



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

FRANCISCO RAFAEL MARCIANO FONSECA

INFLUÊNCIA DA CARGA PARASITÁRIA E DO SÍTIO DE INOCULAÇÃO NA
IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania*
braziliensis EM HAMSTER

FORTALEZA

2016

FRANCISCO RAFAEL MARCIANO FONSECA

INFLUÊNCIA DA CARGA PARASITÁRIA E DO SÍTIO DE INOCULAÇÃO NA
IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania*
braziliensis EM HAMSTER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Medicina II.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F744i Fonseca, Francisco Rafael Marciano.
Influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na imunopatogênese da Leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* em hamster / Francisco Rafael Marciano Fonseca. – 2016.
77 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Medicina II.
Orientação: Profa. Dra. Maria Jania Teixeira.
1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose Cutânea. 3. Citocinas. I. Título.

CDD 616.9364

FRANCISCO RAFAEL MARCIANO FONSECA

INFLUÊNCIA DA CARGA PARASITÁRIA E DO SÍTIO DE INOCULAÇÃO NA
IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania*
braziliensis EM HAMSTER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.
Área de concentração: Medicina II.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Jania Teixeira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Erika Freitas Mota
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Eddie William de Pinho Santana
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Maria Marciano Fonseca e
João Rodrigues Fonseca (in memoriam).
Aos meus irmãos, Jamily Marciano Fonseca
e Francisco Daniel Marciano Fonseca.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Jania Teixeira, por suas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho e pelo incentivo ao crescimento profissional. Agradeço também por sua disponibilidade, atenção, paciência, carinho e, principalmente, pelo apoio nos momentos mais difíceis, que para mim e para os outros alunos é de um valor inestimável; sempre lembrarei e terei como referência por toda minha vida.

Aos professores do Mestrado pelo conhecimento e experiência compartilhados.

Aos membros do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (IOC - FIOCRUZ/RJ), que me receberam muito bem e cederam seu espaço, tecnologia e material para realizar parte deste trabalho. Em especial, agradeço à Professora Dra. Alda Maria da Cruz, à Dra. Raquel Peralva Ribeiro Romão e à Ms. Andrea Franco Saavedra pela grande ajuda na técnica de PCR em tempo real.

À Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu e Diane Isabelle Magno Cavalcante pela aprendizagem e auxílio nas análises histopatológicas.

À agência de fomento à pesquisa CAPES, pelo apoio financeiro para a realização dessa dissertação, por meio da bolsa para estudante de mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML/UFC, em especial à Valéria Cordeiro de Oliveira, Paula da Paz Palácio e Lucineide por sua disponibilidade e eficiência n'a resolução de todos os assuntos administrativos.

À Profa. Dra. Cristina de Souza Chaves, chefe do Setor de Estudos em Parasitologia no DPML, pela oportunidade de trabalhar no laboratório.

Um agradecimento especial aos amigos do laboratório Naya Lúcia, Rafaelle de Paula Freire, Carrel Xavier, Thially Braga Gonçalves, Weberty Miek, Pedro Sindeaux, Allan Rodrigo Soares Maia, Jeane, Priscila, Germana, Marília, Laercio e Brunheld Maia, pelo valioso auxílio, sempre que necessário, e pelo companheirismo na convivência diária do laboratório.

Aos meus amigos Wallace Cruz e Bruno Carvalho, companheiros desde os tempos da graduação em Ciência Biológicas, que acompanharam esse processo de pesquisa e me apoiaram a seguir com meus objetivos.

À toda minha família, em especial aos meus queridos pais, João Rodrigues Fonseca (*in memoriam*) e Maria Marciano Fonseca, e irmãos, Jamily Marciano Fonseca e Francisco Daniel Marciano Fonseca, que são meus grandes amigos e companheiros, aos quais agradeço pelos ensinamentos de uma vida inteira.

Aos meus tios, Francineide Rodrigues Fernandes, José Maria Fernandes e Lúcia de Fátima Rodrigues Lima, por terem me ajudado por um certo período da minha vida e me apoiado em todos os momentos, permitindo, assim, que hoje eu alcançasse mais essa conquista.

Aos colegas da turma de mestrado, que ingressaram juntamente comigo no curso de pós-graduação em Patologia, em 2014.1, pelos momentos compartilhados ao longo desses dois anos.

A Deus, por Essa existência e pelos desafios e bençãos.

RESUMO

Leishmania braziliensis é o principal agente causador de leishmaniose cutânea no Brasil, e apesar de sua importância para a Saúde Pública, há carência de um modelo experimental que possa ser usado para testar novas terapias e vacinas. O objetivo deste estudo foi investigar a influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* em hamster no modelo de infecção na derme da orelha. Grupos de animais (n=48) foram infectados por via intradérmica, na orelha (n=24) ou na pata (n=24), com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*. Em seguida, outros grupos de animais (n=32) foram infectados por via intradérmica na orelha, com 10^5 (n=16) ou 10^6 (n=16) promastigotas. As lesões foram medidas a cada 5 dias por 60 dias. Os animais foram eutanasiados com 30, 45 e 60d.p.i., e coletados a orelha e pata infectada, linfonodos (retromaxilar ou poplíteo), fígado e baço, para a avaliação da carga parasitária, expressão de mediadores inflamatórios e análise das alterações histopatológicas. As lesões surgiram com 20d.p.i., tanto na pata como na orelha. As lesões na orelha ulceraram e foram maiores ($p < 0,0001$) ao contrário das lesões da pata, que se apresentaram como pequenos nódulos, sem úlceras. Na orelha foi observada significativa carga parasitária após 30, 40 e 60d.p.i., tanto na lesão como no linfonodo, sendo a carga parasitária sempre maior na lesão. Independente da via de inoculação, o fígado e baço não estavam aumentados, não apresentavam nódulos e nem parasitos. No linfonodo retromaxilar, observou-se uma maior expressão das citocinas inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-6 e da enzima arginase, com 30 e 60d.p.i., e isso foi corroborado com as alterações histológicas observadas na orelha, processo inflamatório mais intenso e cronicidade da doença. Ao contrário, no linfonodo poplíteo (pata), apresentou um misto de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, sugerindo uma regulação bem precoce da resposta imunológica e inflamatória. Observou-se também que quanto maior o inóculo, mais intensa a resposta inflamatória e maiores as lesões, entretanto, sem disseminação do parasito para fígado e baço, sugerindo menor comprometimento sistêmico e maior tempo de sobrevivência para o animal. Em suma, os dados indicam que o inóculo de 10^5 parasitos no modelo de infecção na orelha poderia facilitar a visualização de um possível efeito protetor de novos fármacos ou candidatos vacinais.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Leishmaniose cutânea. Hamster. Orelha. Pata. Citocinas.

ABSTRACT

Leishmania braziliensis is the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in Brazil and despite its importance for public health, there is a lack of an experimental model that can be used for testing new therapies and vaccines. The aim of this study was to investigate the influence of parasite burden and the inoculation site in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in hamsters using ear dermis infection model. Groups of animals (n = 48) were infected intradermally in the ear (n = 24) or paw (n = 24) with 10^5 promastigotes of *L. braziliensis*. Afterwards, other groups of animals (n=32) were infected intradermally in the ear with 10^5 (n=16) or 10^6 (n=16) promastigotes. The lesions were measured every 5 days for 60 days. The animals were euthanized at 30, 45 and 60 d.p.i., and had their infected ears and paws, as well as lymph nodes (retromaxilar or popliteal), livers and spleens collected for evaluation of parasite burden and expression of inflammatory mediators, and analysis of histopathological changes. The lesions arose at 20 d.p.i. both paw and ear. The ear lesions ulcerated and were bigger ($p < 0.0001$) in contrast to paw lesions that presented themselves as small nodules without ulcers. It was observed significant parasitic burden in the ear after 30, 40 and 60 d.p.i. at the lesion and in the lymph node, with parasite burden being always bigger at the lesion. Regardless of the route of inoculation, neither liver and spleen were enlarged nor had lumps or parasites. In the retromaxillary lymph node, it was observed a greater expression of inflammatory cytokines IFN- γ , TNF- α and IL -6 and the enzyme arginase, 30 and 60 d.p.i., and it was corroborated by histological changes observed in the ear, intenser inflammatory process and chronicity of the disease. On the contrary, the popliteal lymph node (paw) presented a combination of pro and anti-inflammatory cytokines indicating a precocious regulation of immune and inflammatory response. It was also observed that the bigger the inoculum, the more intense the inflammatory response and bigger the lesions, however, without parasite dissemination to the liver and spleen, indicating lesser systemic commitment and increased survival time of the animal. In short, the data indicates that the inoculum of 10^5 parasites through the ear dermis infection model could make easier the visualization of a possible protective effect of new drugs or vaccine candidates.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Cutaneous leishmaniasis. Hamster. Ear. Paw. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, 2013.....	15
Figura 2 – Ciclo biológico de <i>Leishmania sp.</i>	18
Figura 3 – Fotomicrografias dos aspectos das lesões nas orelhas e patas durante o curso de infecção.....	42
Figura 4 – Fotomicrografias dos aspectos das lesões nas orelhas de hamster após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Espessura da lesão de hamsters infectados na orelha ou na pata com 10^5 promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	42
Gráfico 2 – Carga parasitária em hamsters infectados na orelha ou na pata (A) e linfonodos (B) com 10^5 promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	44
Gráfico 3 – Expressão de mediadores inflamatórios em linfonodos retromaxilar (A) e poplíteo (B) de hamsters infectados por <i>L. braziliensis</i>	46
Gráfico 4 – Espessura da lesão de orelha de hamsters após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	50
Gráfico 5 – Carga parasitária de orelha de hamster após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	51
Gráfico 6 – Expressão de mediadores inflamatórios no linfonodo regional de hamsters após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alvos e sequências de <i>primers</i> de hamster utilizados nos ensaios de RT PCR em Tempo Real.....	39
Tabela 2	Alterações histopatológicas na lesão de orelha ou pata de hamster infectados com inócuos de 10^5 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i> ..	48
Tabela 3	Alterações histopatológicas na lesão de orelha de hamster infectado com inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN	Interferon
IL	Interleucina
LT	Leishmaniose tegumentar
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCDif	Leishmaniose cutânea difusa
LCDiss	Leishmaniose disseminada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
NO	Óxido nítrico
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA _m	RNA mensageiro
SBF	Soro bovino fetal
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
TNF	Fator de necrose tumoral
SMF	Sistema fagocítico mononuclear
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do Tipo 2
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do Tipo 2
RT-qPCR	Transcrição Reversa quantitativa da reação em cadeia pela polimerase
Ct	CycleThreshold
Rv	Reverse
Fw	Forward

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Aspectos gerais das leishmanioses.....	15
1.2	Modelo experimental: hamster dourado.....	22
1.3	Hamster dourado como modelo experimental para leishmaniose tegumentar americana.....	24
1.4	Aspectos imunopatológicos e curso da infecção no modelo hamster da leishmaniose tegumentar americana.....	25
1.5	Influência do sítio de inoculação no modelo hamster na leishmaniose tegumentar americana.....	29
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL	33
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICOS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Desenho experimental.....	34
4.2	Animais e declaração de ética.....	34
4.3	Parasitas.....	35
4.4	Infecção experimental e acompanhamento da lesão.....	35
4.5	Avaliação da carga parasitária.....	36
4.6	Ensaio de RT PCR em tempo real.....	36
4.7	Análise histopatológica.....	37
4.8	Análise estatística.....	39
5	RESULTADOS	41
5.1	Comparação do modelo de infecção intradérmica da orelha com o modelo de infecção intradérmica na pata.....	41
5.1.1	Avaliação do sítio de inoculação no curso clínico das lesões por <i>Leishmania braziliensis</i>	41
5.1.2	Carga parasitária nos diferentes sítios de inoculação e nos linfonodos retromaxilar e poplíteo.....	43
5.1.3	Perfil da expressão gênica de mediadores inflamatórios em linfonodos retromaxilar e poplíteo de hamsters infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	45
5.1.4	Avaliação da reação inflamatória nos diferentes sítios de inoculação	47

5.2	Comparação de diferentes inóculos no modelo de infecção intradérmica da orelha.....	49
5.2.1	Curso clínico das lesões causadas por <i>L. braziliensis</i> em orelha de hamster.....	49
5.2.2	Avaliação da carga parasitária na orelha com inóculos 10^5 ou 10^6 de <i>L. braziliensis</i>	50
5.2.3	Expressão de mediadores inflamatórios no linfonodo regional de orelha infectada com inóculos 10^5 ou 10^6 de <i>L. braziliensis</i>	52
5.2.4	Avaliação da reação inflamatória nos diferentes inóculos na orelha.....	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO I	78

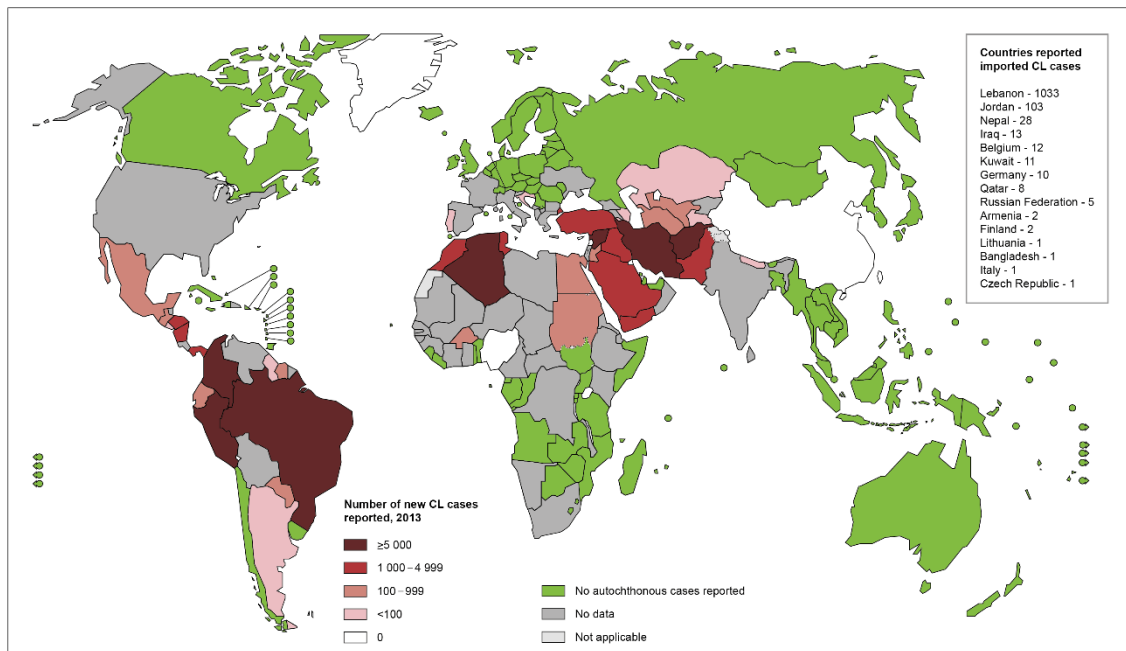
1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública, e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (DESJEUX, 2004; BRASIL, 2010).

As leishmanioses constituem doenças endêmicas em regiões tropicais, subtropicais, em 98 países distribuídos em todos os continentes, exceto Antártida e Oceania, e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (DESJEUX, 2004; ALVAR et al., 2012; WHO, 2015). Dados da OMS indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas ao ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015) (Figura 1).

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



FONTE: Adaptado de WHO, 2015.

A OMS estima que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e aproximadamente dois milhões de novos indivíduos são infectados anualmente. Esta afecção apresenta uma incidência anual de dois milhões de casos de diferentes

formas clínicas, sendo 1,5 milhão de casos de LT e 500.000 de casos de LV que representa a forma mais grave da doença com aproximadamente 59 mil óbitos ao ano, sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda em número de óbitos, perdendo apenas para a malária (ALVAR et al., 2006; LIMA et al., 2007; WHO, 2015).

Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A distribuição da LT é mais ampla, ocorrendo nas Américas, Região Mediterrânea, Ásia Ocidental e Central e no Oriente Médio. Dez países apresentam de 70 a 75% dos casos mundiais de LT: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru. (DESJEUX, 2004; DEN BOER et al., 2011; WHO, 2015). Nota-se que o Brasil é um país com grande importância epidemiológica, pois é endêmico para ambas as formas da doença, com uma média anual de 18,2 mil casos de LC notificados em 2013 e aproximadamente 3,2 mil casos de LV no período de 2011 a 2013 (OPAS; OMS, 2015).

No continente Americano a leishmaniose cutânea é nomeada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e apresenta um espectro de manifestações clínicas, variando desde uma doença benigna como a leishmaniose cutânea localizada, que tende para cura espontânea, até formas graves da doença como a leishmaniose mucosa e a disseminada (ALVAR et al., 2012; DA-CRUZ; PIRMEZ, 2012).

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade e referida em documentos históricos desde tempos antigos (MONTEIRO, 2009). Estudos arqueológicos realizados no Peru revelaram figuras humanas mutiladas em cerâmica, hoje se sabendo como LTA, mas que por alguns anos foram confundidas com a apresentação clínica da sífilis (GOMES et al., 2014).

No Brasil, Moreira (1895) identificou pela primeira vez a existência do botão endêmico dos países quentes, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. A confirmação de formas de *Leishmania* em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas ocorreu no ano de 1909, quando Lindenbergh encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Splendore (1911) diagnosticou a forma mucosa da doença e o médico Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *Leishmania brasilienses* (BRASIL, 2014).

No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel do inseto flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar e Forattini (1958) encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo. Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as unidades federadas (BRASIL, 2014).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são aproximadamente 30 espécies diferentes, das quais cerca de treze estão associadas à doença humana, causadores das formas tegumentares, podem ser subdivididos em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, possuindo padrões epidemiológicos distintos e algumas espécies com acentuada preferência por reservatórios específicos (MOMEM; CUPOLILLO, 2000). Espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia* estão implicadas na LTA, sendo 90% dos casos causados por *L. (V.) braziliensis* (DEN BOER et al., 2011). No Brasil, as espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, mais frequentemente associadas à doença humana são as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2012).

Os agentes causadores da leishmanioses são protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae), que são parasitos encontrados no tubo digestório de flebotomíneos na forma de promastigota e no Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) dos hospedeiros vertebrados na forma de amastigota (ROSS, 1903; REY, 2008; WHO, 2015).

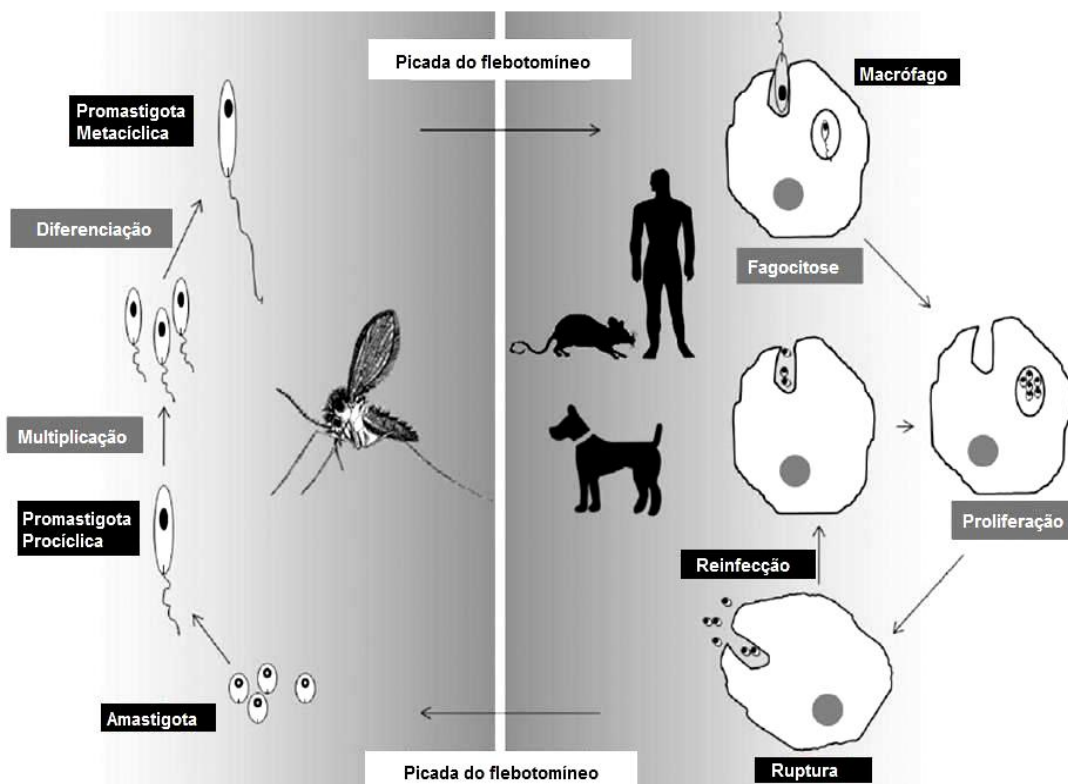
A principal forma de transmissão das leishmanioses é vetorial por intermédio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas, pertencentes à subfamília Phlebotominae (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) (REY, 2008; ELMAHALLAWY et al., 2014). Os flebotomíneos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes (silvestres, rurais e urbanos) (MIRANDA; DIAS, 2011). Quanto aos vertebrados, uma grande variedade de mamíferos como canídeos, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos e primatas, inclusive o homem, são susceptíveis à infecção por *Leishmania* spp. (BRASIL, 2014).

A *Leishmania* é um parasito digenético, cujo ciclo vital se passa em hospedeiros vertebrado e invertebrado, apresentando-se sob duas formas evolutivas: amastigotas, que são estruturas arredondadas, com flagelo interiorizado, que se localizam em células fagocitárias de vertebrados, sobretudo macrófagos; e promastigotas, que são formas alongadas, providas de flagelo livre, e que se

desenvolvem no tubo digestivo do inseto vetor (REY, 2008).

Durante a hematofagia, as formas promastigostas presentes nas glândulas salivares dos flebotomíneos fêmeas são inoculadas na junção derme-epiderme do hospedeiro vertebrado. Nesse local ocorre a fagocitose dos parasitos, que irão se transformar em amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo de células do SMF, entre elas o macrófago. No interior dessas células os amastigotas multiplicam-se por divisão binária e são responsáveis pelas infecções, que podem persistir por toda vida no hospedeiro. Para continuidade da transmissão, flebotomíneos fêmeas, durante o repasto sanguíneo, podem ingerir formas amastigotas do hospedeiro infectado. No interior do inseto uma nova transformação ocorre, e após um período de divisão as formas denominadas promastigotas metacíclicas se instalam na região das glândulas salivares do inseto, o que permite a transmissão do protozoário para um novo hospedeiro durante novo repasto sanguíneo (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). (Figura 2)

Figura 2: Ciclo biológico de *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de VAN ASSCHE et al., 2011.

A lesão inicial ocorre após a picada do flebotomíneo contaminado pelas formas promastigotas do parasito. Forma-se uma mácula, que a partir de duas

semanas pode apresentar um nódulo e/ou pápula eritematosa pequena e pruriginosa (GOTO; LINDOSO, 2012). A apresentação das lesões formadas dependerá da espécie do agente etiológico envolvido (GOTO; LINDOSO, 2012; CFSPH, 2015), além da genética e do estado imunológico do hospedeiro (KALANTARI, et al., 2014), podendo ser: ulceradas, nodulosas e lisas, placas planas ou verrugosas com hiperqueratose; estas lesões podem permanecer localizadas e evoluírem para cura espontânea, ou através dos vasos linfáticos, se disseminarem e produzirem lesões secundárias em outras regiões da pele e mucosas (CFSPH, 2015).

No Brasil, principalmente três espécies de *Leishmania* são associadas à leishmaniose tegumentar: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (COUTINHO et al., 1987; BRASIL, 2010). Essas espécies são capazes de produzir a forma clínica mais frequente da doença, a leishmaniose cutânea localizada (LCL), que representa 50-75% dos casos da doença. Embora os aspectos clínicos da LCL variem de acordo com a espécie, a lesão clássica inicia-se como uma pápula ou nódulo no sítio da inoculação que expande lentamente (REITHINGER et al., 2007), evoluindo para uma lesão ulcerativa na pele, que é a apresentação clínica mais comum da LTA, caracterizada por baixo parasitismo tecidual, sendo considerada benigna uma vez que responde bem à terapêutica antimonial, podendo mesmo evoluir para a cura espontânea (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2012). A LCL pode também evoluir para outras formas clínicas: leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LD) (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2005; BRASIL, 2010).

A LM causa parcial ou total mutilação nas membranas mucosas do nariz, boca e garganta, com destruição de tecido epitelial, com elevada morbidade e, em alguns casos, levando à morte (PEARSON et al., 2000; RODRIGUES et al., 2006). No caso de infecção por *L. braziliensis*, cerca de 3 a 5% dos indivíduos infectados evoluem para leishmaniose mucosa. Nessa apresentação clínica, a exacerbação da resposta imunológica aos antígenos de *Leishmania* e a cronicidade da doença impõem dificuldades no manejo terapêutico, a despeito da escassez de parasitos. Em geral as lesões de LM são mais resistentes ao tratamento, exigindo doses maiores de drogas e recidivando com mais frequência que a forma cutânea. Além dos aspectos patogênicos da infecção, existem indivíduos nas áreas endêmicas que estão expostos ao parasito, mas que não desenvolvem a doença, sendo considerados assintomáticos ou subclínicos (DA-CRUZ; PIRMEZ, 2012).

A LCD é a forma anérgica da leishmaniose tegumentar, caracterizada por lesões múltiplas não ulceradas contendo alto número de parasitos e baixa ou inexistente resposta imunológica celular. Nas Américas, seus agentes causadores são espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* e ao complexo mexicana: *L. venezuelensis*, *L. pifanoi*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (PIRMEZ et al., 1993; BOMFIM et al., 1996). No Brasil está associada principalmente à *L. amazonensis* (LAINSON, 1983; GRIMALDI; TESH, 1993). A resposta à terapêutica na LCD é mais difícil que nas outras formas clínicas e as recidivas são frequentes (BRASIL, 2013).

A LD da LTA é uma expressão relativamente rara que pode ser observada em até 2% dos casos e frequentemente confundida com a forma LCD. Foi descrita clinicamente em 1986 e desde então tem sido realizada pesquisas que complementam as descrições clínicas com informação sobre o comportamento imunológico e parasitológico. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *L. braziliensis* e a *L. amazonenses* (BRASIL, 2010). É caracterizada por apresentar lesões pleomórficas múltiplas, papulares, nodulares e/ou acneiformes, com escassez ou ausência de parasitos nos tecidos afetados. A lesão normalmente inicia-se com uma ou poucas pápulas e rapidamente há o aparecimento de diversas lesões espalhadas por toda a superfície do corpo (TURETZ et al., 2002; BRASIL, 2010). Apesar dos indivíduos acometidos com a forma disseminada serem capazes de montar uma resposta imunológica celular contra *Leishmania*, seu prognóstico não é favorável, pois essa afecção não responde adequadamente à terapêutica, necessitando séries adicionais de tratamento para alcançar a cura clínica (MACHADO et al., 2011; BRASIL, 2013).

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas apesar de diversos trabalhos nos últimos anos terem mostrado esforços crescentes para o desenvolvimento de vacinas e novas drogas (COSTA et al., 2011). O antimônio ainda é o tratamento de eleição preconizado desde 1912 e há mais de 50 anos é baseado em injeções parenterais com antimoniais pentavalentes que, além de causarem dor local e serem tóxicos para o fígado, rins e coração, têm sido alvo de resistência para algumas espécies de *Leishmania* em regiões endêmicas (ROMERO et al., 2001).

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

contra as leishmanioses, não existe ainda uma vacina para uso humano com eficácia comprovada (KEDZIERSK et al., 2006; KEDZIERSK et al., 2010).

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

O camundongo e o hamster são os dois animais em que os modelos da infecção e da quimioterapia para *Leishmania* são mais estudados e melhores documentados (AWASTHI et al., 2004). Dentre os camundongos mais utilizados, o BALB/c é o mais susceptível (HOMMEL et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2004), se infectam por *L. braziliensis*, desenvolvem um quadro clínico frustrante e de curso benigno, não reproduzindo os aspectos mais característicos da LTA. Neste modelo, as lesões progridem até a quinta semana pós-infecção e em seguida regredem espontaneamente, dificultando estudos de acompanhamento de lesão por longo prazo, aspecto desejado em pesquisas por candidatos vacinais (DEKREY et al, 1998; ROCHA et al, 2007).

Ao contrário do modelo murino, o modelo hamster é altamente susceptível à infecção por espécies do subgênero *Viannia* e reproduz perfeitamente a LTA causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (OLIVEIRA et al. 2004). As lesões geradas pela infecção tendem a se desenvolver rapidamente nesse modelo, apresentando evolução de curso crônico, 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 todas as características necessárias, destacando-se como modelo ideal no estudo das leishmanioses, principalmente pela susceptibilidade às espécies do subgênero *Viannia* (OLIVEIRA et al., 2004).

1.2 Modelo experimental: hamster dourado

O hamster é relativamente novo como animal de laboratório. Os primeiros hamsters usados em experimentação animal foram os chineses (*Cricetus griseus*) e já em 1919 foi comprovada sua susceptibilidade à *Leishmania* (ANDRADE et al., 2002; ANDRADE et al., 2006; SIROIS, 2008). Entretanto, a manutenção desses animais era difícil e sua reprodução em cativeiro pouco satisfatória, o que implicava novas e sucessivas importações da China (EVESON, 1981; ANDRADE et al., 2002). Além disso, os animais não forneciam dados satisfatórios nos estudos da leishmaniose mediterrânea. Então, a procura de um modelo mais adequado, levou pesquisadores irem em busca de uma nova espécie de hamster (ANDRADE et al., 2002).

A espécie *Mesocricetus auratus* também é conhecida como hamster sírio dourado ou esquilo libanês porque sua origem é de uma região no norte da Síria, perto do rio Eufrates, chamado Aleppo. O hamster sírio dourado foi descrito como uma nova espécie e originalmente nomeado "*Cricetus auratus*" por Walterhouse em 1839 (WALTERHOUSE, 1840) e por razões desconhecidas, no início da década de 20 ele foi considerado extinto em seu ambiente natural (HEAD; BILLINGHAM, 1985).

Em 1930, o Prof. Aharoni, catedrático do Departamento de Zoologia da Universidade Hebraica de Jerusalém, foi em uma expedição à Síria e coletou uma fêmea de hamster dourado com sua ninhada. Após um ano de criação em cativeiro, percebeu-se a importância do estabelecimento e manutenção do hamster sírio em condições de laboratório (ADLER, 1948). Devido à dificuldade na reprodução desta espécie em cativeiro e aos dados insatisfatórios obtidos em estudos de leishmaniose no Mediterrâneo, foi criada por volta da década de 30, em laboratórios da França e Inglaterra, uma nova colônia de hamsters oriundos da Síria. Essa criação foi posteriormente estendida para os Estados Unidos (SIROIS, 2008). As espécies facilmente adaptáveis a países ocidentais tornaram-se mais comuns entre todos os hamsters (ADLER, 1948). Hoje em dia, todos os animais existentes das espécies de hamsters são descendentes dessa linhagem criada em Jerusalém (HEAD; BILLINGHAM, 1985; ADLER, 1989).

A taxonomia do hamster dourado é definida como: Classe Mammalia, Ordem Rodentia, Família Cricetidae, Gênero *Mesocricetus*, Espécie *M. auratus* Estes animais foram inicialmente denominados de hamsters sírios (Syrian hamsters)

em virtude do local onde foram encontrados e mais tarde, juntou-se a denominação dourado (golden) devido à sua cor de pelagem (ANDRADE et al., 2006; SIROIS, 2008).

Os hamsters dourados são animais que vivem de 18 a 24 meses (HARKNESS; WAGNER, 1993; QUESENBERRY; CARPENTER, 2012), possuem pequeno porte, cujo comprimento quando adulto pode chegar de 15 a 17 centímetros e seu peso de 85 a 120 gramas (ANDRADE et al., 2006; SIROIS, 2008).

Possuem hábitos noturnos, preferindo temperaturas mais altas, podendo hibernar quando a temperatura cai (ANDRADE et al., 2006; SIROIS, 2008). São animais solitários e altamente territoriais, sendo muito agressivos entre membros da mesma espécie, exceto em época reprodutiva (CHAMPAGNE, 2006; QUESENBERRY; CARPENTER, 2012). As fêmeas são mais agressivas que os machos (ANDRADE et al., 2006; SIROIS, 2008).

A puberdade ocorre aos 28 dias de idade, a maturidade sexual se dá por volta dos 42 dias, mas como o hamster é um animal muito precoce pode ocorrer casos em que pode se reproduzir com apenas um mês de vida. O período de gestação é de aproximadamente 16 dias e a média de filhotes por ninhada é de 8, podendo se encontrar ninhadas com até 16 filhotes (ANDRADE et al., 2002; SIROIS 2008).

Os hamsters são utilizados como modelos experimentais para pesquisa por possuírem alta taxa de reprodução e pela facilidade no manejo, sendo relativamente livres de infecções espontâneas e, em contrapartida, susceptíveis a uma série de agentes patogênicos introduzidos (ANDRADE et al., 2002; SIROIS, 2008).

Nos laboratórios, o hamster dourado é utilizado por ser um excelente modelo em diversas doenças infecciosas humanas, como a doença de Chagas, clostridiose, ancilostomose (BILATE et al., 2007, GOULDING et al., 2009), sífilis e as leishmanioses (MELBY et al., 1998), sendo o único modelo disponível em algumas dessas doenças. E como modelo de doença, é o animal mais utilizado para o isolamento de cepas de *Leishmania sp.* (HOMMEL et al, 1995; OLIVEIRA et al., 2004).

Diversos estudos experimentais de *Leishmania* no modelo hamster é feita com as espécies responsáveis pela forma visceral da doença, uma vez que o hamster reproduz a maioria dos aspectos encontrados nas doenças humana (DEA-

AYUELA et al. 2007; MOREIRA et al. 2012) e canina (MOREIRA et al. 2012). No entanto, os estudos envolvendo espécies responsáveis pela LTA são mais escassos, onde as espécies mais frequentemente usadas são *L. braziliensis* e *L. panamensis* (GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014).

1.3 Hamster dourado como modelo experimental para leishmaniose tegumentar americana

Os estudos realizados a partir da infecção por espécies do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*), principais responsáveis pela leishmaniose tegumentar nas Américas, é limitado pela dificuldade de modelos experimentais adequados. No entanto, o modelo do hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é excelente para as pesquisas sobre a LTA devido à elevada suscetibilidade à infecção por espécies do subgênero *Viannia* e à capacidade de reproduzir muitos dos aspectos clínicos e características histopatológicas da leishmaniose tegumentar humana (KAHL et al., 1991; GOMES-SILVA et al., 2013). A susceptibilidade deste modelo foi comprovada nos primeiros trabalhos realizados com *L. braziliensis* em infecção de hamsters e camundongos, Balb/c e CBA/H, onde foi observado que o desenvolvimento da doença era mais difícil em camundongos quando comparados aos hamsters, além do período de incubação nesses também ser maior (ZELEDÓN et al. 1969; NEAL; HALE, 1983).

O animal desenvolve lesões na pele quando infectados por uma das espécies *Viannia* ou *Leishmania*, incluindo *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 1976; WILSON et al., 1979; MORAIS-TEIXEIRA et al., 2008; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014), *L. (L.) amazonensis* (FIGUEIREDO et al., 1999), *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* (REY et al., 1990; OSORIO et al., 2003), *L. (V.) lainsoni* (CORRÊA et al., 2007) e *L. (V.) peruviana* (GAMBOA et al., 2008). Com efeito, as lesões cutâneas desenvolvidas por estes animais são muito semelhantes às observadas úlceras de LC em seres humanos (HOMMEL et al., 1995).

Recentemente, foi demonstrado que o hamster dourado também é um modelo adequado para estudos sobre a imunopatogênese da LC causada por *L. braziliensis* porque desenvolve lesões crônicas de pele que clinicamente e histopatologicamente espelham os dos seres humanos (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014; DA SILVA-COUTO et al., 2015). A persistência da doença e suas

consequências, como a formação de lesões metastáticas e/ou visceralização, típicas da *L. braziliensis*, podem ser vistas após três meses de infecção, no modelo com hamster. Deste modo, podemos acompanhar a cronicidade natural da doença durante longos períodos de tempo (OLIVEIRA, et al., 2004). Isso transforma o hamster dourado em um modelo promissor para o estudo da LTA.

1.4 Aspectos imunopatológicos e curso da infecção no modelo hamster da leishmaniose tegumentar americana

A utilização de modelos experimentais em estudos da leishmaniose tem apontado questões importantes relacionadas à evolução da doença e desenvolvimento da resposta imunológica de resistência e susceptibilidade. Essa condição de susceptibilidade ou de resistência em cada animal é controlada por fatores genéticos próprios, mas também é característica de cada espécie de *Leishmania* (HOMMEL et al., 1995; NIETO et al., 2011).

A suscetibilidade do modelo hamster pode ser observada no estudo da LC causada por espécies do subgênero *Viannia*, mostrando uma previsível evolução da doença, levando a um rápido desenvolvimento das lesões, com uma evolução crônica, que permite o monitoramento imunológico e terapêutico por longo período (OLIVEIRA et al., 2004).

As principais características histopatológicas em lesões crônicas de hamsters infectados com *Leishmania* é a presença de granulomas e corpúsculos de Schaumann. O granuloma ou reação granulomatosa, é caracterizada por macrófagos em arranjos epitelióides apresentam-se vacuolizados e com número variado de parasitos, além de linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, podendo haver ou não necrose (KAHL et al., 1991, GOMES-SILVA et al., 2013). Os corpúsculos de Schaumann ocorrem quando há a presença de estruturas basofílicas em formato lamelar concêntrico (KAHL et al., 1991, GOMES-SILVA et al., 2013), a partir de debris celulares e parasitos mortos que não são rapidamente reabsorvidos e sofrem calcificação (KAHL et al., 1991).

A fase inicial da reação granulomatosa da infecção em hamster por espécies do gênero *Viannia* é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, constituído por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, sendo que a reação granulomatosa se estabelece a partir de 15 dias de infecção, caracterizando a fase

crônica da doença (KAHL et al., 1991). Os corpúsculos de Schaumann, frequentemente vistos em hamsters infectados, não são geralmente descritos em humanos ou em outros animais experimentais com leishmaniose (ESSAYAG et al., 2002).

No primeiro estudo molecular sobre os aspectos imunopatológicos no modelo hamster, utilizando *L. (L.) donovani*, foi descrito sequências nucleotídicas dos genes de várias citocinas de hamster (IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α , IL-10, IL-12 e TGF- β), que foram usadas para análise da expressão no modelo visceral de infecção. Diferente do esperado, já que os animais apresentam doença progressiva com incapacidade de controlar a replicação dos parasitos, não existe uma polarização para o perfil de resposta do tipo 2 (IL-4, IL-10 e TGF- β) e ausência de resposta do tipo 1 (IL-2, TNF- α e INF- γ) (MELBY et al., 1998). Foi observado que a expressão de IL-4 não aumentou em resposta à infecção pelo parasito, apesar dos níveis basais detectados em hamsters não infectados já serem proeminentes. Também, a expressão de IL-12 e IFN- γ foram detectados em baixos níveis, sete dias pós-infecção (MELBY et al., 2001).

Embora detectada uma forte expressão de citocinas Th1 (IL-2 e INF- γ) no fígado, baço e medula óssea, a replicação de parasitos nestes sítios levaram a uma doença progressiva, onde não foi detectada expressão de mRNA para a enzima iNOS. Além disto, foi observada produção de TGF- β e IL-10, que possivelmente estariam agindo na inibição dos macrófagos na geração de NO, possibilitando a evolução da doença neste modelo experimental. Essa ausência também não foi decorrente da falta de TNF- α , um segundo sinal potente para indução de iNOS, já que houve alta expressão dessa citocina (MELBY et al., 2001).

A redução na produção de NO em hamster infectados por *L. donovani* pode ser mediada pelo aumento da expressão de arginase, porque a arginase compete com a iNOS pelo mesmo substrato necessário para a síntese de NO, a L-arginina. Sendo assim, o aumento na expressão de arginase reflete em diminuição na produção de NO. E a metabolização da L-arginina pela arginase leva à formação de L-ornitina, precursor da síntese de poliaminas, o que favorece o crescimento dos parasitos (OSORIO et al., 2012).

Apesar da importância dos níveis de citocinas na compreensão da imunopatogênese e imunidade, ainda são raros os estudos sobre o padrão de citocinas na LC em hamsters. Foram observados em hamsters infectados por *L.*

panamensis, utilizando o ensaio de RT-PCR em tempo real, altos níveis de IFN- γ , IL-12p40, IL-10 e TGF- β em lesões crônicas com dois meses de evolução, sem um padrão de polarização para o tipo 1 ou tipo 2 de resposta (OSORIO et al., 2003).

Recentemente, foram descritas outras sequências de DNA complementar de citocinas, quimiocinas e moléculas relacionadas à resposta imunológica de hamsters infectados pela mesma espécie descrita anteriormente, por sete dias, comparando a expressão do RNAm em pele e linfonodo de hamster infectado por *L. panamensis*. Verificou-se uma maior expressão basal no linfonodo em comparação com a pele para a maioria dos transcritos (IL-4, CCR4, IL-21, TNF- α , TGF- β , IFN- γ , IL-12p40, IL-10, e Foxp3). No início da fase da infecção foi observada regulação concomitante por citocinas do tipo 1 (IFN- γ e IL-12p40) e tipo 2 (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21) no local da infecção cutânea, sugerindo que um tipo equilibrado de resposta contribui para a cronicidade da doença causada por *L. panamensis* em hamster (ESPITIA et al., 2010).

Na maioria dos experimentos realizados com o modelo hamster é observado lesões na pele dos animais, infectados com as espécies do subgênero *Viannia*, que se inicia com eritema e edema local, evoluindo para uma pápula, culminando com uma apresentação nodular ou ulcerada (WILSON et al., 1979; HOMMEL et al., 1995). Essas lesões no hamster geralmente se desenvolvem tardiamente, a partir de um mês (BRASIL, 2013).

Entretanto, o período de surgimento da lesão, a apresentação clínica e o tamanho da lesão, que refletem a gravidade da doença, dependem de uma série de fatores, que podem levar a variações nesses parâmetros (MEHEGAN et al., 1999). Entre esses fatores, está a constituição genética variada desses animais, chamados outbred, que pode influenciar em diferentes resultados clínicos da doença, de tal forma que o modelo reproduza a heterogeneidade observada na doença humana (PEREZ et al., 2006).

Porém, este modelo é subutilizado pela falta de reagentes imunológicos comerciais como, por exemplo, anticorpos específicos para citocinas e moléculas marcadoras de subpopulações celulares, necessários para uma investigação mais detalhada dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença. Além disso, os estudos disponíveis no modelo hamster usam como sítio de inoculação a pata, apresentam diversos protocolos, utilizando diferentes cepas e um inóculo geralmente alto, levando a cursos clínicos diferenciados da doença, além de culminar com a

visceralização do parasito para o fígado e baço, e consequente morte do animal (HOMMEL et al., 1995; AWASTHI et al., 2004, OLIVEIRA et al., 2005). Outros parâmetros também estão envolvidos como o gênero animal ou idade (WILSON et al., 1979; TRAVI et al., 2002), as características biológicas dos parasitos inoculados tais como o número de passagens *in vitro*, fase de crescimento, estágios de desenvolvimento ou taxa de formas metacíclicas (REY et al., 1990; GAMBOA et al., 2008) e a rota e o sítio de inoculação (WILSON et al., 1979; OSORIO et al., 2003).

Entre os vários parâmetros estudados, está a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção do animal, que é um dos principais fatores para os diferentes cursos clínicos da doença. Vários experimentos mostraram diferenças nas manifestações clínicas entre espécies de *Leishmania*, como o de Gamboa et al. (2008) que infectou animais com *L. (V.) peruviana* e *L. braziliensis*, e observaram que *L. braziliensis* era mais virulenta que *L. peruviana*, gerando lesões maiores de surgimento mais precoce, ao contrario de outro experimento em 1979 que *L. (L.) amazonensis* mostrou ser mais virulenta para hamsters do que *L. braziliensis*, que surgiram lesões mais necróticas e consequentemente mais graves (WILSON et al., 1979).

Outro parâmetro importante é o tamanho do inóculo a ser utilizado na infecção, uma vez que a espécie *L. braziliensis* está associada a um baixo crescimento e desenvolvimento das formas infectantes *in vitro*, necessitando de um inóculo elevado para garantir a infecção (OLIVEIRA et al., 2005). Foi observado em estudo com hamsters infectados com diferentes inóculos por *L. braziliensis* (10^4 , 10^5 , 10^6 promastigotas) que os animais infectados com 10^4 promastigostas desenvolveram uma doença mais branda quando comparados aos animais infectados com os inóculos mais altos, sugerindo que diferentes concentrações de inóculo influenciam no quadro clínico, no tamanho final da lesão, e no grau de dano do tecido, além da capacidade de visceralização do parasito (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014).

Mesmo com essa variação no comprometimento sistêmico, os três inóculos utilizados não conduziram à diferenças na carga parasitária, expressão gênica de IFN- γ e IL-10, ou nos níveis de IgG anti-*Leishmania*. Portanto, o inóculo de 10^5 seria o mais apropriado para estudos de candidatos vacinais, uma vez que leva a um desenvolvimento relativamente rápido da lesão quando comparado ao inóculo

mais baixo e a um comprometimento sistêmico menor quando comparado ao inóculo mais alto (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014; SAAVEDRA, 2015).

Estudos que abordam a relação entre o gênero sexual e a susceptibilidade à leishmaniose em modelos experimentais são raros, principalmente envolvendo o subgênero *Viannia*. Foi demonstrado que hamsters machos são mais susceptíveis a desenvolverem lesões maiores e mais graves, tendo uma maior carga parasitária nos linfonodos do que as fêmeas quando infectados com *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. Porém, quando administrada testosterona nas fêmeas, estas desenvolveram lesões de mesma magnitude (TRAVI et al, 2002; SARAVIA et al., 2005).

Quanto a influência hormonal contribuindo na modulação da resposta imunológica e no desenvolvimento da infecção, foi constatado que a doença mais grave em hamsters machos foi associada ao aumento da produção intralésional das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , que favorecem um microambiente favorável a manutenção e replicação do parasito no hospedeiro (TRAVI et al., 2002). Também foi mostrado que as lesões menores com menos parasitos em fêmeas prenhes infectadas com *L. panamensis* era atribuída a resposta imunológica inata no início da infecção, com maior expressão de iNOS e maior produção de óxido nítrico por neutrófilos e macrófagos e uma conseqüente diminuição na expressão de citocinas pró-inflamatórias, quando comparadas com as fêmeas não prenhes (OSORIO et al., 2008).

A idade dos animais também influencia na patogenia da doença, uma vez que animais mais jovens não produzem hormônios sexuais. Foi observado que machos adultos desenvolveram lesões maiores que os animais mais jovens em infecção por *L. panamensis*, porém essa diferença não foi observada entre as fêmeas. Além disso, o desenvolvimento de lesões necróticas foi mais frequente entre hamsters adultos do que entre os jovens (TRAVI et al., 2002).

1.5 Influência do sítio de inoculação no modelo hamster na leishmaniose tegumentar americana

As vias de inoculação mais utilizadas em hamsters são a intradérmica ou subcutânea, geralmente no focinho ou patas traseiras com espécies de *Leishmania*

dermotrópicas, ou via intraperitoneal com espécies causadoras da forma visceral da doença (EVANS, 1989). Foi verificado que animais quando infectados com 10^2 amastigotas de *L. braziliensis* por via subcutânea levaram praticamente o mesmo tempo para desenvolverem lesão quando comparados com animais infectados com 10^6 amastigotas pela via subcutânea (WILSON et al., 1979).

O local de inoculação dos parasitos tem influência no curso da doença no modelo hamster, uma vez que infecções realizadas na pata e focinho 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).

A resposta imunológica no sítio da lesão também é crucial para a evolução da infecção, por isso a pele desempenha um importante papel na imunopatogênese da LC. A resposta imunológica ao parasito no local do inóculo envolve diferentes ramos do sistema imunológica, como fatores do complemento, neutrófilos, fibroblastos, queratinócitos, células de Langerhans, macrófagos e células dendríticas (PAPADOGIANNAKIS et. al., 2015). No local da infecção, o sistema imunológica adaptativo atua em conjunto com o sistema inato para eliminar a *Leishmania* e induzir reparação tecidual e cicatrização de feridas (BALDWIN et al., 2007), sendo que citocinas e moléculas atuam como moduladoras neste processo.

Além desses fatores, a resposta imunológica local pode influenciar no controle ou exacerbação da infecção. Lesões resultantes da inoculação de *L. braziliensis* e *L. panamensis* no focinho de hamsters desenvolveram-se mais rapidamente, além de terem apresentado evolução mais grave e maior ulceração quando comparadas com as lesões na pata (ZELEDÓN et al. 1969, OSÓRIO et al., 2003). Foi observado que a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias foram maiores nas lesões do focinho, consideradas mais graves, do que nas lesões da pata (OSORIO et. al., 2003). Também, verificou-se níveis mais altos de IgG total anti-*Leishmania*, no período inicial da infecção, em animais com lesões no focinho, consideradas mais graves, do que nos animais com lesão na pata, mais brandas, não havendo diferença nos níveis IgG na fase crônica da doença (OSORIO et. al., 2003).

Recentemente foi mostrado um modelo de infecção com *L. braziliensis* na derme da orelha de camundongos BALB/c que mimetiza a infecção humana em muitos aspectos, tais como a presença de lesão ulcerada, disseminação do parasito para os linfonodos de drenagem da lesão e desenvolvimento de resposta imunológica tipo Th1, com produção de IFN- γ e expressão de algumas quimiocinas pró-inflamatórias (MOURA et. al., 2005). Este sítio de inoculação ainda não foi testado no modelo hamster, utilizando-se a via intradérmica de inoculação, com um inóculo próximo ao natural (1.000-10.000 parasitos).

Possivelmente, a infecção via intradérmica na orelha de hamster, com um baixo inóculo, pode ser capaz de levar a lesões mais benignas e a um menor comprometimento sistêmico, tornando esse modelo útil para a investigação de novos fármacos e testes de vacinas. Neste estudo, portanto, comparou-se o modelo de infecção cutânea na orelha de hamster com o modelo tradicional da pata, utilizando um inóculo próximo ao natural, de modo a garantir a infecção, mas sem levar a uma doença exacerbada, além de analisar os aspectos clínicos e imunopatológicos associados a estes sítios de inoculação.

2 JUSTIFICATIVA

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

Considerando que o tamanho ou espessura da lesão é um parâmetro essencial na avaliação da eficácia de novos fármacos e de um candidato vacinal para a leishmaniose cutânea e que uma doença exacerbada dificultaria essa avaliação, a utilização de baixo inóculo, em um sítio de inoculação que mimetiza a lesão humana, em um modelo animal muito susceptível, como o hamster; poderá levar a um quadro clínico menos grave, com baixo comprometimento sistêmico, permitindo a visualização de um possível efeito protetor de novos fármacos ou vacinas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

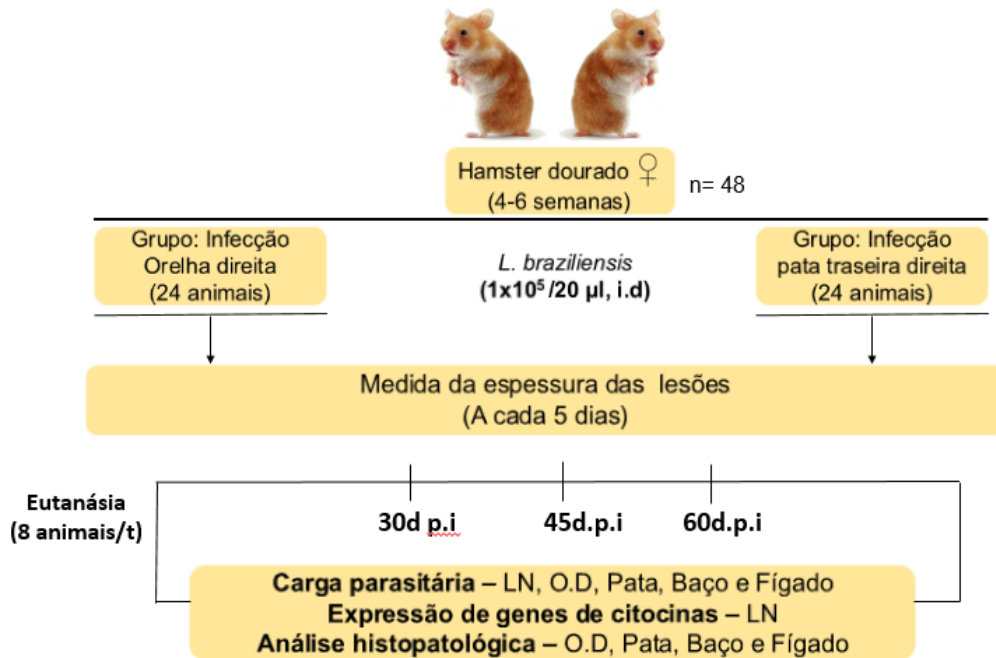
Investigar a influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *leishmania braziliensis* em hamster no modelo de infecção na derme da orelha.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do sítio de inoculação (orelha ou pata) no desfecho da lesão cutânea e na repercussão sistêmica da infecção;
- Investigar se a visceralização dos parasitos está associada com o sítio de inoculação (orelha ou pata);
- Verificar se a expressão gênica de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β) está associada ao sítio de inoculação (orelha ou pata) e com a gravidade da doença;
- Identificar a influência do sítio de inoculação (orelha ou pata) nas alterações histopatológicas observada nas lesões de pele.

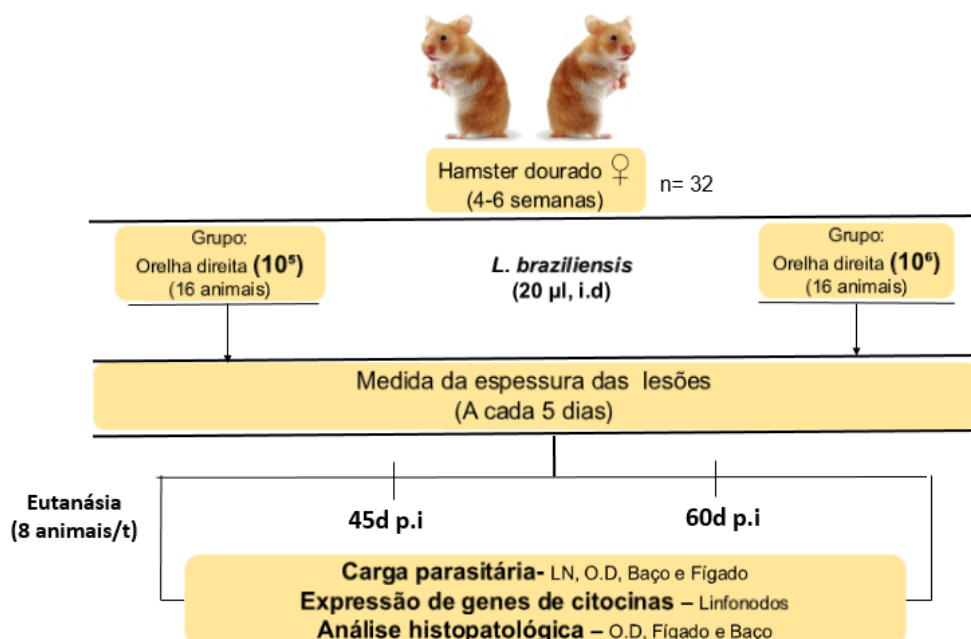
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental I – Comparação do modelo de infecção intradérmica da orelha com o modelo de infecção intradérmica na pata



Fonte: elaborado pelo autor. LN: linfonodo; OD: orelha direita; t: tempo.

4.2 Desenho experimental II – Comparação de diferentes inóculos no modelo de infecção intradérmica da orelha



Fonte: elaborado pelo autor. LN: linfonodo; OD: orelha direita; t: tempo.

4.3 Animais e aspectos éticos

Foram utilizados hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), fêmeas, com 4-6 semanas de vida, pesando 90 a 120g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (DPML/FAMED/UFC). Para o experimento do Desenho Experimental I, animais infectados (n=48) foram divididos em dois grupos com 24 animais em cada grupo, de acordo com o sítio de inoculação (orelha ou pata). Para o experimento do Desenho Experimental II, foram utilizados 32 animais, também fêmeas, com 8-10 semanas de vida, 100 a 140g distribuídas em dois grupos, de acordo com o inóculo utilizado (10^5 ou 10^6 promastigotas), cada grupo com 16 animais. Hamsters não infectados (n=3) foram utilizados como controle para os ensaios moleculares e análise histopatológica. Os animais foram mantidos à temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*, durante todo o período dos experimentos. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa em Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, com número de protocolo n° 30/2014.

4.4 Parasitos

A cepa de *Leishmania braziliensis* (MCAN/BR/98/R619), cedida pela Dra. Alda Cruz do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (IOC-FIOCRUZ/RJ), foi isolada de paciente com leishmaniose cutânea localizada e caracterizada como *L. braziliensis*. A virulência dos parasitos foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após os parasitos serem recuperados, através de aspirado do linfonodo de drenagem da lesão, foram cultivados a 25°C em meio N.N.N., contendo meio Schneider suplementado com 20% de SBF inativado (ambos Sigma-Aldrich, St Louis, MO), urina humana estéril a 2% e antibióticos (100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina). Para garantir a virulência da cepa, só foram utilizados parasitos até a 5ª passagem em cultura em todos os experimentos. Os parasitos foram submetidos a um ciclo de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 1.500 rpm (400 g), por 15 min a 4°C e as concentrações desejadas em cada experimento foram ajustadas com meio Schneider suplementado. A viabilidade dos

parasitos foi analisada pela motilidade por meio da observação em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico.

4.5 Infecção Experimental e acompanhamento da lesão

Para a comparação do modelo de infecção intradérmica da orelha com o modelo de infecção intradérmica na pata, promastigotas de *L. braziliensis* foram inoculadas na concentração de 10^5 em 20 μ L de salina estéril, na derme da orelha direta (DE MOURA et al., 2005) ou no coxim plantar da pata traseira direita (TEIXEIRA et al., 2005). Para a comparação de diferentes inóculos no modelo de infecção intradérmica da orelha, foi realizada infecção via intradérmica, utilizando concentração de 10^5 ou 10^6 em 20 μ L de salina estéril, conforme Moura et. al (2005), como referido acima. A espessura da lesão foi acompanhada por 60 dias com medidas a cada 5 dias, usando um paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) e expressa em milímetros. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a orelha ou a pata infectada e a contralateral não infectada. Discrepâncias na espessura das lesões foram determinadas pelo coeficiente de variação [VC = (desvio padrão / média) x 100]. Os aspectos macroscópicos das patas e orelhas foram registrados por fotomicrografias digitais.

4.6 Avaliação da carga parasitária

Oito animais de cada grupo de animais infectados nos diferentes sítios de lesão foram eutanasiados, em diferentes tempos pós-infecção, através de inalação com halotano (Sigma-Aldrich) e mergulhados em álcool-iodado a 3% por até 3 minutos a fim de permitir a descontaminação dos mesmos. Em seguida, os linfonodos de drenagem da lesão (retromaxilar e poplíteo), orelha e pata infectadas, baço e o fígado foram retirados assepticamente, para a determinação da carga parasitária e para os estudos posteriores da expressão de genes de mediadores inflamatórios e aspectos histopatológicos. A carga parasitária foi quantificada através da técnica de diluição limitante (TITUS et al., 1985). Resumidamente, linfonodo regional, lesão, ou fragmento de baço e fígado (baço: entre 0,15 a 0,18 g; fígado: entre 0,96 a 1,92 g) foram macerados e homogeneizados em placa de Petri estéril com 2 mL de meio Schneider (Sigma-Aldrich). Após a homogeneização, o material

foi diluído para 8 concentrações diferentes (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 e 10^8) com meio Schneider suplementado a 20% com SBF inativado, 2% de urina humana estéril, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Cem microlitros (100µL) destas diluições foram distribuídos em placas de 96 poços, fundo chato, contendo meio ágar-sangue N.N.N., em sextuplicatas (6 poços/diluição). As placas foram seladas e incubadas a 25°C em estufa B.O.D e observadas em microscópio invertido de 3 em 3 dias, até um máximo de 30 dias, para o registro das diluições que continham parasitos. O resultado da leitura das placas foi registrado no software ELIDA 12c para Windows (TASWELL, 1984) para o cálculo final do número de parasitos presentes nas amostras utilizadas.

4.7 Ensaio de RT PCR em Tempo Real

O ensaio de quantificação da expressão gênica dos mediadores inflamatórios foi realizado através de RT-qPCR, no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (IOC -FIOCRUZ/RJ). Foram utilizados 20 a 30 mg de fragmentos de linfonodos retromaxilar e poplíteo, que foram lisados em 1 mL de Trizol[®] (Life Technologies, Califórnia, EUA), com auxílio do homogeneizador de tecido Ultra-Turrax Dispenser (IKA, Wilmington, EUA). Os lisados de tecido foram tratados com Proteinase K (Invitrogen) 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), de acordo com as especificações do fabricante. Após a extração, o RNA foi dosado por espectrofotometria no aparelho Picodrop P200 (Astranet Systems, UK), e então 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 kit *High Capacity Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme orientações do fabricante. O cDNA resultante foi então quantificado por fluorometria, no Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, EUA), utilizando o kit *single strand DNA (ssDNA)*. A quantificação da expressão gênica foi utilizada para alvos de citocinas e enzimas de hamster consideradas importantes na imunopatogênese da leishmaniose tegumentar humana, listados a seguir: IFN-γ, TGF-β, TNF-α, IL-10, arginase, iNOS, IL-4, IL-6 e os genes de referência GAPDH e

γ -Actina, através do método de Ct comparativo (DDCt), utilizando iniciadores previamente desenhados para este estudo com o auxílio do programa Primer-BLAST (IL-6) (Tabela 1). Para a reação de PCR em Tempo Real, para cada alvo foi utilizado 20ng de cDNA em um volume de 2 μ l, utilizando o kit Power SYBR Green® PCR Master Mix (Life Technologies, CA, EUA), em volume final de 10 μ l por poço, em duplicata. Os ensaios foram realizados em placas de 384 poços, no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), que integra a plataforma PDTIS/FIOCRUZ de PCR em Tempo Real (RPT09A) da FIOCRUZ/RJ, em colaboração com o Dr. Otacílio 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 primers foram utilizados nas concentrações 100nM Fw X 100nM Rv, exceto IL-4, que foi utilizado 200nM X 200nM. Os resultados foram expressos em $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (fold change), e amostras provenientes de animais controles (não infectados) foram utilizadas como calibradores.

Tabela 1 – Alvos e sequências de *primers* de hamster utilizados nos ensaios de RT PCR 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
γ Actina	Fw 5'-ACA GAG AGA AGA TGA CGC AGA TAA TG-3' Rv 5'-GCC TGA ATG GCC ACG TAC A-3'	70 pb	Espitia et al, 2010
INF- γ	Fw 5'-TGT TGC TCT GCC TCA CTC AGG-3' Rv 5'-AAG ACG AGG TCC CCT CCA TTC-3'	130 pb	Espitia et al, 2010
TGF- β	Fw 5'-GGC TAC CAC GCC AAC TTC TG-3' Rv 5'-GAG GGC AAG GAC CTT ACT GTA CTG-3'	81 pb	Espitia et al, 2010
TNF- α	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., manuscrito em preparação
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: SAAVEDRA, 2015.

4.8 Análise histopatológica

Para análise dos aspectos histopatológicos, os grupos de animais de cada experimento foram eutanasiados, como descrito anteriormente, para a retirada da orelha e pata infectada ou não infectada (controle sadio), do fígado e baço, os quais foram fixados em formol tamponado a 10%, processadas e incluídas em parafina. Posteriormente, o material foi cortado em seções de espessura de 5-6 μ m e corado por hematoxilina-eosina. As alterações microscópicas foram observadas e analisadas em microscópio óptico, levando em conta os seguintes parâmetros: infiltrados inflamatórios, reações granulomatosas, macrófagos vacuolizados,

presença de amastigotas, de células gigantes e de corpos de Schaumann, necrose, desarranjo na arquitetura do tecido e neovascularização. Cada parâmetro foi avaliado segundo a intensidade da presença ou ausência do evento: - (ausência), 1+ (presença de 1-25%), 2+ (presença de 25-50%), 3+ (>50%).

4.9 Análise Estatística

Para verificar a significância estatística entre os grupos, nos dados com distribuição normal onde foram comparados dois grupos independentes foi utilizado o teste Mann-Whitney. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA e se houve uma diferença significativa, os grupos foram comparados através do post teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism version 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), em todos os testes utilizados. As diferenças foram aceitas, como estatisticamente significantes, quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

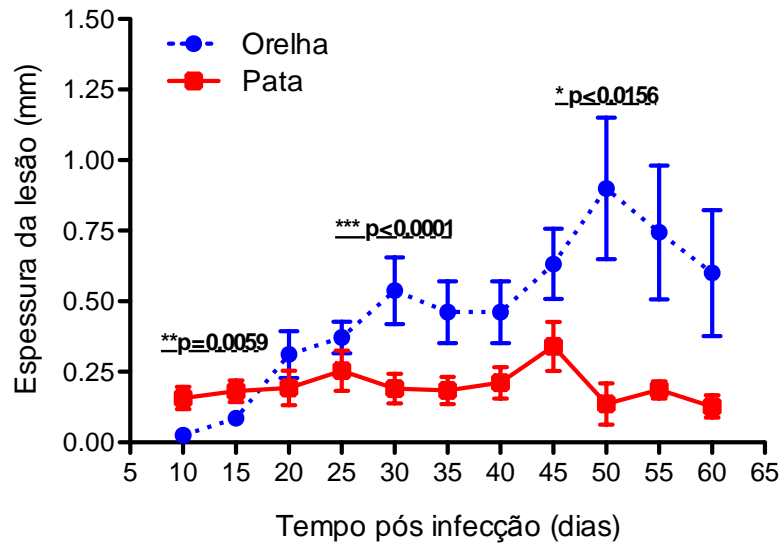
5.1 Comparação do modelo de infecção intradérmica da orelha com o modelo de infecção intradérmica na pata

5.1.1 Avaliação do sítio de inoculação no curso clínico das lesões por *Leishmania braziliensis*

Os grupos de hamsters dourados (n=8) foram inoculados na derme da orelha direita ou na pata direita posterior com 10^5 parasitos, inóculo determinado a partir de trabalho prévio (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014). O desenvolvimento das lesões foi observado a cada 5 dias pós-infecção (d.p.i) e foi acompanhado ao longo de 60 dias. As lesões surgiram a partir do vigésimo dia, com o aparecimento de nódulos com 0,3 mm na orelha e 0,2 mm na pata, em média (Gráfico 1 e Figura 3).

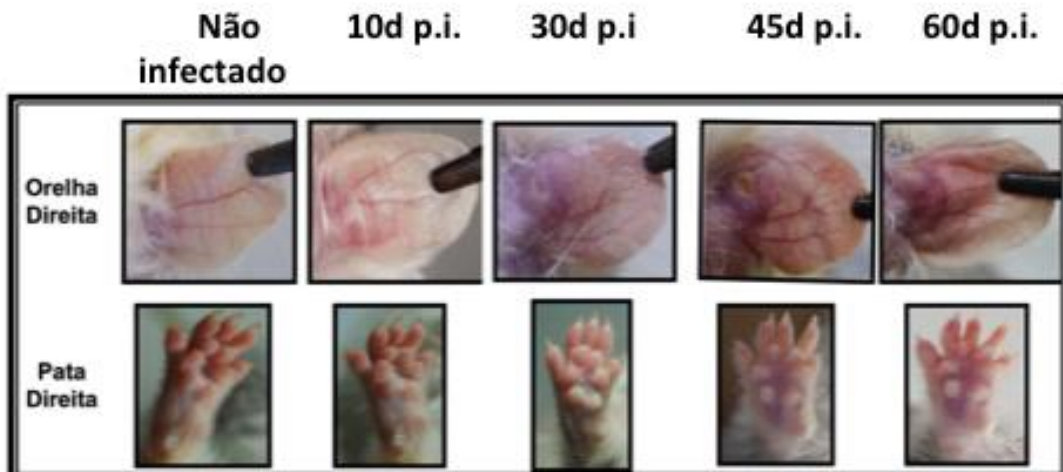
As lesões dos animais infectados na orelha ulceraram no vigésimo quinto dia ($0,54\text{mm} \pm 0,12\text{mm}$) e foram significativamente maiores ($p < 0,0001$) quando comparadas com as lesões dos animais infectados na pata ($0,19 \pm 0,05\text{mm}$), que foram sempre menores e se apresentaram como pequenos nódulos, sem úlcera, ao longo do período avaliado. A diminuição da espessura da lesão na orelha só foi observada após 50 dias de infecção, enquanto que na pata essa diminuição ocorreu mais precocemente, a partir do 45º d.p.i. (Gráfico 1 e Figura 3).

Gráfico 1. Espessura da lesão de hamsters infectados na orelha ou na pata com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor. Os resultados são expressos pela média aritmética \pm erro padrão. Significância estatística quando $P < 0,05$.

Figura 3: Fotomicrografias dos aspectos das lesões em orelhas e patas durante o curso da infecção por *L. braziliensis*



Fonte: elaborada pelo autor; d.p.i. significa dias pós-infecção.

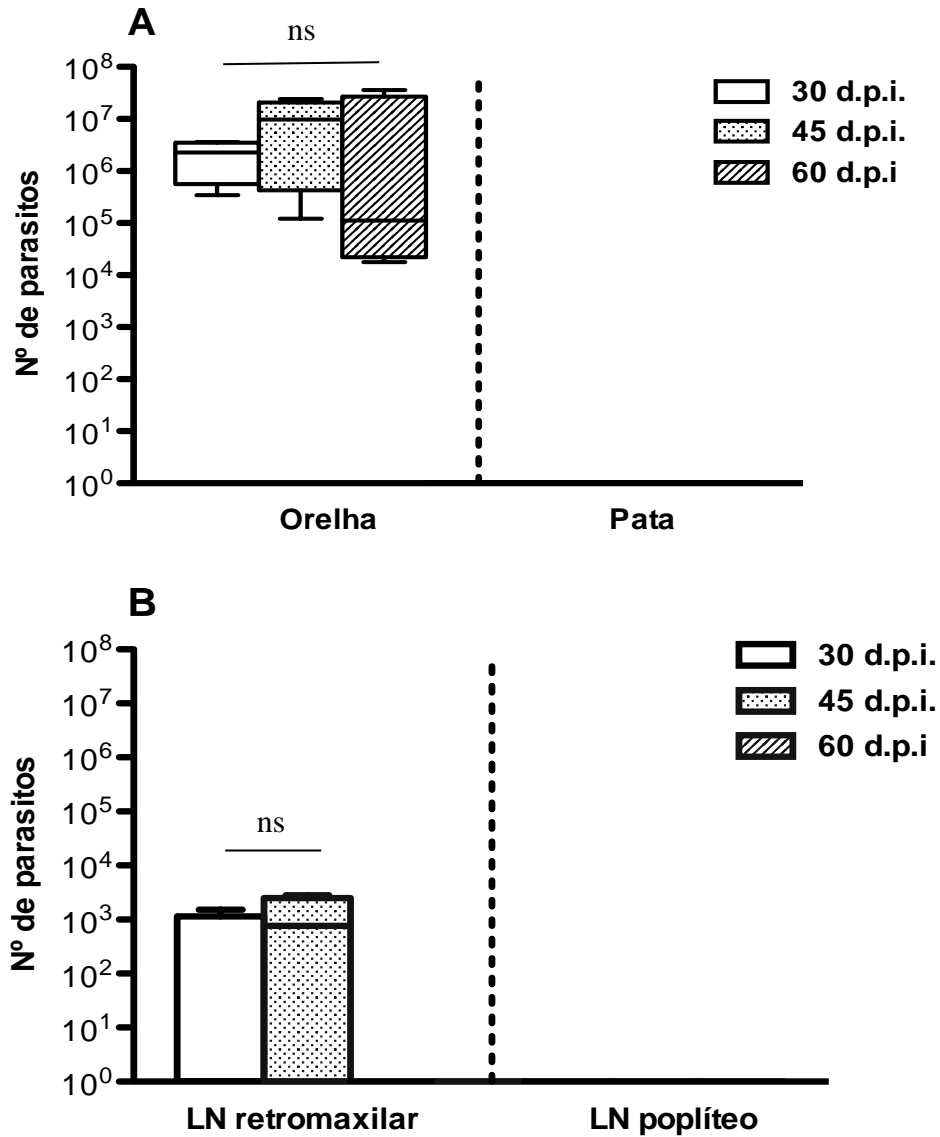
5.1.2 Carga parasitária nos diferentes sítios de inoculação e nos linfonodos retromaxilar e poplíteo

O número de parasitos foi avaliada na orelha ou na pata, nos linfonodos de drenagem (retromaxilar e poplíteo), no baço e fígado. Os resultados mostraram que a carga parasitária se comportou de maneira diferente em alguns dos tecidos avaliados.

Não foram observados parasitos na lesão e nem no linfonodo poplíteo dos animais infectados na pata. Nos animais infectados na orelha foi observada que a carga parasitária na lesão após 30 d.p.i. ($2,1 \times 10^6 \pm 0,79 \times 10^6$), 45 d.p.i. ($1,0 \times 10^7 \pm 0,47 \times 10^7$) e 60 d.p.i. ($9,1 \times 10^6 \pm 8,9 \times 10^6$) foi maior do que no linfonodo retromaxilar nos mesmos tempos (30 dias: $3,8 \times 10^2 \pm 3,3 \times 10^2$; 45 dias: $1,1 \times 10^3 \pm 0,68 \times 10^3$), e isso foi estatisticamente significativo em todos os tempos avaliados com $p < 0,05$ (Gráfico 2).

Independente da via de inoculação, foi observado que o fígado e baço não estavam aumentados, não apresentavam nódulos, não sendo também encontrados parasitos nestes órgãos.

Gráfico 2. Carga parasitária em hamsters infectados na orelha ou na pata (A) e linfonodos (B) com 10^5 promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor. Os resultados são expressos pela média aritmética \pm erro padrão; d.p.i. significa dias pós-infecção; LN significa linfonodo. $P < 0,05$ em relação a lesão na orelha x linfonodo retromaxilar nos tempos 30, 45 e 60 d.p.i.

5.1.3 Perfil da expressão gênica de mediadores inflamatórios em linfonodos retromaxilar e poplíteo de hamsters infectados com *L. braziliensis*

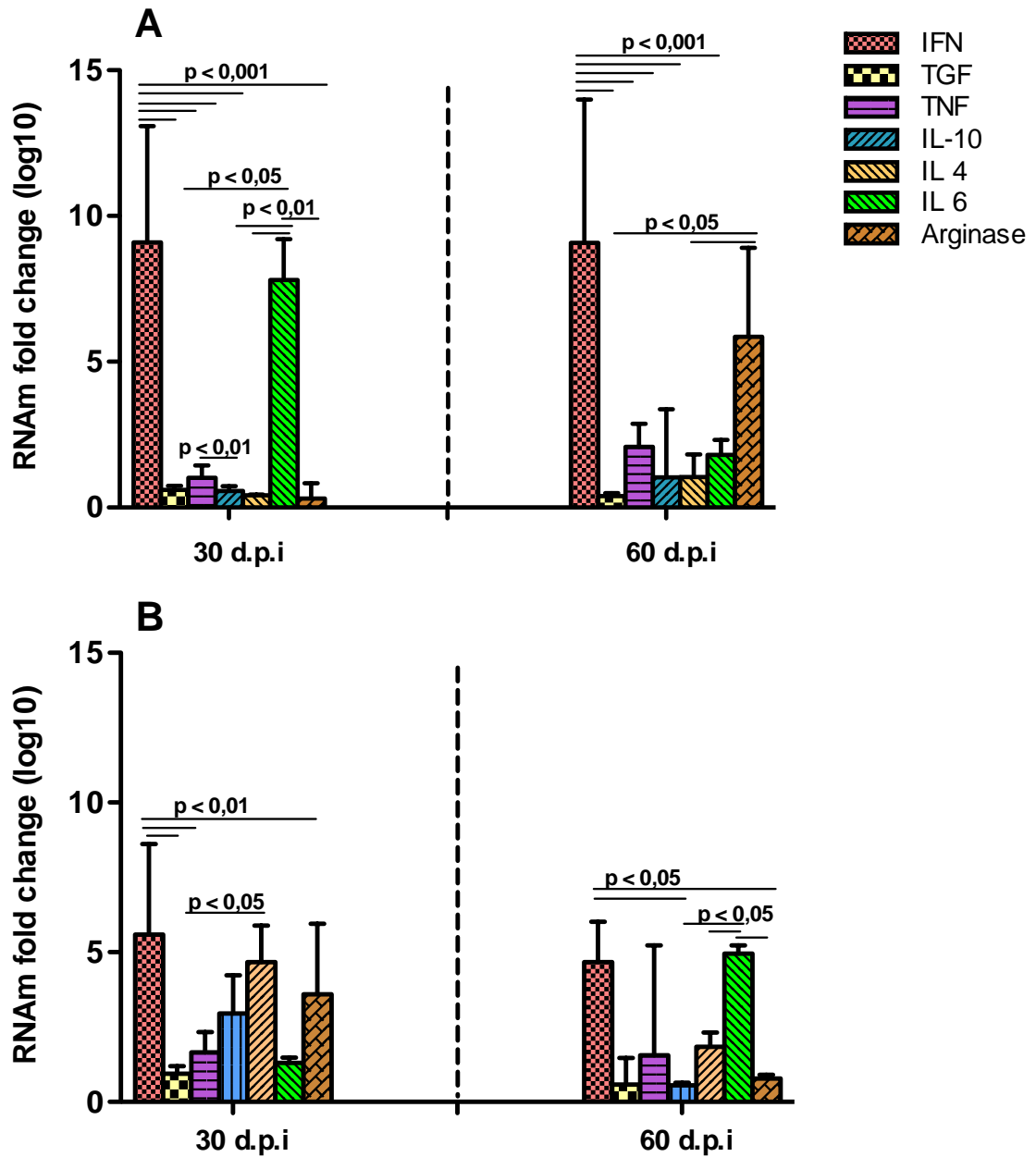
O ensaio de RT-qPCR foi aplicado para avaliar a expressão gênica no linfonodo retromaxilar dos animais infectados na orelha e no linfonodo poplíteo dos animais infectados na pata, após 30 e 60 dias de infecção (n=4).

A expressão de IFN- γ foi sempre mais regulada que as demais citocinas ($p < 0,001$) no linfonodo retromaxilar (orelha), em ambos os tempos de infecção analisados, apresentando expressão praticamente inalterada até 60 dias pós-infecção, exceto em relação a IL-6, no período de 30 dias, e arginase no período de 60 dias, que apresentaram expressão semelhante quando comparado com IFN- γ (Gráfico 3A). IL-6 foi a segunda citocina com expressão mais regulada no linfonodo retromaxilar ($p < 0,01$), no período de 30 dias, com diminuição desta expressão no período de 60 dias (Gráfico 3A). Ainda no linfonodo retromaxilar, a expressão de arginase foi maior que IL-4 e TGF- β ($p < 0,05$) ao final de 60 dias, quando comparada com o período de 30 dias. Verificou-se também que com 30 dias a expressão de TNF- α foi mais significativa que IL-10 ($p < 0,01$), e embora a expressão de TNF- α tenha aumentado no período de 60 dias, esse aumento não foi estatisticamente significativo em relação às outras citocinas (Gráfico 3A).

Quanto a expressão dos mediadores nos linfonodos poplíteos (pata), foi verificada expressão praticamente semelhante de IFN- γ nos dois tempos avaliados, ainda assim permanecendo maior que as citocinas TNF- α , TGF- β e IL-6 ($p < 0,01$) no período de 30 dias, assim como TGF- β , IL-10 e arginase ($p < 0,05$) no período de 60 dias (Gráfico 3B). Observou-se que IL-4 foi mais expressa que TGF- β e IL-6 ($p < 0,05$) com 30 dias, mas tanto IL-4 como TGF- β permaneceram com concentrações semelhantes no período de 60 dias. Ao contrário do período de 30 dias, no período de 60 dias, a expressão de IL-6 foi maior que IL-10 e arginase ($p < 0,05$) (Gráfico 3B).

Vale salientar que não foi observada expressão significativa de iNOS em nenhuma das amostras.

Gráfico 3 - Expressão de mediadores inflamatórios em linfonodos retromaxilar (A) e poplíteo B) de hamsters infectados por *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor. Os dados apresentam mediana com intervalo interquartil; d.p.i. significa dias pós-infecção.

5.1.4 Avaliação da reação inflamatória nos diferentes sítios de inoculação

Os resultados histopatológicos das orelhas ou patas (n = 4, por grupo) encontram-se resumidos na Tabela 2. Não foram observadas alterações no fígado e baço.

Nas lesões de orelha verificou-se um infiltrado inflamatório mais intenso que nas lesões de pata, em todos os períodos analisados, que consistiu predominantemente de eosinófilos e macrófagos vacuolizados, caracterizando a reação inflamatória com a presença da úlcera que foi visualizada na maioria dos animais infectados na derme da orelha. Neutrófilos, linfócitos e plasmócitos também foram observados (dados não mostrados).

Nas lesões da pata essa reação inflamatória foi observada principalmente nos períodos iniciais de infecção, 30 e 45 d.p.i, com ausência ou menos intensidade de todos os parâmetros avaliados.

Amastigotas de *Leishmania* foram observadas nas lesões de orelha apenas nos períodos iniciais de 30 e 45 dias, não sendo mais observadas com 60 dias, enquanto nas lesões de pata não foram observadas amastigotas em nenhum dos tempos analisados.

Salienta-se ainda a observação de reação granulomatosa e presença de corpos Schaumann, vistos em todos os períodos de análise, nos animais infectados na orelha, bem como a neovascularização observada nos períodos de 30 e 45 dias e necrose, no período de 45 dias. Enquanto que nas lesões de pata não foram observadas essas alterações histopatológicas.

Tabela 2: Alterações histopatológicas na lesão de orelha ou pata de hamster infectados com inócuos de 10^5 com promastigotas de *L. braziliensis*.

Aspectos Histopatológicos	30 dias (n=4)		45 dias (n=4)		60 dias (n=4)	
	Tecido		Tecido		Tecido	
	Orelha	Pata	Orelha	Pata	Orelha	Pata
Presença de eosinófilos	++ (3/4)	+ (4/4)	+ (4/4)	- (4/4)	- (4/4)	- (4/4)
Infiltrados inflamatórios	++(4/4)	+ (1/4)	+++ (4/4)	+ (4/4)	++(1/4)	- (4/4)
Reações granulomatosas	++(1/4)	- (4/4)	++(3/4)	- (4/4)	++(1/4)	- (4/4)
Macrófagos vacuolizados	++ (2/4)	- (4/4)	++ (4/4)	- (4/4)	++ (1/4)	- (4/4)
Formas amastigotas de Leishmanias	+ (3/4)	- (4/4)	++ (4/4)	- (4/4)	- (4/4)	- (4/4)
Células gigantes	+ (1/4)	- (4/4)	++ (1/4)	- (4/4)	++ (1/4)	- (4/4)
Corpúsculos de Schaumann	+ (1/4)	- (4/4)	++ (2/4)	- (4/4)	++ (1/4)	- (4/4)
Presença de necrose	- (4/4)	- (4/4)	++ (2/4)	- (4/4)	- (4/4)	- (4/4)
Desarranjo da arquitetura do tecido	+ (3/4)	+ (4/4)	+ (4/4)	+ (3/4)	+ (1/4)	- (4/4)
Neovascularização	++ (4/4)	++ (1/4)	+ (2/4)	- (4/4)	- (4/4)	- (4/4)

n= número de animais por grupo; (-) Ausência; (+) presença de 1-25%; (++) presença de 25-50%; (+++) >50%.

5.2 Comparação de diferentes inóculos no modelo de infecção intradérmica da orelha

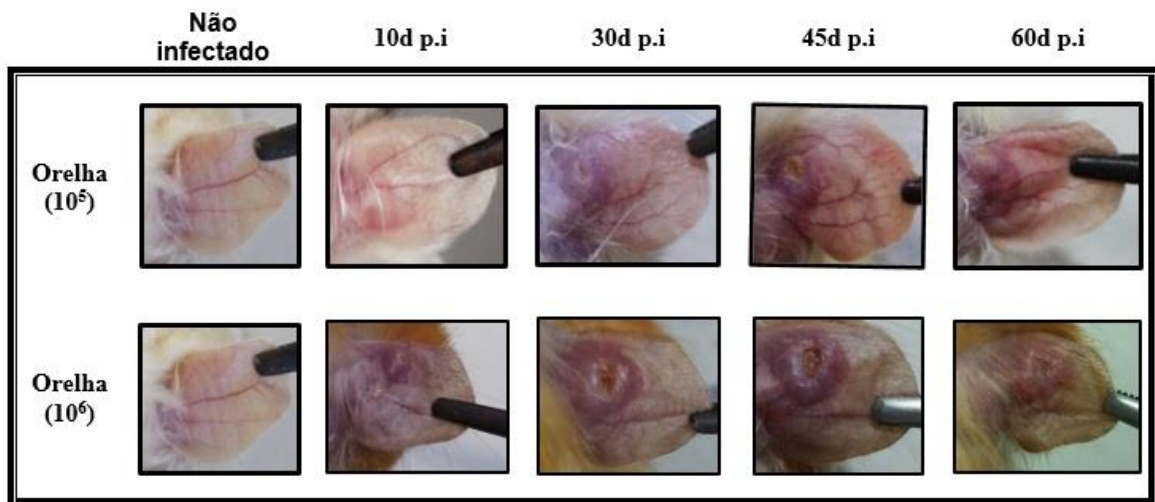
5.2.1 Curso clínico das lesões causadas por *L. braziliensis* em orelha de hamster

Os animais infectados (tanto com 10^5 como com 10^6 promastigotas) apresentaram lesões únicas e ulceradas, com bordas elevadas e bem delimitadas, ao longo dos períodos analisados. A Figura 4 mostra as fotomicrografias das orelhas dos animais infectados com o inóculo de 10^5 e 10^6 , sendo possível acompanhar a progressão das lesões nos períodos avaliados. Com 60 d.p.i., foi verificado o início do processo de cicatrização das úlceras, como observado na imagem do grupo com inóculo de 10^6 (Figura 4).

Os animais que foram infectados com o inóculo de 10^6 apresentaram ulceração a partir de 10 dias. As lesões atingiram espessuras com média de 1.3mm e se mantiveram por volta desse valor por praticamente todo o período de observação. Foi possível observar uma pequena queda na espessura da lesão a partir do 35º dia de infecção, que se manteve provavelmente estável nos dias subsequentes (Gráfico 4).

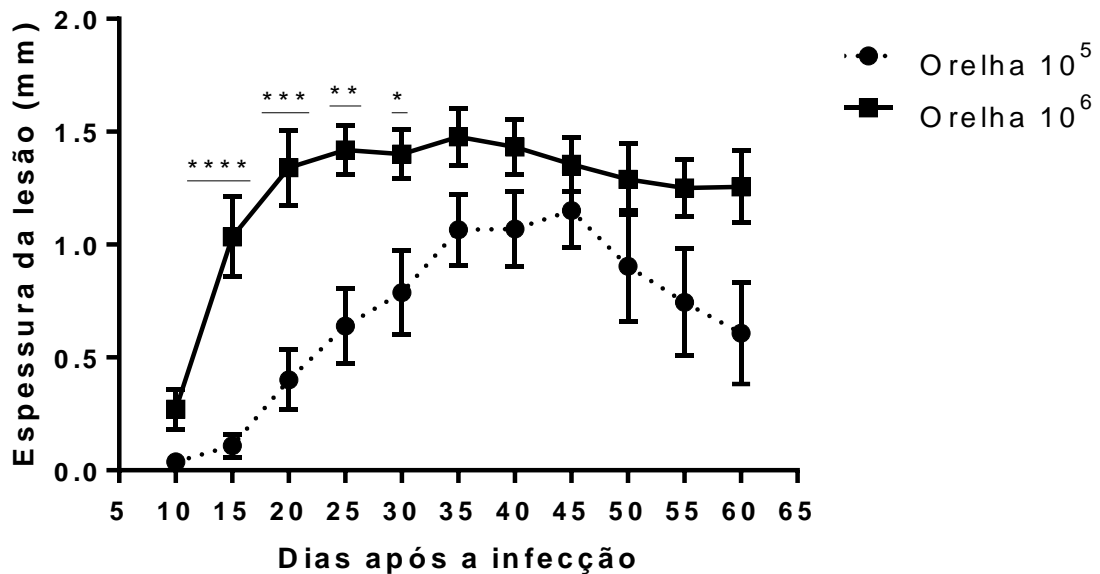
Os animais que receberam o inóculo de 10^5 apresentaram nódulos mais tardiamente, a partir de 20 d.p.i, que os grupos de inóculo de 10^6 . Poucos animais desenvolveram ulceração neste grupo e alguns animais tiveram lesões de tamanho comparável aos infectados com 10^6 . As lesões atingiram espessuras médias de 1.1mm, entretanto, após 45 d.p.i, a lesão começou a diminuir na maioria dos animais, o que levou a uma queda considerável, provavelmente iniciando o processo de cicatrização. Até os 60 dias, todos os animais ainda apresentavam lesões, entretanto, mostravam-se consideravelmente menores (Gráfico 4).

Figura 4: Fotomicrografias dos aspectos das lesões nas orelhas de hamster após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborada pelo autor. As fotomicrografias superiores correspondem aos animais que receberam inóculo de 10^5 promastigotas, e as inferiores aos animais com inóculo de 10^6 promastigotas de *L. braziliensis*.

Gráfico 4: Espessura da lesão de orelha de hamsters após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico apresenta média aritmética \pm o erro padrão das médias. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p > 0,0001$).

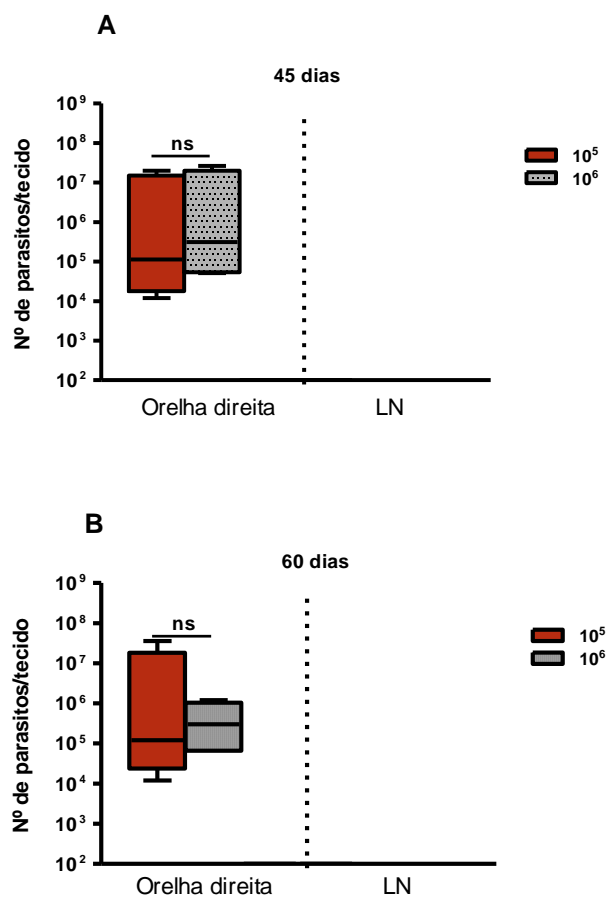
5.2.2 Avaliação da carga parasitária na orelha com inóculos 10^5 ou 10^6

Após a eutanásia dos animais, a carga parasitária de diferentes tecidos foi avaliada em cada grupo. Fígado, baço, orelha infectada e linfonodo retromaxilar foram retirados dos animais a fim de se obter a carga parasitária nesses tecidos.

Não foi detectada disseminação dos parasitos para linfonodo, fígado e baço. Todas as amostras de orelha infectada, em ambos os grupos, apresentaram parasitos. A carga parasitária atingiu médias entre 10^4 e 10^7 aproximadamente de parasitos por tecido. O grupo que obteve menores médias de carga parasitária foi o de inóculo de 10^6 com 60 d.p.i. (Gráfico 5)

Não foi observada diferença estatística entre os grupos com diferentes inóculos.

Gráfico 5: Carga parasitária de orelha de hamster após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de *L. braziliensis*



Fonte: Elaborado pelo autor. Gráfico apresenta média aritmética \pm erro padrão das médias. Ns= sem significância estatística.

5.2.3 Expressão de mediadores inflamatórios no linfonodo de drenagem

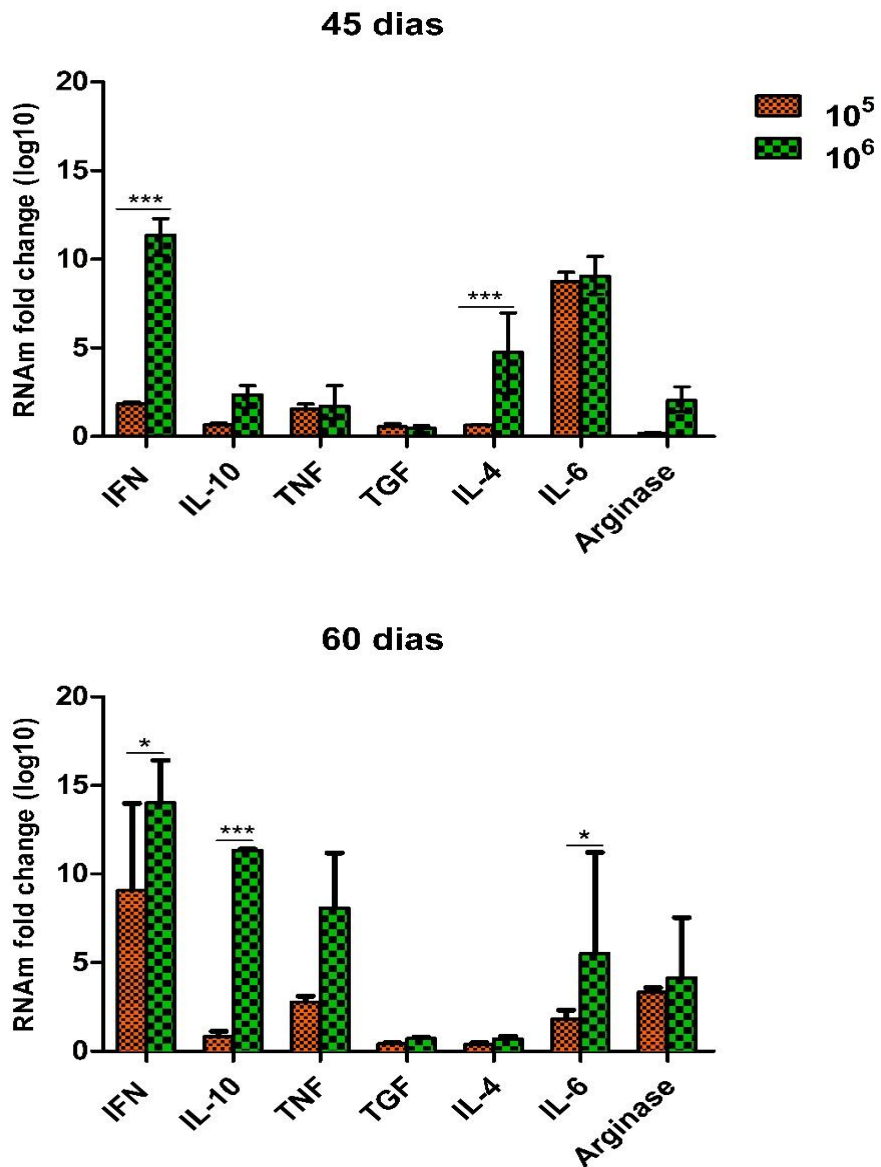
Com 45 dias de infecção foi notável a diferença de IFN- γ entre os animais infectados com 10^5 comparado com 10^6 promastigotas (Gráfico 6). Os animais infectados com 10^6 apresentaram uma elevada expressão de IFN- γ e bem superior à dos grupos de 10^5 ($p < 0.001$). Ainda nas citocinas inflamatórias, IL-6 também teve uma elevada expressão, entretanto, com valores semelhantes entre os diferentes inóculos. O TNF- α se manteve com baixa expressão e sem diferença estatística entre os diferentes inóculos. Das citocinas antiinflamatórias, IL-10 apresentou baixa expressão, com uma pequena diferença entre os inóculos, mas sem diferença estatística. O TGF- β manteve baixa expressão em ambos os grupos, e IL-4 apresentou uma expressão mais elevada no grupo de 10^6 em comparação ao de 10^5 ($p < 0.001$). Com relação a arginase, observou-se baixa expressão, com uma pequena diferença entre os inóculos (maior em 10^6), entretanto, sem significância estatística (Gráfico 6).

Com 60 dias de infecção, o IFN- γ apresentou elevada expressão (e também foi mais expresso quando comparado ao período de 45 dias), com maior expressão no grupo de 10^6 ($p < 0,05$). O IL-6 apresentou menor expressão, se comparada ao tempo de 45 dias, e apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de inóculos ($p < 0.05$), com maior expressão no grupo de 10^6 . O TNF- α apresentou alta expressão quando comparada aos grupos de 45 dias, e apresentou maior expressão no grupo de 10^6 , entretanto, sem significância estatística (Gráfico 6).

Das citocinas anti-inflamatórias, observou-se uma elevada expressão do IL-10 no grupo de 10^6 , e bem superior à do grupo de 10^5 ($p < 0.001$). Tanto o TGF- β , como o IL-4 apresentaram baixa expressão, e sem significância estatística entre os grupos.

Arginase apresentou uma maior expressão, se comparada ao período de 45 dias, sem diferença estatística entre os inóculos. Em nenhum dos grupos avaliados foi encontrada expressão da enzima iNOS (Óxido nítrico sintetase induzida).

Gráfico 6: Expressão de citocinas e arginase no linfonodo retromaxilar de hamsters após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de *L. braziliensis*.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados são expressos como mediana com intervalo interquartil. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

5.2.4. Avaliação da reação inflamatória nos diferentes inóculos na orelha

Dos parâmetros analisados nas lesões de orelha como os infiltrados inflamatórios, reações granulomatosas, macrófagos vacuolizados, células gigantes, corpos de Schaumann e desarranjo na arquitetura do tecido, foram encontrados nos grupos avaliados. O grupo que apresentou menor intensidade para todos esses aspectos foi o dos animais de 10^5 , aos 60 d.p.i. Em contrapartida, os grupos que apresentaram maior intensidade para todos esses aspectos (com exceção do desarranjo tecidual) foram os grupos dos animais infectados com 10^6 , em ambos os períodos analisados, 45 e 60 d.p.i. (Tabela 3).

A presença de parasito foi visualizada em todos os grupos, com exceção do inóculo 10^5 , aos 60 d.p.i. Necrose e neovascularização só foram visualizadas no grupo de 10^5 , no período de 45 dias, mas em baixa intensidade (Tabela 3).

Ao fazer uma comparação temporal entre os inóculos, é possível perceber que nos animais infectados com 10^5 , as alterações inflamatórias mostraram-se mais intensas com 45 dias do que com 60 d.p.i., cujas alterações foram menos intensas. Comparando-se os animais infectados com 10^6 promastigotas nos diferentes tempos, observou-se intensidade semelhante nos diversos parâmetros. A intensidade foi mais intensa na maioria dos parâmetros analisados em ambos os grupos, diferentemente do que aconteceu nos grupos de 10^5 (Tabela 3).

Em relação ao fígado e baço, independente do grupo em questão, não foram observadas quaisquer alterações.

Tabela 3: Alterações histopatológicas na lesão de orelha de hamster infectado após inóculos de 10^5 e 10^6 com promastigotas de *L. braziliensis*.

Aspectos Histopatológicos	Exp 1 45 dias		Exp 1 60 dias	
	Tecido		Tecido	
	Orelha (10^5)	Orelha (10^6)	Orelha (10^5)	Orelha (10^6)
Presença de úlcera	+ (1/4)	+ (1/3)	+ (1/4)	+ (1/2)
Presença de eosinófilos	+ (4/4)	- (3/3)	- (4/4)	- (2/2)
Infiltrados inflamatórios	+++ (4/4)	+++ (3/3)	++(1/4)	+++ (2/2)
Reações granulomatosas	++(3/4)	+++ (3/3)	++(1/4)	+++ (2/2)
Macrófagos vacuolizados	++ (4/4)	+++ (3/3)	++ (1/4)	+++ (2/2)
Formas amastigotas de Leishmanias	++ (4/4)	++ (3/3)	- (4/4)	++ (2/2)
Células gigantes	++ (1/4)	+++ (3/3)	++ (1/4)	+++ (2/2)
Corpúsculos de Schaumann	++ (2/4)	+++ (3/3)	++ (1/4)	+++ (2/2)
Presença de necrose	++ (2/4)	- (3/3)	- (4/4)	- (2/2)
Desarranjo da arquitetura do tecido	+ (4/4)	+ (3/3)	+ (1/4)	+ (2/2)
Neovascularização	+ (2/4)	- (3/3)	- (4/4)	- (2/2)

n= número de animais por grupo; (-) Ausência; (+) presença de 1-25%; (++) presença de 25-50%; (+++) >50%.

6. DISCUSSÃO

A principal espécie responsável pela leishmaniose tegumentar no Brasil e nas Américas é *L. (V.) braziliensis*, e sua importância na dinâmica da doença está não só na sua ampla distribuição geográfica, como também na possibilidade de desenvolver a forma mucosa, que é mais grave e de tratamento mais difícil (PEARSON et al., 2000; DEN BOER et al., 2011). Portanto, o estudo das leishmanioses em modelo experimental é de extrema importância para o entendimento da sua imunopatogênese da doença, bem como para o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas.

Neste estudo foi comparado o modelo de infecção cutânea na orelha de hamster com o modelo tradicional de infecção em pata, e em seguida foram comparados dois diferentes inóculos (10^5 e 10^6) no modelo de infecção na orelha, utilizando inóculos próximos ao inóculo natural dos flebotomíneos, de modo a garantir a infecção, mas sem levar a uma doença exacerbada. A derme da orelha ainda não tinha sido testada como sítio de inoculação no modelo hamster, e tão pouco infecção com um baixo inóculo, o que torna este estudo inédito.

A partir dos dados do presente trabalho, foi verificado que as lesões apareceram a partir do vigésimo dia de infecção, independente se a infecção foi na da orelha ou na pata, e tornando-se crônicas e progressivas, vale ressaltar, entretanto, que as lesões na orelha foram sempre maiores que as lesões observadas na pata. O hamster é conhecido na literatura como altamente susceptível à infecção por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e reproduz perfeitamente a leishmaniose tegumentar causada por espécies como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* (OLIVEIRA et al., 2004). As lesões geradas pela infecção tendem a se desenvolver rapidamente nesse modelo, apresentando evolução de curso crônico, o que permite monitoramento por longos períodos, útil em estudos terapêuticos e imunológicos (HOMMEL et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2004).

Há estudos que mostram que a infecção cutânea no hamster reproduz muitos dos aspectos observados na infecção humana, como a linfadenopatia (HOMMEL et al., 1995), fato este que não foi observado no presente estudo, na concentração de parasitos utilizada, que foi de 10^5 , quando a infecção foi realizada na pata. Ao contrário, no modelo de infecção na derme da orelha foi observado

disseminação de parasitos para os linfonodos de drenagem da lesão, mas não foram detectados parasitos no fígado e baço, sugerindo que um baixo inóculo neste modelo não é capaz de causar uma doença exacerbada no hamster. Interessante que não foram observados parasitos na lesão e nem no linfonodo poplíteo dos animais infectados na pata.

Os animais que foram inoculados na derme da orelha desenvolveram lesões maiores e ulceradas, diferentemente dos animais que foram inoculados na pata, cujas lesões foram sempre menores, nodulares e sem ulcerações. Há trabalhos que mostram que o local de inoculação dos parasitos no modelo hamster pode influenciar no curso da doença, uma vez que infecções realizadas na pata, focinho e orelha com *L. braziliensis* mostraram ser melhores 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 e multiplicação dos parasitos (ZELEDÓN et al., 1969; OSORIO et al., 2003).

Além desses fatores, a resposta imunológica local pode influenciar no controle ou exacerbção 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 lesões de pata (ZÉLEDON et al., 1969, OSÓRIO et al., 2003), o que corrobora com os achados do presente estudo.

Quanto às lesões de orelha com diferentes inóculos (10^5 e 10^6 promastigotas), foram observadas lesões, em sua maioria, ulceradas, com bordas elevadas com espessura relativamente semelhante entre os grupos de diferentes inóculos. Os grupos com inóculos de 10^5 demoraram mais para apresentar o nódulo inicial e o processo ulcerativo. Isso foi reportado anteriormente por Ribeiro-Romão et al., 2014, que compararam inóculos de 10^4 , 10^5 , e 10^6 de *L. braziliensis* em pata de hamster, e perceberam semelhança entre na espessura da lesão nos inóculos de 10^5 e 10^6 , mas o inóculo de 10^6 apresentou lesões mais graves ao longo do tempo. Cortês, em 2010, também percebeu resultado semelhante ao comparar inóculos de 10^3 e 10^6 de *L. major* e *L. amazonensis*.

Apesar de uma lesão com maior dano tecidual e ulceração mais grave nos animais que receberam inóculo maior, a carga parasitária encontrada no tecido da orelha não apresentou diferença estatística, entre os grupos analisados, nos

períodos de 45 e 60d.p.i. Ao contrário do que foi observado neste estudo, De Moura et al., 2005, observaram que a parasitemia diminuiu na orelha do animal, acompanhando a queda da lesão. Entretanto, resultados semelhantes foram encontrados por Ribeiro-Romão e colaboradores, em 2013, mostrando que mesmo com a diferença de inóculos (10^4 , 10^5 e 10^6), a carga parasitária nas lesões foi semelhante (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2013).

Nos trabalhos mais recentes, como o de De Moura et al., em 2005, que infectaram camundongos BALB/c na intraderme da orelha, com inóculo de 10^5 promastigotas de *L. braziliensis* e analisaram a carga parasitária no linfonodo retromaxilar, observaram parasitos durante todo o período de infecção (a partir da 2ª semana até a 10ª semana), e inclusive após a eliminação da carga parasitária nas lesões (8ª semana), os parasitos permaneceram no linfonodo regional. Ribeiro-Romão et al., 2013, utilizaram o modelo hamster, infectando os animais com inóculos de 10^4 , 10^5 e 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* na pata traseira, e ao final do experimento, com 105 dias, ainda encontraram parasitos no linfonodo regional. Portanto, seria necessário um acompanhamento por um período maior de tempo para se observar se os animais infectados com 10^5 iriam reduzir a carga parasitária e as lesões totalmente.

Um fato interessante sobre os resultados da carga parasitária é que o único tecido em que foi detectado parasitos, entre os tecidos analisados, foi o tecido da orelha. Estudos anteriores mostraram que na infecção cutânea, no modelo hamster, aspectos como linfadenopatia são observados, assim como na infecção humana (HOMMEL et al. 1995). O linfonodo é um importante sítio de proliferação do parasito durante a infecção, e um dos primeiros órgãos afetados durante a disseminação sistêmica do parasito, o parasito pode inclusive persistir dentro de macrófagos ou fibroblastos dos linfonodos de drenagem por períodos indefinidos, ajudando desta forma na modelação da resposta imunológica (MOLL; FLOHE; BLANK, 1995).

O presente estudo, por sua vez, é um trabalho inédito, visto que tenta propor um novo modelo de infecção de *L. braziliensis* por via intradérmica na orelha de hamster. Desse modo, não existe na literatura trabalhos que comprovem a existência ou ausência de parasitos no linfonodo regional em algum momento após a infecção, neste modelo. Nesse presente estudo não foram detectados parasitos nos linfonodos de drenagem em nenhum dos grupos, nem com 45 dias (com 10^5 e 10^6

promastigotas), nem com 60 dias (com 10^5 e 10^6 promastigotas). Lembrando que a carga parasitária não foi avaliada antes de 30 dias de infecção, e portanto, não é possível afirmar que os parasitos não tenham migrado para o linfonodo de drenagem na face inicial da infecção, antes dos 30 dias. Existe a possibilidade de os parasitos terem sido eliminados do linfonodo regional antes do período final do experimento, provavelmente pela forte resposta imunológica que foi observada. Isso ficará mais claro mais adiante com a discussão da expressão de citocinas observada no linfonodo. Outra explicação seria que os parasitos estavam presentes em um número muito baixo e a metodologia de Diluição Limitante utilizada no presente estudo não foi sensível o suficiente para detectar carga parasitária muito baixa.

Um achado promissor foi não ter sido encontrado parasitos no fígado ou no baço foi um resultado interessante, visto que o presente trabalho buscava um modelo que não apresentasse visceralização, e portanto, permitisse uma sobrevida maior ao animal e semelhança com a LTA em pacientes humanos. No trabalho de Ribeiro-Romão et al. em 2013, utilizando a pata traseira do hamster para inoculação do parasito, os autores observaram disseminação do parasito para o baço ao fim dos 105 dias do experimento em boa parte dos animais, além disso, observaram também que a carga parasitária no baço aumentou a medida que o inóculo inicial foi maior. A disseminação do parasito em leishmaniose cutânea no modelo hamster e também no de camundongos tem sido relatada (SOLIMAN, 2006). Entretanto, estudos demonstrando a disseminação do parasito para o fígado e baço nesse novo sítio de infecção (orelha) ainda não foram realizados. De Moura et al. em 2005, que trabalharam com o modelo de infecção intradérmica na orelha de BALB/c não analisaram a carga parasitária em fígado e baço, e portanto não existe registro da disseminação do parasito para estes órgãos nesse modelo de infecção.

No modelo de leishmaniose cutânea em hamster, um estudo que realizou a infecção por *L. (V.) panamensis*, indicou um perfil não polarizado da resposta imunológica (MELBY et. al., 1998). Em outros estudos foi visto um perfil de resposta imunológica do tipo 1 (IL12p40, IFN- γ) e do tipo 2 (IL-10 e TGF- β) na fase crônica de infecção (OSORIO et al. 2003) e um perfil misto de resposta inicial de resposta com susceptibilidade à infecção, com aumento de IFN- γ e IL12p40, IL-4, IL-13, IL-10 e IL-21 (ESPITIA et. al., 2010). O mesmo foi observado no presente estudo, que apresentou uma expressão mista de várias citocinas nos linfonodos, principalmente nos linfonodos poplíteos, ou seja, quando a infecção foi realizada na pata.

A expressão de IFN- γ permaneceu maior que a maioria das citocinas, nos linfonodos retromaxilar (orelha) e poplíteo (pata), durante os dois períodos de infecção analisados, sem a detecção de parasitos nos linfonodos poplíteo e retromaxilar. A alta expressão de IFN- γ observada nos linfonodos retromaxilar e poplíteo dos animais infectados com o inóculo 10^5 , sem a presença de parasitos nesses órgãos, pode indicar a ativação de macrófagos, com consequente morte dos parasitos (AWASHTI et al., 2004, CUMMINGS et al., 2010). Outros estudos mostraram também que a citocina IFN- γ é muito importante para o controle da infecção por *Leishmania* e sua ausência pode causar disseminação dos parasitos do local da infecção para outros tecidos e órgãos (ROCHA et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2010). Recentemente foi mostrado que a morte de *Leishmania* pode ser atribuída às células TCD4+ produtoras de IFN- γ (SANTOS et al., 2013) associado aos linfócitos T CD8+, levando à cura na leishmaniose cutânea (DA-CRUZ et al., 2005). Os achados do presente trabalho corroboram com esses estudos, sugerindo que a presença desta citocina favoreceu uma resposta efetora eficiente para controlar a replicação dos parasitos e a sua disseminação.

Observou-se a presença de citocinas inflamatórias em ambos os grupos infectados com inóculo 10^5 e 10^6 na orelha, nos períodos de 45 e 60d.p.i. Das citocinas inflamatórias avaliadas, o IFN- γ teve uma maior expressão nos linfonodos retromaxilares, independente do inóculo inicial. É mostrado na literatura que o IFN- γ , produzido pelas células TCD4+ diferenciadas, ativa macrófagos que juntamente com óxido nítrico (NO), produzido a partir da iNOS2 (Óxido nítrico sintetase induzida tipo 2), são mediadores responsáveis pela morte do parasito (ANDRADE et al., 2014). Então, o presente estudo corrobora com a literatura, visto a alta expressão de IFN- γ e a ausência de parasitos no linfonodo.

Outro fato importante, foi a elevada expressão do IFN- γ no período de 60d.p.i, quando comparado ao período de 45d.p.i, e se manteve sempre superior no grupo de 10^6 , em ambos os períodos analisados. Isso pode sugerir que a resposta Th1 no grupo de 10^6 pode ser bem mais intenso em vista ao maior número de parasitos inoculados na orelha.

Constatou-se neste estudo, uma baixa expressão de TNF- α nos grupos com diferentes inóculos no período de 45d.p.i, quando comparado com os grupos de 60d.p.i. Com 45d.p.i, essa citocina foi pouco expressa nos grupos de 10^5 e 10^6 e em ambos a expressão foi relativamente baixa. Com 60d.p.i, a expressão foi elevada em

ambos os grupos, com maior expressão no grupo de 10^6 . Na literatura é relatado que uma resposta imunológica do tipo Th1 com produção de IFN- γ e TNF- α é responsável por impedir a proliferação de parasitos intracelulares e controlar a disseminação de infecções, como leishmanioses (CARVALHO et al., 1985). Em um estudo mais recente, Oliveira et al., 2014, investigaram o papel das citocinas inflamatórias e antiinflamatórias na leishmaniose tegumentar. Estes autores mostraram a importância de IFN- γ e TNF- α como principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória, e também na destruição tecidual observada na doença com eventual processo de ulcerações cutâneas.

Estudos mostraram que o IFN- γ pode ativar macrófagos com ou sem a presença de TNF- α , e portanto, a produção de NO pelos macrófagos pode ocorrer independente de TNF- α , o que ressalta IFN- γ como agente primordial na ação leishmanicida dos macrófagos (VIEIRA et al., 1996). Desse modo, mesmo com a baixa expressão de TNF- α no período de 45 dias, seria possível a ação leishmanicida dos macrófagos por indução de IFN- γ , utilizando outras vias microbicidas.

Trabalhos anteriores relacionam lesões mais graves de pacientes de LTA localizada causada por *L. braziliensis* com maiores níveis de IFN- γ e TNF- α (ANTONELLI et al., 2005). O dano tecidual na orelha de hamster foi bem maior nos animais que receberam maior número de promastigotas, o que faz sentido, em vista da maior expressão das citocinas inflamatórias, IFN- γ , TNF- α e IL-6, nesse grupo.

Quanto aos grupos infectados na orelha e na pata com inóculos de 10^5 , observou-se no período de 30d.p.i. que a expressão de IL-6 no linfonodo retromaxilar (orelha), apresentou-se mais expressa quando comparada às outras citocinas, entretanto, observou-se diminuição na expressão dessa citocina no período de 60d.p.i. No linfonodo poplíteo (pata), ao final de 30d.p.i., a expressão de IL-6 foi relativamente baixa quando comparada com a maioria das citocinas e no período de 60 dias a expressão dessa citocina foi maior que IL -10, IL-4 e arginase. Em relação aos diferentes inóculos, 10^5 e 10^6 , foi observada maior expressão de IL-6 com 45d.p.i., sem diferença entre os inóculos. Com 60d.p.i. a expressão de IL-6 foi um pouco menor e apresentou diferença estatística entre os inóculos, com maior expressão no grupo de 10^6 . Sabe-se que as atividades da citocina IL-6 estão principalmente ligadas à transição da imunidade inata para a imunidade adaptativa, pois atua na manutenção da inflamação de fase aguda, progressão de doenças

crônicas e na maturação de diferentes tipos celulares, como a proliferação de células T (JONES, 2005). Como foi visto no presente trabalho, essa citocina juntamente com IFN- γ , deve estar participando no aumento da resposta inflamatória no início da infecção nos linfonodos, corroborando com o controle dos parasitos.

Tem sido mostrado a inibição da produção de IL-6 em células de Langerhans por *L. amazonenses* (CAMPELO, 2014) e em experimentos de imunoterapia, que utilizaram células dendríticas deficientes em IL-6, durante a infecção por *L. donovani* (STÄGER et al., 2006). Observou-se que esta citocina desempenha um importante papel no mecanismo de supressão da resposta imunológica mediada por células dendríticas, principalmente as células de Langerhans, contra os parasitos. A expressão de IL-6 possivelmente pode ser explicada pela sua produção a partir das células de Langerhans presentes no linfonodo. No linfonodo retromaxilar (orelha), o aumento da expressão de IL-6 com 30 dias e a diminuição com 60 dias, pode possivelmente estar contribuindo no período inicial da infecção para o controle dos parasitos, o que corrobora com a ausência de parasitos ao final de 60 dias. Esse controle dos parasitos também parece ser encontrado nos linfonodos poplíteo (pata) devido ao aumento da expressão de IL-6 e ausência dos parasitos neste tecido ao longo dos períodos analisados. A maior produção no grupo de 10^6 , comparado ao de 10^5 (com 60 dias) pode ser explicada pelo fato de que no grupo de maior inóculo ter sido observada uma resposta Th1 mais forte, com maior expressão da maioria de citocinas inflamatórias.

Quanto à produção de arginina e NO neste trabalho, a expressão de NO não foi detectável nos períodos analisados, enquanto a arginase, no linfonodo retromaxilar (orelha), foi mais expresso que IL-4 e TGF- β ao final de 60d.p.i., quando comparado com o período de 30d.p.i. Ao contrário, no linfonodo poplíteo (pata), a arginase foi mais expressa que a maioria das citocinas no período de 60d.p.i. quando comparado ao final de 30d.p.i. Estudos anteriores demonstraram que a baixa expressão de NO em hamster era devido a uma baixa expressão e atividade da iNOS, provavelmente em consequência de uma falha na região promotora do gene (MELBY et al., 2001; PEREZ et al., 2006). Foi visto também que a redução na produção de NO em hamster infectados por *L. donovani* pode ser mediada pelo aumento da expressão de arginase, porque a arginase compete com a iNOS pelo mesmo substrato necessário para a síntese de NO, a L-arginina. Além disso, durante

a síntese de arginina, a partir da L-arginina, ocorre o aumento de poliaminas, que também favorecem o crescimento dos parasitos (OSORIO et al., 2012). No presente estudo os dados sugerem que outros mecanismos estão envolvidos na eliminação dos parasitos nos linfonodos, independente de NO, como já discutido acima.

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, a maior parte delas se manteve com baixa expressão. O TGF- β se manteve com baixa expressão em todos os grupos analisados, independente do sítio de inoculação ou tamanho do inóculo. O IL-4 também apresentou baixa expressão na maior parte dos grupos, com um pequeno aumento no grupo infectado com 10^6 , no período de 45d.p.i. Apenas o IL-10 apresentou uma alta expressão no grupo infectado com 10^6 no tempo de 60d.p.i. É válido enfatizar que a resposta imunológica nas leishmanioses nunca segue um padrão de citocinas totalmente Th1 ou totalmente Th2. Atualmente, na leishmaniose questiona-se a simplicidade do Th1/ Th2 de resistência/suscetibilidade à infecção intracelular (ALEXANDER; BROMBACHER, 2012), e isso é explicado pela possibilidade de expressão em conjunto de citocinas ditas pertencentes a um perfil Th1 (citocinas inflamatórias) e de citocinas pertencentes a um perfil Th2 (citocinas antiinflamatórias). Esta resposta imunológica apresentando um balanço entre citocinas do tipo 1 e do tipo 2 (reposta Th1 e Th2), observada muito expressivamente no modelo de infecção na pata com um baixo inóculo do que no modelo de infecção intradérmica na orelha sugere que uma modulação da resposta inflamatória contribuiu para a natureza mais benigna da doença.

Oliveira et al., em 2014, mostraram que IL-10 tem função de regular a produção de TNF- α na leishmaniose cutânea. Isso pode explicar o aumento de IL-10 no 10^6 com 60 dias, que seria em decorrência do aumento de TNF- α . Oliveira e Barral-Netto, 2005, também concluíram que o aumento de TNF- α pode desencadear uma exacerbação na produção de IFN- γ e gerar, portanto, um grande dano tecidual. Pacientes com lesões nas mucosas da orofaringe apresentam uma relação de alta produção de IFN- γ , e baixa produção de IL-10, sugerindo que a incapacidade de modular essa produção exacerbada de IFN- γ leve a um maior dano tecidual (GOMES-SILVA et al., 2007). A alta expressão de IL-10 no grupo infectado com 10^6 promastigotas, no período de 60d.p.i., sugere um controle da produção de TNF- α e isso de forma indireta pode diminuir também a expressão de IFN- γ .

Quanto à análise histopatológica nas orelhas e patas nos períodos de 30, 45 e 60d.p.i., verificou-se um infiltrado inflamatório mais intenso nos grupos de

animais infectados na intraderme da orelha. Vários estudos mostram que o ser humano e o hamster compartilham várias características histopatológicas na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014), como a presença de granuloma, rodeado e/ou intercalado por linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e eosinófilos, além da presença de corpúsculos de Schaumann, e que já foram observadas e bem caracterizadas em outros trabalhos envolvendo o modelo hamster na infecção por *L. braziliensis* (KAHL et al., 1991, SINAGRA et al., 1997; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014).

Amastigotas de *Leishmania* foram observadas nos períodos de 30 e 45d.p.i., ao contrário do período de 60d.p.i no linfonodo retromaxilar (orelha) e ausência de amastigotas nos linfonodos poplíteo (pata). Verificaram-se áreas com reação granulomatosa e corpos Schaumann, vistos em todos os períodos de análise, nos animais infectados na orelha, corroborando com a reação inflamatória mais intensa nestes animais. Ao contrário, nas amostras das patas não foram observadas essas características histopatológicas. A formação de granuloma mediado pela infecção por *L. braziliensis* é o principal achado histopatológico observado na doença humana (SOUZA-LEMOES et al., 2008), podendo haver também células gigantes multinucleadas e necrose (HEPBURN, 2000).

A fase inicial da reação inflamatória da infecção em hamster por espécies do gênero *Viannia* é caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, constituído por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos, sendo que a reação granulomatosa se estabelece a partir de 15 dias de infecção, caracterizando a fase crônica da doença (KAHL et al., 1991). Curiosamente, embora corpos Schaumann, não sejam geralmente descritos em seres humanos ou em outros experimentos com animais envolvendo leishmaniose (ESSAYAG et al., 2002), essas estruturas são comumente vistos em hamsters infectados por *L. braziliensis*, (GOMES-SILVA et al., 2013) e sua presença no interior de granulomas sugere um sistema fagocítico mononuclear frágil do hamster (LAURENTI et al., 1990; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014).

A análise histopatológica das lesões na orelha, geradas pelos inóculos de 10^5 e 10^6 , utilizando *L. braziliensis*, mostraram um maior comprometimento inflamatório nos grupos infectados com 10^6 promastigotas, nos períodos de 45 e 60d.p.i., com intensos infiltrados inflamatórios, reações granulomatosas, macrófagos vacuolizados, presença de células gigantes e corpos de Schaumann. Verificou-se

uma maior intensidade das reações granulomatosas, e dos corpos de Schaumann, nos animais infectados com os inóculos de 10^5 e 10^6 , em ambos os períodos analisados, corroborando com as reações inflamatórias intensas, conseqüentemente maiores ulcerações, principalmente nos grupos com inóculos de 10^6 . Ribeiro-Romão et al., em 2013, obtiveram resultados semelhantes no modelo hamster, mostrando que os animais infectados com os maiores inóculos (10^5 e 10^6) apresentaram maior comprometimento inflamatório local ao contrário dos animais que receberam menor inóculo (10^4).

O modelo hamster apresenta muitas características histopatológicas comuns aos pacientes humanos na infecção por *L. braziliensis*. Magalhães et al., 1986, relatam que a formação de granuloma é o principal achado histopatológico encontrado na infecção humana com LTA, caracterizando a reação como “Exsudativa e Granulomatosa”. Presença de infiltrado inflamatório, células gigantes e necrose também são características comuns nos achados histopatológicos da doença humana (MEHEGAN et al., 1999). Esses trabalhos fortalecem a hipótese do hamster como modelo ideal para LTA. Os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com essas informações.

Neste estudo, também foi observado que os animais infectados com 10^5 apresentarem uma diminuição no comprometimento inflamatório no período de 60d.p.i, ao contrário de 45d.p.i. Além disso, a presença de amastigotas foi verificado nos períodos analisados, com exceção no grupo de 10^5 no período de 60d.p.i. No gráfico referente à espessura da lesão, dos inóculos de 10^5 e 10^6 , no decorrer de 60d.p.i, observou-se uma diminuição da espessura das lesões no grupo de 10^5 , a partir de 45d.p.i., corroborando com os achados histopatológicos que mostraram um processo inflamatório menor neste grupo. A ausência de parasitos nesse grupo, somada com esses dados, fornece um indicativo maior de um possível controle do parasitismo nesses animais, ou a metodologia utilizada não é sensível o suficiente para detectar carga parasitária muito abaixo da que foi detectada no presente trabalho, como já discutido acima.

O fato de não ter sido encontrado alterações no fígado e baço corrobora com a análise da carga parasitária, na qual não houve visualização de parasitos. Desse modo, é possível sugerir a não disseminação do parasita para o fígado e baço.

O modelo do hamster tem sido subutilizado pela falta de reagentes imunológicos comerciais, necessários para uma investigação mais detalhada dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na doença. No entanto, neste estudo, o modelo de infecção na orelha em hamster com inóculo de 10^5 , mesmo causando lesões maiores e ulceradas do que o modelo tradicional de infecção na pata e menores quando comparados com o inóculo de 10^6 , com expressão de citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , e IL-6, não mostrou exacerbação da doença e nem disseminação para linfonodo, fígado e baço, podendo ser útil para abordar questões relacionadas com a modulação da resposta imunológica, disseminação do parasito e magnitude da fase crônica da doença. Além disso, uma infecção não exacerbada poderia facilitar a visualização de um possível efeito protetor de novos fármacos ou vacinas.

7 CONCLUSÃO

- A infecção na derme da orelha com baixos inóculos induz lesões ulceradas, diferentemente da pata, que apresenta pequenos nódulos sem ulcerações, sugerindo que o sítio de inoculação tem papel importante na apresentação clínica da doença;
- Baixa carga parasitaria inicial, independente do sítio de inoculação (orelha ou pata), parece não causar disseminação dos parasitos para o linfonodo regional, fígado e baço, até 60 dias pós-infecção, não induzindo provavelmente comprometimento sistêmico;
- No modelo de infecção na orelha a resposta imunológica apresenta perfil inflamatório com expressão significativa de IFN- γ , TNF- α , IL-6, ao contrário, no modelo de infecção na pata observa-se um perfil misto de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias tais como IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-4.
- Baixos inóculos no modelo de infecção da orelha induz, com maior intensidade alterações histopatológicas, diferente do modelo de infecção na pata, corroborando com as lesões ulceradas na orelha
- O modelo de infecção na derme da orelha com pequeno inóculo de *Leishmania braziliensis* apresenta possibilidade de estudos mais longos, pelo baixo comprometimento sistêmico, o que aumenta a sobrevivência do animal por mais tempo, permitindo o desenvolvimento de estudos com novos fármacos ou vacinas.

REFERÊNCIAS

- ADLER, S. Origin of the golden hamster *Cricetus auratus* as a laboratory animal. **Nature**, v.162, p.256, 1948.
- ADLER, J. H. The origin of the golden hamster as a laboratory animal. **Isr J Med Sci**, v.25, p.206-9, 1989.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T. Helper 1/T Helper 2 cells and resistance/susceptibility to leishmania infection: is this paradigm still relevant. **Frontiers in Immunology**, 2012. doi: 10.3389/fimmu.2012.00080.
- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol.** v. 22, n.12, p. 552-557, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.; OLIVEIRA, R. Eds. Animais de Laboratório Criação e Experimentação. Rio de Janeiro: Fiocruz ed. 2006.
- ANDRADE, A.C.; FRANÇA, L.A.; ARAUJO, C.F.; ROCHA, V.J.; SILVA, M.C.B.; FIGUEIRAS, C.P.; OLIVEIRA, P.R.; FREITAS, L.A.R.; VERAS, P.S.T.; CARVALHO, L.P. Extracellular Vesicles from Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v.8, n.9, p.3161, Setembro 2014.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6. **Available from SciELO Books** . Disponível em: <<http://books.scielo.org>>. Acesso em: 07 dez. 2015.
- ANTONELLI, L.R.V., DUTRA, W.O., ALMEIDA, R.P., BACELLAR, O., CARVALHO, E.M., GOLLOB, K.J. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett** 101:226-230.
- ARAGÃO, H. 1922. 'Transmissão da leishmaniose no Brasil pelo Phlebotomus intermedius'. **O Brasil Médico**, 36, p. 129.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J Med Res**, v. 119, p. 238-258, 2004.
- BOMFIM, G.; NASCIMENTO, C.; COSTA, J.; CARVALHO, E.M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. 1996. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Exp Parasitol** 84:188-194.
- BALDWIN, T., SAKTHIANANDESWAREN, A., CURTIS, J.M., KUMAR, B., SMYTH, G.K., FOOTE, S.J., HANDMAN, E. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. **Parasite**

Immunol. 2007 Oct;29(10):501-13.

BATES, P.A.; TETLEY, L. 1993. Leishmania mexicana: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. **Exp. Parasitol.** 76: 412–423.

BILATE, A.M.B., SALEMI, V.M., RAMIRES, F.J., BRITO, T., RUSSO, M., FONSECA, S.G., FAE, K.C., MARTINS, D.G., SILVA, A.M., MADY, C., KALIL, J., CUNHA-NETO, E. 2007. TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes and Infection** 9: 1104-1113.

BOGDAN C.; DONHAUSER N.; DÖRING R.; RÖLLINGHOFF M.; DIEFENBACH A.; RITTIG M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 191, n. 12, p. 2121–2130, 2000.

BRASIL, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Cap.11 p.639-701.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília 2014. 120 p.: il.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L; REED, S. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol.**[PubMed: 4067312]v. 135, p. 4144–4148. 1985.

Center for Food Security and Public Health (CFSPH). Leishmaniasis (cutaneous and visceral). Iowa State of University, College of Veterinary Medicine, Iowa, 2009. Disponível em: < <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/leishmaniasis.pdf>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

CHAMPAGNE, A. 2006. Mesocricetus auratus. Disponível em: < http://animaldiversity.org/accounts/Mesocricetus_auratus/>. Acesso em: 16 nov. 2015.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. Leishmanioses Do Continente Americano. 1. ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014. 512p.

CORTÊS, D. F. Infecções com baixas doses de Leishmania amazonensis: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar Americana. Tese (Doutorado em Ciências). Departamento de Biotecnologia e Farmacologia, **Universidade Federal de Minas Gerais**. 2010.

COSTA NC, PETERS NC, MARUYAMA SR, BRITO JR EC, SANTOS IKFM. Vaccines for the Leishmaniasis: Proposals for a Research Agenda. **Plos Negl Trop Dis** 5: 943, 2011.

COUTINHO, S.P.C.; MENDONÇA, S.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; DÓREA, R. Pathogenesis in immunopathology of leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 1987;82:214-28.

DA-CRUZ, A.M.; PIRMEZ, C. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Coura J (ed). *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 2005. Rio de Janeiro. Edição. Guanabara Koogan, V. 2.

DA-CRUZ, A.M.; PIRMEZ, C. 2012. Leishmaniose tegumentar Americana. In: Coura JR (eds). *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 2a. Edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

DA SILVA-COUTO, L., RIBEIRO-ROMÃO, R.P., SAAVEDRA, A.F., DA SILVA COSTA SOUZA, B.L., MOREIRA, O.C., GOMES-SILVA, A., ROSSI-BERGMANN, B., DA-CRUZ, A.M., PINTO, E.F. Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. **PLoS Negl Trop Dis**. 2015 Jan; 9(1):e3439.

DEA-AYUELA, M.A., RAMA-INIGUEZ, S., ALUNDA, J.M., BOLAS-FERNANDEZ, F. 2007. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. **Vet Res Commun**, 31, 703-717.

DEKREY, G.K., LIMA, H.C., TITUS, R.G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**. 1998 Feb;66(2):827-9.

DEN BOER M, Argaw D, Jannin J, Alvar J 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin Microbiol Infect** 17(10):1471-7

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

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 8, p. 961–972, 2014.

ESPITIA, C.M., ZHAO, W., SILDARRIAGA, O., OSORIO, Y., HARRISON, L.M., CAPPELLO, M., TRAVI, B.L., MELBY, P.C. 2010. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC Immunol** 22: 11-31.

ESSAYAG, S.M., LANDAETA, M.E., HARTUNG, C., MAGALDI, S., SPENCER, L., SUÁREZ, R., GARCÍA, F., PÉREZ, E. 2002. Histopathologic and histochemical characterization of calcified structures in hamsters inoculated with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycoses** 45: 351–357.

EVANS, D. 1989. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of

Leishmania, World Health Organization, Geneva, 45 pp.

EVESON, J. W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 10, n. 3, p. 129-146, June 1981.

FORATTINI, O. P. Entomologia médica. Sao Paulo: Editora Edgar Blucher, 1973. v. 4.

GAMBOA, D., TORRES, K., DE DONCKER, S., ZIMIC, M., AREVALO, J., DUJARDIN, J.C. 2008. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology* 135:319-326.

GARG, R.A.; DUBE. 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res** 123:439-454.

GIANNINI, M. S. 1974. Effects of promastigotes growth phase, frequency of subculture and host age on promastigote-initiated infections in *Leishmania donovani* in the gold hamster. *J. Protoz.* n. 21, p. 521-527.

GOMES-SILVA, A., VALVERDE, J.G., RIBEIRO-ROMÃO, R.P., PLÁCIDO-PEREIRA, R.M., DA-CRUZ, A.M. 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.

GOMES, C.M.; PAULA, N.A.; MORAIS, O.O.; SOARES, K.A.; ROSELINO A.M.; SAMPAIO R.N.R.; Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Anais Brasileiros Dermatologia*, Rio de Janeiro, v. 89, n.5, Oct. 2014.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, Philadelphia, v. 26, p. 293-307, 2012.

GOULDING, D., THOMPSON, H., EMERSON, J., FAIRWEATHER, N.F., DOUGAN, G., DOUCE, G.R. 2009. Distinctive profiles of infection and pathology in hamsters infected with *Clostridium difficile* strains 630 and B1. *Infect Immun* 77: 5478–5485.

GRIMALDI, G.J.; TESH, R.B. 1993. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250.

HEAD, J.R., BILLINGHAM, R.E. Immunologically privileged sites in transplantation immunology and oncology. *Perspec Biol Med*. 1985;29(1):115-31.

HEPBURN, N. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology*, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000. ISSN 1365-2230.

HARKNESS, J.E., WAGNER, J.E. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3ed. São Paulo: Roca; 1993. p. 57-85.

HOMMEL, M., JAFFE, C.L., TRAVI, B., MILON, G. 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine**

and Parasitol 89:55-73.

KAHL, L., BYRAM, J., DAVID, J., COMERFORD, S., VON LICHTENBERG, F. 1991. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Comparative pathology of GoldenHamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*44:218-32.

KALANTARI, H; HEMMATI, A; BAVARSAD, N; REZAIE, A; AHMADI, S. Effect of topical Nanoliposomes of Paromomycin on Rats Liver and Kidney. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v.9, n.4, Nov,2014.

KEDZIERSKI L, ZHU Y, HANDMAN E. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitol** 133: 87-112, 2006.

KEDZIERSKI L. Leishmaniasis Vaccine: Where are we today? **J Glob Infect Dis** 2: 177-185, 2010.

LAURENTI, M. D.; SOTTO, M. N.; CORBETT, C. E. P.; MATTA, V. L. R.; DUARTE, M. I. S. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. **Int. J. Exp. Pathol.**, Reino Unido, v. 71, n. 6, p. 791-797, 1990.

LIMA, I. S.; SILVA J. S.; ALMEIDA, V. A. JUNIOR, F. G. L.; SOUZA, P. A. N.; LARANJEIRA, D.F.; MOURA-NETO, J.P.; FRAGA,D.B.M.; FREITAS, L.A.R.; DOS-SANTOS, W.L.C. Severe Clinical Presentation of Visceral Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs with Disruption of the Splenic White Pulp. **PLOS ONE**.v.9 (2),2014.

LIEW, F. Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunology**.v.69, p.570-573. 1990.

LIMA, B. S. Perfil epidemiológico da Leishmaniose Tegumentar Americana em São Vicente Férrer, Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, Brasil. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

LAINSON, R. The American leishmaniases: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77(5):569-96.

LINDENBERG A. A úlcera de Bauru e o seu micróbio. Comunicação preventiva. *Revista Médica de S. Paulo.* 1909;12:116-120.

MACHADO, P.R.; ROSA, M.E.A.; COSTA, D.; MIGNAC, M.; SILVA, J.S.; SCHRIEFER, A., et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.** 2011 Jul; 105 (2011): 438-44.

MAGALHÃES, A.V., MORAES, M.A.P., RAICK, A.N., LLANOS-CUENTRAS, A., COSTA, J.M.L., CUBA, C.C., MARSDEN, P.D. 1986. Histopatologia da leishmaniose

tegumentar Americana por *Leishmania braziliensis braziliensis*: padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Rev Inst Med Trop** 28: 253-262.

MEHREGAN, D. R.; MEHREGAN, A. H.; MEHGERAN, D. A. Histologic diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol.* v.17, p.297-304. 1999.

MELBY, P.C., TRYON, V.V., CHANDRASEKAR, B., FREEMAN, G.L. 1998. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 66: 2135-2142.

MELBY, P.C., CHANDRASEKAR, B., ZHAO, W., COE, E. 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent th1-like cytokine response. *J. Immunol* 166: 1912-1920.

MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. Vetores das leishmanioses nas Américas. In: Barral A e Costa J. *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. Salvador.: CYTED: 2011. P. 55-65.

MOLL, H.; RITTER, U.; FLOHE, S.; ERB, K.; BAUER, C. ; BLANK, C. Cutaneous leishmaniasis: a model for analysis of the immunoregulation by accessory cells. **Med Microbiol Immunol (Berl)**.v.184n: 4, p.163-168. 1996.

MOLL, H.; FLOHE, 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.**v.378, p. 507-509, 1995.

MOMEM, H.; CUPOLILLO, E. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul-Aug;95(4):583-8, 2000.

MONTEIRO, C.M.C.C. *Leishmaniose tegumentar americana: uma abordagem farmacológica*. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmaceutica)-Centro Universitário De Anápolis/Unievangelica, Universidade Católica de Goiás, Goiania, 2009.

MOREIRA, Juliano. Distribuição geográfica. *Gazeta Médica, Bahia*, 1895.

MOREIRA, N., VITORIANO-SOUZA, J., ROATT, B.M., VIEIRA, P.M., KER, H.G., DE OLIVEIRA CARDOSO, J.M., GIUNCHETTI, R.C., CARNEIRO, C.M., DE LANA, M., REIS, A.B. 2012. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: "Leishman Donovan units" versus real-time PCR. **PLoS One**, 7, e47907.

MOURA, T.R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study american cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

NEAL, R.A., HALE, C. 1983. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World

leishmaniasis. *Parasitology*, 87: 7-13.

NIETO, A., DOMINGUEZ-BERNAL, G., ORDEN, J.A., DE LA FUENTE, R., MADRID-ELENA, N., CARRION, J. 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res*, 42, 39.

OLIVEIRA, C.I., TEIXEIRA, M.J., GOMES, R., BARRAL, A., BRODSKY, C. 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. **Drug Discovery Today** 1: 81-86.

OLIVEIRA, C.I., BARRAL-NETTO, M. 2005. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *GM Bahia* 75: 35-45.

ORGANIZACAO PANAMERICANA DA SAUDE (OPAS); ORGANIZACAO MUNDIAL DA SAUDE (OMS). **Informe Epidemiológico das Américas**. n. 3, Jul. 2015.

OSORIO, Y., MELBY, P.C., PIRMEZ, C., CHANDRASEKAR, B., GUARÍN, N., TRAVI, B.L. 2003. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. **Parasite Immunol** 25:139-148.

OSORIO, Y. et al. Pregnancy enhances the innate immune response in experimental cutaneous leishmaniasis through hormone-modulated nitric oxide production. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 1413-1422, 2008.

OSORIO EY, Zhao W, Espitia C, Saldarriaga O, Hawel L, Byus CV, Travi BL, Melby PC 2012. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PloS Pathog** 8: 1-17.

PAPADOGIANNAKIS, E.I., KOUTINAS, A.F. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Vet Immunol Immunopathol**. 2015 Feb 15;163(3-4):94-102.

PEARSON, D.P.; SOUZA, A.Q.; JERONIMO, S.M.B. Leishmania Species:mVisceral (Kala-Azar), Cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E. & DULIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5.ed. New York, Churchill Livingstone, 2000. Parte III, v.2, cap.265, p.2831-44.

PEREZ, L., CHANDRASEKAR, B., SALDARRIAGA, O., ZHAO, W., ARTEAGA, L., TRAVI, B., MELBY, P. 2006. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. **J Immunol** 176:5519-5528.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R.L. 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91: 1390-1395.

QUESENBERRY, K.; CARPENTER, J. 2012. Ferrets, rabbits, and rodents: Clinical

medicine and surgery. (3rd ed.). St. Louis, Mo.: Saunders/Elsevier.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2007 Sep;7(9):581-96.

REY, J.A., TRAVI, B.L., VALENCIA, A.Z., SARAIVA, N.G. 1990. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. **The American J. Trop. Med. Hyg.** 43: 623–631.

REY, Luís. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. Influência do tamanho do inóculo de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* na imunopatogênese da leishmaniose cutânea experimental no modelo golden hamster (*Mesocricetus auratus*). 2013. Tese (Doutorado em Ciências). Fundação Oswaldo Cruz, **Instituto Oswaldo Cruz**. 2013.

RIBEIRO-ROMÃO, R.P., MOREIRA, O.C., OSORIO, E.Y., CYSNE-FINKELSTEIN, L., GOMES-SILVA, A., VALVERDE, J.G., PIRMEZ, C., DA-CRUZ AM, PINTO EF. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations. **Infect Immun.** 2014 Dec;82(12):5203-13.

ROCHA, F.J., SCHLEICHER, U., MATTNER, J., ALBER, G., BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in mice. **Infect Immun.** 2007;75(8):3823-32.

RODRIGUES, A.M.; HUEB, M.; SANTOS, T.A.R.R.; FONTES, C.J.F. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniatado de meglumina. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.2, Mar./Apr. 2006.

ROMERO, G.A.S.; GUERRA, M.V.F; PAES, M.G.; MACÊDO, V.O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*viannia*) *braziliensis* and *L.* (*v.*) *guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456–465, 2001.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and further notes on Leishman's bodies. **Brit Med J**, v.2, p.1261-1401, 1903.

SAAVEDRA, A.F. Análise molecular da resposta imune no modelo hamster dourado e avaliação da eficácia da vacina lack DNA por via intranasal contra infecção por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Instituto Oswaldo Cruz**. Pós-graduação em biologia parasitária. Rio de Janeiro, 2015.

SARAIVA, N., HAZBÓN, M., OSORIO, Y., VALDERRAMA, L., WALKER, J., SANTRICH, C., CORTÁZAR, T., LEBOWITZ, J., TRAVI, B. 2005. Protective immunogenicity of the paraflagellar rod protein 2 of *Leishmania mexicana*. **Vaccine** 23:984-95.

SINAGRA, A.; LUNA, C.; ABRAHAM, D.; IANELLA, M.C.; RIARTE, A.; KROLEWIECKI, A. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. **Rev Soc Bras Med Trop**.v. 40, p.627-630. 2007

SIROIS, M., Ed. Medicina de Animais de Laboratório Princípios e Procedimento. São Paulo: Rocaed. 2008.

SOLIMAN, M.F.M. 2006. The persistence, dissemination and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146-150.

SOUZA-LEMONS C, DE-CAMPOS S, TEVA A, CÔRTE-REAL S, FONSECA E, PORROZZI R, GRIMALDI GJ 2008. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. **J Pathol** 216: 375-386.

SPLENDRE, Affonso. Boubá, blastomicose, leishmaniose: nota sobre algumas afecções framboesicas observadas no Brasil. Imprensa Médica, [S.l.], jan. 1911.

TITUS, R.G., MARCHAND, M., BOON, T., LOUIS, J.A. 1985. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunol* 7: 545-555

TRAVI, B., OSORIO, Y., MELBY, P., CHANDRASEKAR, B., ARTEAGA, L., SARAVIA, N. 2002. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp*. *Infect. Immun* 70:2288-2296.

TURETZ, M.L.; MACHADO, P.R.; Ko. A.I., ALVES, F; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R.P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W.D. Jr; CARVALHO, E.M. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis*. 186: 1829-1834.

VAN ASSCHE, T., DESCHACHT, M., DA LUZ, R.A., MAES, L., COS, P. Leishmaniamacrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51: 337- 351, 2011.

VERÇOSA, B.L.A.; LEMOS, C.M.; MENDONÇA, I.L.; SILVA, S.M. M.S.; CARVALHO, S.M.; GOTO, H.; COSTA, F.A.L. Transmission potential, skin inflammatory response and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. *BMC Veterinary Research*, v.4, p.45, 2008.

WALTERHOUSE, G.T. The Hamster: Reproduction and behavior: Proceedings of learned societies. In: Siegel, H.I. New York: Plenum Press, c1985, p.6, 1940.

WANASEN, N.; X.I.N., L.; SOONG, L. Pathogenic role of B cells and antibodies in murine *Leishmania amazonensis* infection. *International Journal for Parasitology*, Oxford, v. 38, n. 3-4, p. 417–429, 2008.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmaniasis: report of a**

meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2010.

WHO. World Health Organization. **Global Health Observatory Data Repository: leishmaniasis.** WHO, Geneva, Switzerland, 2014.

WHO. World Health Organization. Health topics: **Leishmaniasis.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 16 nov. 2015.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis control programma. Annual country reports, 2013. Disponível em: <gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png>. Acesso em: 16 nov. 2015.

WILSON, H., DIECKMANN, B., CHILDS, B. 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in *Golden* hamsters. ***Experimental Parasitology*** 47: 270-283.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 26 n. 4, p.644-5, 2010.

ZAKAI, H.A., CHANCE, M.L., BATES, P.A. 1998. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitol.* 116: 305–309.

ZELEDÓN, R., BLANCO, E., DE MONGE, E. 1969. Comparative experimental infections with Costa Rican strains of *Leishmania braziliensis* Vianna, 1911. *Acta Trop.*26: 136-155.

ANEXO I

ANEXO 1 - Declaração de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.



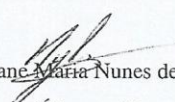
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 30/2014, sobre o projeto intitulado: “**INFLUÊNCIA DO SÍTIO DE INOCULAÇÃO NA IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *Leishmania braziliensis* EM HAMSTER**”, de responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Maria Jania Teixeira e 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 28 de agosto de 2014.

Fortaleza, 15 de setembro de 2014

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