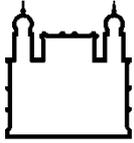


MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS

Fortaleza  
Agosto de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

*CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS*

Estudo da migração celular induzida por *Leishmania braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo de bolsa de ar subcutânea em hamster e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

**Orientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jania Teixeira

**FORTALEZA**

Agosto de 2017

VASCONCELOS, CAMILA OLIVEIRA DE .

Estudo da migração celular induzida por *Leishmania braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo da bolsa de ar subcutânea em hamster e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção / CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS. - , 2017.

75 f.; il.

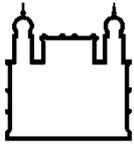
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2017.

Orientadora: ALDA MARIA DA CRUZ.

Co-orientadora: MARIA JANIA TEIXEIRA.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. bolsa de ar subcutânea. 3. citocinas. 4. infiltrado inflamatório. 5. hamster. I. Título.



Ministério da Saúde

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

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

*CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS*

**ESTUDO DA MIGRAÇÃO CELULAR INDUZIDA POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* NA COMPOSIÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA MIMETIZADA EM MODELO DE BOLSA DE AR SUBCUTÂNEA EM HAMSTER E A SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO E GRAVIDADE DA INFECÇÃO**

**ORIENTADORAS: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz**  
**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jania Teixeira**

**EXAMINADORES**

**Titulares:**

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa – Presidente (IOC-Fiocruz/RJ)

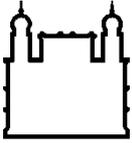
Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira (UFC)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Erika Freitas Mota (UFC)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas (UFC)

Prof. Dr. Roberto Nicolete (Fiocruz/CE)

Fortaleza, 24 de agosto de 2017



Ministério da Saúde

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



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Medicina Tropical de **Camila Oliveira de Vasconcelos**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz e Dr<sup>a</sup>. Maria Jania Teixeira. Ao vigésimo quarto dia do mês de agosto de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, no Auditório do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Dinâmica da migração celular induzida por *Leishmania (Viannia) braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo de bolsa de ar subcutânea e a sua relação com a evolução e a gravidade da infecção”** no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Relação Parasito - Hospedeiro A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Edson Holanda Teixeira - UFC/CE, Dr. Roberto Nicolete - FIOCRUZ/CE, Dr<sup>a</sup> Érika Freitas Mota - UFC/CE, Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas - UFC/CE e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cunha Frota - UFC/CE e Dr<sup>a</sup>. Margarida Maria de Lima Pompeu - UFC/CE. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Fortaleza, 24 de agosto de 2017.

Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Presidente da Banca): 

Dr. Edson Holanda Teixeira (Membro da Banca): 

Dr. Roberto Nicolete (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup> Érika Freitas Mota (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup>. Conceição Aparecida Dornelas (Membro da Banca): 

Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis (Coordenadora do Programa): 

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360  
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: [atendimentoaseac@ioc.fiocruz.br](mailto:atendimentoaseac@ioc.fiocruz.br) Site: [www.fiocruz.br/iocensino](http://www.fiocruz.br/iocensino)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, primeiramente, pela sua bondade e amor que me permitiram chegar até aqui.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Alda Maria da Cruz pelo acolhimento, atenção e ajuda em todos momentos do curso.

À minha orientadora Dr<sup>a</sup> Maria Jania Teixeira pela força, incentivo, amizade, um grande exemplo de profissional e ser humano. Uma grande responsável por esse momento.

Aos meus pais Amilton Nogueira de Vasconcelos e Herandi Oliveira de Vasconcelos (*in memoriam*) por aceitarem essa missão de cuidar e me formar, são os responsáveis por tudo que sou.

Ao meu esposo Daniel Vasconcelos Lima e meu filho Pedro Felipe Oliveira de Vasconcelos Barros, meus companheiros e incentivadores diários.

Aos meus irmãos Plínio Oliveira de Vasconcelos e Leonardo Roberto Oliveira de Vasconcelos, à minha tia Rosimar Ferreira de Oliveira por amar e cuidar tão bem do meu filho nos momentos em que estive ausente.

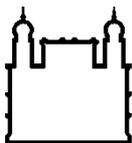
Ao meu chefe e amigo Professor Eduardo Souza Bastos por ter sido um grande incentivador e ter me ajudado em momentos difíceis.

À amiga Raquel Peralva Ribeiro pela colaboração e enorme ajuda para a realização desse trabalho.

Aos professores do programa DINTER FIOCRUZ/UFC, especialmente ao Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Cunha Frota pela dedicação, disposição e empenho em fazer esse programa dar certo.

Aos amigos de turma e caminhada Aline, Cristianne, Cynara, Emília, Fabrício, Jakeline, Juliana, Luiz, Roberta, Weberty, pela parceria e amizade que ajudaram a tornar esses anos mais alegres.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pelo auxílio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Estudo da migração celular induzida por *Leishmania (Viannia) braziliensis* na composição da reação inflamatória mimetizada em modelo de bolsa de ar subcutânea em hamster e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção**

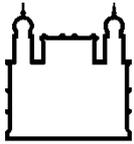
### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM MEDICINA TROPICAL

#### CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS

*Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie envolvida na leishmaniose tegumentar americana. O hamster é o modelo mais susceptível às espécies do subgênero *Viannia*. O surgimento das lesões está relacionado à carga infectiva inicial, influenciando a gravidade, a evolução clínica e as alterações histopatológicas na doença. Neste estudo, foi avaliado o perfil imunocelular inflamatório induzido por diferentes cargas infectivas de *L. braziliensis* e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção, em modelo hamster. Hamsters (n=60) foram infectados na pata (via intradérmica) com promastigotas de *L. braziliensis* com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  e a mensuração da espessura da pata foi realizada semanalmente por 45 dias. No 15º e 45º dia pós-infecção, os animais foram submetidos à bolsa de ar subcutânea com inóculo de  $10^6$  parasitos. Foram coletados a pata infectada e o linfonodo de drenagem da lesão (LN), bem como o exsudato e o tecido da bolsa de ar, para avaliação de parâmetros, tais como: recrutamento e fenótipo celular (bolsa de ar), carga parasitária (pata e LN; RTqPCR), expressão de citocinas (pata e LN; RTqPCR) e aspectos histopatológicos (pata e tecido da bolsa de ar). Observou-se que o tempo de surgimento das lesões foi inversamente relacionado à concentração do inóculo, enquanto os aspectos das lesões, carga parasitária e alterações histopatológicas foram diretamente relacionados à concentração do inóculo. Observou-se ainda um perfil misto de expressão de citocinas, nos 3 inóculos e nos tempos avaliados. Observou-se também baixa modulação de IL-4 e TGF- $\beta$  nos animais infectados com  $10^4$ , o que pode ter contribuído para a discreta carga parasitária e lesões mais benignas, ao contrário do que foi observado com  $10^6$ . Nos inóculos  $10^5$  e  $10^6$  observou-se uma aparente desregulação da resposta imunológica, com alta expressão de citocinas, provavelmente relacionado ao maior estímulo antigênico. Em suma, os resultados mostraram uma tendência do inóculo  $10^4$  induzir um controle mais eficiente da infecção, mediado provavelmente pela baixa modulação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Ao contrário, o inóculo  $10^6$  mostrou tendência a um controle menos efetivo, e mesmo mediante a alta expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS, induziu também IL-4 e TGF- $\beta$ , o que pode contribuir para o curso crônico da doença. Além disso, os dados sugerem também que o perfil de citocinas produzidas na primo-infecção no linfonodo pode ter influenciado o tipo e quantidade de células que foram recrutados no tecido da bolsa de ar.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*, bolsa de ar subcutânea, citocinas, infiltrado inflamatório, hamster, primo-infecção.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Study of cell migration induced by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the composition of the inflammatory reaction mimicked in a subcutaneous air pouch model in hamster and its relation with the evolution and severity of the infection**

### ABSTRACT

#### THESIS IN MEDICINA TROPICAL

**CAMILA OLIVEIRA DE VASCONCELOS**

*Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species involved in American tegumentary leishmaniasis. Hamster is the most susceptible model to the species of the subgenus *Viannia*. The appearance of the lesions is related to the initial infectious load, influencing the severity, the clinical evolution and the histopathological changes in the disease. In this study, the inflammatory immunocellular profile induced by different infective loads of *L. braziliensis* and its relation with the evolution and severity of the infection was evaluated in a hamster model. Hamsters (n = 60) were infected in the footpad (intra-dermal way) with *L. braziliensis* promastigotes with  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  and the footpad thickness measurement was performed weekly for 45 days. On the 15th and 45th day after infection, the animals were submitted to a subcutaneous air pouch with inoculum of  $10^6$  parasites. The infected footpad and lesion drainage lymph node (LN), as well as the exudate and the air pouch tissue, were collected for evaluation of parameters such as: recruitment and cell phenotype (air pouch), parasitic load (footpad and LN, RTqPCR), cytokine expression (footpad and LN; RTqPCR) and histopathological aspects (footpad and tissue of the air pouch). It was observed that lesion appearance was inversely related to the concentration of the inoculum; while lesion aspects, parasite load and histopathological changes were directly related to the concentration of the inoculum. A mixed profile of cytokine expression was also observed in the 3 inocula and in the evaluated times. Low modulation of IL-4 and TGF- $\beta$  was also observed in the animals infected with  $10^4$ , which may have contributed to the mild parasite load and more benign lesions, contrary to what was observed with  $10^6$ . In the inocula  $10^5$  and  $10^6$  was observed an apparent deregulation of the immune response, with high expression of cytokines, probably related to the major antigenic stimulus. In summary, the results showed a tendency of the inoculum  $10^4$  to induce a more efficient infection control, probably mediated by the low modulation of IL-4, IL-10 and TGF- $\beta$  cytokines. In contrast, the inoculum  $10^6$  showed a trend towards a less effective control, and even through the high expression of IFN- $\gamma$  and iNOS, it also induced IL-4 and TGF- $\beta$ , which may contribute to the chronic course of the disease. In addition, the data also suggest that the cytokine profile produced in the lymph node primo-infection may have influenced the type and the amount of cells that were recruited into air pouch tissue.

**Keywords:** *Leishmania braziliensis*, subcutaneous air pouch, cytokines, inflammatory infiltrate, hamster, primo-infection.

# ÍNDICE

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Situação do problema.....	1
1.2 Leishmaniose tegumentar americana (LTA).....	3
1.3 Aspectos imunopatológicos de LTA .....	4
1.4 Aspectos histopatológicos e clínico-evolutivos de lesões no hamster como modelo de LTA.....	16
1.5 Modelo da bolsa de ar subcutânea.....	19
1.6 Justificativa....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo geral .....	22
2.2 Objetivos específicos .....	22
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
3.1 Materiais.....	23
3.1.1 Animais.....	23
3.1.2 Parasito.....	23
3.2 Metodologia para o Objetivo 1.....	23
3.2.1 Bolsa de ar subcutânea.....	23
3.3 Metodologia para os Objetivos 2, 3 e 4 .....	24
3.3.1 Infecção e acompanhamento da espessura da lesão de pata.....	24
3.3.2 Formação da bolsa de ar subcutânea.....	25
3.3.3 Extração de RNA e DNA.....	25
3.3.4 Expressão gênica.....	26
3.3.5 Determinação da carga parasitária.....	27
3.3.6 Contagem de mastócitos.....	28
3.4 Metodologia para os Objetivos 5 e 6.....	29
3.4.1 Análise histopatológica	29
3.5 Análise estatística .....	29
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Influência do inóculo na quantidade e tipo de leucócito recrutado na bolsa de ar subcutânea .....	31
4.2 Influência da primo-infecção por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> na quantidade e tipo de leucócitos recrutados na bolsa de ar .....	32

4.3 Análise da espessura da lesão da pata infectada com os diferentes inóculos.....	35
4.4 Avaliação da carga parasitária do tecido da pata e do linfonodo após 15 e 45 dias de infecção com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	36
4.5 Análise da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase em lesão de pata e linfonodo de hamsters infectados com diferentes inóculos .....	37
4.6 Alteração histopatológica no tecido da pata de hamster com infecção com três diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e do tecido da bolsa de ar na reinfecção com 15 e 45 dias .....	41
5 DISCUSSÃO .....	44
6 CONCLUSÕES .....	59
7 PERSPECTIVAS.....	60
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
9 APÊNDICES E/OU ANEXOS.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2015 .....	2
<b>Figura 2</b> – Fluxograma esquemático do desenho experimental 1. Indução de resposta inflamatória no modelo de bolsa de ar em hamsters com diferentes inóculos de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	24
<b>Figura 3</b> – Fluxograma esquemático do desenho experimental para os objetivos 2 a 6 .....	30
<b>Figura 4</b> – Quantificação de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamster em resposta a presença de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos) .....	31
<b>Figura 5</b> – Quantificação dos tipos de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamster em resposta à presença de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos) .....	32
<b>Figura 6</b> – Quantificação dos leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos) .....	33
<b>Figura 7</b> – Quantificação dos tipos de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos) .....	34
<b>Figura 8</b> – Quantificação de mastócitos avaliados no tecido da bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos) .....	35
<b>Figure 9</b> – Avaliação do tamanho das lesões de pata de hamster após infecção por promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> em três diferentes concentrações do parasito ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ ) .....	36
<b>Figura 10</b> – Quantificação da carga parasitária em lesões cutâneas (A) e linfonodo (B) de hamsters infectados com $10^4$ (◆), $10^5$ (▲) e $10^6$ (■) promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> com 15 e 45 dias após a infecção.....	37
<b>Figura 11</b> – Expressão gênica de IFN- $\gamma$ (A), TNF (B), IL-10 (C), TGF $\beta$ (D), IL-4 (E), IL-6 (F), arginase (G) e iNOS (H) na lesão da pata de hamsters com 15 e 45 dias após a infecção com $10^4$ (◆), $10^5$ (▲) e $10^6$ (■) promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	39
<b>Figura 12</b> – Expressão gênica de IFN- $\gamma$ (A), TNF (B), IL-10 (C), TGF $\beta$ (D), IL-4 (E), IL-6 (F), arginase (G) e iNOS (H) no linfonodo poplíteo de hamsters com 15 e 45 dias após a infecção com $10^4$ (●), $10^5$ (▲) e $10^6$ (■) promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> .....	40
<b>Figura 13</b> – Alterações histopatológicas representadas por escore, no tecido da pata de hamsters infectados com diferentes concentrações de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> ( $10^4$ , $10^5$ e $10^6$ parasitos), com 15 (A) e 45 (B) dias pós-infecção.....	41

**Figura 14** – Alterações histopatológicas no tecido da bolsa de ar produzida em hamsters infectados previamente na pata com diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos) representado por escores, com 15 (A) e 45 (B) dias pós-infecção.....42

**Figura 15** – Fotomicrografia de pata infectada e bolsa da ar subcutânea formada em hamsters infectados com diferentes concentrações de parasitos de *Leishmania braziliensis* 45 dias após a infecção. Infiltrado inflamatório discreto na pata posterior direita infectada com  $10^4$  (A), moderado com  $10^5$  (B) e severo com  $10^6$  (C).....43

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Grupos de animais utilizados no segundo experimento .....25

**Tabela 2** – Alvos e sequências de iniciadores para quantificação de citocinas, iNOS e arginase de hamster utilizados nos ensaios de RT-qPCR em Tempo Real .....27

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês: Bovine serum albumin)
CCL2/MCP-1	Ligante 2 de CC quimiocina/ proteína quimiotática de monócitos-1
CCR2	Receptor de quimiocina 2
CD	Célula dendrítica
CD4	Célula T com grupo de diferenciação 4
CD8	Célula T com grupo de diferenciação 8
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Ct	Cycle threshold
FBS	Soro fetal bovino (do inglês: foetal bovine serum)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
IL-12p40	Subunidade beta da Interleucina doze
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase (do inglês: inducible nitric oxide synthase 2)
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea disseminada
LCF	Fator quimiotático de <i>Leishmania</i>
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose muco-cutânea
LM	Leishmaniose mucosa
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NK	Célula natural killer
NKT	Linfócito T natural killer
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução salina fosfatada tamponada
PMN	Polimorfonucleare
Real time	Transcrição reversa da reação em cadeia pela polimerase em
RT-PCR	tempo real
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- $\beta$	Fator de crescimento de transformação - $\beta$
Th	Células T helper
TNF	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Situação do problema

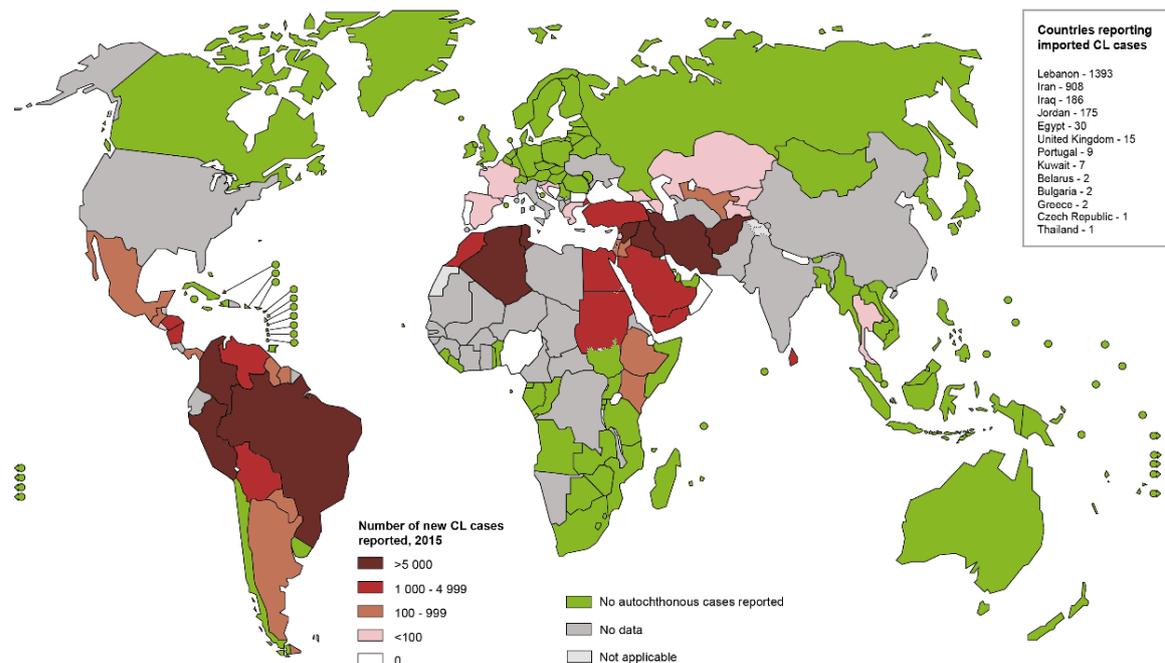
As doenças negligenciadas, embora, afetem milhares de pessoas ao redor do mundo, ainda não dispõem de tratamentos eficazes ou adequados. Em sua maioria, são doenças infecciosas que atingem principalmente pessoas com condições sócio-econômicas precárias, em áreas tropicais e subtropicais, a exemplo das leishmanioses. Apesar das medidas adotadas nos programas de controle nos últimos anos, as leishmanioses continuam apresentando uma incidência alta, em várias regiões do mundo (WHO, 2017).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as onze doenças infecto-parasitárias de maior importância no mundo, sendo a segunda entre as causadas por protozoários (WHO, 2017).

As leishmanioses compreendem duas apresentações clínicas, leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), onde a evolução da infecção vai depender da espécie do parasito, da virulência da cepa, da quantidade de parasitos inoculados no momento da infecção e da resposta imunológica do hospedeiro. Estas manifestações clínicas variam desde lesões cutâneas simples até casos mais graves associados com disseminação para outros locais da pele ou mucosa, podendo ocorrer também visceralização dos parasitos (Pearson et al., 2005; Scorza et al., 2017).

As leishmanioses atingem 98 países situados em regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que 700 mil a 1 milhão de novos casos ocorram anualmente em todo o mundo, com cerca de 20 a 30 mil mortes. Dos novos casos anuais, 50 a 90 mil são de LV, forma mais grave da doença, responsável pela maioria dos casos fatais; e 0,6 a 1 milhão são de LC (WHO, 2017).

No contexto mundial, o Brasil se destaca por estar entre sete mais acometidos pela LV, entre os seis países mais acometidos pela LC, e entre os quatro mais acometidos pela leishmaniose mucocutânea (LM), tornando-as importante problema de saúde pública em nosso país (WHO, 2017).



**Figura 1** – Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo em 2015  
 Fonte: WHO (2017).

Nas Américas, a LC é conhecida como leishmaniose tegumentar americana (LTA), ocorrendo desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (Brasil, 2017).

No Brasil, a LTA encontra-se difundida em todas as regiões federadas, com número de casos variando de 18 a 35 mil por ano entre os anos de 1990 e 2015 (Brasil, 2017). No Brasil, a LTA é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, sendo que as espécies *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* são as mais frequentemente associadas à doença humana (revisito por Da-Cruz; Pirmez, 2012).

No Ceará, as formas tegumentares humanas têm como agente etiológico principal *L. (V.) braziliensis* (Vasconcelos et al., 1988), espécie capaz de desenvolver quadros de leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea, no qual pode haver, principalmente, o comprometimento das mucosas da orofaringe, com elevada morbidade e a forma cutânea disseminada (LCD), relativamente rara, geralmente em pacientes imunossuprimidos (Pearson et al., 2000; Sousa et al., 2006; Scorza et al., 2017).

## 1.2 Leishmaniose tegumentar americana (LTA)

O espectro clínico da LTA depende de interações complexas que abrangem parasito e hospedeiro, tais como: a espécie de *Leishmania*, sua capacidade infectiva e o estado imunológico e nutricional do hospedeiro (Pearson; Sousa 1996; Scorza et al., 2017). Enquanto no Velho Mundo as espécies causam formas benignas e com frequência auto-limitadas, no Novo Mundo, as manifestações da LTA vão desde formas mais brandas, com lesão única, até formas mais graves, com comprometimento mucoso (Blum et al., 2004; Scorza et al., 2017).

A leishmaniose cutânea localizada é a apresentação clínica mais prevalente de LTA, caracterizada por baixo parasitismo tecidual e considerada benigna, uma vez que responde bem à terapêutica antimonial, podendo mesmo evoluir para a cura espontânea (Da-Cruz; Pirmez, 2012; Scorza et al., 2017). Geralmente não traz ameaça à vida, mas pode ser socialmente estigmatizante, pela possibilidade de causar cicatrizes desfigurantes (Scorza et al., 2017).

Em regiões onde *L. braziliensis* é endêmica, aproximadamente de 1 a 10% dos pacientes com LCL evoluem para LM (Scorza et al., 2017). Esta é considerada uma forma grave, onde as lesões são destrutivas, localizadas em áreas distantes do local do inóculo, no caso, o trato respiratório superior. Nessa apresentação clínica, a exacerbação da resposta imune aos antígenos de *Leishmania* e a cronicidade da doença impõem dificuldades no manejo terapêutico, a despeito da escassez de parasitos (Da-Cruz; Pirmez, 2012). Os casos de LM evoluem mais frequentemente com resistência terapêutica e reativação da lesão, em comparação com a LCL (Amato et al., 2007).

A forma disseminada, também chamada de leishmaniose cutânea disseminada, causada por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, como a *L. braziliensis*, tem emergido como altamente prevalente em algumas regiões do Brasil (Carvalho et al., 1994; Turetz et al., 2002; Machado et al., 2011). A LD é caracterizada por um grande número de lesões pleomórficas, em duas ou mais regiões anatômicas não contíguas, que compreendem uma mistura de lesões tipo acneiformes, papulares, nodulares e ulceradas (Machado et al., 2011). Os pacientes podem responder ao tratamento, mas requerem, muitas vezes, múltiplo ou um regime mais longo de tratamento do que LCL (Hashiguchi et al., 2016).

Poucos são os estudos experimentais conduzidos com espécies do subgênero *Viannia* comparados com o subgênero *Leishmania*, apesar de sua

grande importância na América Latina (De Moura et al., 2005; Salay et al., 2007). No caso de *L. braziliensis*, provavelmente a escassez se deve à dificuldade no crescimento desse parasito em cultura e na obtenção das formas infectivas *in vivo*, e principalmente a baixa susceptibilidade dos camundongos à infecção por essa espécie (Neal; Hale 1983; De Moura et al., 2005).

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

Diferente do modelo murino, o hamster é altamente susceptível à infecção por espécies do subgênero *Viannia*, podendo ser considerado um modelo experimental para estudo de LTA causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (Travi et al., 1988; Oliveira et al., 2004; Gomes-Silva et al., 2013). As lesões geradas pela infecção tendem a se desenvolver rapidamente nesse modelo apresentando curso crônico de evolução, o que permite monitoramento por longos períodos, útil em estudos terapêuticos e imunológicos. Além disso, a infecção cutânea no hamster reproduz muitos dos aspectos observados na infecção humana como a linfadenopatia, a metástase cutânea e a capacidade de montar uma resposta protetora em lesões secundárias (Hommel et al., 1995). Nesse sentido, o hamster preenche as características necessárias como modelo adequado no estudo das leishmanioses, principalmente pela susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia* (Mears et al., 2015).

### **1.3 Aspectos imunopatológicos de LTA**

A inflamação é uma resposta do tecido a um dano e é caracterizada na fase aguda pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular com acumulação de fluidos, leucócitos e mediadores inflamatórios, como as citocinas. A fase crônica é caracterizada pelo desenvolvimento da resposta imunológica celular e humoral aos patógenos presentes no local inflamatório. Durante o processo inflamatório, vários fatores solúveis estão envolvidos no recrutamento de leucócitos,

umentando a expressão de moléculas de adesão e de quimioatração (Teixeira et al., 2006). Muitos desses mediadores solúveis regulam a ativação de células residentes como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos teciduais e mastócitos, e recrutam novas células inflamatórias como monócitos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos; além disso, alguns desses mediadores desencadeiam também uma resposta sistêmica (Feghali; Wright, 1997).

A resposta imunológica inata caracteriza-se por ser inespecífica e rápida e não gerar memória imunológica, podendo, entretanto, ser crucial para limitar a replicação e a propagação de agentes infecciosos, nos momentos iniciais da infecção (Bachmann; Kopf, 2002; Le Bom; Tough, 2002). Uma vez ultrapassada a barreira físico-química pelo patógeno, a resposta imunológica inata utiliza outros recursos, como os polimorfonucleares (PMN), monócitos, macrófagos, células dendríticas (CD), células natural killer (NK), linfócitos T natural killer (NKT), ativação dos receptores “toll-like” e frações do complemento, dentre outros (Pasare; Medzhitov, 2005).

Células sentinelas, incluindo CDs, macrófagos e linfócitos T  $\gamma\delta$ , também expressam vários receptores para citocinas e, junto com as células do tecido, produzem quimiocinas iniciando a cascata da resposta inata (Spellberg, 2000). A interação patógeno-receptor “toll-like” induz a expressão de moléculas de adesão e coestimuladoras, e a liberação de citocinas e quimiocinas como IL (interleucina) -1 $\alpha$ , IL-8, IL-12 e IFN (interferon) - $\gamma$ . Consequentemente ocorre a migração de células inflamatórias para o sítio lesado (Schroder et al., 2006).

Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras para *Leishmania*, monócitos, células dendríticas e neutrófilos, que são recrutados para o local da infecção, podem se infectar e têm importantes e distintos papéis na formação da resposta imunológica à infecção (Scott; Novais, 2016).

Quando fagocitadas por neutrófilos, as partículas estranhas são destruídas por enzimas proteolíticas estocadas nos grânulos dos PMNs e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Awasthi et al., 2004). Nas leishmanioses, a própria *Leishmania* produz uma proteína quimioatraente chamada fator quimiotático de *Leishmania* (LCF), que pode atrair PMNs como neutrófilos, mas não atrai outros leucócitos como monócitos e células NK (van Zandbergen et al., 2002). Em humanos, os PMNs que contêm *Leishmania* são capazes de secretar quimiocinas como CXCL8, que é essencial para atrair mais PMNs para o local da infecção (Laufs et al., 2002). Um estudo mostra que a co-incubação de *Leishmania* com PMNs inibe

a produção de IFN- $\gamma$  induzido pela quimiocina CXCL10, sugerindo que *Leishmania* inibe a atividade das células T helper 1 (Th1) e NK (van Zandbergen et al., 2002).

Os PMNs são células fagocíticas que podem favorecer ou promover a morte da *Leishmania*, sendo responsáveis em controlar inicialmente o parasito (Lima et al., 1998). Tem sido demonstrado que *Leishmania* pode sobreviver dentro de neutrófilos nas primeiras horas ou primeiros dias após a infecção (Laufs et al., 2002; van Zandbergen et al., 2004) e pode atrasar, embora não evite, a apoptose espontânea dos neutrófilos (Aga et al., 2002).

Duas hipóteses têm sido propostas para a interação inicial *Leishmania*-neutrófilo. Na primeira, o neutrófilo seria um local de refúgio temporário para os parasitos, e na segunda, o neutrófilo seria o local de adaptação da *Leishmania* para parasitar macrófagos. Ambas ocorrem simultaneamente, e mostram como a *Leishmania* é adaptada para usar a resposta natural do hospedeiro para sobreviver e se desenvolver (Peters et al., 2008).

Os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da infecção por *Leishmania* (Peters et al., 2008), mas seu papel é complexo. Eles podem matar os parasitos ou proteger contra a infecção, dependendo da espécie do parasito e do hospedeiro. Os neutrófilos também podem contribuir no controle de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* interagindo com macrófagos infectados (Novais et al., 2009; De Souza-Carmo et al., 2010). Em contrapartida, a absorção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos e CDs após infecção por *L. major* pode limitar a ativação de macrófagos e CDs, levando a uma melhor sobrevivência parasitária (Savill et al., 2002; van Zandbergen et al., 2004).

Um estudo da lesão inicial mostra que outras células, além dos macrófagos, servem como hospedeiras para os parasitos em diferentes momentos da infecção. Durante as 18 h iniciais de infecção, a maioria das células infectadas são neutrófilos, entretanto, entre 48 horas e 7 dias após a infecção, a proporção dos neutrófilos infectados diminui e os macrófagos tornam-se as células infectadas predominantes (Peters et al., 2008). Resultados semelhantes foram documentados em um modelo de infecção por *L. infantum* (Thalhofer et al., 2011), no qual os macrófagos eram as células hospedeiras infectadas predominante com 2 a 7 dias de infecção. Esses estudos sugerem que a formação de lesões cutâneas se correlaciona com o desenvolvimento da imunidade adaptativa (Belkaid et al., 2000; Peters et al., 2008).

Outro estudo relata que a infiltração dos neutrófilos ocorre em dois momentos na infecção cutânea. No primeiro momento, os neutrófilos são as células mais

frequentes no local da infecção com *L. panamensis* (dentro de 2 a 6 horas de infecção). A magnitude da primeira infiltração de neutrófilos é modesta e não tem efeitos aparentes na carga parasitária, nem no desenvolvimento clínico da lesão inicial. A segunda infiltração de neutrófilos é mais intensa que a primeira, e é associada a uma lesão aumentada, ulceração da pele, necrose e a carga parasitária. Os neutrófilos na segunda infiltração têm redução da função oxidativa, produção de óxido nítrico e expressão de GM-CSF. No entanto, eles expressam citocinas anti-inflamatórias e proteases que provavelmente contribuem para a patologia do tecido na lesão crônica (Peniche et al., 2017).

Na segunda infiltração dos neutrófilos, as lesões continham grande número de macrófagos infectados e parasitos extracelular. Esses dados corroboram com observações anteriores de neutrófilos associados a macrófagos parasitados e abundante presença de amastigotas livres no fluido extracelular das lesões de humanos (Daboul, 2010). O recrutamento dos neutrófilos pode ser induzido por amastigotas livres, que agem como quimioatraentes (van Zandbergen et al., 2002) ou pelos macrófagos inflamatórios. É possível que os fatores quimiotáticos produzidos pelos próprios parasitos (Rousseau et al., 2001) e citocinas inflamatórias (Lopez et al., 2009) estimulam o massivo recrutamento de neutrófilos nas lesões crônicas mais parasitadas.

Os macrófagos são o segundo tipo celular que chegam ao local da infecção, atraídos no início por produtos da saliva e 2 a 3 dias depois por quimiocinas (Teixeira et al., 2006). *Leishmania* pode induzir quimiocinas que atraem monócitos, como CCL2 (Badolato et al., 1996). Além de atrair monócitos e macrófagos, CCL2 pode atrair outras células como CD4 e NK, que possuem CCR2, receptor para CCL2 (Allavena et al., 1994; Ritter; Moll, 2000). Nas leishmanioses humanas, CCL2 e CCL3 são responsáveis pela ativação dos macrófagos nas lesões da pele, sugerindo que macrófagos estimulados pela ação sinérgica de CCL2 e IFN- $\gamma$  podem matar os parasitos na LC (Muzio et al., 2000).

Embora *Leishmania* consiga diferenciar-se em amastigota e proliferar dentro de células dendríticas (Prina et al., 2004), os macrófagos são as células hospedeiras preferenciais, nas quais os parasitos proliferam intensamente no interior dos fagolisossomos (Konecny et al., 1999). Esse tipo de célula é especializado em destruir patógenos invasores, mas *Leishmania* possui mecanismos sofisticados que inibem estas células no desempenho de sua função. *Leishmania* impede a ativação dos agentes antimicrobianos como o óxido nítrico (NO) e também inibem algumas

das citocinas que induzem a função dos macrófagos necessária para uma resposta imunológica efetiva (Moll, 2000).

Os monócitos inflamatórios e CDs também são recrutados para o local da infecção e nos primeiros dias tornam-se as células dominantes infectadas com *Leishmania* (Ribeiro-Gomes et al., 2012). Mesmo dentro das primeiras horas de infecção, algumas CDs e monócitos são infectados com os parasitos. A consequência da infecção por monócitos é marcadamente diferente da infecção de macrófagos. Os monócitos apresentam uma forte explosão respiratória após a infecção, levando ao controle precoce dos parasitos, enquanto que os macrófagos precisam ser ativados por IFN- $\gamma$  para matar os parasitos (Gonçalves et al., 2011).

Sabe-se que ao ingerir PMNs apoptóticos, a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos é inibida, através de mecanismos envolvendo TGF (fator de crescimento de transformação) - $\beta$ , prostaglandina E2 e fator ativador de plaqueta (Fadok et al., 1998; Ribeiro-Gomes et al., 2004). Esses eventos contribuem para uma entrada silenciosa da *Leishmania* nos macrófagos, e em outros tipos celulares (Laskay et al., 2003; Laskay et al., 2008).

Os eosinófilos, juntamente com os neutrófilos chegam inicialmente no local da infecção por patógenos em geral, incluindo *Leishmania* (Andrade et al., 1984; Lima et al., 1998; Pompeu et al., 1991; Teixeira et al., 2005). Por muito tempo, os eosinófilos foram consideradas células não específicas, com atividade antimicrobiana mediada pela secreção de grânulos. O papel dos eosinófilos durante a infecção por *Leishmania* tem sido pouco investigado, inclusive em infecções experimentais. Os poucos estudos já realizados demonstraram que os eosinófilos representam 15% do infiltrado celular no local da infecção por *L. major* em camundongos resistentes (C57BL/6), não sendo identificado em camundongos susceptíveis (BALB/c) (Beil et al., 1992). Observou-se também que os eosinófilos do sangue periférico de humanos podem transcrever ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) para uma variedade de citocinas, incluindo TNF (fator de crescimento tumoral) - $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$ , sugerindo, portanto, que os eosinófilos podem ter um importante papel na função das citocinas em doenças humanas (Nakajima et al., 1996).

Atualmente se sabe que os eosinófilos podem influenciar o desenvolvimento da resposta imune adaptativa de três formas. Primeiro, os eosinófilos podem funcionar como células apresentadoras de antígenos (Padigel et al., 2006; Blanchard et al., 2009). No modelo de infecção por *Strongyloides stercoralis*, os eosinófilos

aumentaram sua expressão do MHC II (complexo maior de histocompatibilidade de classe II), direcionando a resposta imunológica para um fenótipo do tipo Th2 (Padigel et al., 2006), e evidências sugerem a habilidade da apresentação de antígenos também na reação inflamatória alérgica (Akuthota et al., 2010). Segundo, os eosinófilos podem facilitar a resposta imune inata através da ativação de neutrófilos, basófilos e mastócitos (Blanchard et al., 2009; Akuthota et al., 2010). Terceiro, os eosinófilos podem moldar a resposta imune adaptativa induzindo a maturação de CDs e modulando a resposta das células Th1 e Th2 (Rodríguez; Wilson, 2014).

As linhas iniciais de defesa contra patógenos invasores são barreiras físicas e químicas. Exemplos de barreiras químicas incluem a pele e as membranas mucosas, ambas revestidas com mastócitos. Durante muito tempo, os mastócitos foram apenas implicados na mediação de respostas alérgicas, mas evidências emergentes indicam que desempenham papéis iniciais fundamentais nas respostas imunes inatas e adaptativas. Primeiro, os mastócitos podem produzir NO e uma grande variedade de moléculas pró-inflamatórias, muitas das quais armazenadas em grânulos citoplasmáticos e liberadas em poucos minutos de ativação (Bidri et al., 2001; Gali et al., 2005). Em segundo lugar, os mastócitos podem reconhecer e fagocitar micróbios através de CD48, receptores do complemento e receptores “toll-like” (Bidri et al., 1997; Awasthi et al., 2004). Evidências crescentes demonstram que a exposição de mastócitos a produtos bacterianos, virais e de parasitos induz a secreção de mediadores pré-formados e/ou a síntese de citocinas e quimiocinas (Rodríguez; Wilson, 2014).

Os sintomas da infecção são resultados de uma resposta inflamatória local, e um estudo sugere que os mastócitos são, em parte, responsáveis por mediar a lesão inflamatória local induzida por *L. major* (Wershil et al., 1994). Há evidências que os mastócitos favorecem uma resposta do tipo Th2 através da liberação de histamina, IL-4 e IL-13 (de Oliveira et al., 2005). Romao e colaboradores (2009) observaram que a degranulação dos mastócitos antes da infecção por *L. major* reduziu não somente sua habilidade em exacerbar a inflamação pela liberação de histamina, mas também sua habilidade em promover uma resposta adaptativa do tipo Th2, o que pode antagonizar o desenvolvimento de uma resposta Th1 curativa.

A complexidade nas funções dos mastócitos durante infecção por *Leishmania* vai além das diferenças de cada hospedeiro. O número relativo de mastócitos pode variar de acordo com as espécies de *Leishmania*. Um estudo mostrou que as lesões

de *L. braziliensis* apresentavam o maior número de mastócitos, enquanto as lesões causadas por *L. amazonensis* mostravam o contrário (Tuon et al., 2008). Os autores especulam que as variações nas quimiocinas e/ou citocinas induzidas pelos parasitos, assim como a genética dos indivíduos, também podem resultar nas diferenças observadas nos infiltrados de mastócitos. Ambos os estudos em camundongos e humanos indicam que os mastócitos desempenham um papel na resposta inflamatória durante a LC, mas a extensão da infiltração e o fenótipo funcional dos mastócitos variam de acordo com as espécies de *Leishmania* e a origem do hospedeiro (Rodríguez; Wilson, 2014).

Entretanto, mais recentemente, Paul e colaboradores (2016) consideram improvável o envolvimento de mastócitos no desenvolvimento clínico da LC. Segundo os autores, a LC murina se desenvolve independente dos mastócitos e que os mesmos não influenciam a função imunomoduladora na diferenciação das células T. Os autores concluíram também que, os mastócitos não são fontes importantes de IL-4 e, portanto, não devem influenciar na progressão da doença.

As células NK têm sido descritas como tendo importante papel nas infecções por *Leishmania*. Células NK migram para a derme de camundongos infectados com *L. major* 24 horas após a infecção (Laskay et al., 1995). Foi demonstrado também que a migração de células NK em camundongos resistentes infectados com *L. major* está associada com a expressão da quimiocina CXCL10 (Vester et al., 1999). In vivo, células NK são as principais fontes de IFN- $\gamma$  junto com linfócitos Th1 e uma atividade precoce destas células pode influenciar a cinética da resposta Th1, como foi relatado por Martin-Fontecha e colaboradores (2004). Esses autores observaram que células NK também são capazes de migrar para linfonodos estimulados, mediadas pelo receptor CXCR3 (receptor para CXCL10 e CXCL9) e que nestes sítios estas células são a fonte inicial de IFN- $\gamma$ , citocina necessária para a polarização de Th1. Além disso, CXCL10 também recruta células Th1 CXCR3+ que são capazes de secretar maior quantidade de IFN- $\gamma$  no sítio inflamatório (Ritter; Korner, 2002).

As APCs (células apresentadoras de antígenos), como os macrófagos, CDs, células de Langerhans e células de Kupffer, capturam, internalizam e processam o patógeno, selecionando o antígeno a ser apresentado à molécula do MHC de classe II para que seja reconhecido pelo linfócito T auxiliar (Abbas et al., 2013). As CDs chegam ao sítio de inoculação sob a influência de quimiocinas ou citocinas liberadas por queratinócitos, neutrófilos, mastócitos e macrófagos (Moll, 2000). As CDs

pertencem a um grupo heterogêneo de células migratórias derivadas da medula óssea, especializadas em reconhecer, englobar, transportar e processar antígenos. Estas células desempenham um papel chave na resposta imunológica adaptativa porque são as primeiras e únicas células capazes de apresentar antígenos aos linfócitos T virgens, como também são responsáveis em ativar as células NK (Moreno, 2007), fazendo a ponte entre a resposta inata e a adaptativa. As CDs são potentes células apresentadoras de antígenos (APCs) e podem induzir uma eficiente ativação das células T (Guermonprez et al., 2002). Alguns estudos sugerem que a regulação negativa da expressão do receptor de quimiocina CCR7 pela *L. donovani* impede a migração das CDs, sendo esta uma estratégia do parasito em evadir-se do sistema imunológico, contribuindo na progressão da doença (Ato et al., 2002).

Macrófagos e CDs secretam IL-12, citocina que atua nos linfócitos T e nas células NK, estimulando a produção de IFN- $\gamma$  e promovendo a diferenciação de linfócitos T. A citocina IL-12 desempenha um papel decisivo no direcionamento da resposta Th1, a qual é indispensável à eliminação de patógenos intracelulares. Portanto, a apresentação de antígenos pelas APCs aos linfócitos T constitui a interface entre a resposta imunológica inata e a resposta imunológica adquirida (Nacy et al., 1991; Bohem et al., 1997; Yoshida et al., 2001).

Células T efetoras são capazes de produzirem distintas citocinas que podem migrar para o local da infecção e regular a eficiência da resposta imunológica contra *Leishmania* no local da infecção e nos linfonodos de drenagem. Essas respostas são bem conduzidas pelas células Th1 CD4<sup>+</sup> T, produzindo IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em conjunto com citocinas regulatórias, como IL-10. Assim, a natureza da resposta celular CD4<sup>+</sup> T durante a fase ativa de LC e durante a resolução da doença é associada com a produção de citocinas inflamatórias, como TNF e IFN- $\gamma$ , mesmo na presença de IL-10, uma citocina regulatória que age inibindo a produção de TNF (Gollob et al., 2014).

Em pacientes com LC por *L. braziliensis*, foi detectada a produção de IFN- $\gamma$  e IL-10 nas lesões de pele (Costa et al., 2015). É possível que as células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> TGF- $\beta$ <sup>+</sup> estejam envolvidas na modulação da resposta imunológica efetora nas lesões de pele por *Leishmania* em humanos. Esses resultados sugerem que IL-10 e TGF- $\beta$  são produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> no local da infecção por *L. braziliensis* (Campanelli et al., 2006). No caso da infecção por *L. panamensis*, tanto a doença em humanos quanto no modelo animal apresenta uma produção mista de citocinas (Castilho et al., 2010). Juntamente com

IFN- $\gamma$ , existe uma produção concomitante de IL-10, IL-13, IL-17 e TNF- $\alpha$ . Esta resposta imune mista pode ser parcialmente responsável pela patologia da doença (Ribeiro-Romão et al., 2016).

Existem muitas complexidades na imunidade da leishmaniose. É bem documentado que a resistência à leishmaniose é relacionada ao desenvolvimento da resposta Th1 e produção de citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e/ou IL-2 que leva a ativação de macrófagos e morte dos parasitos (von Stebut et al., 2003; Sacks et al., 2002). Ao contrário, a susceptibilidade à infecção é ligada ao desenvolvimento de resposta Th2 e produção de citocinas Th2 como IL-4, IL-5, e/ou IL-13, levando à replicação e persistência do parasito (Sacks et al., 2002; Kropf et al., 2005).

No entanto, ainda persistem vários paradoxos sobre o papel da resposta imunológica na imunoproteção e imunopatologia da LC. Por exemplo, embora a resposta Th1 e a produção de citocinas pró-inflamatórias tenham papéis fundamentais para a imunoproteção contra LC (Sacks et al., 2002; Nylén; Eidsmo, 2012), a sua produção excessiva pode conduzir concomitantemente à imunopatologia grave na doença (Martin; Leibovich, 2005; Pasparakis et al., 2014). Ao contrário, o desenvolvimento de Th2 está associado à persistência dos parasitos no local da infecção (Nylén; Eidsmo, 2012), mas a produção das citocinas anti-inflamatórias em níveis mais baixos também atenua as reações inflamatórias e acelera o processo de cura (Gause et al., 2013; Pasparakis et al., 2014). Além disso, outras células T, como células Th17, que produzem citocinas inflamatórias (IL-22, IL-17 e/ou IFN- $\gamma$ ) (Seder et al., 2008), e T reguladoras (Treg), que produzem citocinas reguladoras (IL-10 e/ou TGF- $\beta$ ) contribuem para progressão ou melhoria da doença, dependendo da espécie de *Leishmania* e também da característica genética do hospedeiro.

Duas importantes citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , estão envolvidas na imunoproteção e imunopatologia da LC. Essas citocinas têm papéis essenciais no controle de agentes patogênicos intracelulares e de células tumorais, mas o aumento da produção dessas citocinas pode levar ao surgimento de doenças autoimunes (Schoenborn; Wilson, 2007). IFN- $\gamma$  é produzido principalmente pelas células Th1 CD4+, linfócitos T CD8+ citotóxicos, células NK. Esta citocina estimula a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados e inibe o crescimento do parasito intracelular (Sharma; Singh, 2009). Além disso, IFN- $\gamma$  promove a diferenciação de

células T CD4 + para Th1 e inibe o desenvolvimento de células Th2 e Th17 (Amatoama et al., 1999).

TNF é principalmente produzido por macrófagos que desempenham um papel crucial na eliminação de *Leishmania* ativando macrófagos com consequente síntese de NO (Liew et al., 1997). Camundongos C57BL/6 deficientes em TNF e infectados com *L. major* apresentaram infecção visceral fatal, apesar da produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 por macrófagos (Wilhelm et al., 2001). Uma correlação positiva entre o tamanho da lesão com níveis de IFN- $\gamma$  e TNF foi observada em pacientes com LC infectados com *L. braziliensis*. Pacientes com maiores lesões apresentaram níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  e TNF apesar da presença de IL-10 no local da infecção (Pompeu et al., 2001; Bacellar et al., 2002; Antoneli et al., 2005).

Os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF foram menores em indivíduos assintomáticos infectados por *L. braziliensis* do que em pacientes com sinais típicos de LC (Ivonise, et al., 2002). Pacientes com sinais típicos da doença apresentaram níveis excessivos de IFN- $\gamma$  e TNF com reações inflamatórias e úlceras de pele, enquanto em pacientes subclínicos, a produção moderada de IFN- $\gamma$  e TNF foi associada ao controle do crescimento do parasito sem destruição tecidual (Ivonise et al., 2002). Embora a produção de IFN- $\gamma$  e TNF parece ser necessária para o controle de infecção por *Leishmania*, aumento dos níveis dessas citocinas pode levar à destruição de tecidos e ao desenvolvimento progressivo das lesões, como já mencionado acima.

Os dois principais mecanismos responsáveis pelo controle de *Leishmania* são a produção de ROS, gerada pela explosão respiratória que ocorre durante a fagocitose, e a produção de NO, gerada pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) após a ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  (Green et al., 1990; Bodgan et al., 1990). Embora *Leishmania* seja sensível a ROS, a explosão respiratória que ocorre nos macrófagos não ativados após a infecção é insuficiente para matar os parasitos (Nacy et al., 1981), uma vez que os parasitos podem inibir a geração de ROS nos fagolisossomos (Matheoud et al., 2013). No entanto, IFN- $\gamma$  aumenta a explosão respiratória em macrófagos, levando a uma maior eficiência na eliminação dos parasitos (Novais et al., 2014). Ao contrário, monócitos humanos e de camundongos podem mediar a morte do parasito produzindo altos níveis de ROS sem ativação prévia (Goncalves et al., 2011; Novais et al., 2014). Como NO pode atravessar as membranas celulares, ele provoca tanto a morte dos parasitos intracelulares quanto das células infectadas, produtoras de NO (Olekhovitch et al., 2014).

No entanto, o papel do NO em seres humanos é menos claro. Apesar da expressão de iNOS ter sido detectada em lesões de pacientes com LC (Qadoumi et al., 2002), não foi observada mudança na expressão do gene humano que codifica iNOS (*NOS2*) em lesões de pacientes com LC comparada com a pele normal (Novais et al., 2014). Assim, embora NO seja o principal mediador para matar *Leishmania* em camundongos, os reais papéis de ROS e NO no controle da *Leishmania* em humanos não são ainda muito claros.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua tanto como pró e anti-inflamatória, é produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, CDs e células T (Scheller et al., 2011). Além disso, essa citocina atua como fator de crescimento para a célula B (Titus et al., 2001) e junto com TGF- $\alpha$  estimula o desenvolvimento da resposta Th17 e produz IL-17 e IL-10 (McGeachy et al., 2007). Experiências em animais demonstraram que IL-6 promove resposta Th2 em LC (Moskowitz et al., 1997; Saha et al., 1999). Titus e colaboradores (2001) relataram que a produção de ambas as citocinas Th1 e Th2 diminuíram nos camundongos BALB/c IL-6-/- infectados por *L. major*, mas não houve diferença significativa entre espessura da lesão e carga parasitária, quando comparados com os animais tipo selvagem.

Embora IL-10 seja conhecida por ser uma potente citocina imunorreguladora, ela é produzida por diferentes células da imunidade inata (CDs, macrófagos, mastócitos, células NK, eosinófilos, neutrófilos) e células da imunidade adaptativa (Th1, Th2 e Th17, células Treg, células T CD8 + e células B) (Belkaid et al., 2002; O'Garra; Vieira 2007; Saraiva; O'Garra, 2010). Além disso, IL-10 suprime ativação de macrófagos e maturação de CDs. A produção de IL-10 pelas células Th1 limitam as respostas imunes contra infecções parasitárias intracelulares, como *L. major* e *Toxoplasma gondii* (O'Garra; Vieira, 2007). Esta citocina está associada à susceptibilidade à leishmaniose e à persistência do parasito no local de infecção (Belkaid et al., 2001).

Apesar dos efeitos supressivos da IL-10, que levam à progressão da doença e à persistência do parasito na LC, esta citocina é um imunoregulador vital que modula a imunopatologia e os danos nos tecidos causados pela excessiva resposta imune Th1 e de suas citocinas inflamatórias, especialmente IFN- $\gamma$  (Gomes-Silva et al., 2007). Portanto, IL-10 atua como uma espada de dois gumes que suprime a resposta imune celular e a produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) que levam a persistência do parasito no local da infecção, e por outro lado, IL-10 inibe a imunopatologia exacerbada e danos ao tecido através do aumento da produção de

citocinas inflamatórias, desempenhando um papel central na remodelação do tecido durante a cicatrização das lesões (Castellano et al., 2015).

A citocina IL-4 desempenha um papel importante na diferenciação de células Th0 em células Th2 (Kopf et al., 1993). IL-4 é produzida principalmente por Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos ativados (Zamorano et al., 2003). A produção de IL-4 conduz a regulação positiva de arginase e a biossíntese de poliaminas que inibem a atividade leishmanicida de macrófagos e prolonga a sobrevivência dos parasitos (Kropf et al., 2005). IL-4 limita a geração de citocinas Th1 através da inibição da produção IL-12 (Szabo et al., 1997). Além disso, IL-4 diminui a produção de quimiocinas que recrutam células de tipo Th1 no local da infecção (Lazarski et al., 2013).

Estudos mostraram um papel importante da IL-4 na susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Na infecção por *L. major* em BALB/c, a neutralização de IL-4 inibiu o desenvolvimento da resposta Th2 e aumentou quatro vezes o nível de IFN- $\gamma$  nos linfonodos, levando a cura completa em 85% dos animais infectados e diminuição da infecção em 100% dos animais (Sadick et al., 1990). Heinzl e colaboradores (1989) relataram que IL-4 foi expresso apenas em camundongos BALB/c infectados com *L. major*, mas não em camundongos C57BL/6. Outro estudo mostrou que o bloqueio do gene IL-4 em camundongos BALB/c infectados por *L. major* não promoveu a polarização da resposta Th1 e não teve efeito na cicatrização da lesão e na eliminação do parasito (Noben-Trauth et al., 1996).

Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , estimulam os macrófagos tipicamente ativados (M1) para produzir iNOS e a consequente liberação de NO e morte dos parasitos, enquanto as citocinas Th2 tais como IL-4 e IL-13 estimulam os macrófagos alternativamente ativados (M2) a induzirem a atividade de arginase que resulta em sobrevivência do parasito e inibição da inflamação. O equilíbrio entre M1 e M2 regula as respostas inflamatórias e leva à homeostase no sistema de imunidade e na cicatrização de feridas (Gordon; Martinez, 2010).

TGF- $\beta$  é um fator de crescimento pleiotrópico com significantes propriedades anti-inflamatórias e imunossupressoras, desempenhando papel central na homeostase do sistema imunológico (Hansen et al., 2000). É produzido por diferentes células, incluindo células T CD4+, Tregs, monócitos, neutrófilos e DCs (Grotendorst et al., 1989; Gorelik; Flavell, 2002; Tran et al., 2012; Speck et al., 2014). TGF- $\beta$  suprime tanto a resposta imunológica adaptativa quanto a inata, inibindo a função de células inflamatórias e promovendo a função das células Treg

(Laouar et al., 2005; Lucas et al., 2000). TGF- $\beta$  suprime também a diferenciação de células T em Th1 e Th2 (Sad et al., 1994; Gorelik et al., 2000), assim como a geração de células T ativadas pela inibição da produção de IL-2 e IL-1. Essa citocina aumenta a suscetibilidade à infecção por *Leishmania* pela supressão de NO, TNF e produção de IFN- $\gamma$  (Kedzierski; Evans, 2014), como também exacerba a infecção por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* via estimulação da produção de citocinas Th2 tais como IL-10. Li e colaboradores (1999) mostraram que na ausência de TGF- $\beta$ , mesmo com a resposta tipo Th2 dominante, níveis relativamente baixos de IFN- $\gamma$  são suficientes para ativar macrófagos e matar parasitos intralésionais. Portanto, TGF- $\beta$  é uma citocina imunorreguladora crucial que limita as reações inflamatórias através de uma regulação negativa de citocinas inflamatórias na leishmaniose.

#### **1.4 Aspectos histopatológicos e clínico-evolutivos de lesões no hamster como modelo de LTA**

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

Diferentes padrões histopatológicos podem ser encontrados nas lesões de hamsters dependendo também do tempo de evolução da doença. A fase inicial da infecção é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, constituído por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, e a fase crônica da doença é caracterizada pela reação granulomatosa que se estabelece a partir de 15 dias de infecção (Kahl et al., 1991).

As alterações histopatológicas também são influenciadas pelo tamanho do inóculo de *Leishmania*. Inóculos menores ( $10^4$ ) mostram menor comprometimento inflamatório local com reação granulomatosa mais localizada. Ao contrário, em inóculos com maior número de parasitos ( $10^5$  e  $10^6$ ), observa-se reação granulomatosa maior e com presença de necrose (Ribeiro-Romão et al., 2014).

Além da espécie utilizada na infecção, variações intraespecíficas na infectividade do isolado de parasito utilizado devem ser levadas em consideração para definir o tamanho do inóculo a ser utilizado na infecção, uma vez que a espécie *L. braziliensis* está associada a um baixo crescimento e desenvolvimento das formas infectantes in vitro, necessitando de um inóculo elevado para garantir a infecção em camundongos (Oliveira et al., 2005). Em estudo onde hamsters foram infectados com diferentes concentrações de parasitos, inóculos muito baixos ( $10^2$  e  $10^1$ ) de *L. braziliensis* ainda foram capazes de levar ao desenvolvimento de lesões (Wilson et al., 1979).

Outros estudos que avaliaram diferentes isolados de *L. braziliensis* obtidos de lesões cutâneas e de lesões mucosas de pacientes, mostraram diferenças nos períodos de pré-patência das lesões no modelo hamster, tanto entre isolados obtidos somente de lesões cutâneas (Sinagra et al., 2007), quanto daqueles oriundos de lesões cutâneas e mucosas (Kahl et al., 1991), sugerindo a existência de variação na virulência entre isolados de uma mesma espécie.

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

A via de inoculação é também um fator muito importante envolvido no surgimento e evolução da infecção, quando hamsters foram inoculados com promastigotas de *L. braziliensis* por diferentes vias (Wilson et al., 1979). A via intradérmica foi mais eficiente que a via subcutânea quanto à infecção e ao início das lesões. Quando animais foram infectados com  $10^2$  parasitos por via subcutânea, levaram praticamente o mesmo tempo para desenvolverem lesão quando comparados com animais infectados com  $10^6$ , por via subcutânea. Assim, a via

intradérmica usada no estudo mostrou que é necessário um inóculo muito menor para o desenvolvimento da lesão (Wilson et al., 1979).

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

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

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

## 1.5 Modelo da bolsa de ar subcutânea

O modelo da bolsa de ar foi desenvolvido inicialmente por Selye (1953a), para estudar os mecanismos da hidrocortisona na resistência dos tecidos a agressões, utilizando o óleo de cróton como estímulo. Uma grande vantagem que este modelo de inflamação *in vivo* oferece é a criação de um ambiente “limpo”, delimitado por uma estrutura que recobre o limite interno, semelhante a uma membrana sinovial. A formação desta cavidade permite a coleta e a análise fenotípica das células que migram em resposta a uma pequena quantidade de estímulo. Além do mais é uma cavidade semi-independente de tamanho e estrutura reproduzíveis (Selye, 1953b). Ao contrário das cavidades naturais do corpo, como a cavidade peritoneal, a injeção de agentes irritantes na cavidade da bolsa não afeta diretamente outros órgãos do corpo, por exemplo, fígado, rim e baço. O grau de inflamação pode ser avaliado pelo peso e espessura da parede da bolsa, pelo volume de exsudato, e a composição química e celular dos vários componentes da bolsa também pode ser estudada (Selye 1953b; Robert; Nezamis, 1957).

A técnica da bolsa de granuloma de Selye (1953b) permite o estudo tanto da reação inicial aguda do tecido local quanto do estágio posterior de reparo. Os dados quantitativos podem ser obtidos em termos do peso do tecido de granuloma, a espessura da cápsula inflamatória e o volume do exsudato inflamatório. E pode-se distinguir com precisão entre tecido "antigo" e recém-formado adjacente. Até no caso de animais desnutridos, cujas bolsas eram muitas vezes malformadas, a separação do tecido reativo era possível. O exame das características do exsudado acumulado e do tecido de granuloma formado, obtido a partir de ratos sacrificados durante vários períodos experimentais, exibiu uma uniformidade considerável. Além disso, o isolamento de bactérias da bolsa, no caso de infecção acidental, sugere que pode servir como um tipo de sistema de cultura de tecidos *in vivo* para o cultivo de vírus e outros microorganismos, e, como tal, poderia ser usado para estudar o efeito da desnutrição em várias reações durante a infecção: Crescimento de microorganismos inoculados experimentalmente, resposta específica e inespecífica de anticorpos, reações histoquímicas e metabólicas (Taylor et al., 1967).

As bolsas de ar são tecnicamente fáceis de realizar e a análise de fluidos é simples e pode ser repetida com trauma mínimo. O tecido da bolsa é uniforme e pode ser cortado perpendicularmente à superfície de forma consistente. As características do tecido são uma superfície interna sem membrana basal e um

revestimento variável de células mononucleares misturadas. Nas bolsas de ar com mais de 5 dias de idade, está presente uma camada superficial predominantemente mononuclear de células. Antes disso, a superfície é revestida em células polimorfonucleares (Sedgwick et al., 1985),

A formação da membrana sinovial é resultante do rompimento mecânico do tecido conectivo subcutâneo devido à inoculação de ar. Após a formação inicial da bolsa de ar, já é possível observar a formação desta membrana, o que permite o estudo de estímulos com atividade inflamatória (Edwards et al., 1981; Sedgwick et al., 1983). Vários trabalhos têm utilizado este modelo para estudos que avaliam o efeito de estímulos na inflamação aguda e crônica até a formação de tecido de granulação. A estimulação da bolsa de ar com lipídio A permitiu a avaliação do papel do CD44 e IL-1a na resposta inflamatória induzida por este estímulo (Matsukura et al., 1998). Em um trabalho que comparava o efeito de três corticóides in vivo, foi possível detectar diferenças na velocidade e intensidade anti-inflamatória dos fármacos testados (Rull et al., 2003).

Alguns trabalhos têm demonstrado a utilidade do modelo da bolsa de ar também na avaliação da resposta inflamatória induzida por *Leishmania*. A utilização deste modelo em camundongos possibilitou a detecção de diferenças na resposta inflamatória inicial e produção de citocinas e quimiocinas induzidas entre *L. major* e *L. donovani* ou entre diferentes cepas de *L. braziliensis* (Matte; Ollivier, 2002; Teixeira et al., 2005), assim também como a resposta inflamatória induzida por *L. infantum* associada com saliva de *Lutzomyia longipalpis* (Vasconcelos et al., 2014). Em outro trabalho, utilizando o modelo da bolsa de ar, também foi possível observar o efeito modulatório da *Leishmania* na indução da proteína tirosina fosfatase (SHP-1) do hospedeiro (Forget et al., 2005).

## 1.6 Justificativa

As leishmanioses ainda são um grave problema de saúde pública, e o cenário atual não apresenta perspectivas robustas para um novo tratamento menos tóxico e mais eficaz ou vacina. O estudo das leishmanioses em modelo experimental é de extrema importância para o entendimento da dinâmica do processo patológico, bem como para o teste de novos fármacos e potenciais candidatos vacinais. A principal espécie responsável pela leishmaniose tegumentar nas Américas e no Brasil é a *L.*

(V.) *braziliensis*, e sua importância reside não só na sua ampla distribuição geográfica como também na possibilidade de desenvolver a forma mucosa, mais grave e de tratamento mais difícil. Apesar da grande importância dessa espécie na leishmaniose tegumentar, poucos estudos são realizados em modelo experimental, principalmente devido à resistência à infecção apresentada pela maioria das linhagens de camundongos. O modelo hamster se destaca pela alta susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia*, apresentando muitos dos aspectos imunopatológicos envolvidos na doença humana. Porém, é subutilizado pela falta de reagentes imunológicos comerciais, necessários para uma investigação mais detalhada dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença.

Levando em consideração que o tamanho da lesão é um parâmetro essencial na avaliação da eficácia de um candidato vacinal para a leishmaniose cutânea, foi observado em trabalhos anteriores que o número de promastigotas de *Leishmania* influenciou no tempo de manifestação clínica da doença, no aspecto clínico, no curso evolutivo e no tamanho final das lesões e sugeriu que na fase inicial da infecção, a diferença no número de parasitos inoculados poderá ditar o início do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa, com consequente manifestação clínica da doença e a magnitude dessa resposta, determinando então a fase crônica da infecção. A identificação dessa dinâmica do processo inflamatório é de extrema importância para esclarecer melhor as diferenças na evolução e gravidade das lesões induzidas por diferentes cargas infectivas. Neste trabalho foi analisado o perfil imunocelular inflamatório induzido com diferentes inóculos no modelo de bolsa de ar subcutânea em hamster e a sua relação com a evolução e gravidade da lesão na leishmaniose cutânea.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar o perfil imunocelular inflamatório induzido por diferentes cargas infectivas de *Leishmania braziliensis*, e a sua relação com a evolução e gravidade da infecção em modelo hamster.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a influência de diferentes inóculos na quantidade e no tipo de leucócito que é recrutado para o sítio de inoculação na bolsa de ar subcutânea;
2. Investigar se a quantidade e o tipo de leucócitos recrutados para o sítio de inoculação na bolsa de ar subcutânea e no seu tecido são influenciados por infecção prévia na pata, com diferentes concentrações dos inóculos;
3. Avaliar a evolução da espessura da lesão e a carga parasitária das patas e linfonodos de animais submetidos à infecção com diferentes cargas infectivas;
4. Determinar o perfil de citocinas induzido na pata e no linfonodo regional, após infecção prévia com diferentes concentrações dos inóculos, e avaliar sua relação com o perfil celular recrutado na bolsa de ar subcutânea;
5. Analisar o padrão histopatológico nas lesões de patas infectadas com diferentes inóculos, relacionando com a evolução e a gravidade da doença;
6. Avaliar as alterações histopatológicas do tecido da bolsa de ar de animais previamente infectados na pata e determinar e se isto é influenciado pelos diferentes concentrações dos inóculos.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Animais**

Foram utilizados hamsters adultos (n=90) de ambos os sexos, 6 a 10 semanas de idade, pesando em torno de 80 a 90g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará (Nº 92/2014).

#### **3.1.2 Parasito**

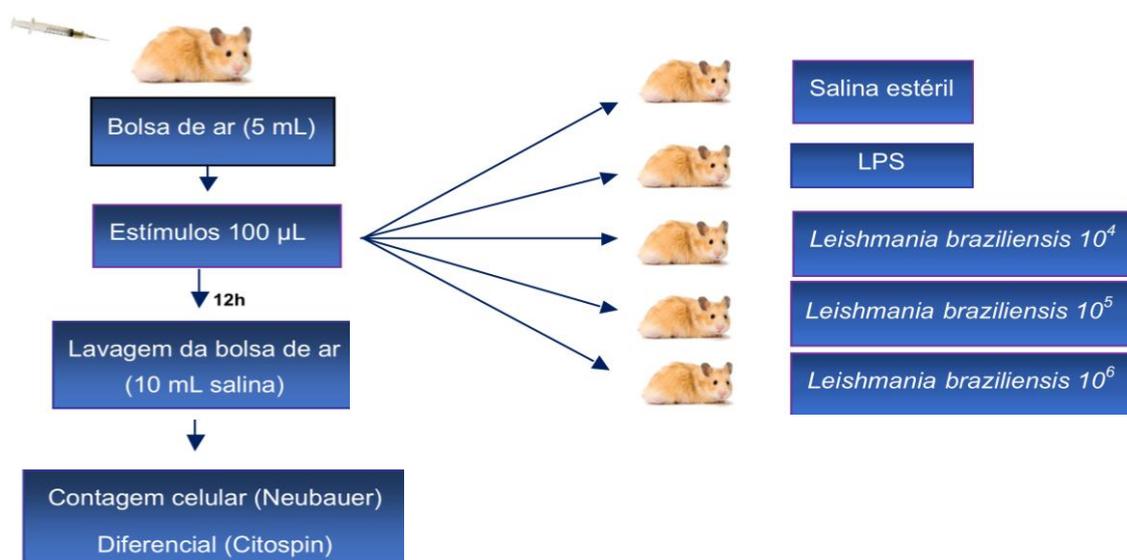
A cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) foi utilizada nos experimentos. A virulência dos parasitos foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Os parasitos foram cultivados a 25°C em meio N.N.N., contendo Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado (SBF), 2% de urina humana estéril, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Para as infecções, foram utilizadas promastigotas em fase estacionária com até 5 passagens de cultivo.

### **3.2 Metodologia para o Objetivo 1**

#### **3.2.1 Bolsa de ar subcutânea**

As bolsas de ar subcutâneas foram preparadas segundo a técnica descrita por Muller e colaboradores (2001), com algumas modificações (Teixeira et al., 2005). Resumidamente, após a anestesia dos animais com quetamina e xilazina, os estímulos, num volume total de 100 µL, foram injetados imediatamente após a injeção de 5 mL de ar estéril, aspirado no fluxo laminar, no dorso dos animais. Os

estímulos utilizados continham salina estéril; lipopolissacarídeo (LPS, Sigma, St. Louis, MO, EUA) 20µg/mL (Teixeira et al., 2005) ou promastigotas de *L. braziliensis* na fase estacionária, nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ , diluídas em salina estéril. Após 12 horas, 4 a 5 animais de cada grupo foram letalmente anestesiados (halotano) e as bolsas foram lavadas com 10 mL de salina estéril a fim de coletar os leucócitos do exsudato. O exsudato recuperado foi centrifugado a 100g por 10 min a 4°C, e o sedimento celular ressuspensionado em uma solução de PBS + BSA 10% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e utilizado para a contagem total e diferencial das células. As células totais foram contadas diretamente em câmara de Neubauer, após coloração com solução de Turk e a contagem diferencial foi feita microscopicamente em preparações coradas com Panótico® (RenyLab, MG, Brasil), após passar por citocentrífuga 500 rpm, 5 min (Cytospin, Shandon, St. Paul, MN, EUA).



**Figura 2** – Fluxograma esquemático do desenho experimental 1. Indução de resposta inflamatória no modelo de bolsa de ar em hamsters com diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Fonte: Elaboração própria.

### 3.3 Metodologia para os Objetivos 2, 3 e 4

#### 3.3.1 Infecção e acompanhamento da espessura da lesão de pata

Os animais (60) foram divididos em 3 grupos (20 animais por grupo) e inoculados na pata posterior direita com promastigotas de *L. braziliensis*, via intradérmica, com diferentes concentrações dos parasitos ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) em 20 µL

salina (Tabela 1). A espessura das lesões foi medida semanalmente com paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) por 45 dias, sendo a lesão representada pela diferença de tamanho entre a pata infectada e a contralateral não infectada.

### 3.3.2 Formação da bolsa de ar subcutânea

Após 15 e 45 dias da infecção prévia na pata com os inóculos  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* (Tabela 1), 4 a 6 animais de cada grupo foram submetidos ao procedimento para formação da bolsa de ar subcutânea, como descrito na metodologia do Objetivo 1. Após 12 horas da inoculação, tempo onde ocorre o pico máximo de recrutamento (Vasconcelos et al., 2014), os animais (4 animais do estímulo com salina e 6 animais (estímulo com *Leishmania*) foram letalmente anestesiados (halotano) e as bolsas foram lavadas com 10 mL de salina estéril a fim de coletar os leucócitos do exsudato. As células totais foram contadas diretamente em câmara de Neubauer, após coloração com solução de Turk e a contagem diferencial foi feita microscopicamente em preparações coradas com Panótico®, após passar por citocentrífuga (Cytospin: 500 rpm, 5 min). Os experimentos foram realizados em duplicata.

**Tabela 1** – Grupos de animais utilizados no segundo experimento

<b>Infecção na pata posterior direita (inóculos utilizados)</b>	<b>Bolsa de ar com salina estéril</b>	<b>Bolsa de ar com <i>L. braziliensis</i> (inóculo fixo de <math>10^6</math>)</b>
$10^4$	Grupo 1 (n =8)	Grupo 2 (n = 12)
$10^5$	Grupo 3 (n = 8)	Grupo 4 (n = 12)
$10^6$	Grupo 5 (n = 8)	Grupo 6 (n = 12)

Fonte: Elaboração própria.

### 3.3.3 Extração de RNA e DNA

Os fragmentos de tecido obtidos do local da infecção e dos linfonodos de drenagem foram conservados em 1 ml de Trizol® (Life Technologies, California, EUA) e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração dos ácidos nucleicos. Para obtenção do RNA, as amostras foram lisadas com auxílio do homogeneizador

de tecidos Ultra-Turrax Dispenser (IKA, Wilmington, EUA). Os lisados foram tratados com 10µL de proteinase K (Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA) a 56°C por 30 minutos. Após a adição de 200µL de clorofórmio, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas, para a separação das fases orgânica e aquosa. O RNA total foi extraído a partir da fase aquosa, utilizando o RNeasy mini Kit (Qiagen, Austin, Texas, EUA), conforme as especificações do fabricante. Após remoção da fase aquosa, a precipitação sequencial com etanol extraiu o DNA a partir da fase orgânica, para quantificação da carga parasitária. O DNA foi precipitado em 0,3 ml de etanol a 100%. Após precipitação por centrifugação, o DNA foi lavado duas vezes em 1 ml de solução de citrato de sódio (0,1 M) em etanol a 10% (com intervalo de 30 minutos entre cada lavagem). Em seguida, o DNA foi lavado em 1,5 mL de etanol a 75%, e o pellet foi seco ao ar e dissolvido em 400 µL de solução de hidróxido de sódio (8 mM). O RNA e DNA foram armazenados a -80°C e -20°C, respectivamente, até a sua utilização. O RNA foi quantificado por espectrofotometria em Picodrop P200 (Astranet Systems, UK) e, posteriormente, tratado com DNase I (Promega Corporation, Madison WI, EUA). A transcrição reversa foi realizada a partir de 2,0 µg de RNA tratado, utilizando o *High Capacity Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme especificações do fabricante. O cDNA resultante foi dosado por fluorometria, no equipamento Quibit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Eugene, Oregon, USA), utilizando o kit *single strand DNA* (ssDNA).

### **3.3.4 Expressão gênica**

A quantificação da expressão gênica por RT-qPCR foi previamente padronizada para sequências de citocinas e moléculas descritas para a espécie *M. auratus* (hamster dourado) e consideradas importantes na imunopatogênese da LTA humana, listadas a seguir: IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF, IL-10, arginase, iNOS, IL-4, IL-6 e os genes de referência GAPDH e  $\gamma$ -Actina, através do método do Ct comparativo (DDCt), utilizando iniciadores já descritos na literatura (Ribeiro-Romão et al., 2016). (Tabela 2). Para a reação de PCR em Tempo Real, para cada alvo foram utilizados 20ng de cDNA em um volume de 2 µL, utilizando Power SYBR Green® PCR Master Mix (Life Technologies, EUA), em volume final de 10µL por poço, em duplicata. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços, no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), que integra a plataforma

PDTIS/FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), em colaboração com o Dr. Otacilio Moreira (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas - IOC/FIOCRUZ). As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C. A especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da presença de um único pico nas curvas de dissociação. Os iniciadores foram utilizados nas concentrações 100nM forward X 100nM reverse, exceto IL-4, que foi utilizado as concentrações de 200nM X 200nM. Os resultados foram expressos em  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*fold change*), e amostras provenientes de animais controles (não infectados) foram utilizadas como calibradores.

**Tabela 2** – Alvos e sequências de iniciadores para quantificação de citocinas, iNOS e arginase de hamster utilizados nos ensaios de RT-qPCR em Tempo Real

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

Fonte: Vieira (2017).

### 3.3.5 Determinação da carga parasitária

A mensuração da carga parasitária por qPCR foi realizada por quantificação absoluta, com base numa curva padrão produzida a partir da contaminação artificial com formas promastigotas de *L. braziliensis* de amostras de fragmento de pele de hamster (não infectado). Para isso, em 3 mg de pele obtida do dorso da pata posterior direita do hamster foram adicionadas  $10^5$  promastigotas de *L. braziliensis*, e

o DNA de ambos foi extraído, como descrito anteriormente. Diluições seriadas de 1:10 foram feitas com tampão Tris-EDTA (TE) para produzir os sete pontos da curva padrão variando de  $10^5$  a 0,5 equivalentes de parasitos, e de 3 a  $3 \times 10^{-6}$  mg equivalentes de pele, respectivamente.

Para a quantificação dos parasitos, foram utilizados iniciadores que amplificam a região conservada dos minicírculos de kDNA, a 50 nM e 50 nM (iniciadores direto e inverso, respectivamente) e iniciadores que amplificam o gene de referência GAPDH, a 100 nM e 100 nM. Antes do ensaio qPCR, amostras de DNA de hamster foram diluídas 1: 500 para melhor adaptarem-se a curva padrão do parasito. As reações foram realizadas no equipamento ViiATM 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que integra a plataforma PDTIS/FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A), em colaboração com o Dr. Otacilio Moreira (LABIMDOE - IOC/FIOCRUZ), com 5  $\mu$ L do Power SYBR Green® PCR Master Mix (Life Technologies, CA, EUA), em um volume final de 10  $\mu$ L por poço. As condições da PCR foram as seguintes: um ciclo de 10 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 64°C por um minuto. Após a amplificação, a curva de dissociação foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 segundos, seguidos de 15 segundos a 50°C e aquecimento contínuo de 0,1°C/s a 90°C. Os resultados foram obtidos a partir da razão kDNA/GAPDH e expressos em equivalentes de parasitos/mg de tecido.

### **3.3.6 Contagem de mastócitos**

Os cortes foram feitos a partir dos tecidos da bolsa de ar, fixados em formol tamponado a 10% e embebidos em parafina, e em seguida foram corados com azul de toluidina. Para as bolsas de ar induzidas pelos estímulos com salina, em animais previamente infectados na pata (com diferentes inóculos) com 15 dias e 45 dias pós-infecção, foram realizados quatro cortes de cada grupo. Para as bolsas de ar induzidas por  $10^6$  de *L. braziliensis* nos animais previamente infectados na pata (diferentes inóculos) com 15 e 45 dias pós-infecção, foram feitos seis cortes de cada grupo. A contagem foi feita em 10 campos aleatórios com aumento de 400x.

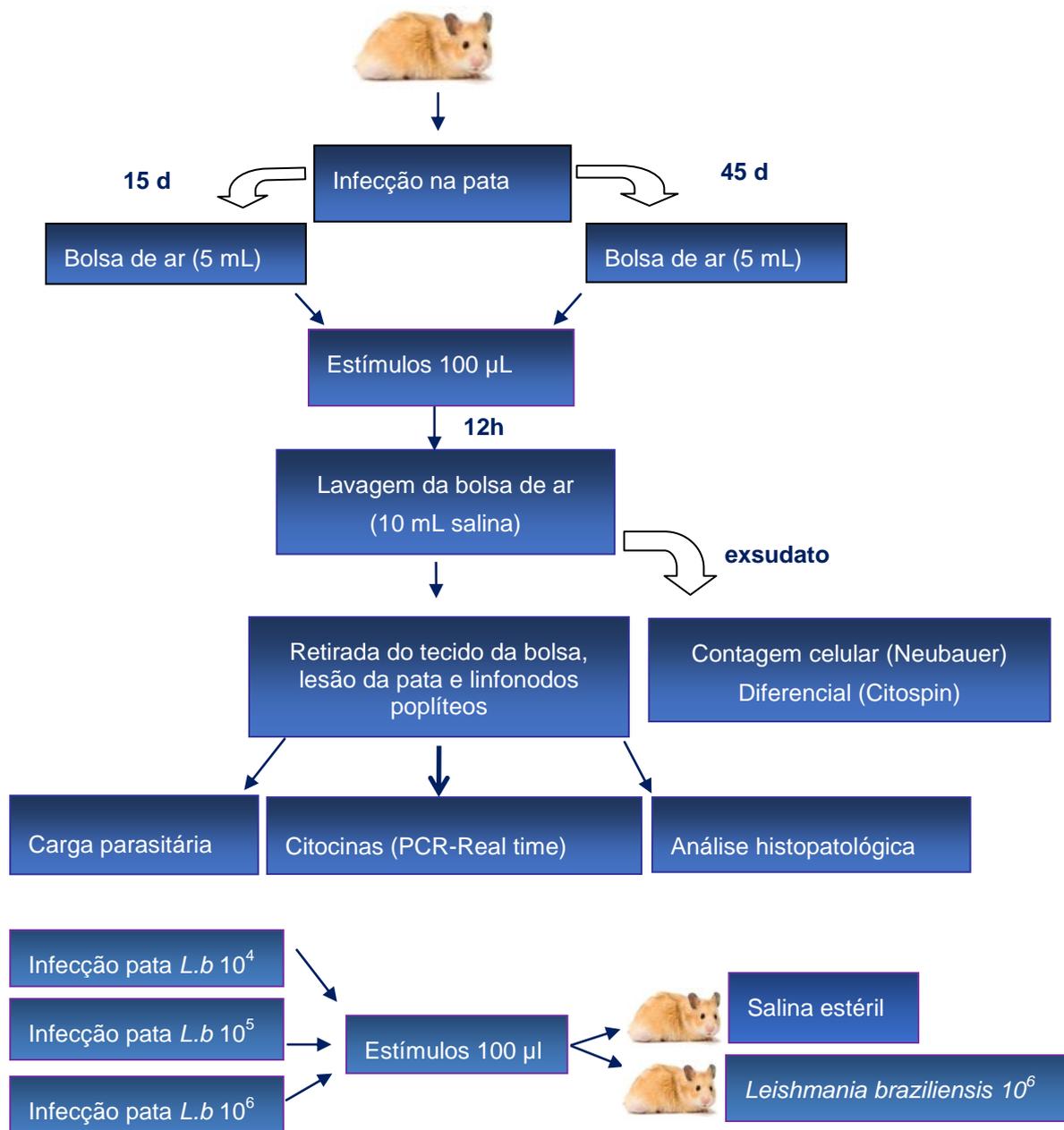
### **3.4 Metodologia para os Objetivos 5 e 6**

#### **3.4.1 Análise histopatológica**

Os cortes histológicos foram feitos a partir dos tecidos da lesão da pata e da bolsa de ar, fixados em formol tamponado a 10% e embebidos em parafina. As alterações histopatológicas foram observadas e analisadas levando-se em conta os seguintes parâmetros, de acordo com cada tecido: infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão, edema, necrose, fibrose, amastigotas, granulomas e células gigantes. A avaliação foi realizada por um patologista veterinário, segundo a presença ou ausência do evento através de escores: 0 (ausência), 1+ (presença de 1-25% = discreto), 2+ (presença de 25-50% = moderado) e 3+ (>50% = intenso), como já descrito (Vasconcelos et al., 2014). Tecidos de animais sadios foram utilizados como controle negativo.

#### **3.5 Análise estatística**

Os resultados foram apresentados como média aritmética e erro padrão da média (EPM), ou mediana e intervalo interquartil. Para verificar a significância estatística entre os grupos infectados e o controle foi aplicado o teste *t*-Student ou ANOVA (Kruskal-Wallis, post-test Dunns). A análise dos parâmetros histopatológicos foi feita levando-se em conta os escores de cada animal. Os testes foram realizados utilizando-se o Programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando  $P < 0,05$  ou  $P < 0,001$ , de acordo com o teste utilizado.



**Figura 3** – Fluxograma esquemático do desenho experimental para os objetivos 2 a 6

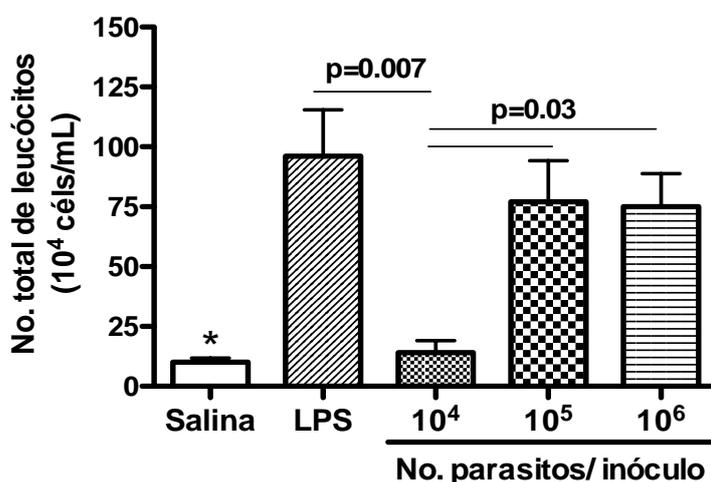
Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Indução de resposta inflamatória no modelo de bolsa de ar em hamster infectados na pata com diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Influência do inóculo na quantidade e tipo de leucócito recrutado na bolsa de ar subcutânea

Inicialmente foi avaliada a quantidade de células presentes no exsudato da bolsa de ar em resposta aos três diferentes inóculos após 12 horas do estímulo. O tempo de 12 horas foi escolhido porque é quando ocorre o pico máximo de recrutamento celular, de acordo com estudos realizados previamente (Teixeira et al., 2005; Vasconcelos et al., 2014). Observou-se um aumento significativo do infiltrado leucocitário com o aumento da carga infectiva. O recrutamento total de leucócitos induzido pelos inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  parasitos foi  $77 \times 10^4 \pm 17,2 \times 10^4$  céls/mL e  $75 \times 10^4 \pm 13,8 \times 10^4$  céls/mL, respectivamente, sendo ambos significativamente maiores que aquele induzido pelo inóculo  $10^4$  ( $p=0.03$ ;  $14 \times 10^4 \pm 5,1 \times 10^4$  céls/mL) e pelo controle Salina ( $p=0.04$ ;  $10 \times 10^4 \pm 1,83 \times 10^4$  céls/mL). Os inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  só não conseguiram induzir mais leucócitos do que o estímulo com LPS (controle positivo) ( $p=0.007$ ;  $96 \times 10^4 \pm 19,4 \times 10^4$  céls/mL). Vale salientar ainda que o inóculo  $10^4$  e Salina induziram recrutamentos semelhante (Figura 4).

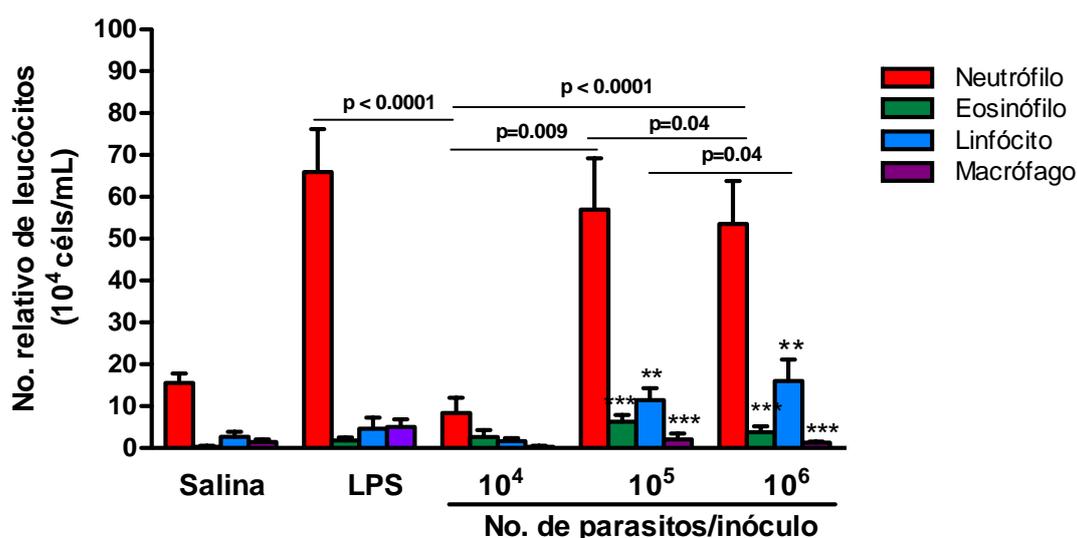


**Figura 4** – Quantificação de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamster em resposta a presença de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos)

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: O exsudato foi coletado 12h após inoculação dos estímulos. Os leucócitos foram enumerados microscopicamente. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média de 2 experimentos independentes. N=8 (Salina e LPS cada grupo); n=12 (*Leishmania* cada grupo). \* $p=0.04$  ( $10^5$  e  $10^6$  versus Salina).

Quando foi avaliado o tipo celular que migrou para o exsudato, de acordo com cada estímulo, observou-se que o maior recrutamento celular induzido pelos inóculos de  $10^5$  e  $10^6$  foi devido à maior migração de neutrófilos ( $10^5$  parasitos;  $57 \times 10^4$  céls/mL e  $10^6$  parasitos;  $53,6 \times 10^4$  céls/mL) e linfócitos ( $10^5$  parasitos;  $11,5 \times 10^4$  céls/mL e  $10^6$  parasitos;  $16 \times 10^4$  céls/mL). Interessante observar também que o número de linfócitos aumentou significativamente com o aumento da carga infectiva. (Figura 5).



**Figura 5** – Quantificação dos tipos de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamster em resposta à presença de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos)

Fonte: Elaboração própria.

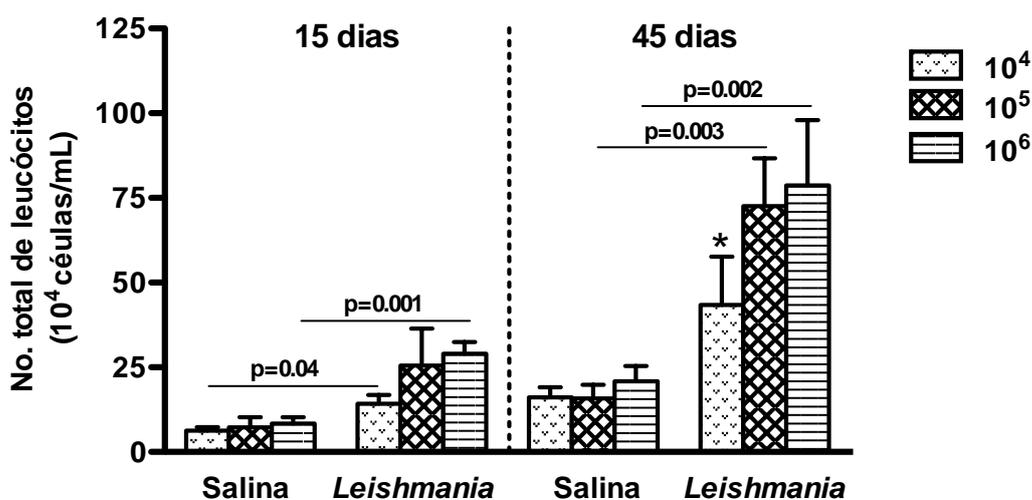
Legenda: O exsudato foi coletado 12h após inoculação dos estímulos. Os leucócitos foram enumerados microscopicamente. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média de 2 independentes experimentos. N=8 (salina e lipopolissacarideo - LPS cada grupo); n=12 (*Leishmania* cada grupo). \*\*p=0.001 (neutrófilos  $10^5$  e  $10^6$  versus linfócitos  $10^5$  e  $10^6$ ), \*\*\*p=0.0002 (neutrófilos  $10^5$  e  $10^6$  versus eosinófilos e macrófagos  $10^5$  e  $10^6$ ).

#### 4.2 Influência da primo-infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* na quantidade e tipo de leucócitos recrutados na bolsa de ar

O próximo passo foi investigar se a quantidade e o tipo de leucócitos recrutados para a bolsa de ar seriam influenciados por uma infecção prévia. Para isso, hamsters foram infectados no coxim plantar da pata com *L. braziliensis*, usando as concentrações  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ . Após 15 e 45 dias de infecção foram realizadas bolsa de ar subcutânea nestes animais com a mesma cepa que foi utilizada na infecção prévia na pata, mas mantendo uma concentração fixa de  $10^6$  parasitos para o estímulo de todas as bolsas de ar. Os tempos 15 e 45 dias foram escolhidos com o

objetivo de verificar um tempo de infecção ainda bem precoce (fase silenciosa) e outro com a infecção já estabelecida (início da resposta adaptativa). Os resultados mostraram que ocorreu um aumento significativo no número de leucócitos no infiltrado da bolsa de ar a medida que se aumentou a carga infectiva na pata dos animais, principalmente após 45 dias de infecção (Figura 6). Aos 15 dias após a infecção na pata, os inóculos  $10^4$  ( $p = 0.04$ ) e  $10^6$  ( $p = 0.001$ ) mostraram aumento significativo de leucócitos comparado com o estímulo com Salina na bolsa de ar.

Além disso, observou-se que os animais previamente infectados na pata com os diferentes inóculos tiveram um aumento ainda maior ( $10^4$ , aumento de 2 vezes;  $10^4$  e  $10^6$ , aumento de 3 vezes) no recrutamento celular com 45 dias após a re-infecção com *Leishmania* na bolsa de ar quando comparado com 15 dias (Figura 6). Foi possível observar ainda que com 45 dias, as duas maiores concentrações ( $10^5$  e  $10^6$ ) recrutaram um significativo maior número de células ( $p=0.009$ ) do que o estímulo com a menor concentração,  $10^4$  (Figura 6).



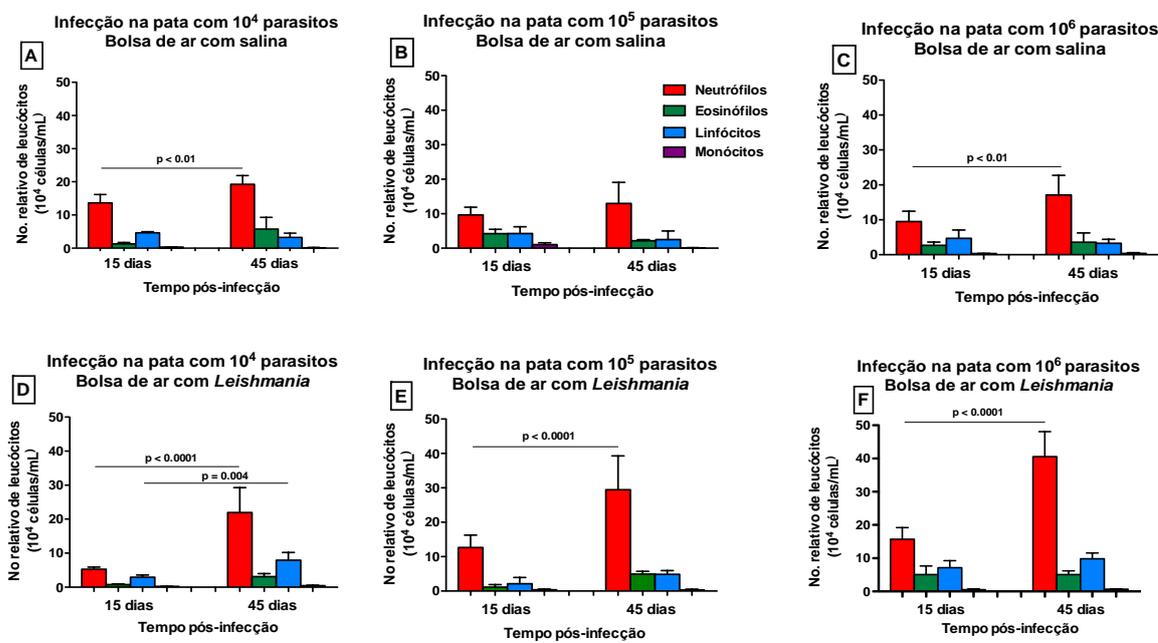
**Figura 6** – Quantificação dos leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos)

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Os animais foram infectados com  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$  parasitos no coxim plantar da pata e após 15 e 45 dias de infecção foi realizada a bolsa de ar subcutânea (inóculo fixo de  $10^6$  parasitos) nestes mesmos animais. O exsudato foi coletado 12h após inoculação dos estímulos. Os leucócitos foram enumerados microscopicamente. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média de 2 experimentos independentes. N=8 (grupo Salina); n=12 (*Leishmania* cada grupo). \* $p=0.0093$  ( $10^5$  e  $10^6$  versus  $10^4$ ).

Em relação ao tipo celular encontrado no exsudato, no gráfico 7 é possível observar que as células que migraram em maior número para o exsudato da bolsa de ar foram neutrófilos, seguidos de linfócitos e/ou eosinófilos, independente do

estímulo ter sido feito com salina ou *Leishmania*. Vale salientar que o número de neutrófilos induzido foi praticamente duas vezes maior na bolsa de ar dos animais que foram previamente infectados com  $10^5$  e  $10^6$  (Figura 7E e 7F) e que receberam o re-estímulo na bolsa com *Leishmania*, quando comparado com os que receberam apenas salina no tempo de 45 dias (Figura 7B e 7C).



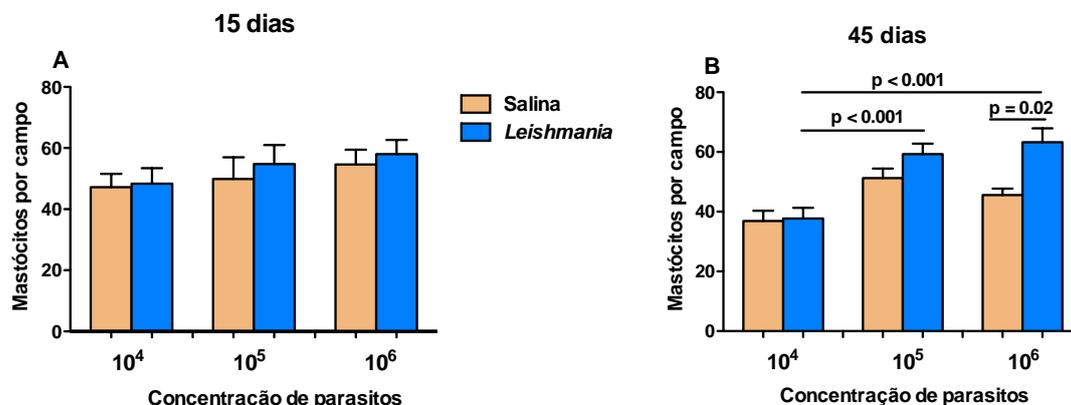
**Figura 7** – Quantificação dos tipos de leucócitos recrutados na bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos)

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Os animais foram infectados com  $10^4$ ,  $10^5$  ou  $10^6$  parasitos no coxim plantar da pata e após 15 e 45 dias de infecção foi realizada a bolsa de ar subcutânea (inóculo fixo de  $10^6$  parasitos) nestes mesmos animais. O exsudato foi coletado 12h após inoculação dos estímulos. Os leucócitos foram enumerados microscopicamente. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão da média de 2 independentes experimentos. N=8 (grupo Salina); n=12 (*Leishmania* cada grupo).

Com relação aos mastócitos, diferente do que se observou com a migração leucocitária no exsudato inflamatório da bolsa de ar, no tecido da bolsa, não houve diferença no número destas células em resposta ao estímulo com salina ou *Leishmania* aos 15 dias após a primo-infecção na pata (Figura 8A). Entretanto, aos 45 dias pós infecção na pata, observou-se nos tecidos da bolsa de ar dos animais que foram re-estimulados com *Leishmania*, que a quantidade de mastócitos foi significativamente maior ( $p < 0.001$ ) nos tecidos da bolsa de ar dos animais infectados na pata com os inóculos  $10^5$  e  $10^6$  em comparação ao menor inóculo  $10^4$  (Figura 8B). Foi visto também que nos animais infectados com  $10^6$  na pata, a quantidade de mastócitos no tecido da bolsa de ar em resposta a *Leishmania* foi

maior comparado à bolsa estimulada apenas com salina, aos 45 dias pós-infecção (Figura 8B).



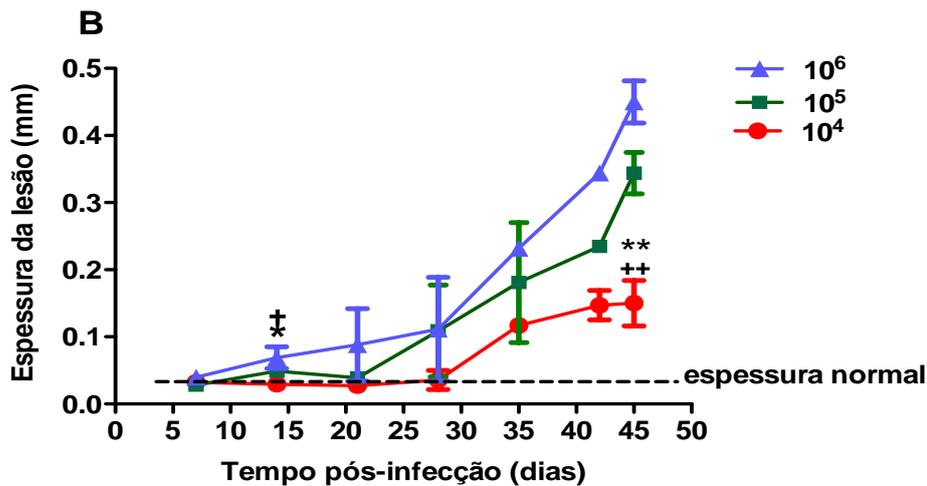
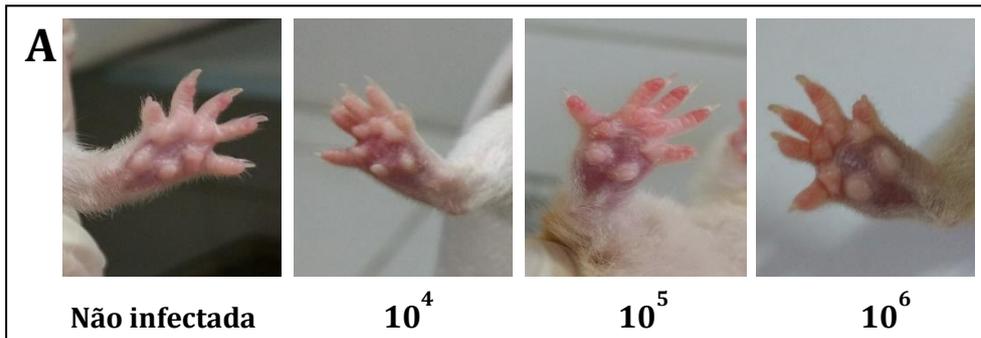
**Figura 8** – Quantificação de mastócitos avaliados no tecido da bolsa de ar subcutânea produzida em hamsters infectados previamente na pata com *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> parasitos)

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Os animais foram infectados com 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> ou 10<sup>6</sup> parasitos no coxim plantar da pata e após 15 (A) e aos 45 (B) dias de infecção foi formada a bolsa de ar subcutânea (inóculo fixo de 10<sup>6</sup> parasitos ou Salina) nestes mesmos animais. O tecido da bolsa foi coletado 12h após inoculação dos estímulos. Os mastócitos foram enumerados microscopicamente. Os valores representam a média aritmética ± erro padrão da média de 2 independentes experimentos. N=8 (grupo Salina); n=12 (*Leishmania* cada grupo). Aumento 400X. \* p < 0.001 (10<sup>4</sup> versus 10<sup>5</sup> e 10<sup>4</sup> versus 10<sup>6</sup>).

#### 4.3 Análise da espessura da lesão da pata infectada com os diferentes inóculos

O acompanhamento da evolução das lesões cutâneas após a infecção com 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> promastigotas de *L. braziliensis* procedeu-se semanalmente com a medida das patas, onde a espessura da lesão foi determinado pela diferença entre a pata infectada e a pata contralateral não infectada do mesmo animal. Com relação ao aspecto clínico, observou-se pápulas e lesões nodulares que não ulceraram (Figura 9A). A espessura das lesões dos animais infectados com os inóculos 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> foi sempre maior que a dos animais infectados com o inóculo de 10<sup>4</sup> (Figura 9B). Vale salientar que houve diferença significativa na espessura das lesões com 45 dias pós infecção, nos grupos 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> (0.344 ± 0.0031mm e 0.450 ± 0.0032mm, respectivamente) comparado com 10<sup>4</sup> (0.150 ± 0.034mm) (Figura 9B).



**Figure 9** – Avaliação do tamanho das lesões de pata de hamster após infecção por promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* em três diferentes concentrações do parasito ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ )

Fonte: Elaboração própria.

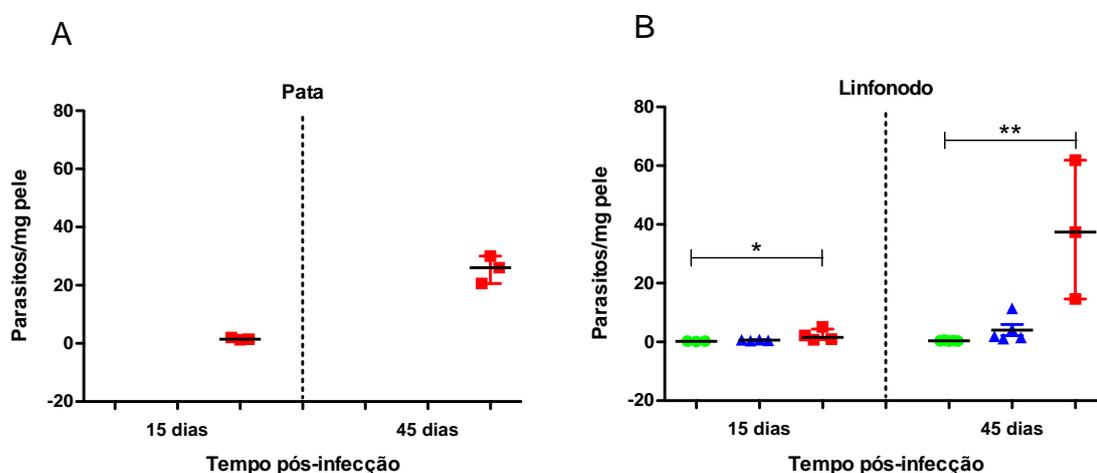
Legenda: A espessura das lesões foi definida pela diferença entre a pata infectada e a contralateral não infectada (expresso em milímetros). (A) Aspectos clínicos das lesões com 45 dias pós-infecção. (B) Cinética de desenvolvimento das lesões cutâneas ao longo de 45 dias pós-infecção (média  $\pm$  erro padrão da média); \* $p=0,01$  ( $10^4$  vs  $10^5$ ), + $p=0,03$  ( $10^4$  vs  $10^6$ ), \*\* $p=0,004$  ( $10^4$  vs  $10^5$ ) ++ $p=0,05$  ( $10^4$  e  $10^6$ ). N= 60.

#### 4.4 Avaliação da carga parasitária do tecido da pata e do linfonodo após 15 e 45 dias de infecção com diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A mensuração da carga parasitária no tecido da pata e linfonodo de drenagem da lesão dos animais infectados com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis*, após os períodos de 15 e 45 dias de infecção (n=60), foi realizada pela técnica qPCR. No tecido da pata, a carga parasitária só foi possível ser quantificável nos experimentos com o inóculo  $10^6$ , em ambos os períodos avaliados. Os animais analisados com 45 dias apresentaram níveis significativamente maiores de DNA

parasitário (mediana = 21 parasitos/mg) do que com avaliados com 15 dias (mediana = 1,3 parasitos/mg) (Figura 10A).

No tecido do linfonodo, entretanto, observou-se carga parasitária que foi quantificável nos três inóculos, nos dois períodos avaliados. Com 15 dias, os três inóculos apresentaram níveis de mediana equivalentes a menos de 3 parasitos/mg: com  $10^6$  - 1.6 parasitos/mg,  $10^5$  - 0.6 parasitos/mg e  $10^4$  - 0.25 parasitos/mg, sendo o primeiro significativamente mais elevado ( $p < 0.05$ ) em relação ao inóculo  $10^4$  (Figura 10B). Ainda em relação ao linfonodo, com 45 dias pós-infecção, os animais infectados com  $10^6$  apresentaram mediana significativamente ( $p < 0.001$ ) mais elevada (38 parasitos/mg) do que aqueles dos inóculos de  $10^5$  (2,0 parasitos/mg) e  $10^4$  (0.36 parasitos/mg) (Figura 10B).



**Figura 10** – Quantificação da carga parasitária em lesões cutâneas (A) e linfonodo (B) de hamsters infectados com  $10^4$  (◆),  $10^5$  (▲) e  $10^6$  (■) promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* com 15 e 45 dias após a infecção

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A carga parasitária foi quantificada por PCR em tempo real e os resultados expressos em equivalentes de parasitos/massa de tecido de pele ou linfonodo (mg). Cada símbolo representa um animal. As linhas horizontais representam mediana com intervalo interquartil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.5 Análise da expressão gênica de citocinas, iNOS e arginase em lesão de pata e linfonodo de hamsters infectados com diferentes inóculos

O ensaio de RT-qPCR foi aplicado para avaliar a expressão gênica na pele e linfonodo poplíteo de animais infectados com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* após os períodos de 15 e 45 dias de infecção.

Com 15 dias de infecção, foi observada expressão na maioria das moléculas analisadas na pata infectada com  $10^6$  parasitos, o que não ocorreu com os animais infectados com os outros inóculos (Figura 11). Nos animais inoculados com  $10^5$ ,

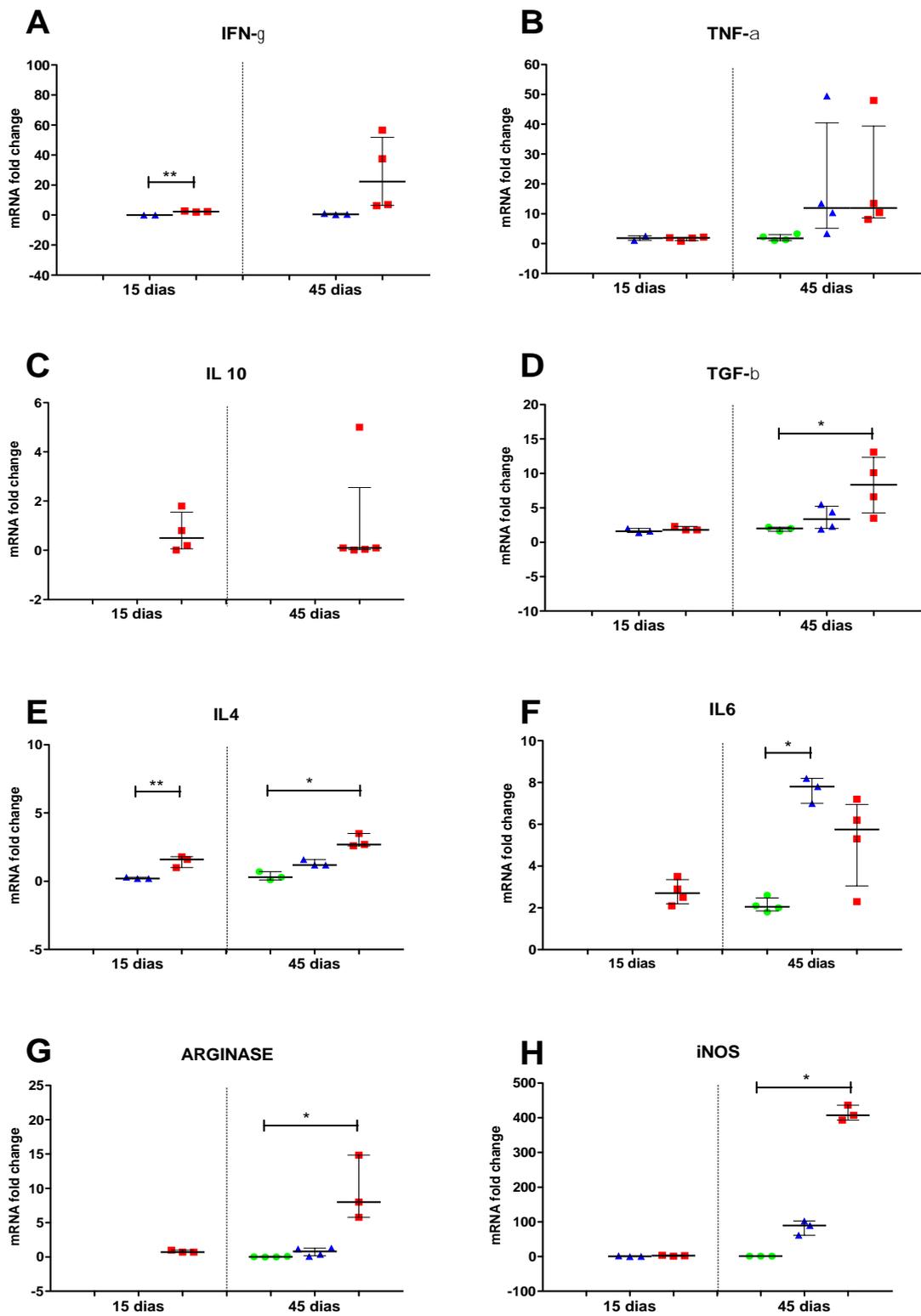
houve expressão de TNF, TGF- $\beta$  e iNOS, em quantidades semelhantes a de  $10^6$  e pouca expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4, com diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao inóculo de  $10^6$ , bem como nenhuma expressão de IL-10, IL-6 e arginase. Em relação aos animais inoculados com  $10^4$ , não houve expressão nenhuma das moléculas analisadas (Figura 11).

Entretanto, com 45 dias de infecção, foi observado um aumento na expressão da maioria das moléculas analisadas, quando comparado com 15 dias, nas três concentrações utilizadas. A expressão de iNOS ( $p < 0,05$ ) e IFN- $\gamma$  foi maior na concentração de  $10^6$ , quando comparada a expressão dessas moléculas com  $10^5$ . Foi observada também a expressão de IL-6 com 45 dias, no inóculo de  $10^5$ , o que não ocorreu com 15 dias de infecção (Figuras 11A e F). Para o inóculo de  $10^4$  foi observada expressão gênica de TNF, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-6, arginase e iNOS, em pequenas quantidades (Figura 11).

A análise da expressão de citocinas no linfonodo poplíteo dos animais infectados com as três concentrações de parasitos mostrou que houve expressão gênica de todas as moléculas analisadas nos três inóculos e nos dois períodos estudados. Porém, observou-se aumento significativo somente na expressão de IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  e iNOS ( $p < 0,05$ ) com o inóculo de  $10^6$  em relação ao de  $10^4$ , com 15 dias de infecção (Figura 12).

Com 45 dias pós-infecção, a expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS foi maior em relação as outras moléculas, nas concentrações de  $10^5$  e  $10^6$ , embora também tenha sido observada a expressão das outras moléculas, em quantidades menores. Vale salientar que o inóculo de  $10^5$  induziu um pouco menos a expressão de citocinas em relação a  $10^6$ , porém percebe-se que o perfil de expressão foi semelhante (Figura 12).

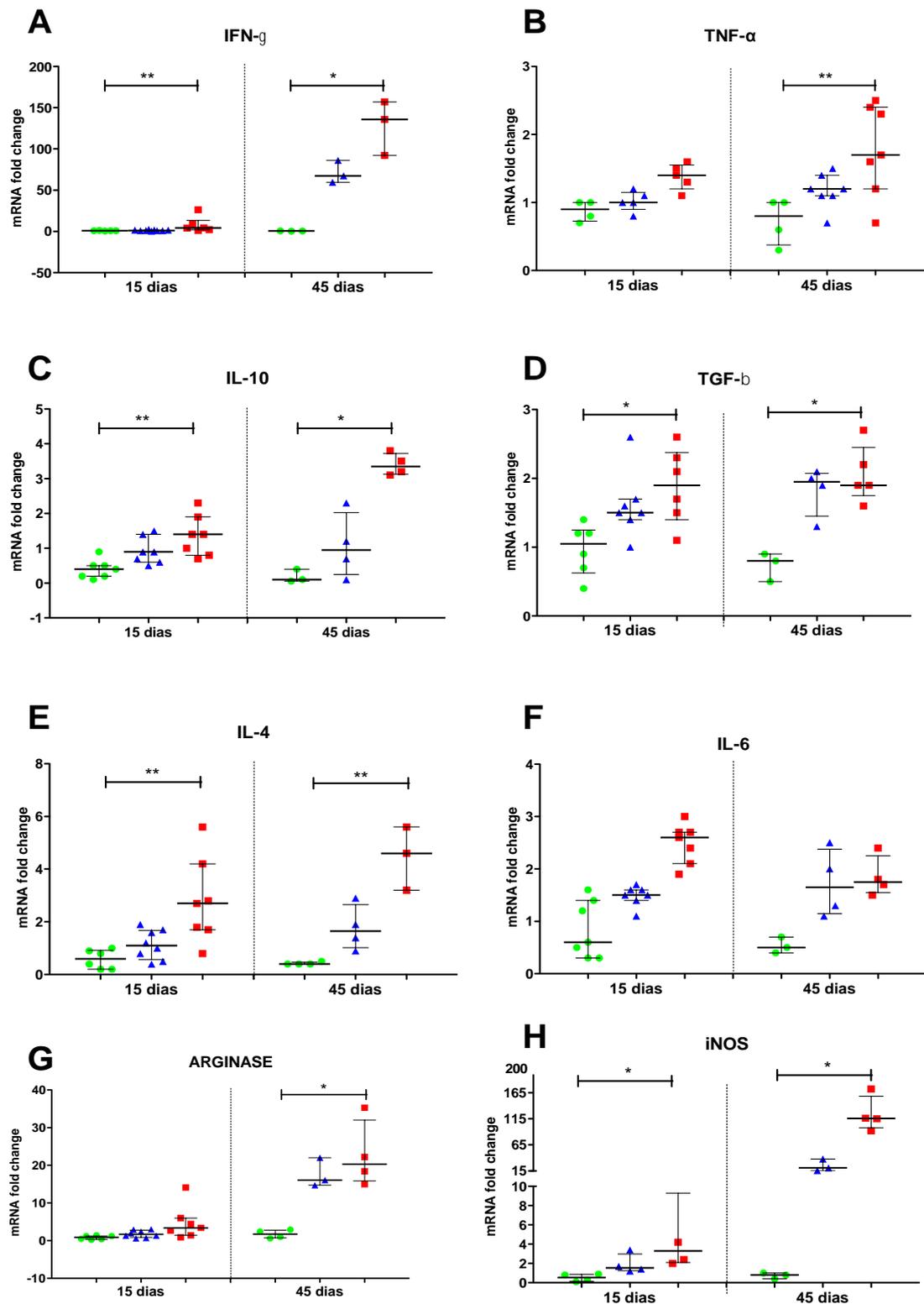
Na concentração de  $10^4$  observou-se expressão de todas as moléculas analisadas de forma semelhante, mostrando um certo equilíbrio entre as quantidades que foram expressas, enquanto na concentração de  $10^6$  observou-se expressão significativamente maior de todas as citocinas, exceto de IL-6, quando comparado ao inóculo de  $10^4$ , com 45 dias (Figura 12).



**Figura 11** – Expressão gênica de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C), TGF $\beta$  (D), IL-4 (E), IL-6 (F), arginase (G) e iNOS (H) na lesão da pata de hamsters com 15 e 45 dias após a infecção com  $10^4$  ( $\blacklozenge$ ),  $10^5$  ( $\blacktriangle$ ) e  $10^6$  ( $\blacksquare$ ) promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Amostras de pele de animais não infectados foram utilizadas como calibradores da reação. Cada símbolo representa um animal. Mediana com intervalo interquartil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$



**Figura 12** – Expressão gênica de IFN- $\gamma$  (A), TNF (B), IL-10 (C), TGF $\beta$  (D), IL-4 (E), IL-6 (F), arginase (G) e iNOS (H) no linfonodo poplíteo de hamsters com 15 e 45 dias após a infecção com  $10^4$  (●),  $10^5$  (▲) e  $10^6$  (■) promastigotas de *Leishmania braziliensis*  
 Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Amostras de pele de animais não infectados foram utilizadas como calibradores da reação. Cada símbolo representa um animal. Mediana com intervalo interquartil. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

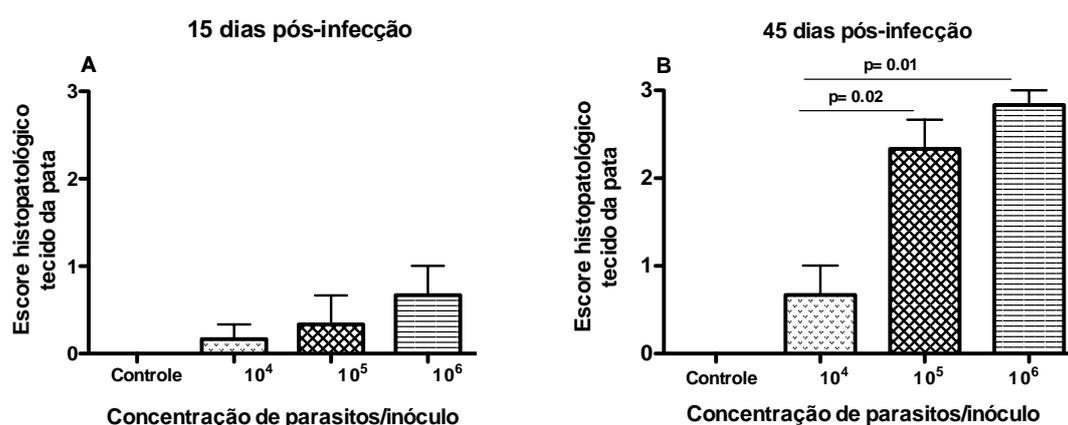
#### 4.6 Alteração histopatológica no tecido da pata de hamster com infecção com três diferentes inóculos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e do tecido da bolsa de ar na reinfecção com 15 e 45 dias

Com o intuito de analisar se o modelo bolsa de ar mimetizava o infiltrado inflamatório das lesões induzido pela infecção por *Leishmania* foram comparadas as alterações histopatológicas ocorridas nos dois sítios.

Em relação às alterações histológicas na pata infectada foi possível observar que, com 15 dias, a derme do tecido da pata dos animais infectados não apresentou alterações histopatológicas que as diferenciassem dos controles não infectados, em nenhum dos três inóculos utilizados (Figura 13A).

Entretanto, com 45 dias pós-infecção, observou-se um infiltrado inflamatório constituído por macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, organizados na região perivascular e se difundindo na derme das lesões das três diferentes concentrações de parasitos utilizadas (Figura 15A, B e C).

Os animais infectados com  $10^4$  exibiram infiltrado inflamatório discreto, enquanto os animais inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  apresentaram uma infiltração inflamatória moderada, e moderada a intensa, respectivamente (Figura 13B e Figura 15A, B e C). Os escores histopatológicos obtidos dos tecidos das patas dos animais inoculados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos (2.3 e 3.0, respectivamente) foram significativamente mais elevados quando comparados aos observados com o inóculo  $10^4$  no período de 45 dias pós-infecção (Figura 13B).



**Figura 13** – Alterações histopatológicas representadas por escore, no tecido da pata de hamsters infectados com diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos), com 15 (A) e 45 (B) dias pós-infecção.

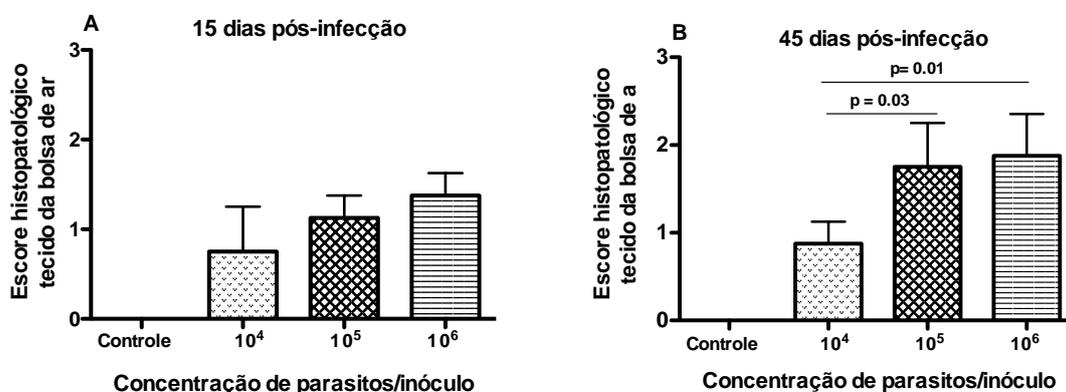
Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A avaliação foi feita de forma semiquantitativa utilizando escores (intensidade de ocorrência) das alterações histopatológicas, variando de ausência (escore = 0), discreto (escore = 1), moderado (escore = 2) a intenso (escore = 3). As seguintes alterações

histopatológicas foram avaliadas: infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão, edema, necrose, fibrose, amastigotas, granulomas e células gigantes. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão. N=4 (grupo Controle); n=6 (*Leishmania* cada grupo).

Também foi feita a análise histopatológica do tecido da bolsa de ar dos grupos de animais, após a infecção prévia na pata, sendo que os tecidos foram retirados com 15 e 45 dias pós-infecção. No tecido da bolsa de ar foi observado infiltrado inflamatório organizado em áreas perivasculares e difusas, especialmente na hipoderme, constituído por macrófagos, linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, nos dois tempos avaliados (15 e 45 dias) e nos três diferentes inóculos ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) (Figura 14 e Figura 15D, E e F). Nos animais infectados na pata previamente com  $10^4$ , o infiltrado do tecido da bolsa foi discreto, enquanto, nos animais infectados previamente na pata com  $10^5$  e  $10^6$ , o infiltrado do tecido da bolsa de ar mostrou-se moderado, em ambos os tempos avaliados (Figura 14A e B; Figura 15D, E e F).

No tecido da bolsa de ar obtido no período de 45 dias pós-infecção, os escores histopatológico dos inóculos  $10^5$  e  $10^6$  (1.75 e 2.0, respectivamente) também foram significativamente mais elevados quando comparados a  $10^4$  (Figura 14B).



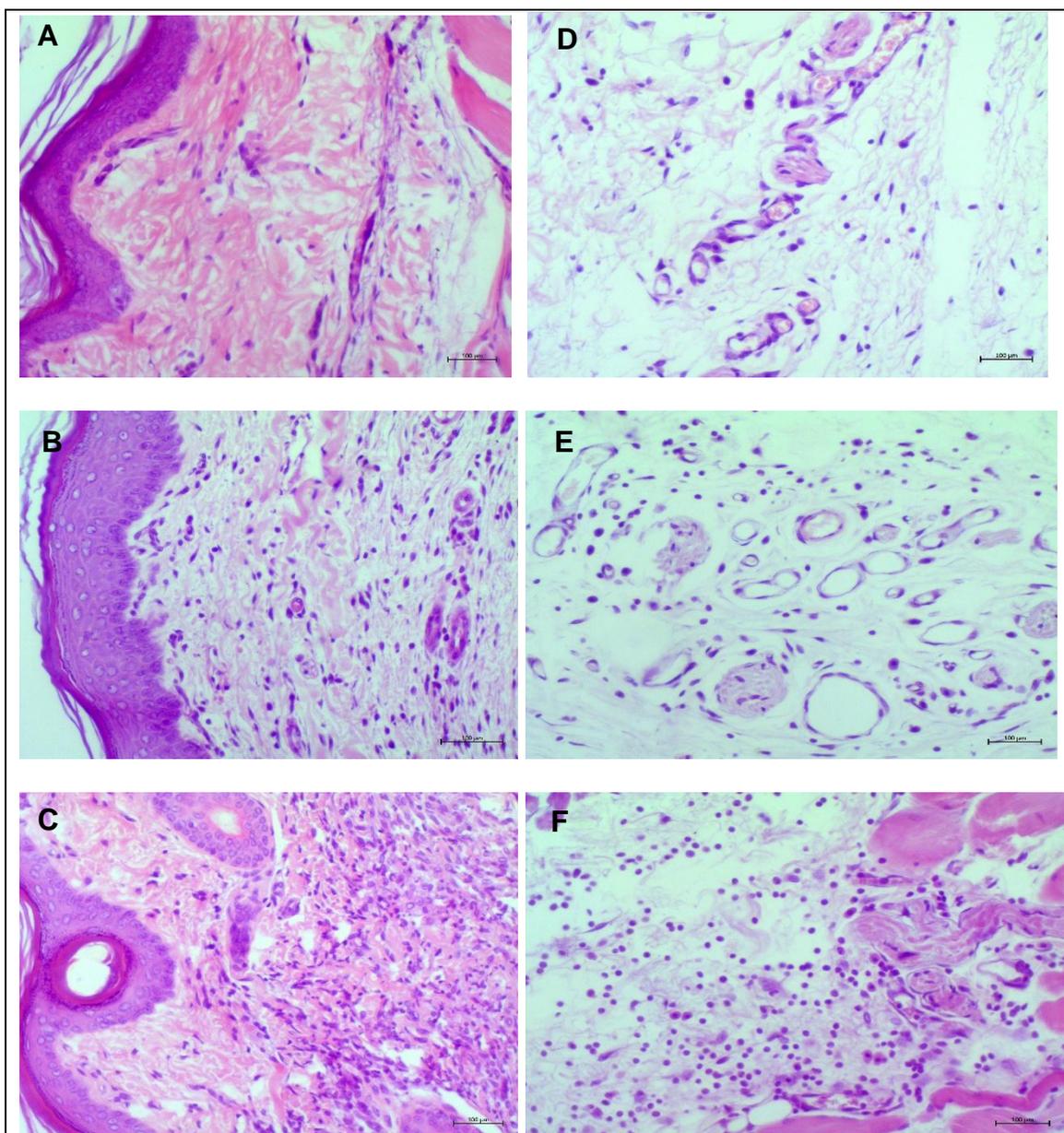
**Figura 14** – Alterações histopatológicas no tecido da bolsa de ar produzida em hamsters infectados previamente na pata com diferentes concentrações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  parasitos) representado por scores, com 15 (A) e 45 (B) dias pós-infecção

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: A avaliação foi feita de forma semiquantitativa utilizando escores (intensidade de ocorrência) das alterações histopatológicas, variando de ausência (escore = 0), discreto (escore = 1), moderado (escore = 2) a intenso (escore = 3). As seguintes alterações histopatológicas foram avaliadas: infiltrado inflamatório, hemorragia, congestão, edema, necrose, fibrose, amastigotas, granulomas e células gigantes. Os valores representam a média aritmética  $\pm$  desvio padrão. N=4 (grupo Controle); n=6 (*Leishmania* cada grupo).

Pata

Bolsa de ar



**Figura 15** – Fotomicrografia de pata infectada e bolsa da ar subcutânea formada em hamsters infectados com diferentes concentrações de parasitos de *Leishmania braziliensis* 45 dias após a infecção.

Fonte: Elaboração própria.

Legenda: Infiltrado inflamatório discreto na pata posterior direita infectada com  $10^4$  (A), moderado com  $10^5$  (B) e intenso com  $10^6$  (C). Infiltrado inflamatório discreto no tecido da bolsa de ar em animal previamente infectado com  $10^4$  (D) e moderado com  $10^5$  (E) e  $10^6$  (F). Hematoxilina e Eosina, 100X.

## 5 DISCUSSÃO

O uso de modelos experimentais no estudo de doenças infecciosas é de suma importância para o entendimento dos mecanismos da imunopatogenicidade, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (Awashti et al., 2004; Oliveira et al., 2005; Hommel et al., 1995). No modelo hamster, sugere-se que na fase inicial da infecção, durante a resposta imunológica inata, a diferença no número de parasitos inoculados influencia o início do desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa, com consequente manifestação clínica da doença, e a magnitude dessa resposta adaptativa determinará o curso crônico da infecção (Ribeiro-Romão et al., 2014).

Neste trabalho, o modelo da bolsa de ar foi utilizado para analisar o perfil celular induzido por diferentes concentrações ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ) de *L. braziliensis*. Em seguida, o mesmo modelo foi usado para analisar o exsudato inflamatório induzido na bolsa de ar em resposta a um inóculo fixo de  $10^6$  de *L. braziliensis* em animais previamente infectados na pata com diferentes concentrações do parasito ( $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ ), com o objetivo de verificar a resposta inflamatória influenciada por essas concentrações após 15 e 45 dias da primo-infecção e, desta forma, entender melhor os eventos iniciais da infecção e sua possível relação com a evolução e gravidade da doença.

Diversos estudos em camundongos têm descrito a utilização da bolsa de ar como modelo consistente de investigação da resposta inflamatória, uma vez que com este modelo é possível se criar um ambiente que propicia o recrutamento e a análise fenotípica das células que migraram para dentro do espaço da bolsa de ar (Matte; Olivier, 2002; Forget et al., 2005). Recentemente, o modelo hamster mostrou-se bastante aplicável ao estudo da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, uma vez que reproduziu muitos dos aspectos clínicos e imunopatológicos observados na doença humana (Gomes-Silva et al., 2013).

No presente trabalho, a avaliação inicial dos diferentes inóculos na bolsa de ar mostrou que o inóculo  $10^4$  induziu uma migração celular bem menor que os inóculos  $10^5$  e  $10^6$ . No entanto, apesar da maior diferença no número de parasitos entre os inóculos  $10^5$  e  $10^6$ , a quantidade de células que migraram para a bolsa de ar induzida por estes, foi semelhante. Ao contrário, entre as concentrações  $10^4$  e  $10^5$ , cuja quantidade de parasitos, é menor entre os inóculos, houve um aumento significativo no recrutamento celular. Alguns trabalhos já demonstraram que cepas

dermotrópicas, como *L. major* e *L. braziliensis* são melhores recrutadoras de leucócitos dentro da bolsa de ar do que as cepas viscerotrópicas, como *L. infantum*, sugerindo que a acumulação de leucócitos no local do inóculo pode ajudar a reduzir a carga parasitária e restringir a difusão do parasito, permitindo o desenvolvimento de lesões características na pele (Matte; Olivier, 2002; Teixeira et al., 2005; Vasconcelos et al., 2014).

Quando a bolsa de ar foi realizada em animais que foram previamente infectados na pata com diferente carga infectiva, o mesmo fenômeno foi observado, ou seja, a menor concentração  $10^4$  induziu menos migração celular que as maiores concentrações  $10^5$  e  $10^6$ , que por sua vez, comportaram-se de forma semelhante. Observou-se ainda uma diferença em relação ao tempo, uma vez que com 45 dias pós-infecção na pata, encontrou-se uma maior migração de células na bolsa de ar, sugerindo que não somente a infecção prévia interferiu no recrutamento celular, mas também o tempo de infecção teve importância na quantidade de células que migraram. As células que migram para o sítio inflamatório podem modular a resposta do hospedeiro, tornando o ambiente favorável ou desfavorável para a sobrevivência do parasito, portanto, o conhecimento do que acontece nessa fase inicial da infecção é muito importante para esclarecer a diferença na evolução e gravidade das lesões induzidas por diferentes cargas infectivas.

O tipo celular que migrou para a bolsa de ar também foi investigado. Os animais infectados na pata com  $10^5$  e  $10^6$  induziram maior recrutamento celular, após 45 dias de infecção, e esse aumento se deu devido ao grande número de neutrófilos, seguido em menor número de linfócitos e eosinófilos. Trabalhos anteriores demonstraram que *Leishmania* aciona o recrutamento de uma população mista de células inflamatórias, como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, que pode variar entre espécies e cepas (Matte; Olivier, 2002; Teixeira et al., 2005).

Vários estudos mostram que os PMNs são os primeiros leucócitos a aparecerem no local inflamatório (revisado por Jochim; Teixeira, 2008; Peters et al., 2008). O papel dessas células no sítio inflamatório é complexo; os PMNs podem matar ou proteger os parasitos, dependendo da espécie do parasito e do hospedeiro (Scott; Novais, 2016). Já foi demonstrado que neutrófilos podem albergar *Leishmania* nas primeiras horas ou dias após a infecção (Laufs et al., 2002; van Zandbergen et al., 2004). *Leishmania* é capaz de retardar a apoptose de neutrófilos, um mecanismo que envolve a inibição de caspase-3 (Aga et al., 2002), e corroborando isso, em um estudo recente, não foi observada apoptose em

neutrófilos na infecção por *L. mexicana* (Hurrell et al., 2015). Os parasitos que são ingeridos, mas não mortos pelos PMNs, nesta fase inicial, podem se beneficiar desta acumulação precoce de neutrófilos para o sítio de infecção, como já foi demonstrado para *L. major* (Tacchini-Cottier et al., 2000).

Os neutrófilos podem servir, então, de porta de entrada silenciosa para a *Leishmania* nos macrófagos, mecanismo denominado de “cavalo de Troia” (van Zandbergen et al., 2004). Além disso, algumas promastigotas podem escapar do neutrófilo logo antes da sua ingestão por macrófagos, mecanismo denominado de “coelho de Troia” (Peters et al., 2008). Adicionalmente, foi relatado também que promastigotas de *Leishmania* podem induzir a migração de PMN, liberando um fator chamado fator quimiotático de *Leishmania*, que tem potente atividade quimioatraente para neutrófilos (van Zandbergen et al., 2002).

Por outro lado, neutrófilos atuam como células fagocíticas efetoras também em leishmaniose, matando *Leishmania* (Pearson et al., 1981; Chang 1981; Lima et al., 1998). Os neutrófilos liberam grânulos de proteínas enquanto migram para o local inflamatório, que induzem a produção de TNF- $\alpha$ , que por sua vez ativa macrófago para promover a morte dos parasitos (Filardy et al., 2011). Um estudo tem demonstrado que neutrófilos interagem com macrófagos pela via CD28-CD80/CD86, resultando em secreção de IFN- $\gamma$ , que por sua vez controlaria o crescimento de *Leishmania* dentro de macrófagos (Venuprasad et al., 2002). No presente estudo, não podemos afirmar que o recrutamento destas células para a bolsa de ar favoreceu a sobrevivência do parasito, podemos apenas especular, uma vez que não foi determinada carga parasitária nas células da bolsa de ar.

Os linfócitos e eosinófilos foram as células mais recrutadas depois dos neutrófilos. Foi demonstrado em outros trabalhos que além de *L. braziliensis* outras espécies de *Leishmania*, como *L. major* e *L. donovani* também são capazes de induzir a migração de eosinófilos (Matte; Olivier, 2002; Teixeira et al., 2005). Sabe-se que assim como os neutrófilos, os eosinófilos também são capazes de albergar e matar *Leishmania* (Pompeu et al., 1991; Lima et al., 1998). Os eosinófilos podem participar da vasodilatação, favorecendo a alimentação sanguínea do vetor e ao mesmo tempo criar um ambiente inóspito para os patógenos transmitidos pelo vetor (Belkaid et al., 2000). Por outro lado, a presença de eosinófilos tem sido fortemente relacionada às reações alérgicas e picadas de insetos, caracterizada por uma resposta imunológica tipo Th2 (Blanchard; Rothenberg, 2009).

Nos últimos anos tem sido relatado que os eosinófilos podem influenciar o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa participando do processo como células apresentadoras de antígenos, podendo facilitar a resposta imunológica inata através da ativação de neutrófilos, basófilos e mastócitos, e podendo também favorecer uma resposta imunológica adaptativa pela indução da maturação de CDs e modulação da resposta Th1 versus Th2 (Padigel et al., 2006; Blanchard et al., 2009; Akuthota et al., 2010; Rodríguez; Wilson, 2014). Outros estudos sugerem que eosinófilos produzem citocinas IFN- $\gamma$  e IL-12 que induzem uma resposta Th1, mas esses dados só foram observados em infecção experimental por *Cryptococcus neoformans* (revisto por Rodríguez; Wilson, 2014). Portanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar as atividades de eosinófilos em outras doenças infecciosas, incluindo as leishmanioses.

No presente trabalho, foi observado que os linfócitos foram o segundo tipo celular mais presente no exsudato da bolsa de ar, depois de neutrófilos. Segundo von Stebut (2007), para a eficiência na eliminação dos parasitos, as células T devem migrar para a lesão da pele infectada com *Leishmania*. Essa migração é dependente de quimiocinas presentes no local da infecção e da expressão de receptores de adesão pelas células T, que leva à migração de células T efetoras para o sítio de inflamação. Um estudo realizado com *L. major* sugere que duas populações de células T CD4+ são responsáveis pela proteção imunológica: células T efetoras, dependente do parasito, e células T de memória central, independente do parasito. A existência de uma população duradoura de células T de memória central não requer a presença de parasitos vivos (Scott, 2005). Numa reinfecção com *L. major*, essas células se multiplicam e promovem proteção eficiente.

Trabalhos anteriores mostraram que quando ocorre um baixo número de macrófagos infectados no sítio inflamatório, conseqüentemente não haveria produção da quimiocina CCL2, responsável por recrutar células NK, macrófagos e outras células CCR2+ (Teixeira et al., 2006). Além disso, segundo alguns autores, macrófagos inflamatórios são os responsáveis pela secreção de CCL2, e a infecção por *Leishmania* não induz ativação desse tipo de macrófago (Bhardwaj et al., 2010). O baixo número de macrófagos também pode acarretar uma baixa produção da quimiocina CXCL10, que serve não somente para atrair mais macrófagos para o sítio inflamatório, mas também para ativar células NK, importantes produtoras de IFN- $\gamma$  na resposta inata (Vester et al., 1999; Teixeira et al., 2006).

No presente trabalho, foi observado um número reduzido de macrófagos na bolsa de ar. O recrutamento inicial de monócitos inflamatórios é dependente da quimiocina CCL2, que é produzida por células que estão no local da infecção (Scott; Novais, 2016). Sabe-se que os neutrófilos são as primeiras células encontradas em grande número no início das infecções por patógenos, ocorrendo depois uma dominante presença de macrófagos. A proporção de neutrófilos e macrófagos muda durante as primeiras semanas da infecção e em pouco tempo os neutrófilos diminuem e ocorre um aumento concomitante de macrófagos e CDs (Jochim; Teixeira, 2008).

Matte e Olivier (2002) mostraram que o número de macrófagos aumentou em torno de 50% após 48 horas de infecção na bolsa de ar estimulada por *L. donovani*. Resultados parecidos podem ser observados no trabalho de Vasconcelos e colaboradores (2014), onde o estímulo por *L. chagasi* na bolsa de ar, resultou na predominância de macrófagos, tanto com 12h como com 24h pós-inóculo, no tecido da bolsa de ar e não no exsudato celular, sugerindo que estas células foram recrutadas, mas podem não ter migrado, ou migrariam apenas mais tarde (após 24h). Já foi relatado que o menor recrutamento de macrófagos na bolsa de ar estimulada por *L. donovani* pode estar relacionado com o LPG de superfície do parasito, uma vez que o LPG tem sido implicado na redução da migração transendotelial de monócitos, por conta do bloqueio da expressão de E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 (Lo et al., 1998). Pode-se especular que o número reduzido de macrófagos no presente trabalho, apesar de significar, a priori, menos células hospedeiras para os parasitos inicialmente, pode não se apresentar como um grande problema em um tempo mais tardio, uma vez que, como já citado acima, existe uma tendência à inversão da proporção neutrófilos/macrófagos com o tempo, que é de 48 h na bolsa de ar estimulada com *Leishmania*, e esse tempo não foi avaliado neste trabalho.

No presente trabalho também foi realizada a contagem de mastócitos no tecido da bolsa de ar de animais que foram infectados previamente com os diferentes inóculos na pata e, após 15 e 45 dias de infecção, foram submetidos à bolsa de ar. Foi observada uma maior presença de mastócitos nos animais infectados com  $10^6$  parasitos após 45 dias de infecção. Estudos realizados por Birdri e colaboradores (1997) sugerem que os mastócitos são células importantes na primeira linha de defesa contra *Leishmania spp.* inoculada na pele. Além do mais, pode-se especular que sua habilidade em secretar citocinas, induz a resposta

imunológica adaptativa que terá maior implicação no desfecho da doença (Rodríguez; Wilson, 2014).

Foi relatado que mastócitos são em parte responsáveis por mediar a lesão inflamatória local induzida por *L. major* (Wershil et al., 1994). A degranulação dos mastócitos antes da infecção por *L. major* reduz não somente sua capacidade em exacerbar a inflamação pela liberação de histamina, mas também sua habilidade em promover uma resposta Th2, que antagonizará o desenvolvimento de uma resposta Th1 curativa (Romao et al., 2009). Outros estudos mostram que a deficiência dos mastócitos está associada com a diminuição da migração dos neutrófilos, macrófagos e CDs nas lesões. Além disso, a deficiência dos mastócitos leva a diminuição da produção de IL-12, uma citocina promotora da resposta Th1 (Maurer et al., 2006). Com base nesses resultados, sugere-se que os mastócitos induzem uma resposta imunológica sistêmica à *Leishmania spp.* através do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da lesão.

Estudos clínicos tanto em humanos quanto em animais indicam que os mastócitos têm papel na resposta inflamatória da LC, mas a extensão da infiltração e o seu fenótipo funcional dependem da espécie de *Leishmania* e do hospedeiro (revisto por Rodríguez; Wilson, 2014). Por outro lado, alguns autores consideram improvável o envolvimento de mastócitos no desenvolvimento clínico da LC. Afirmam que a LC murina se desenvolve independente dos mastócitos e que eles não influenciam a função imunomoduladora na diferenciação das células T e sugerem também que os mastócitos não são fontes críticas de IL-4 e, portanto, não influenciam na progressão da doença (Paul et al., 2016).

Os aspectos clínicos e patológicos também foram avaliados nos grupos de animais infectados na pata com diferentes cargas infectivas. As lesões nos animais com o inóculo  $10^4$  apresentaram surgimento mais demorado (35 dias pós-infecção) do que as dos inóculos  $10^5$  e  $10^6$  (ambos surgiram com 15 dias pós-infecção), sugerindo uma resposta inflamatória menos intensa, com curso mais prolongado. Estes resultados corroboram com os achados da bolsa de ar, onde a menor carga infectiva também induziu um menor infiltrado inflamatório. Achados semelhantes foram reportados anteriormente por Cortês (2010) que, ao comparar inóculos de  $10^3$  e  $10^6$  de *L. major* e *L. amazonensis*, relatou resultados similares.

Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), comparando inóculos de  $10^4$ ,  $10^5$ , e  $10^6$  de *L. braziliensis* em pata de hamster, também perceberam semelhanças na espessura da lesão nos inóculos de  $10^5$  e  $10^6$ , e animais infectados com  $10^4$

parasitos apresentaram lesões menores, além disso, relataram ainda que o início da lesão foi inversamente proporcional ao tamanho do inóculo, refletindo a habilidade da resposta imunológica em controlar altas ou baixas cargas parasitárias de *Leishmania*. Outro estudo mostrou que a utilização do inóculo  $10^6$ , considerado muito alto se comparado à infecção natural, foi associado à visceralização da *Leishmania* para o baço e o fígado (Gomes-Silva et al., 2013). Adicionalmente, já foi relatado também que animais infectados com inóculos ainda menores,  $10^2$  e  $10^3$  parasitos, desenvolveram uma resposta imune protetora (Brestcher et al., 1992), confirmando que o tamanho do inóculo também é um dos fatores importantes para ditar o tipo de resposta imunológica que se desenvolverá.

Já foi descrito que os mecanismos desencadeados no início da infecção, antes do surgimento da lesão, caracterizada como fase silenciosa da infecção, parecem ser decisivos na progressão da doença. Acredita-se que exista um limite de infecção dos macrófagos ou de parasitos liberados no meio extracelular para desencadear uma resposta imunológica e então o início da lesão (Belkaid et al., 2000). Sabe-se também que após a inoculação de *L. major* na derme, a opsonização de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* com complemento é rápida e a lise, através do complexo de ataque à membrana (complexo C5b-C9), começa 60 segundos após o contato sérico (Domínguez et al., 2002). Isso resulta em eficiente morte de 90% de todos os parasitos inoculados, dentro de 3 minutos (von Stebut, 2007). Com base no exposto acima, pode-se especular que a sobrevivência de parasitos com um inóculo  $10^4$  seria bem menor nas primeiras horas do que com inóculos maiores. Talvez essas observações possam explicar a tão pouca diferença encontrada entre os inóculos  $10^5$  e  $10^6$ , tanto em relação a espessura da lesão e as alterações histopatológicas, como aos seus efeitos na bolsa de ar.

Neste estudo, só foi detectada carga parasitária na pata dos animais infectados com o maior inóculo ( $10^6$ ), tanto com 15 como com 45 dias pós-infecção, e ainda assim em níveis muito baixos. E isso corrobora com as lesões pequenas, nodulares e não ulceradas e com as moderadas alterações histopatológicas observadas nesses animais. Além disso, não foram observadas também amastigotas na análise histopatológica. Os estudos nos modelos animais com infecção por *L. braziliensis*, seja na pata ou na orelha, mostram que a parasitemia diminui no sítio de infecção, acompanhando a queda da espessura da lesão (De Moura et al., 2005; Teixeira et al., 2005). O tempo de observação do presente

trabalho foi de 45 dias pós-infecção e a espessura das lesões continuavam aumentando, portanto, teria sido necessário um acompanhamento por um período maior de tempo para se observar se isso de fato iria ocorrer, ou então, uma outra hipótese, é que os dois menores inóculos ( $10^4$  e  $10^5$ ) controlaram de forma mais eficiente a carga parasitária.

No linfonodo, entretanto, foi detectada carga parasitária nos três inóculos, nos dois tempos avaliados. Estudos anteriores mostraram que na infecção cutânea no modelo hamster aspectos como a linfadenopatia são observados, assim como na infecção humana (Hommel et al., 1995). Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), trabalharam com o modelo hamster, utilizando inóculos de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  promastigotas de *L. braziliensis* na pata traseira dos animais, constataram que ao final do experimento, com  $10^5$  dias pós-infecção, ainda foi possível encontrar parasitos no linfonodo regional dos animais. O linfonodo é relatado como um importante sítio de proliferação do parasito durante a infecção, e um dos primeiros órgãos afetados durante a disseminação sistêmica do parasito, que pode persistir dentro de macrófagos ou fibroblastos dos linfonodos por períodos indefinidos, ajudando desta forma na modelação da resposta imunológica (Moll et al., 1995). E essa modulação parece ter uma relação inversa com a carga infectiva, ou seja, quanto maior a carga infectiva mais tardia será a modulação da resposta imunológica.

No presente trabalho, foi analisado o perfil de expressão gênica de moléculas envolvidas na resposta imune da LC, de modo a investigar como esse perfil pode influenciar na patogênese dessa infecção, no modelo hamster. A análise foi feita na pata e nos linfonodos de drenagem da lesão dos animais infectados com  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ , com 15 e 45 dias pós-infecção. No geral, tanto na pata como no linfonodo, houve uma relação direta entre a expressão de IFN- $\gamma$ , TNF, IL-10, TGF- $\beta$ , arginase e iNOS com o tempo de infecção, isto é, houve uma tendência ao aumento da expressão dessas citocinas com o tempo.

Alguns trabalhos compararam a expressão de RNAm de algumas moléculas inflamatórias em pele e linfonodo de hamster infectado com *L. panamensis* e constataram a maior expressão basal no linfonodo em relação à pele na maioria dos transcritos (IL-4, IL-21, TNF, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12p40 e IL-10), porém ocorreram menores mudanças na expressão dessas moléculas nos animais infectados, na fase inicial da infecção (Espitia et al., 2010).

Verificou-se um padrão de resposta misto em ambos os sítios inflamatórios avaliados, isto é, com co-expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias na pele e linfonodo, sem polarização de resposta para o tipo Th1 ou Th2. O perfil misto de resposta imunológica do hamster dourado na LC já foi documentado na literatura. Em hamsters com dois meses de infecção por *L. panamensis* foi observado co-expressão de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12) e do tipo Th2 (IL-10 e TGF $\beta$ ) em lesões cutâneas (Osorio et al., 2003). Estudos da resposta imune inicial, em hamsters com sete dias após a infecção, também por *L. panamensis*, demonstraram expressão concomitante de citocinas do tipo Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-12p40) e tipo Th2 (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21) na pele infectada. Na infecção por *L. braziliensis*, no hamster, também foi observado um perfil de resposta imune misto, com aumento da expressão gênica de todos os alvos testados (IFN- $\gamma$ , TNF, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, iNOS e arginase) na pele, com 110 dias de infecção (Ribeiro-Romão et al., 2016). Esses estudos sugerem que uma resposta, provavelmente desregulada, de citocinas do tipo Th1 e Th2 contribui para o curso crônico observado na infecção no modelo hamster.

Nos animais infectados por  $10^6$  parasitos foi detectado na pata, com 15 dias após a infecção, expressão de todos os alvos analisados, e de forma significativa uma maior expressão de IFN- $\gamma$  e IL-4 em relação aos animais infectados com  $10^5$ . Os animais infectados com o inóculo  $10^5$  também expressaram TNF, TGF- $\beta$  e iNOS, com 15 dias pós-infecção. No linfonodo, observou-se que houve um maior aumento da expressão das citocinas avaliadas, com diferença significativa de IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e iNOS entre os inóculos  $10^4$  e  $10^6$ . Talvez essas diferenças na expressão de citocinas possam ser explicadas pelo fato de que animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos tendem a desencadear uma resposta mais precoce por, hipoteticamente, atingirem um limite de macrófagos infectados em menos tempo, como já citado anteriormente, com consequente produção de citocinas, desenvolvimento mais precoce da resposta adaptativa e surgimento de lesão.

No linfonodo, observou-se que com 45 dias pós-infecção, houve uma tendência do inóculo  $10^5$  induzir um aumento de expressão de algumas citocinas, se assemelhando ao inóculo  $10^6$ , principalmente em relação a IFN- $\gamma$ , arginase e iNOS. Em contrapartida, o inóculo  $10^4$  apresentou um perfil misto de expressão de citocinas, sem polarização de resposta Th1 e Th2, tanto na pata com 45 dias, como no linfonodo com 15 e 45 dias pós-infecção.

IFN- $\gamma$  é uma citocina bem conhecida como responsável pela produção NO, a partir da enzima iNOS em macrófagos ativados e isso inibe o crescimento do parasito intracelular (Sharma; Singh, 2009). Além disso, IFN- $\gamma$  promove a diferenciação de células T CD4 + para o subconjunto Th1 e inibe o desenvolvimento das células Th2 e Th17 (Alexander et al., 1999). O fato de haver uma relevante expressão de IFN- $\gamma$  e iNOs nas patas e linfonodos pode explicar a ausência de parasitos ou baixa carga parasitária encontrada no sítio inflamatório da pata na análise das diferentes cargas infectivas.

Os resultados obtidos no presente trabalho não se assemelham ao que ocorre na infecção por *L. donovani*, agente da leishmaniose visceral, na qual a expressão da arginase aumenta substancialmente (mais de mil vezes), ao passo que a expressão de iNOS, no baço de hamsters infectados, é muito baixa, sendo próxima a expressão basal dos animais não-infectados (Melby et al., 2001; Osorio et al., 2012). A redução da produção de NO em hamster infectado por *L. donovani* pode ser relacionada pelo aumento da expressão da arginase, uma vez que a arginase compete com a iNOS com o mesmo substrato necessário para síntese de NO, a L-arginina. Sendo assim o aumento da expressão de arginase se reflete na diminuição da produção de NO. A metabolização de L-arginina pela arginase leva a formação de L-ornitina, precursora da síntese de poliaminas, o que favorece o crescimento dos parasitos (Osorio et al., 2012).

No presente trabalho, verificamos uma ausência ou baixa indução de IL-4 e TGF- $\beta$ , tanto na pata quanto no linfonodo dos animais infectados por  $10^4$  parasitos, nos dois tempos analisados, ao contrário do que ocorreu com o inóculo  $10^6$ . Resultados semelhantes também foram observados no estudo de Vieira (2017). É bem documentado que essas citocinas exercem um papel importante na desativação dos macrófagos e que sua produção pode culminar em aumento da carga parasitária.

Estudos mostraram um papel importante de IL-4 na susceptibilidade à infecção por *Leishmania*. Esta citocina desempenha um papel relevante na diferenciação de células Th0 em células Th2 (Kopf et al., 1993), e é produzida principalmente por Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos ativados (Zamorano et al., 2003). A produção de IL-4 conduz à regulação positiva de arginase e a biossíntese de poliaminas que inibe a atividade leishmanicida de macrófagos e prolonga a sobrevivência de parasitos (Kropf et al., 2005).

Citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , estimulam os macrófagos classicamente ativados para liberarem NO e matar os parasitos, enquanto as citocinas Th2, tais como IL-4 e IL-13, estimulam os macrófagos alternativamente ativados a induzirem a atividade de arginase que resulta em sobrevivência do parasito e inibição da inflamação. O equilíbrio entre macrófagos classicamente ativados e macrófagos alternativamente ativados regula respostas inflamatórias e leva à homeostase no sistema de imunidade e na cicatrização de feridas (Gordon; Martinez, 2010). Esse fato pode explicar, no presente trabalho, o aumento da arginase no linfonodo com o maior inóculo ( $10^6$ ), já que foi encontrada expressão significativa de IL-4. Esse fato, em conjunto com a alta expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS sugere um equilíbrio na resposta imunológica, portanto, favorecendo a resolução da infecção, sem o surgimento de lesões ulceradas.

Outros trabalhos mostraram que na infecção por *L. major* em BALB/c, a neutralização de IL-4 inibiu o desenvolvimento da resposta Th2 e aumentou quatro vezes o nível de IFN- $\gamma$  nos linfonodos, levando a cura completa em 85% dos animais infectados e diminuição da infecção em 100% dos animais (Sadick et al., 1990). No entanto, no presente trabalho, observou-se uma baixa modulação da expressão de IL-4 no menor inóculo ( $10^4$ ), independente da quantidade de IFN- $\gamma$ . Além disso, IL-4 diminui a produção de quimiocinas que recrutam células de tipo Th1 no local da infecção (Lazarski et al., 2013). Isso pode ter influenciado no número de células recrutadas na bolsa em resposta ao menor inóculo de *Leishmania*.

Duas importantes citocinas pró-inflamatórias, IFN- $\gamma$  e TNF, são envolvidas na imunoproteção e imunopatologia da LC. Neste trabalho, a expressão de TNF na pata foi bastante parecida com a expressão de IFN- $\gamma$ , no maior inóculo, já no linfonodo a expressão de TNF foi bem menor que IFN- $\gamma$ , nos dois tempos analisados, também com o maior inóculo. TNF é principalmente produzida por macrófagos que desempenham um papel crucial na eliminação de *Leishmania*, através do aumento de atividade de macrófagos e síntese de NO (Liew et al., 1997). Esta citocina é capaz de promover respostas Th1/IFN- $\gamma$  na infecção por *L. major* (Sharma; Singh, 2009). No entanto, uma correlação positiva entre o tamanho da lesão com níveis de IFN- $\gamma$  e TNF foi observado em pacientes com LC infectados com *L. braziliensis* (Pompeu et al., 2001; Bacellar et al., 2002; Antoneli et al., 2005).

Pacientes com sinais típicos da doença apresentaram níveis excessivos de IFN- $\gamma$  e TNF com reações inflamatórias e úlceras da pele no local da infecção, enquanto em pacientes subclínicos, a produção moderada de IFN- $\gamma$  e TNF foi

associada ao controle do crescimento do parasito sem destruição tecidual (Ivonise et al., 2002). Embora a produção de IFN- $\gamma$  e TNF parece ser necessária para o controle de infecção por *Leishmania*, o aumento dos níveis dessas citocinas pode levar à destruição de tecidos e ao desenvolvimento progressivo das lesões.

TGF $\beta$  é uma citocina que é muito expressa constitutivamente na pele de animais não infectados (Ribeiro-Romão et al., 2016), desempenhando um papel central na homeostase do sistema imunológico e na tolerância imunológica. Estudos no modelo murino de infecção por *L. major* mostraram que o tratamento local com anti-TGF- $\beta$  levou a uma diminuição do número de parasitos e a uma cicatrização mais rápida das lesões, apesar de esse tratamento não ter alterado significativamente o padrão de produção de IL-4 e IFN- $\gamma$ . Além disso, TGF- $\beta$  e IL-10 parecem estar associados às formas clínicas de leishmaniose sem tendência à cura (Li et al., 1999). TGF- $\beta$  é produzido por células T CD4<sup>+</sup> (Tregs), monócitos, neutrófilos e CDs (Grotendorst et al., 1989; Gorelik; Flavell, 2002; Tran et al., 2012; Speck et al., 2014). Essa citocina aumenta a suscetibilidade à infecção por *Leishmania* pela supressão de NO, TNF e produção de IFN- $\gamma$  (Kedzierski; Evans, 2014).

Um estudo realizado por Li et al. (1999), mostrou que com a ausência de TGF- $\beta$ , mesmo com a resposta tipo Th2 dominante, níveis relativamente baixos de IFN- $\gamma$  são suficientes para ativar macrófagos e matar parasitos nas lesões. TGF- $\beta$  é uma citocina imunorreguladora crucial que limita as reações inflamatórias por uma regulação negativa de citocinas inflamatórias na leishmaniose. Considerando os achados documentados na literatura e os resultados do presente estudo, sugerimos que a baixa modulação de IL-4 e TGF- $\beta$  presente nos animais infectados por 10<sup>4</sup> propicia um controle mais eficiente da infecção, podendo influenciar o fato de esses animais induzirem um processo inflamatório discreto tanto na pata infectada com esse inóculo, quanto no tecido da bolsa desses animais. Além disso, em relação ao inóculo de 10<sup>6</sup> parasitos, vale salientar que mesmo mediante a alta expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS, as citocinas IL-4 e TGF- $\beta$  também tiveram um incremento importante na sua expressão nos animais infectados com essa concentração de parasito, o que pode contribuir para a carga parasitária mais alta desses animais.

Foi observada uma moderada expressão de IL-6 nos três inóculos analisados, nos dois tempos, tanto na pata como no linfonodo. Sabe-se que as atividades de IL-6 estão ligadas à transição da imunidade inata para a imunidade adaptativa, pois atua na manutenção da inflamação da fase aguda, progressão de doenças crônicas

e na maturação de diferentes tipos celulares, como a proliferação de células T (Jones, 2005). IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua tanto como pró e anti-inflamatória, sendo produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos, CDs e células T (Scheller et al., 2011). Para alguns autores, IL-6 é um fator de susceptibilidade na LC (Maspi et al., 2016).

A citocina IL-10 mostrou discreto aumento nos linfonodos aos 45 dias pós-infecção, no maior inóculo avaliado, apresentando inclusive diferença significativa entre  $10^4$  e  $10^6$ . Embora IL-10 seja conhecida por ser uma potente citocina imunorreguladora, ela é produzida por diferentes células da imunidade inata e da imunidade adaptativa (Belkaid et al., 2002; Saraiva; O'Garra, 2010; O'Garra; Vieira, 2007). Esta citocina está associada à susceptibilidade à leishmaniose e à persistência do parasito no local de infecção (Belkaid et al., 2001).

IL-10 atua, na verdade, suprimindo a resposta imune celular e a produção de citocinas inflamatórias (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) levando à persistência do parasito no local da infecção. Por outro lado, IL-10 inibe uma imunopatologia exacerbada e danos ao tecido através do aumento da produção de citocinas inflamatórias e desempenha um papel central na remodelação do tecido durante a cicatrização das lesões (Castellano et al., 2015). É possível sugerir que esse aumento, mesmo discreto, observado na expressão de IL-10 nos linfonodos, se deu por conta do aumento da expressão de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , na tentativa de inibir uma imunopatologia exacerbada.

A análise histopatológica da pata infectada com os três diferentes inóculos, bem como do tecido da bolsa de ar, mostrou que não houve mudanças na arquitetura do tecido em nenhuma concentração utilizada e em nenhum tempo estudado. Fato aceitável para o tecido da bolsa onde a análise foi realizada com apenas 12 horas após a introdução do inóculo. Quanto aos achados das patas, estes resultados corroboram com estudos recentes que, utilizando a mesma cepa deste trabalho, não foram observadas alterações histopatológicas importantes (Fonseca 2016). Para a quantificação do infiltrado inflamatório, neste trabalho, foi utilizada a medida por *score*, onde a intensidade do infiltrado foi pontuada de 0 a 3 (Vasconcelos et al., 2014; Ribeiro-Romão et al., 2014). Portanto, *score* mais altos, são indicativos de maior infiltrado inflamatório. Os maiores *scores* foram observados nas patas dos animais infectados com os inóculos maiores e isso corrobora com as lesões também maiores nestes animais.

O processo inflamatório foi caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório em áreas perivasculares e difusas, constituído por macrófagos,

linfócitos, plasmócitos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos, corroborando com alguns trabalhos que consideram que a fase inicial da infecção em hamster por espécies do gênero *Viannia* é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, e a reação granulomatosa se estabelece a partir de 15 dias de infecção, caracterizando a fase crônica da doença (Kahl et al., 1991).

Dentre os dois tempos pós-infecção estudados, o infiltrado inflamatório mostrou diferença significativa apenas com 45 dias entre os inóculos mais altos, em relação a  $10^4$ , e vale salientar que, apesar de não ter sido observada diferença significativa, com 15 dias pós-infecção, os inóculos apresentaram perfil do infiltrado inflamatório semelhante ao observado com 45 dias pós-infecção, ou seja, os escores foram diretamente proporcionais ao tamanho do inóculo. Também é possível observar que existe uma relação direta entre o grau de intensidade do infiltrado e tempo de infecção, já que os escores aumentam com o tempo para os três inóculos.

Tem sido relatado que pacientes de LC com lesões tardias apresentam um infiltrado inflamatório mais exuberante em comparação com os pacientes com lesões precoces (Faria et al., 2009). Com 45 dias pós-infecção, verificou-se que existe uma tendência do inóculo  $10^5$  se equiparar ao inóculo  $10^6$ . Resultados semelhantes foram obtidos nos estudos de Ribeiro-Romão e colaboradores (2014), onde foi observado um comprometimento inflamatório pouco intenso da pele em animais infectados com  $10^4$  parasitos, ao passo que extensa lesão tecidual ocorreu nos animais infectados com  $10^5$  e  $10^6$  parasitos, em um período mais tardio.

Estes achados sugerem que a resposta aos parasitos desencadeada, tanto durante a fase silenciosa (resposta anterior ao surgimento das lesões), como após essa fase (resposta gerada concomitantemente ao início das lesões), pelos inóculos mais altos ( $10^5$  e  $10^6$ ), gera uma resposta inflamatória inicial mais intensa, que se mantém até a fase crônica da infecção. Outros estudos em camundongos, também observaram que inóculo baixo de *L. major* resulta em poucas alterações histopatológicas, enquanto que o inóculo alto resulta em alterações mais graves (Kimblin et al., 2008).

A análise do infiltrado inflamatório induzido no tecido da bolsa de ar teve um perfil semelhante com os três inóculos, no tempo de 15 dias pós-infecção, porém, após 45 dias de infecção, observou-se diferença no infiltrado do tecido da bolsa entre os animais que foram previamente infectados na pata com  $10^4$  e  $10^5$  e com  $10^4$  e  $10^6$ , sugerindo que a infecção primária interferiu no processo inflamatório ocorrido após a reinfeção na bolsa de ar. Provavelmente o perfil de citocinas produzidas na

infecção primária também influenciou no tipo e quantidade de células que foram recrutadas no tecido da bolsa de ar.

Não foi observada a presença de amastigotas na análise histopatológica das patas dos animais infectados e nem no tecido da bolsa nos períodos avaliados. Achados semelhantes foram obtidos para *L. braziliensis*, onde não se observou a presença de formas amastigotas na lesão e nem nos linfonodos poplíteos (Fonseca 2016). Trabalhos relatam a presença mais frequente de amastigotas nos inóculos  $10^5$  e  $10^6$  em comparação com o inóculo  $10^4$ , na fase crônica da infecção (Ribeiro-Romão et al., 2014).

Portanto, em conjunto, os resultados deste trabalho mostram que o padrão de migração celular para a bolsa é influenciado pela presença do parasito, e quanto maior o inóculo, mais intensa é a migração celular. Além disso, os dados sugerem também uma tendência do inóculo  $10^4$  induzir um controle mais eficiente da infecção, uma vez que causa lesões mais benignas e tardias com discretas alterações histopatológicas, apresenta controle parasitário mais eficiente e induz baixa modulação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . Ao contrário, o inóculo  $10^6$  mostra tendência a um controle menos efetivo e mais tardio da infecção, causando lesões mais precoces e mesmo mediante a alta expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS, induz também IL-4 e TGF- $\beta$ , o que pode contribuir para a carga parasitária mais alta desses animais e o curso crônico da doença.

## 6 CONCLUSÕES

A partir desses resultados podemos concluir:

- O padrão de migração celular para a bolsa de ar subcutânea é influenciado pela presença do parasito, e quanto maior o inóculo de *Leishmania*, mais intensa é a migração celular, sugerindo que esse modelo pode ser utilizado para mimetizar a reação inflamatória dos tecidos;
- A quantidade e tipo de leucócitos recrutados no exsudato da bolsa de ar e as alterações histopatológicas do tecido da bolsa de ar são influenciados pela carga infectiva e pelo tempo pós-infecção da primo-infecção, sugerindo que ambos são importantes para determinar o resultado da infecção.
- A menor carga infectiva apresenta uma tendência a induzir um controle mais eficiente da infecção, uma vez que causa lesões mais benignas e tardias com discretas alterações histopatológicas, apresenta controle parasitário mais eficiente e induz baixa modulação das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ .
- A maior carga infectiva apresenta tendência a um controle menos efetivo e mais tardio da infecção, causando lesões mais precoces e maiores, e mesmo mediante a alta expressão de IFN- $\gamma$  e iNOS, induz também IL-4 e TGF- $\beta$ , o que pode contribuir para a carga parasitária mais alta, nas lesões e linfonodo de drenagem da lesão, e o curso crônico da doença.

## 7 PERSPECTIVAS

- Análise de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias expressas na bolsa de ar (RT-qPCR) e relacionar com o perfil encontrado no linfonodo de drenagem da lesão;
- Análise das principais quimiocinas expressas no tecido da bolsa de ar (RT-qPCR) e relacionar com os tipos celulares que migram para a bolsa de ar;
- Análise dos tipos de leucócitos e fenotipagem dos linfócitos predominantes no tecido da bolsa de ar e relacionar com os que migram para a bolsa de ar (Histopatologia e Imunohistoquímica).

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico*. 4. ed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier; 2013.

Aga E, Katschinski DM, Van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol*. 2002;169:898-905.

Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2010;10(1):14-9.

Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci*. 1999;112(18):2993-3002.

Almeida M, Cuba-Cuba C, Moraes M, Miles M. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol*. 1996;115:311-6.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Aug;77(2):266-74.

Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2005;101(2):226-30.

Ato M, Stäger S, Engwerda CR, Kaye PM. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*. 2002 Dec;3(12):1185-91.

Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania*. *Indian J Med Res*. 2004;119:238-58.

Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-Regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun*. 2002;70(12):6734-40.

Bachmann MF, Kopf M. Balancing protective immunity and immunopathology. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:413-9.

Badolato R, Sacks DL, Savoia D, Musso T. *Leishmania major*: infection of human monocytes induces expression of IL-8 and MCAF. *Exp Parasitol*. 1996 Jan;82(1):21-6.

Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C. Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *J Leukoc Biol*. 1992 Aug;52(2):135-42.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, et al.. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 2001;194(10):1497-506.

- Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Kadambi N, Milon G, Sacks D. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J Immunol*. 2000;165:969-77.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002;420(6915):502-7.
- Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:1-13.
- Bidri M, Feger F, Varadaradjalou S, Ben Hamouda N, Guillosson JJ, Arock M. Mast cells as a source and target for nitric oxide. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(8):1543-58.
- Bidri M, Vouldoukis I, Mossalayi MD, Debre P, Guillosson JJ, Mazier D. Evidence for direct interaction between mast cells and *Leishmania* parasites. *Parasite Immunol*. 1997;19:475-83.
- Blanchard C, Rothenberg ME. Brolong of the eosinophil. *Adv Immunol*. 2009;101:1-250.
- Blum J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Feb;53(2):158-66.
- Bogdan C, Moll H, Solbach W, Rollinghoff M. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in combination with interferon- $\gamma$ , but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. *Eur. J. Immunol*. 1990;20:1131-5.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil, grandes regiões e unidades federadas: 1980 a 2015. Brasília, DF: Sinan/SVS/MS; 2017.
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*. 1992 Jul 24;257(5069):539-42.
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA, Pereira MS, Mortara RA, Brodskyn CI, et al. CD4 + CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006;193(9):1313-22.
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*. 1994 Apr;56(4):315-25.
- Castellano LR, Argiro L, Dessen H, Dessen A, da Silva MV, Correia D, et al. Potential use of interleukin-10 blockade as a therapeutic strategy in human cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol Res*. 2015;2015:1-5.
- Castilho TM, Goldsmith-Pestana K, Lozano C, Valderrama L, Saravia NG, McMahon-Pratt D. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. *Eur J Immunol*. 2010;40:2816-29.

- Chang KP. Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30:322-33.
- Corrêa JR, Brazil RP, Soares MJ. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira et al. 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesion in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasitol Res.* 2007 May;100(6):1227-32.
- Costa DL, Cardoso TM, Queiroz A, Milanezi CM, Bacellar O, Carvalho EM, et al. Tr-1-like CD4 + CD25-CD127-/lowFOXP3- cells are the main source of interleukin 10 in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis*. *J Infect Dis.* 2015;211(5):708-18.
- Daboul MW. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* 2010;16(10):1055-8.
- Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
- de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986 Jul-Aug;28(4):253-62.
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 2005;73: 5827-34.
- de Oliveira MP, Lima MC, Calheiros AS, Martins MA, Antas PR, De Luca PM, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: human mast cell line activation induced by logarithmic and stationary promastigote derived-lysates. *Exp Parasitol.* 2005;109(2):72-9.
- de Souza Carmo EV, Katz S, Barbieri CL. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: infected macrophages. *PLoS ONE.* 2010;5(11):e13815.
- Domínguez M, Moreno I, López-Trascasa M, Toraño A. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum. *J Exp Med.* 2002 Feb 18;195(4):451-9.
- Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J Pathol.* 1981 Jun;134(2):147-56.
- Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol.* 2010;22:11-31.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998 Feb;101(4):890-8.

Faria DR, Souza PE, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009 Aug;31(8):432-9.

Feghali CA, Wright TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:12-26.

Filardy AA, Pires DR, Dos Reis GA. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to *Leishmania* infection. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(11):1863-70.

Fonseca FRM. Influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* em hamster. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Patologia] – Universidade Federal do Ceará; 2016.

Forget G, Matte C, Siminovitch K, Rivest S, Pouliot P, Olivier M. Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Eur J Immunol.* 2005;35:1906-17.

Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135-42.

Gause WC, Wynn TA, Allen JE. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(8):607-14.

Ghersetich I, Menchini G, Teofoli P, Lotti T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. *Clin Dermatol.* 1999 May-Jun;17(3):333-8.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 2014;36(8):367-76.

Gomes-Silva A, De Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, Da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, et al.. Can interferon- $\gamma$  and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 2007;149(3):440-4.

Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology.* 2013;140:771-9.

Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania* major infection. *J Exp Med.* 2011;208:1253-65.

Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32:593-604.

Gorelik L, Fields PE, Flavell RA. Cutting edge: TGF- $\beta$  inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J Immunol.* 2000;165(9):4773-7.

- Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-[beta] in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(1):46-53.
- Green SJ, Crawford RM, Hockmeyer JT, Meltzer MS, Nacy CA. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Immunol.* 1990 Dec;145(12):4290-7.
- Grotendorst GR, Smale G, Pancev D. Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils. *J Cell Physiol.* 1989;140(2):396-402.
- Guermontprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Théry C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:621-67.
- Hansen G, McIntire JJ, Yeung VP, Berry G, Thorbecke GJ, Chen L, et al. CD4+ T helper cells engineered to produce latent TGF- $\beta$ 1 reverse allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *J Clin Invest.* 2000;105(1):61-7.
- Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Trop Med Health.* 2016 Mar;44:2.
- Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med.* 1989;169:59-72.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Dermatol.* 2000 Jul;25(5):363-70.
- Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Annals of Tropical Medicine and Parasitol.* 1995;89:55-73.
- Hurrell BP, Schuster S, Grün E, Coutaz M, Williams RA, Held W, et al. Rapid sequestration of *Leishmania mexicana* by neutrophils contributes to the development of chronic lesion. *PLoS Pathog.* 2015;11(5):e1004929.
- Ivonise F, Cibele A, Olívia B, Clarissa BA, Lucas PC, Roque PA, et al. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. *Clin Infect Dis.* 2002;34(11):e54-e8.
- Jochim RC, Teixeira C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. *Trends Parasitol.* 2008;25:145-7.
- Jones SA. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol.* 2005 Sep;175(6):3463-8.
- Kahl L, Byram J, David J, Comerford S, Von Lichtenberg F. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: comparative pathology of Golden Hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44:218-32.

- Kedzierski L, Evans KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*. 2014;141(12):1-19.
- Kimblin N, Peters N, Debrabant A, Secundino N, Egen J, Lawyer P, et al. Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Jul 22;105(29):10125-30.
- Konecny P, Stagg AJ, Jebbari H, English N, Davidson RN, Knight SC. Murine dendritic cells internalize *Leishmania major* promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur J Immunol*. 1999 Jun;29(6):1803-11.
- Kopf M, Gros G, Bachmann M, Lamers M, Bluethmann H, Köhler G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 1993;362(6417):245-8.
- Kropf P, Herath S, Weber V, Modolell M, Müller I. Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2003;25(8-9):439-47.
- Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2005;6(6):600-7.
- Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 1995 Aug;25(8):2220-7.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology*. 2008;213(3-4):183-91.
- Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes: trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*. 2003 May;11(5):210-4.
- Laufs H, Müller K, Fleischer J, Reiling N, Jahnke N, Jensenius JC, et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*. 2002;70:826-35.
- Lazarski CA, Ford J, Katzman SD, Rosenberg AF, Fowell DJ. IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance. *PLoS ONE*. 2013;8:e71949.
- Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:432-6.
- Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing *in vivo* nitric oxide production. *J Immunol*. 1999;162(2):974-9.
- Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997;352(1359):1311-15.

- Lima GMAC, Vallochi AL, Silva VR, Bevilacqua EMAF, Kiffer MMF, Abrahamson IA. The role of polymorphonuclear leukocytes in the resistance to cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 1998;64:145-51.
- Lo SK, Bovis L, Matura R, Zhu B, He S, Lum H, et al. Leishmania lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractants. *J Immunol.* 1998 Feb;160(4):1857-65.
- Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009;182(5):3039-46.
- Lucas PJ, Kim SJ, Melby SJ, Gress RE. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor. *J Exp Med.* 2000;191(7):1187-96.
- Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(8):438-44.
- Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trend Cell Biol.* 2005;15(11):599-607.
- Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health.* 2016 Sep;110(6):247-260.
- Matheoud D, Moradin N, Bellemare-Pelletier A, Shio MT, Hong WJ, Olivier M, et al. *Leishmania* evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. *Cell Host Microbe.* 2013;14(1):15-25.
- Matsukura Y, Takagi T, Okamoto R, Koshino T. Upregulation of CD44 in the inflamed mouse air pouch injected with synthetic lipid A. *J Rheumatol.* 1998 Mar;25(3):539-45.
- Matte C, Olivier M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis.* 2002;185(5):673-81.
- Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *Faseb J.* 2006;20(14):2460-7.
- McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y, Tato CM, Blumenschein W, McClanahan T, et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol.* 2007;8(12):1390-7.
- Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A review: the current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015 Sep 3;9(9):e0003889.
- Mehregan DR, Mehregan AH, Mehregan DA. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1999 May-Jun;17(3):297-304.

- Melby PC, Tabares A, Restrepo BI, Cardona AE, McGuff HS, Teale JM. *Leishmania donovani*: evolution and architecture of the splenic cellular immune response related to control of infection. *Exp Parasitol*. 2001 Sep;99(1):17-25.
- Moll H, Flohé S, Blank C. Dendritic cells seclude *Leishmania* parasites that persist in cured mice: a role in the maintenance of T-cell memory? *Adv Exp Med Biol*. 1995;378:507-9.
- Moll H. The role of dendritic cells at the early stages of *Leishmania* infection. *Adv Exp Med Biol*. 2000;479:163-73.
- Moskowitz NH, Brown DR, Reiner SL. Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. *Infect Immun*. 1997;65(6):2448-50.
- Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):5998-6004.
- Nacy CA, Meltzer MS, Leonard EJ, Wyler DJ. Intracellular replication and lymphokine-induced destruction of *Leishmania tropica* in C3H/ HeN mouse macrophages. *J Immunol*. 1981;127(6):2381-6.
- Nacy CA, Meltzer MS. T-cell-mediated activation of macrophages. *Curr Opin Immunol*. 1991 Jun;3(3):330-5.
- Nakajima H, Gleich GJ, Kita H. Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J Immunol*. 1996 Jun 15;156(12):4859-66.
- Neal RA, Hale C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World leishmaniasis. *Parasitology*. 1983;87(Pt 1):7-13.
- Noben-Trauth N, Kropf P, Muller I. Susceptibility to *Leishmania major* Infection in Interleukin-4-deficient mice. *Science*. 1996;271(5251):987-90.
- Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis*. 2014;209(8):1288-96.
- Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol*. 2009;183(12):8088-98.
- Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2012;34(12):551-61.
- O'Garra A, Vieira P. TH1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(6):425-8.
- Olekhovitch R, Ryffel B, Muller AJ, Bousso P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *J Clin Invest*. 2014;124:1711-22.

- Oliveira CI, Barral-Netto M. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. GMBahia. 2005;75:35-45.
- Oliveira CI, Teixeira MJ, Gomes R, Barral A, Brodskyn C. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. Drug Discov Today Dis Models. 2004;1(1): 81-86.
- Osorio EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, et al. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. PLoS Pathog. 2012 Jan;8(1):e1002417.
- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín N, Travi BL. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. Parasite Immunol. 2003;25:139-48.
- Padigel UM, Lee JJ, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. Infect Immun. 2006;74(6):3232-8.
- Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. Adv Exp Med Biol. 2005;560:11-8.
- Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. Nat Rev Immunol. 2014;14(5):289-301.
- Paul C, Wolff S, Zapf T, Raifer H, Feyerabend TB, Bollig N, et al. Mast cells have no impact on cutaneous leishmaniasis severity and related Th2 differentiation in resistant and susceptible mice. Eur J Immunol. 2016 Jan;46(1):114-21.
- Pearson DP, Sousa AQ, Jeronimo SMB. Leishmania species: visceral (Kala- Azar), cutaneous and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dulin R. Principles and practice of infectious diseases. 5. ed. New York: Churchill Livingstone, 2000. p. 2831-44.
- Pearson RD, Romito R, Symes PH, Marcus JL. Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human monocyte-derived macrophages: parasite entry, intracellular survival, and multiplication. Infect Immun. 1981;32:1249-53.
- Pearson RD, Sousa AQ, Jeronimo SMB. *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: Mandell GL, Bennett J, Dolin R, editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingston; 2005. p. 2832-45.
- Peniche AG, Bonilla DL, Palma GI, Melby PC, Travi BL, Osorio EY. A secondary wave of neutrophil infiltration causes necrosis and ulceration in lesions of experimental American cutaneous leishmaniasis. PLoS ONE. 2017;12(6): e0179084.
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science. 2008;321(5891):970-4.

- Pompeu ML, Freitas LAR, Santos MLV, Khouri M, Barral-Netto M. Granulocytes in the inflammatory process of BALB/c Mice Infected by *Leishmania amazonensis*: a quantitative approach. *Acta Trop*. 1991;48(3):185-93.
- Pompeu MM, Brodskyn C, Teixeira MJ, Clarencio J, Van Weyenberg J, Coelho IC, et al. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect Immun*. 2001;69(12):7453-60.
- Prina E, Abdi SZ, Lebastard M, Perret, E, Winter N, Antoine CJ. Dendritic cells as host cells for the promastigote and amastigote stages of *Leishmania amazonensis*: the role of opsonins in parasite uptake and dendritic cell maturation. *J. Cell Science*. 2004;117:315-25.
- Qadoumi M, Becker I, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2002;70:4638-42.
- Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early antileishmania response. *PLoS Pathog*. 2012;8(2):e1002536.
- Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4454-62.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, et al. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun*. 2014;82(12):5203-13.
- Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, Da-Cruz AM, Pinto EF, Moreira OC. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors*. 2016 Jun 27;9(1):361.
- Ritter U, Körner H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2002 Jun;24(6):295-301.
- Ritter U, Moll H. Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates the killing of *leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN-gamma and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol*. 2000 Nov;30(11):3111-20.
- Robert A, Nezamis JE. The granuloma pouch as a routine assay for antiphlogistic compounds. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1957 May;25(1):105-12.
- Rodríguez NE, Wilson ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res*. 2014;59:129-41.
- Romao PR, Da Costa Santiago H, Ramos CD, De Oliveira CF, Monteiro MC, De Queiroz Cunha F. Mast cell degranulation contributes to susceptibility to *Leishmania major*. *Parasite Immunol*. 2009;31(3):140-6.

- Rousseau D, Demartino S, Ferrua B, Michiels JF, Anjuère F, Fragaki K, et al. In vivo involvement of polymorphonuclear neutrophils in *Leishmania infantum* infection. *BMC Microbiol.* 2001;1:17.
- Rull M, Clayburne G, Sieck M, Schumacher HR. Intra-articular corticosteroid preparations: different characteristics and their effect during inflammation induced by monosodium urate crystals in the rat subcutaneous air pouch. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Sep;42(9):1093-100.
- Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(11):845-58.
- Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol.* 1994;153(8):3514-22.
- Sadick MD, Heinzl FP, Holaday BJ, Pu RT, Dawkins RS, Locksley RM. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *J Exp Med.* 1990;171(1):115-27.
- Saha B, Saini A, Germond R, Perrin PJ, Harlan DM, Davis TA. Susceptibility or resistance to *Leishmania* infection is dictated by the macrophages evolved under the influence of IL-3 or GM-CSF. *Eur J Immunol.* 1999;29(7):2319-29.
- Salay G, Dorta ML, Santos NM, Mortara RA, Brodskyn C, Oliveira CI, et al. Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14:1173-81.
- Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(3):170-81.
- Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(12):965-75.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The proand anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Mol Cell Res.* 2011;1813(5):878-88.
- Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* 2007;96:41-101.
- Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. Signal integration between IFN $\gamma$  and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiol.* 2006;211(6-8):511-24.
- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016.16:581-92.
- Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous manifestations of human and leishmaniasis. *Int J Mol Sci.* 2017. 18 (6): 1296.
- Scott P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol.* 2005; 7:1707-13.

- Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):247-58.
- Sedgwick AD, Moore AR, Al-Duaij AY, Edwards JC, Willoughby DA. The immune response to pertussis in the 6-day air pouch: a model of chronic synovitis. *Br J Exp Pathol*. 1985 Aug;66(4):455-64.
- Sedgwick AD, Sin YM, Edwards JC, Willoughby DA. Increased inflammatory reactivity in newly formed lining tissue. *J Pathol*. 1983 Dec;141(4):483-95.
- Selye H. Induction of topical resistance to acute tissue injury: an experimental study with the granuloma pouch technique. *Surg Clin North Am*. 1953a;97:1417-46.
- Selye H. Use of the "granuloma pouch" technic in the study of antiphlogistic corticoids. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953b Feb;82(2):328-33.
- Sharma U, Singh S. Immunobiology of leishmaniasis. *Indian J Exp Biol*. 2009;47(6):412-23.
- Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki A. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the goldenhamster model. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40:627-30.
- Sousa AQ, Pompeu MM, Sólón FR, Frutuoso MS, Teixeira MJ, Silva TM. Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. *Braz J Infect Dis*. 2006 Jun;10(3):230.
- Souza-Lemos C, de-Campos SN, Teva A, Côrte-Real S, Fonseca EC, Porrozzi R, et al. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol*. 2008 Nov;216(3):375-86.
- Speck S, Lim J, Shelake S, Matka M, Stoddard J, Farr A, et al. TGF- $\beta$  signaling initiated in dendritic cells instructs suppressive effects on Th17 differentiation at the site of neuroinflammation. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e102390.
- Spellberg B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci*. 2000;67(5):477-502.
- Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R  $\beta$ 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med*. 1997;185(5):817-24.
- Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4<sup>+</sup> Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol*. 2000 Sep;165(5):2628-36.
- Taylor PE, Tejada C, Sanchez M. The effect of malnutrition on the inflammatory response as exhibited by the granuloma pouch of the rat. *J Exp Med*. 1967 Oct;126(4):539-56.

- Teixeira MJ, Fernandes JD, Teixeira CR, Andrade BB, Pompeu ML, Santana da Silva J, et al. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun*. 2005 Feb;73(2):1191-5.
- Thalhofer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum chagasi*. *Infect Immun*. 2011;79(1):108-17.
- Titus RG, DeKrey GK, Morris RV, Soares MBP. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. *Infect Immune*. 2001;69(8):5189-92.
- Tran DQ. TGF- $\beta$ : the sword, the wand, and the shield of FOXP3+ regulatory T cells. *J Cell Mol Biol*. 2012;4(1):29-37.
- Travi B, Rey-Ladino J, Saravia N. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in goldenhamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. *J Parasitol*. 1988 Dec;74(6):1059-62.
- Tuon FF, Duarte MI, Amato VS. A quantitative and morphometric study of mast cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2008;30(11-12):641-5.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 2002 Dec;186(12):1829-34.
- van Zandbergen G, Hermann N, Laufs H, Solbach W, Laskay T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. *Infect Immun*. 2002;70(8):4177-84.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 2004;173(11):6521-5.
- Vasconcelos CO, Coêlho ZCB, Chaves CS, Teixeira CR, Pompeu MML, Teixeira MJ. Distinct cellular migration induced by *Leishmania infantum chagasi* and saliva from *Lutzomyia longipalpis* in a hemorrhagic pool model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2014;56(1):21-7.
- Vasconcelos IA, Vasconcelos AW, Momen H, Grimaldi G Jr, Alencar JE. Epidemiological studies on American leishmaniasis in Ceará State, Brazil. Molecular characterization of the *Leishmania* isolates. *Ann Trop Med Parasitol*. 1988 Dec;82(6):547-54.
- Venuprasad K, Banerjee PP, Chattopadhyay S, Sharma S, Pal S, Parab PB, et al. Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN- $\gamma$  secretion and restriction of *Leishmania* growth. *J Immunol*. 2002;169(2):920-8.
- Vieira LR. Avaliação das alterações imunopatológicas das lesões cutâneas por *Leishmania (viannia) braziliensis* no modelo hamster dourado (*mesocricetus auratus*). Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Ciências] – Instituto Oswaldo Cruz; 2017.

von Stebut E, Ehrchen JM, Belkaid Y, Kostka SL, Molle K, Knop J, et al. Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. *J Exp Med*. 2003;198(2):191-9.

von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 2007 Mar-Apr;17(2):115-22.

Wershil BK, Theodos CM, Galli SJ, Titus RG. Mast cells augment lesion size and persistence during experimental *Leishmania major* infection in the mouse. *J Immunol*. 1994;152(9):4563-71.

Wilhelm P, Ritter U, Labbow S, Donhauser N, Rollinghoff M, Bogdan C, et al. Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking tnf. *J Immunol*. 2001;166(6):4012-19.

Wilson H, Dieckmann B, Childs B. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp Parasitol*. 1979;47(47):270-83.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. 2017 [acesso em 27 jul 2017]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

Zamorano J, Rivas M, Perez G. Interleukin-4: a multifunctional cytokine. *Immunologia*. 2003;22(2):215-24.

Zeledón R, Blanco E, De Monge E. Comparative experimental infections with Costa Rican strains of *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911. *Acta Trop*. 1969;26(2):136-55.

## 9 APÊNDICES E/OU ANEXOS



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 92/2014, sobre o projeto intitulado: “**INFLUÊNCIA DO INÓCULO DE *Leishmania brazilienses* NA REAÇÃO INFLAMATÓRIA, EVOLUÇÃO E GRAVIDADE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO MODELO HAMSTER**”, de responsabilidade da Profª. Drª. Maria Jania Teixeira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 30 de outubro de 2014.

Fortaleza, 03 de novembro de 2014

  
Profª. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA