a circulação, deflagrando o fenômeno da translocação microbiana (TM) e causando, conseqüentemente uma ativação sistêmica (Brenchley et al. 2006). Durante esse fenômeno de TM é observada a passagem de produtos, como o LPS, que quando presente na circulação sanguínea pode constituir um fator adicional na imunopatogênese da LV, principalmente por contribuir para agravar a ativação imune característica desta doença, impactando profundamente no curso clínico e no prognóstico dessa doença. Tal fato pode contribuir para aumentar o risco de morte dos pacientes com LV, mesmo quando sob tratamento leishmanicida específico. Assim, apesar da escassez de estudos sobre a translocação microbiana na LV, eles tornam-se cada vez mais necessários, pois podem influenciar e modificar o racional terapêutico, no intuito de diminuir a morbidade/mortalidade associada a esta patologia, principalmente nos casos em que os pacientes estiverem coinfectados com outras doenças como o HIV-1 (Santos-Oliveira et al. 2013), por exemplo.

Apesar de já ter sido relatado na literatura que os níveis de LPS encontravam-se elevados nos pacientes com LV (Santos-Oliveira et al. 2011), ainda não tinha sido observado nenhum dado a respeito das dosagens dessa endotoxina na LV experimental. Dessa maneira, foi realizada a dosagem plasmática dessa endotoxina nos *golden hamsters* infectados experimentalmente por *L. infantum* e foi observado que esses níveis também estavam aumentados nos animais infectados. No entanto, foi vista uma diminuição significativa nos animais tratados com o antibiótico amicacina, que possui um efeito específico sobre as bactérias Gram-negativas. Levando em consideração que as células da mucosa intestinal podem se apresentar parasitadas na LV (Baba et al. 2006; Luz et al. 2010), não seria inesperado que o dano intestinal com consequente passagem de produtos microbianos pudesse ocorrer nos pacientes com LV, assim como nos hamsters infectados por esse parasito. A partir de resultados publicados anteriormente por nosso grupo (Santos-Oliveira et al. 2011), indagamos sobre a possível origem intestinal desse LPS presente no plasma de pacientes com LV. Essa hipótese foi levantada devido à observação de alterações morfológicas significativas ao longo de todo trato gastrointestinal, provocadas pelo parasito em questão (Muigai et al. 1983; Gonzalez et al. 1986; Hicks et al. 2009; Pinto et al. 2011).

O primeiro relato histopatológico acerca das lesões causadas pela LV ocorreu em 1903. Em 1904 Christopher (Christopher, 1904 *apud* Silva 1957) publicou dois trabalhos em que relatou achados histopatológicos em autópsias de pacientes que estavam com LV. Nesses trabalhos ele descreveu que o parasito provocou lesões com úlceras e algumas com perfuração, ao longo de toda mucosa intestinal, sendo algumas com localizações pontuais no intestino grosso e no reto. Posteriormente, Lombrado (Lombrado, 1913 *apud* Silva 1957) publicou um trabalho em que descreveu um relato de caso sobre uma criança com LV e que tinha lesões no intestino delgado, representadas por erosões ao nível das placas de Peyer e por ulcerações no intestino grosso. O grupo de Meira (Meira e colaboradores, 1948 *apud* Silva 1957) também descreveu ulcerações na mucosa do intestino grosso em um paciente com LV, porém eles notaram a presença de uma faixa de necrose, edema e exsudato de fibrina na camada submucosa. Similares a esses achados histopatológicos descritos nos seres humanos, também já foram relatados a ocorrência de lesões no trato intestinal de cães infectados com LV (Pinto et al. 2011).

Esses diversos trabalhos reforçam a hipótese de que o LPS observado no plasma dos pacientes com LV (Santos-Oliveira et al. 2011) e que no presente trabalho teve sua presença confirmada no modelo experimental, provavelmente tenha como origem, o lúmen intestinal. As lesões observadas na mucosa do trato gastrointestinal por diversos pesquisadores ao longo das décadas, nos seres humanos e nos cães, e que possivelmente também esteja ocorrendo nos

golden hamsters, é um forte indício de que essa endotoxina tenha atingido a circulação por meio da translocação microbiana, facilitada pelas possíveis lesões provocadas pelo parasito nessa região. Estudos futuros com as amostras de intestino delgado (final do duodeno e início do íleo) poderão esclarecer a presença não só do parasito, mas também da molécula LPS através da técnica de imunohistoquímica e anticorpos específicos. Esta última, já foi utilizada em espécimes teciduais de macacos *rhesus* cronicamente infectados por SIV e permitiu a observação de LPS na lamina própria e nos linfonodos mesentéricos (Estes et al. 2010).

No presente trabalho nós também avaliamos o desenvolvimento de uma resposta imune humoral por meio da dosagem de anticorpos IgG anti-*L. infantum*, no plasma dos hamsters, através da técnica do ELISA. Nessa análise observamos um aumento progressivo nos níveis de IgG anti-*L. infantum* nos animais com LV a partir de 45 dpi, o que pode sugerir que possivelmente, este seja o período necessário para que o sistema imunológico produza esses anticorpos específicos para o parasito. Similares aos nossos resultados, já foi relatado que com um inóculo de 1×10^7 promastigotas de *L. infantum*, a resposta imune com a produção de IgG total ocorre em períodos que podem variar de 30 a 49 dpi (Dea-Ayuela et al. 2007; Moreira et al. 2012). Nossos resultados também estão de acordo com os de Moreira e colaboradores no sentido de que também encontramos uma correlação positiva entre os níveis de IgG específica e o tempo pós-infecção. Entretanto, estes pesquisadores ainda verificaram que os maiores níveis de IgG anti-*Leishmania* apareceram nos estágios mais avançados da doença e portanto, associaram a resposta humoral à presença de sinais clínicos importantes como perda de peso, esplenomegalia e ascite (Moreira et al. 2012).

Em um estudo anterior já foi demonstrado o aparecimento precoce de altos níveis de IgG total em hamsters infectados por *L. infantum* pela via intracardíaca, independente da dose utilizada (Dea-Ayuela et al. 2007), que se mantiveram elevados por um longo período de tempo. Nos animais aqui investigados, tais resultados também se repetiram, o que pode ser devido ao período pós-infecção em que eles foram avaliados, sugerindo que talvez não tenha havido tempo suficiente para que os níveis retornassem aos níveis basais. Ao observarmos os animais tratados, verificamos que mesmo com a diminuição da carga parasitária esplênica, estes permaneceram com elevados níveis de IgG total. Entretanto, sabe-se que o parasito não é totalmente eliminado do organismo e pode permanecer em sítios alvos, mantendo assim com um estímulo antigênico constante. Vale ressaltar que tal análise foi feita apenas com a IgG total, o que não nos permite inferir qual é a subclasse predominante que pode estar contribuindo para altos níveis totais dessa imunoglobulina.

Os níveis de IgG total anti-*Leishmania* só apresentaram uma correlação positiva com a carga parasitária esplênica no grupo infectado sem nenhum tipo de tratamento (G2). Essa

correlação positiva foi igualmente observada por Moreira e colaboradores (Moreira et al. 2012), independente das vias de infecção avaliada em seu trabalho e usando uma cepa de *L. infantum* isolado de um cão sintomático e naturalmente infectado. Entretanto, em nosso estudo não houve correlação positiva quando os animais infectados e tratados com os fármacos propostos foram incluídos na análise. Isso mostra que, apesar da diminuição da carga parasitária esplênica obtida pelo tratamento antimonial (G3), ou pelo tratamento concomitante com o antimonial e o antibiótico (G5), os níveis de IgG ainda permaneceram elevados. Uma diminuição na carga parasitária também foi observada no grupo tratado com amicacina (G4) após 46 dias depois do término do tratamento (101 dpi), mas ainda assim os níveis de IgG total estavam elevados.

Requena e colaboradores (Requena et al. 2000) observaram uma correlação entre o tamanho do inóculo de parasitos utilizados na infecção e o tempo de aparecimento dos anticorpos IgG no plasma, onde o maior inóculo apresentou uma resposta imune humoral mais precoce. É possível que não somente o tamanho do inóculo parasitário usado na infecção, mas também a virulência da cepa seja capaz de influenciar na resposta imune humoral e também na correlação entre a carga parasitária e os níveis desses anticorpos produzidos. Essa inferência foi feita baseada no trabalho de Moreira e colaboradores (Moreira et al. 2012), no qual não foi possível verificar a existência dessa correlação positiva entre os animais que foram infectados com uma cepa de *Leishmania* oriunda de um centro de referência. Provavelmente, esse fato se deu devido à perda da virulência dessa cepa. Entretanto, eles observaram a ocorrência dessa correlação nos animais que foram infectados, independente da via de infecção utilizada, usando-se uma cepa isolada de um cão naturalmente infectado e sintomático (Moreira et al. 2012). Por esse motivo, e para evitar a possível perda de virulência de nossa cepa usada na infecção, o parasito, que foi obtido de um centro de referência, foi mantido por meio de sucessivas passagens *in vivo* em hamsters.

Apesar da dosagem dos níveis de IgG anti-*Leishmania* ser utilizada como uma ferramenta para monitorar a infecção pela LV em humanos e nos cães, este tipo de análise não é robusto o suficiente para informar sobre o real estado imunológico apresentado por esses indivíduos infectados. Para inferir de modo mais fidedigno a qualidade da resposta imune que está sendo elicitada são realizadas as dosagens das subclasses de IgG, pois essas são tidas como marcadores de suscetibilidade ou resistência à infecção pela LV. A subclasse IgG1 está relacionada com o desenvolvimento da doença e a subclasse IgG2 com a infecção assintomática em cães (Leandro et al. 2001; Cardoso et al. 2007; Ribeiro et al. 2007). Foi observado que os cães que foram naturalmente infectados pela *L. infantum* apresentavam níveis significativamente elevados de anticorpos IgG total e IgG2, comparado aos grupos sem

infecção (Reis et al. 2006). Além disso, também observaram que os cães que estavam assintomáticos apresentavam níveis elevados do anticorpo IgG1 (Reis et al. 2006). Esses dados nos revelam a importância de se realizar a dosagem das subclasses do anticorpo IgG para que se possa avaliar com maior precisão o real estado imunológico apresentados pelos hamsters com LV.

Alguns trabalhos anteriores já demonstraram a presença de vários isotipos de imunoglobulinas, como IgM, IgE, IgG e as subclasses de IgG (da Matta et al. 2000; Atta et al. 2004) na LV humana. Entretanto, o papel desses níveis elevados de anticorpos no que se refere à patogênese ou à proteção ainda não está definido. Calda e colaboradores (Caldas et al. 2005) também verificaram altos níveis de anticorpos IgG anti-*Leishmania* em todas as subclasses nos pacientes de LV, especialmente para IgG1. Estes níveis declinaram após o tratamento, embora para valores de absorvância ainda maiores do que o *cut-off* estabelecido. No que se refere ao modelo hamster infectado por *L. infantum*, a proteção produzida por uma vacina intranasal foi capaz de induzir um aumento na produção de imunoglobulinas específicas da classe IgG e de seu subtipo IgG2. Entretanto, nesse mesmo trabalho não se verificou diferença entre os níveis produzidos de IgG total, IgG1 e IgG2 nos animais que estavam somente infectados pelo parasito e não receberam a vacina (DC et al. 2011). Porém, fazem-se necessários estudos nesse modelo experimental para que possamos verificar se há diferença nos níveis de produção dessa imunoglobulina durante a infecção por *L. infantum*.

Em relação aos fármacos utilizados no tratamento dos hamsters com LV do presente trabalho, o antibiótico amicacina foi escolhido no intuito de se reduzir os níveis de bactérias Gram-negativas presentes na microbiota intestinal, devido ao seu efeito específico sobre patógeno. Em nosso trabalho, observamos que o uso concomitante da amicacina com o antimonial pentavalente apresentou melhores resultados quando comparado ao uso desses dois fármacos separadamente. Esse fato pode ser verificado pela diminuição do peso do fígado e do baço, na diminuição da carga parasitária esplênica, e no aspecto macroscópico do intestino delgado em relação à recuperação do número de placas de Peyer dos animais com LV. Esse sinergismo terapêutico observado pode ser explicado pelo fato do antibiótico amicacina pertencer à subclasse dos aminoglicosídeos, mesma classe em que se encontra o fármaco paramomicina. A paramomicina é também um antibiótico que possui efeito contra a maioria das bactérias Gram-negativas e as Gram-positivas, e também atua contra alguns protozoários e cestoides (Wiwanitkit 2012). Esse antibiótico é utilizado no tratamento das leishmanioses, inclusive na LV, em países como a Índia, e sua eficiência terapêutica se iguala a da anfotericina B (Sundar et al. 2007; Wiwanitkit 2012). Desse modo a amicacina provavelmente exerceu um efeito não somente sobre as bactérias Gram-negativas que

colonizavam a luz intestinal dos hamsters, mas também sobre o protozoário *Leishmania*. Esse fato pode ser verificado pela diminuição significativa da carga parasitária nos animais que foram tratados pela amicacina (G4) e pela amicacina e pelo antimonial, concomitantemente (G5), nos momentos 55 e 101 dpi. No entanto, esse sinergismo terapêutico não foi capaz de proporcionar uma diminuição significativa nos níveis de LPS plasmático, no momento 101 dpi no grupo G5, mas este foi visto com o uso da amicacina separadamente.

Além da análise da resposta imune humoral apresentada por esses animais ao longo do curso da infecção pela LV, também avaliamos o grau de comprometimento imune desses animais infectados através do percentual de linfócitos T CD4⁺ e CD25⁺, cuja molécula nos informa a respeito do grau de ativação celular. Essa análise foi realizada uma vez que, a LV é caracterizada por um comprometimento imune dos pacientes infectados, os quais cursam com uma imunossupressão específica e apresentam uma diminuição dos linfócitos T e de outras linhagens celulares hematopoéticas (Saha et al. 2006). O parasito causador da LV possui um tropismo pelos órgãos linfoides primários, e desse modo acaba por gerar um comprometimento da medula óssea e do timo, que por sua vez tornam-se incapazes de formar e liberar os progenitores dos linfócitos T. Esse fenômeno acaba influenciando na capacidade de reposição de novas células T CD4⁺ para a periferia. Nossos resultados corroboram com esses achados imunológicos observados nos seres humanos, pois também observamos no modelo hamster uma diminuição dos níveis de linfócitos T CD4⁺ nos animais com LV. No entanto, tal diferença só se apresentou estatisticamente significativa em relação aos animais controles com 101 dpi. Logo após 10 dias de tratamento, os animais infectados e tratados com antimonial ou amicacina separadamente, apresentaram níveis de T CD4⁺ mais baixos do que os animais sem infecção (G1), sugerindo que o tempo pode não ter sido o suficiente para tal reconstituição imunológica. Já os animais tratados com os dois fármacos mostraram uma tendência a níveis mais elevados. No entanto, foi após 46 dias do término do uso dos diferentes fármacos, que se observou que o tratamento com o antibiótico (G4) e àquele com o antimonial pentavalente e a amicacina concomitante (G5), proporcionou uma recuperação imunológica nos níveis de linfócitos T CD4⁺ nesses dois grupos, que se mostraram similares.

Além do comprometimento imunológico observado nos hamsters aqui analisados através dos baixos percentuais de T CD4⁺, verificamos que os níveis da ativação linfocitária (observado pelos níveis de linfócitos T CD25⁺ dentro da população de linfócitos T CD4⁺), mantiveram-se elevados no grupo infectado sem nenhum tipo de tratamento (G2), ao longo de todo o acompanhamento. Tais níveis ainda estavam elevados mesmo quando a carga parasitária esplênica em G2 apresentou-se baixa aos 45 dpi. Esse ambiente de comprometimento da resposta imune, observados pelo baixo nível de linfócitos T CD4⁺ e

pelos altos níveis de ativação podem favorecer a replicação parasitária, e assim gerar possíveis recidivas da LV em seres humanos. Aqui, essa intensa ativação imune verificada pelos linfócitos T CD4⁺ expressando a molécula CD25⁺, nos hamsters com LV foi cessada pelo uso bem sucedido dos tratamentos propostos no presente projeto. Entretanto, mais uma vez, verificamos que o uso concomitante do antibiótico amicacina e o antimonial pentavalente mostrou-se mais eficaz também em relação à diminuição dessa ativação imune provocada pelo parasito. Isso aconteceu logo após 10 dias de tratamento e permaneceu por longo tempo depois (101 dpi).

Outro fator que possivelmente pode estar ocasionando essa ativação imune nos hamsters, além da presença do protozoário *L. infantum*, é o LPS. Já foi observado que produtos microbianos oriundos da TM, dentre eles o LPS, foram capazes de contribuir para a ativação imune durante a infecção crônica pelo HIV-1 (Brenchley et al. 2006). Esses níveis elevados de LPS além de já terem sido relacionados a essa função imunoestimulatória, também já foram associados à presença de diversas moléculas de ativação imune inata e/ou adaptativa, seja no tecido linfoide associado à mucosa (GALT - do inglês *gut-associated lymphoid tissue*) (Estes et al. 2010) ou na circulação sistêmica (Brenchley et al. 2006; Jiang et al. 2009). Considerando estudos anteriores de nosso grupo, nos quais foi observado que pacientes com LV apresentavam altos níveis de LPS na circulação e que estes estavam correlacionados a uma intensa ativação celular e produção de citocinas inflamatórias (Santos-Oliveira et al. 2011), investigamos se os animais experimentalmente infectados também poderiam exibir um *status* similar. De fato, observamos que os níveis de LPS se correlacionaram com a ativação linfocitária apresentada pelos animais com LV, sugerindo e novamente ratificando resultados anteriores (Santos-Oliveira et al. 2011), de que uma molécula bacteriana não associada à infecção por *Leishmania* pode estar exercendo efeitos deletérios sobre a resposta imune efetora nesses animais.

É importante ressaltar que a presença de níveis elevados de LPS nos hamsters com LV pode ser uma consequência da falha dos mecanismos naturais de controle da translocação microbiana que ocorre em níveis basais ou mesmo uma falha na sua eliminação pelos macrófagos residentes do trato gastrointestinal ou do fígado (Brenchley & Douek 2012). Tal possibilidade pode ser verdadeira, principalmente se considerarmos que tais células são alvo do parasitismo pela *L. infantum* e podem apresentar um comprometimento da função fagocítica ou mesmo já terem alcançado uma saturação desta capacidade. Simultaneamente, pode ser que o tempo de avaliação após o tratamento ainda não tenha sido o suficiente para a normalização desses produtos microbianos na circulação. A presença de infecções bacterianas foi descartada, uma vez que tais animais foram mantidos em condições de higiene capazes de

eliminar qualquer tipo de infecção externa, bem como o comportamento apresentado por eles ao longo de todo o acompanhamento afasta tal possibilidade.

A ideia de que os componentes do parasito estão envolvidos nas anormalidades imunológicas observadas na LV, seja nos mecanismos supressores ou nos ativadores, permanece em investigação. Somado a isso, a possibilidade de que o parasitismo intestinal concomitantemente à depleção de células T pode comprometer o GALT de pacientes e pode ser reproduzido e estudado em modelos experimentais com LV, adiciona um novo conceito a essa complexa interação entre o parasito e o hospedeiro e merece atenção em estudos futuros. O fato é que a presença do LPS proveniente de bactérias Gram-negativas, junto ao antígeno *Leishmania* pode contribuir para a hiperativação do sistema imune e aponta para os possíveis benefícios do tratamento antibacteriano ao lado da terapia leishmanicida.

Dessa maneira, verificamos no presente projeto que a infecção experimental por *L. infantum* no modelo hamster apresentou achados similares ao da LV humana, exceto no que se refere à presença de sinais clínicos. Esses animais apresentaram um aumento da carga parasitária esplênica ao longo da infecção e elevados níveis plasmáticos de LPS, similares ao apresentado por pacientes com LV (Santos-Oliveira et al. 2011). De forma similar a dados já observados em seres humanos com LV, os hamsters infectados por esse parasito também apresentaram elevados níveis de IgG total, no entanto, faz-se necessário a realização das suas subclasses para que possamos melhor compreender esses achados imunológicos. Em adição, a imunossupressão, assim como a ativação celular também foram características da LV experimental. Esses resultados reforçam dados da literatura que afirmam ser o hamster um bom modelo para estudo de aspectos clínicos e imunopatológicos da LV.

Em relação à provável eficiência do sinergismo terapêutico entre o antimonial pentavalente e a amicacina, nossos dados sugerem que este pode proporcionar uma melhora em diversos aspectos da infecção pela LV, como já exposto anteriormente. No entanto, apesar de já haver fortes indícios da eficiência terapêutica do uso concomitante desses dois fármacos, faz-se necessário a repetição desse protocolo, aumentando não só o número de animais nessa avaliação, mas também o tempo de acompanhamento para que possamos desse modo ter uma maior confiabilidade estatística nos dados aqui apresentados.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Os hamsters experimentalmente infectados por *L. infantum* e acompanhados até 101 dias após infecção apresentaram parâmetros laboratoriais e imunológicos similares aos da LV humana, principalmente no que se refere à carga parasitária esplênica, aos níveis de anticorpos anti-*Leishmania*, ao percentual de linfócitos T CD4⁺ e aos níveis de ativação celular, excetuando-se apenas a ausência de sinais clínicos característicos da LV.
- ✓ O peso dos hamsters apresentou um aumento progressivo ao longo do experimento, todavia, esse foi condizente com o crescimento e idade dos mesmos. Além disso, o tratamento com o antimonial pentavalente e/ou antibiótico amicacina não influenciou o peso dos animais, mantendo-se todos similares ao grupo sem infecção, nos respectivos momentos analisados.
- ✓ O fígado e o baço apresentaram aumento de peso e alterações macroscópicas em momentos tardios da infecção por *L. infantum*, que coincidiram com o aumento progressivo do número de formas amastigotas no baço. A infecção parasitária também levou a alterações no intestino delgado dos hamsters, tornando-os friável à manipulação e provocando uma diminuição significativa no número de placas de Peyer.
- ✓ Elevados níveis de LPS plasmático foram observados nos animais infectados a partir de 15 dias pós-infecção, confirmando nossa hipótese anterior de que a infecção por *L. infantum* pode contribuir para o aumento dos níveis circulantes dessa molécula. Embora, estudos futuros precisem confirmar a provável origem do LPS, os danos macroscópicos no intestino e a diminuição do número de placas de Peyer podem apontar para o lúmen intestinal.
- ✓ Os altos níveis de LPS na LV experimental se correlacionaram positivamente com a ativação de células T, sugerindo que este produto bacteriano não associado à infecção por *Leishmania*, deve contribuir para o prejuízo da função imune efetora, exercendo um papel importante da imunopatogênese da LV.
- ✓ A intensa ativação celular também pode ser vista pelos níveis de IgG total anti-*Leishmania* que aumentaram progressivamente com o tempo de infecção e não diminuíram apesar do tratamento com os fármacos propostos.
- ✓ De um modo geral, o uso concomitante do antimonial pentavalente com o antibiótico apresentou resultados mais satisfatórios na evolução da LV, do que os fármacos utilizados

separadamente. O sinergismo terapêutico ocorreu especialmente no que diz respeito à redução do peso esplênico e hepático dos hamsters, na melhora macroscópica desses órgãos, na diminuição da carga parasitária esplênica, na recuperação do número de placas de Peyer do intestino delgado e em sua friabilidade tecidual, no aumento do percentual de linfócitos T CD4⁺ e na diminuição dos níveis de ativação celular. Esses achados sugerem uma elegibilidade desses fármacos para o tratamento da leishmaniose visceral humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer Md, Team. WLC 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE*, 7, 12.

Anam K, Afrin F, Banerjee D, Pramanik N, Guha SK, Goswami RP, Saha SK, Ali N 1999. Differential decline in Leishmania membrane antigen-specific immunoglobulin G (IgG), IgM, IgE, and IgG subclass antibodies in Indian kala-azar patients after chemotherapy. *Infect Immun*, 67, 6663-6669.

Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, Zaman T, Stone D, Mefford M, Morgello S, Singer EJ, Wolinsky SM, Gabuzda D 2008. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One*, 3, e2516.

Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarencio J, Camargo LM, Barral A, Barral-Netto M 2010. Severe Plasmodium vivax malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*, 9, 13.

Antinori S, Schifanella L, Corbellino M 2012. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 31, 109-118.

Aslan H, Dey R, Meneses C, Castrovinci P, Jeronimo SM, Oliva G, Fischer L, Duncan RC, Nakhasi HL, Valenzuela JG, Kamhawi S 2013. A New Model of Progressive Visceral Leishmaniasis in Hamsters by Natural Transmission via Bites of Vector Sand Flies. *J Infect Dis*.

Atta AM, Colossi R, Sousa-Atta ML, Jeronimo SM, Nascimento MD, Bezerra GF, Orge G, Carvalho EM 2004. Antileishmanial IgG and IgE antibodies recognize predominantly carbohydrate epitopes of glycosylated antigens in visceral leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 525-530.

Baba CS, Makharia GK, Mathur P, Ray R, Gupta SD, Samantaray JC 2006. Chronic diarrhea and malabsorption caused by Leishmania donovani. *Indian J Gastroenterol*, 25, 309-310.

Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, 12, 1228-1231.

Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R 1997. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol*, 150, 235-246.

Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E, Falcoff R 1991a. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 163, 853-857.

Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG 1992. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science*, 257, 545-548.

- Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, Reed SG, Johnson WD, Jr. 1991b. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol*, 147, 281-284.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL 2001. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*, 194, 1497-1506.
- Brenchley JM, Douek DC 2012. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol*, 30, 149-173.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*, 12, 1365-1371.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, Nguyen PL, Khoruts A, Larson M, Haase AT, Douek DC 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200, 749-759.
- Caldas A, Favali C, Aquino D, Vinhas V, van Weyenbergh J, Brodskyn C, Costa J, Barral-Netto M, Barral A 2005. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. *BMC Infect Dis*, 5, 113.
- Caradonna L, Amati L, Magrone T, Pellegrino NM, Jirillo E, Caccavo D 2000. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J Endotoxin Res*, 6, 205-214.
- Caradonna L, Mastronardi ML, Magrone T, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG, Caccavo D, Pellegrino NM, Amoroso A, Jirillo E, Amati L 2002. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. *Curr Pharm Des*, 8, 995-1005.
- Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M 2007. Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol*, 117, 35-41.
- Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD, Jr. 1989. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*, 83, 860-864.
- Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD, Jr. 1985. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest*, 76, 2066-2069.
- Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD, Jr. 1981. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect Immun*, 33, 498-500.
- Ceccarelli G, d'Ettorre G, Mancone M, Francone M, Vullo V 2011. Accelerated coronary atherosclerosis after execution of percutaneous coronary intervention in patient with HIV/HCV coinfection: case report and review of the literature. *Cardiovasc Revasc Med*, 12, 262-265.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*, 5, 873-882.

Cooke KR, Olkiewicz K, Erickson N, Ferrara JL 2002. The role of endotoxin and the innate immune response in the pathophysiology of acute graft versus host disease. *J Endotoxin Res*, 8, 441-448.

Costa CH, Pereira HF, Araujo MV 1990. [Visceral leishmaniasis epidemic in the State of Piauí, Brazil, 1980-1986]. *Rev Saude Publica*, 24, 361-372.

Costa CH, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, Cavalcanti JC, Santos LS 2010. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 386-392.

Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL 2003. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*, 40, 677-684.

Costa FA, Guerra JL, Silva SM, Klein RP, Mendonca IL, Goto H 2000. CD4(+) T cells participate in the nephropathy of canine visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 33, 1455-1458.

Cunningham-Rundles S, Ahrne S, Johann-Liang R, Abuav R, Dunn-Navarra AM, Grasseley C, Bengmark S, Cervia JS 2011. Effect of probiotic bacteria on microbial host defense, growth, and immune function in human immunodeficiency virus type-1 infection. *Nutrients*, 3, 1042-1070.

D'Ettoire G, Douek D, Paiardini M, Ceccarelli G, Vullo V 2012. Microbial translocation and infectious diseases: what is the link? *Int J Microbiol*, 2012, 356981.

Da-Cruz AM, Pirmez C 2005. Leishmaniose tegumentar americana In G Koogan, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias* J.R.Coura, Rio de Janeiro, p. 697-712.

da Matta VL, Hoshino-Shimizu S, Dietze R, Corbett CE 2000. Detection of specific antibody isotypes and subtypes before and after treatment of American visceral leishmaniasis. *J Clin Lab Anal*, 14, 5-12.

DC DEOG, BL DASCS, HL DEMG, Lopes UG, Rossi-Bergmann B 2011. Intranasal immunization with LACK-DNA promotes protective immunity in hamsters challenged with *Leishmania chagasi*. *Parasitology*, 1-6.

Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Alunda JM, Bolas-Fernandez F 2007. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. *Vet Res Commun*, 31, 703-717.

Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.

Dwyer DM 1976. Antibody-induced modulation of *Leishmania donovani* surface membrane antigens. *The Journal of Immunology*, 117, 2081-2091.

Estes JD, Harris LD, Klatt NR, Tabb B, Pittaluga S, Paiardini M, Barclay GR, Smedley J, Pung R, Oliveira KM, Hirsch VM, Silvestri G, Douek DC, Miller CJ, Haase AT, Lifson J,

- Brenchley JM 2010. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog*, 6, e1001052.
- Fazzani C, Guedes PA, Senna A, Souza EB, Goto H, Lindoso JA 2011. Dynamics of immunosuppression in hamsters with experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 44, 666-670.
- Garg R, Dube A 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res*, 123, 439-454.
- Garg R, Srivastava JK, Pal A, Naik S, Dube A 2005. Isolation of integral membrane proteins of *Leishmania* promastigotes and evaluation of their prophylactic potential in hamsters against experimental visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 23, 1189-1196.
- Gatt M, Reddy BS, MacFie J 2007. Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther*, 25, 741-757.
- Giorgi JV, Hultin LE, McKeating JA, Johnson TD, Owens B, Jacobson LP, Shih R, Lewis J, Wiley DJ, Phair JP, Wolinsky SM, Detels R 1999. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J Infect Dis*, 179, 859-870.
- Gonzalez JL, Insa F, Novoa C, Pizarro M 1986. Intestinal amyloidosis in hamsters with visceral leishmaniasis. *Br J Exp Pathol*, 67, 353-360.
- Goto H, Lindoso JA 2004. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, 37, 615-623.
- Goto H, Prianti MdG 2009. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51, 241-246.
- Handman E 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clin Microbiol Rev*, 14, 229-243.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CH 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*, 27, 403-409.
- Harrison OJ, Maloy KJ 2011. Innate immune activation in intestinal homeostasis. *J Innate Immun*, 3, 585-593.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, 354, 1191-1199.
- Hicks L, Kant P, Tay PH, Vincini V, Schuster H, Rotimi O, Maughan N, Jordan C, Moss S, Everett S, Hamlin PJ 2009. Visceral Leishmaniasis presenting with intestinal failure: a case report and literature review. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 21, 117-122.
- Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, Landay A, Martin J, Sinclair E, Asher AI, Deeks SG, Douek DC, Brenchley JM 2009. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis*, 199, 1177-1185.
- Kumar R, Nylen S 2012. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Front Immunol*, 3, 251.

- Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romao P, Cortes S, Rolao N, Gomes-Pereira S, Rica Capela MJ, Abranches P 2001. Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, 79, 273-284.
- Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-151.
- Luz KG, Tuon FF, Duarte MI, Maia GM, Matos P, Ramos AM, Nicodemo AC 2010. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop*, 43, 393-395.
- Marzochi MC, Fagundes A, Andrade MV, Souza MB, Madeira Mde F, Mouta-Confort E, Schubach Ade O, Marzochi KB 2009. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil: eco-epidemiological aspects and control. *Rev Soc Bras Med Trop*, 42, 570-580.
- Matlashewski G, Arana B, Kroeger A, Battacharya S, Sundar S, Das P, Sinha PK, Rijal S, Mondal D, Zilberstein D, Alvar J 2011. Visceral leishmaniasis: elimination with existing interventions. *Lancet Infect Dis*, 11, 322-325.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol*, 166, 1912-1920.
- Missawa NA, Veloso MA, Maciel GB, Michalsky EM, Dias ES 2011. [Evidence of transmission of visceral leishmaniasis by *Lutzomyia cruzi* in the municipality of Jaciara, State of Mato Grosso, Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 44, 76-78.
- Mogensen TH 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rev*, 22, 240-273, Table of Contents.
- Moreira N, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM, Ker HG, de Oliveira Cardoso JM, Giunchetti RC, Carneiro CM, de Lana M, Reis AB 2012. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of leishmania (*Leishmania*) infantum: "Leishman Donovan units" versus real-time PCR. *PLoS One*, 7, e47907.
- MS MdS- 2006a. *Leishmaniose Visceral Grave - Normas e Condutas*. Brasília - DF.
- 2006b. *Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral*. Ministério da Saúde, 122 pp.
- Portal Saúde [database on the Internet]. Ministério da Saúde. 2013. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1561.
- Muigai R, Gatei DG, Shaunak S, Wozniak A, Bryceson AD 1983. Jejunal function and pathology in visceral Leishmaniasis. *Lancet*, 2, 476-479.
- Murray HW 2004. Progress in the treatment of a neglected infectious disease: visceral leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2, 279-292.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, 1561-1577.

- Murray HW, Stern JJ, Welte K, Rubin BY, Carriero SM, Nathan CF 1987. Experimental visceral leishmaniasis: production of interleukin 2 and interferon-gamma, tissue immune reaction, and response to treatment with interleukin 2 and interferon-gamma. *J Immunol*, 138, 2290-2297.
- Nieto A, Dominguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrion J 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res*, 42, 39.
- Nylen S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D 2007. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med*, 204, 805-817.
- Peruhype-Magalhaes V, Martins-Filho OA, Prata A, Silva Lde A, Rabello A, Teixeira-Carvalho A, Figueiredo RM, Guimaraes-Carvalho SF, Ferrari TC, Van Weyenbergh J, Correa-Oliveira R 2006. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. *Clin Exp Immunol*, 146, 124-132.
- Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MS, Tafuri WL 2011. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand*, 53, 67.
- Rey L 2008. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 883 pp.
- Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Correa-Oliveira R, Martins-Filho OA 2006. Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*, 112, 102-116.
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet Immunol Immunopathol*, 76, 269-281.
- Ribeiro FC, de OSA, Mouta-Confort E, Schubach TM, de Fatima Madeira M, Marzochi MC 2007. Use of ELISA employing *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* antigens for the detection of IgG and IgG1 and IgG2 subclasses in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in dogs. *Vet Parasitol*, 148, 200-206.
- Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 414, 920-924.
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N 2006. Immune responses in kala-azar. *Indian J Med Res*, 123, 245-266.
- Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, Kleiner DE, Deeks SG, Liang TJ, Heller T, Douek DC 2011. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. *Gastroenterology*, 141, 1220-1230 e1221-1223.

Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM 2012. Lipopolysaccharide-Induced Cellular Activation May Participate in the Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis Alone or in HIV Coinfection. *Int J Microbiol*, 2012, 364534.

Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, Lindoso JA, Goto H, Oliveira-Neto MP, Guerra J, Grinsztejn B, Jeronimo SM, Morgado MG, Da-Cruz AM 2013. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in visceral leishmaniasis patients co-infected with HIV-1. *J Infect Dis*.

Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CR, Cunha RV, Bozza PT, Da-Cruz AM 2011. Evidence that lipopolysaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1198.

Silva JR 1957. *Leishmaniose visceral (Kala-azar)*. Doutorado, Faculdade Nacional de Medicina da Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

Soares NM, Ferraz TP, Nascimento EG, Carvalho EM, Pontes-de-Carvalho L 2006. The major circulating immunosuppressive activity in American visceral leishmaniasis patients is associated with a high-molecular weight fraction and is not mediated by IgG, IgG immune complexes or lipoproteins. *Microb Pathog*, 40, 254-260.

Stauber LA 1958. Host Resistance to the Khartoum Strain of *Leishmania donovani*. *The Rice Institute Pamphlet*, 45, 80-96.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK 2007. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*, 356, 2571-2581.

Sundar S, Mondal D, Rijal S, Bhattacharya S, Ghalib H, Kroeger A, Boelaert M, Desjeux P, Richter-Airijoki H, Harms G 2008. Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment. *Trop Med Int Health*, 13, 2-5.

van Griensven J, Diro E 2012. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*, 26, 309-322.

Werneck GL 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad Saude Publica*, 24, 2937-2940.

— 2010. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica*, 26, 644-645.

WHO WHO- 2009. World Distribution of visceral leishmaniasis, 2009. In.

Wiwanitkit V 2012. Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). *Ther Clin Risk Manag*, 8, 323-328.

ANEXO 1



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone: (55-11) 3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e
3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br



São Paulo, 28 de março de 2012.

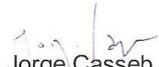
Ilmo (a)

Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

(aos cuidados de Elaine Marques Paulo)

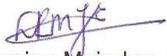
Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2011/118** e intitulado "Avaliação dos efeitos do comprometimento da barreira do trato intestinal na gravidade da leishmaniose visceral experimental em modelo hamster dourado (*Mesocricetus auratus*)", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,


Dr. Jorge Casseb

Presidente

Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP


Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP