



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

HELLEN ANASTÁCIA DA SILVA SOARES

**PROGRESSÃO DA INFECÇÃO CUTÂNEA E A PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA
PELE E NO SORO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB/c INFECTADOS COM
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Orientadora: Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias

BELÉM-PARÁ

2017

HELLEN ANASTÁCIA DA SILVA SOARES

**PROGRESSÃO DA INFECÇÃO CUTÂNEA E A PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA
PELE E NO SORO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB/c INFECTADOS COM
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias

BELÉM-PARÁ

2017

HELLEN ANASTÁCIA DA SILVA SOARES

**PROGRESSÃO DA INFECÇÃO CUTÂNEA E A PRODUÇÃO DE CITOCINAS NA
PELE E NO SORO DE CAMUNDONGOS C57BL/6 E BALB/c INFECTADOS COM
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Bacharel em Biomedicina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Dra. Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias – INSTITUTO
EVANDRO CHAGAS

Avaliador 1: Chubert Bernardo Castro de Sena – ICB/UFPA

Avaliador 2: Luis Henrique Seabra de Farias – Escola Superior da Amazônia

Avaliador 3: José Antonio Picanço Diniz Junior (Suplente) – INSTITUTO EVANDRO
CHAGAS

BELÉM-PARÁ

2017

Não sonhe a sua vida, viva o seu sonho!
(Luizinho Fornera)

DEDICATÓRIA

A Deus.

À nossa senhora.

À mamãe, *Madalena Silva*, por tanta abdicação e todo o amor!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. *Ana Paula Drummond Rodrigues de Farias* pela orientação, dedicação, disponibilidade e amor à ciência. Muito obrigada!

À *Xamilla Roberta Gonçalves*, AMIGA e esteio/assessoria para todos os aspectos da minha vida, todos; obrigada por me ensinar a perseverar e confiar. À *Juliana Monfer Soares*, privilégio e sorte de uma vez na vida e, também, irmã caçula. À *Auanna de Nazaré Belarmino*, minha *soul sister*, que dispensa comentários desde o primeiro, sortudo, dia em que entrou e me deu a honra em participar da minha vida. Ao *Flavio Alencar Seabra*, pelo estímulo, atenção e possibilidades!

Aos colegas do laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas, especialmente ao Msc. *Felipe Tuji* pelos longos auxílios em biologia molecular, ao Msc. *Sanderson Araújo* pelo apoio nas técnicas histopatológicas e à mestrande *Ana Patrícia Pacua*, especialmente, pelas engraçadas e contribuintes conversas, assim como pela companhia em vários turnos noturnos neste referido laboratório. Já ao setor de Hepatologia deste mesmo Instituto, agradecimentos à *Andreza Dinheiro*, *Alex Souza* e *Andrea Lima* pela disponibilidade e ensinamentos.

Aos animais experimentais, meu imenso respeito pela contribuição.

Aos meus amigos e familiares por tanto apoio e carinho.

À Universidade Federal do Pará.

Ao órgão fomentador deste estudo: Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, muitíssimo obrigada.

É muito bom poder continuar...

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados nas regiões brasileiras entre os anos de 1990 e 2014.	3
Figura 2 - Aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana.	5
Figura 3 - Desenvolvimento dos subtipos de células efectoras T CD4 ⁺ .	12
Figura 4 - Camundongos isogênicos, <i>Mus musculus</i> das linhagens C57BL/6 e BALB/c.	20
Figura 5 - Desenho experimental do presente estudo.	29
Figura 6 - Diluição seriada para obtenção da curva-padrão para RT-qPCR.	35
Figura 7 – Tamanho da lesão (mm) em cada uma das cinco semanas do período de 30 dias após infecção.	42
Figura 8 – Tamanho da lesão (mm) em cada uma das cinco semanas do período de 60 dias após infecção.	43
Figura 9 – Análise histopatológica de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados após 30 dias de infecção a partir do surgimento da primeira lesão.	45
Figura 10 – Análise histopatológica de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados após 60 dias de infecção a partir do surgimento da primeira lesão.	46
Figura 11 – Produção da citocina IL-2 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-2 em pele e B: IL-2 em soro.	48
Figura 12 – Produção da citocina IL-10 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-10 em pele e B: IL-10 em soro.	49
Figura 13 – Produção da citocina IL-17A em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-17A em pele e B: IL-17A em soro.	50
Figura 14 – Produção da citocina IFN- γ em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IFN- γ em pele e B: IFN- γ em soro.	51

Figura 15 - Produção da citocina IL-4 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-4 em pele e B: IL-4 em soro. 52

Figura 16 - Produção da citocina IL-6 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-6 em pele e B: IL-6 em soro. 53

Figura 17 - Produção da citocina TNF- α em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: TNF- α em pele e B: TNF- α em soro. 54

Figura 18 – Produção de nitrito em sobrenadante do macerado dos tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. 56

Figura 19 – Equação da reta da curva padrão demonstrando a eficiência da mesma através de valores do coeficiente de correlação de Pearson e do coeficiente de determinação. 57

Figura 20 – Ciclos de amplificação da padronização do ensaio de PCR para quantificação da carga parasitária a partir de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. 58

Figura 21 – Carga parasitária (parasitos/mg de pele) em fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. 60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais e número de animais por grupo. LA: <i>L. (L.) amazonensis</i> .	31
Quadro 2 - Etapas para o processamento histopatológico.	32
Quadro 3 - Bateria de álcool e xilol para desparafinização.	33
Quadro 4 - Bateria de álcool e xilol para desidratação.	33
Quadro 5 - Primers e probe utilizados na RT-qPCR.	36
Quadro 6 - Reagentes utilizados na RT-qPCR para cada amostra.	36
Quadro 7 - Condições utilizadas na RT-qPCR.	37

RESUMO

As leishmanioses são patologias causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e transmitidas por vetores flebotomíneos, podendo acarretar distintas manifestações clínicas sob a forma tegumentar (através das subformas cutânea ou cutânea localizada, cutânea difusa e mucocutânea) e visceral; assim, de acordo com o condicionamento genético e desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro e também da espécie *Leishmania* spp., pode-se ter perfis divergentes de resposta imunológica. Atualmente, por conta da variabilidade genética tanto do hospedeiro quanto da espécie parasitária, o padrão clássico e bem estabelecido dos perfis Th1 e Th2 não representa a resposta imunológica padronizada e bem segmentada frente às leishmanioses, necessitando maiores estudos baseados em infecções experimentais murinas. Neste estudo, foi analisada a progressão da infecção cutânea e a produção de citocinas na pele e no soro de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, ambos suscetíveis, mas exibindo divergentes cursos clínicos. Avaliamos as lesões após 30 e 60 dias de infecção e observamos surgimento precoce acompanhado de lesões mais severas em animais BALB/c com uma presença mais freqüente de vacúolos de macrófagos intensamente parasitados, assim como uma carga parasitária superior, bem como menor atividade nitrérgica desde a fase aguda (30 dias) da infecção. Em contrapartida, animais C57BL/6 apresentaram lesões mais brandas, menor carga parasitária, maior atividade nitrérgica e maior produção das citocinas IL-4, IL-6 e TNF- α durante a fase crônica da infecção (60 dias). Concluimos que estes fatos estão relacionados com o perfil ou intensidade de resposta imune desenvolvido por cada um desses animais.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; leishmaniose tegumentar americana; animais isogênicos; resposta imune; curso da infecção; inflamação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. LEISHMANIOSE	2
1.1.1. Leishmaniose no Brasil e na região Norte	3
1.1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana e suas formas clínicas	4
1.2. LEISHMANIOSE CUTÂNEA E LINFÓCITOS T AUXILIAR	5
1.2.1. LINFÓCITO T AUXILIAR E SUBTIPOS	10
1.2.2. Subtipo TH1	13
1.2.2. Subtipo TH2	14
1.2.3. Subtipo TH17	16
1.4. CAMUNDONGO COMO MODELO EXPERIMENTAL	18
1.2.1. Camundongos isogênicos	18
1.2.2. Camundongos como modelos experimentais das Leishmanioses	20
2. OBJETIVOS	26
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. ÁREA DE ESTUDO	29
3.2. TIPO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO DE DADOS	29
3.3. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO	30
3.3.1. Animais	30
3.3.2. Cultivo e manutenção dos parasitos	30
3.3.3. Infecção dos animais e grupos experimentais	30
3.3.4. Curso da evolução da infecção	31
3.3.5. Análise histopatológica das biópsias	31
3.3.5.1. Processamento para histopatologia	31
3.3.5.2. Coloração com hematoxilina e eosina	33
3.3.6. Dosagem de citocinas em fragmentos de tecido e soro de animais infectados	34
3.3.7. Dosagem de nitrito	34
3.3.8. Extração de RNA em fragmentos de tecido de animais infectados	34
3.3.9. Análise da expressão gênica por meio de reações de RT-PCR em tempo real	35
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38

3.5. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA	38
4. RESULTADOS	39
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. ANEXO	81

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são compreendidas como um conjunto de doenças infecto-parasitárias que afetam centenas de milhares de pessoas em todo o mundo, principalmente em países em desenvolvimento (SILVA et al., 2005); esta zoonose é provocada por protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e à família Tripanosomatidae, sendo transmitida através do inseto vetor fêmea, o flebótomo (conhecido como mosquito-palha ou birigui). A doença apresenta como reservatórios pessoas e animais infectados com a doença; cães e roedores são os reservatórios mais preocupantes, devido à íntima relação entre estes e os seres humanos (LIMA-JÚNIOR, 2013).

As leishmanioses podem ser divididas, segundo as diversas formas clínicas apresentadas, em dois grandes grupos: a leishmaniose tegumentar (LT) compreendendo a leishmaniose cutânea localizada (LCL), a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose visceral (LV) também chamada popularmente de “calazar” (AWASTHI et al., 2004). As manifestações clínicas divergem segundo as características particulares de cada hospedeiro e também da espécie envolvida (SAHA et al., 2006).

Para o grupo de leishmanioses correspondente à LT, a principal espécie diagnosticada e também estudada é a *L. amazonensis*, assim, sabe-se que esta é o agente causador da leishmaniose cutânea difusa, uma doença que se caracteriza por uma resposta imune diminuída em pacientes infectados (CONVIT et al. 1972).

Com exceção do continente Antártida e Oceania, as leishmanioses encontram-se presentes em todos os outros continentes. Sendo, assim, a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias mundiais (LIMA-JÚNIOR, 2013). Para a Organização Mundial da Saúde (2010) estipula-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas correm o risco de contrair, anualmente, alguma leishmaniose no planeta; porém, estima-se que por volta de 12 milhões de pessoas já encontram-se infectadas. Esses dados tornam-se ainda mais alarmantes, pois há surgimento de aproximadamente dois milhões de novos casos por ano (destes, 1-1.5 milhões de casos correspondem à leishmaniose tegumentar americana [LTA] e 500.000 à

leishmaniose visceral; tendo em média, 70.000 casos resultando em óbito) (WHO, 2010). A alta incidência da doença, tal como a severidade das lesões acometidas, levou a Organização Mundial de Saúde a incluir a leishmaniose entre as seis endemias mais importantes no mundo (LIMA-JÚNIOR, 2013).

1.1.1. Leishmaniose no Brasil e na região Norte

De todos os países da América latina, o Brasil apresenta os maiores índices da doença, sendo a leishmaniose tegumentar americana (LTA) a forma clínica mais diagnosticada entre os brasileiros. A distribuição geográfica da leishmaniose no Brasil é ampla e tem sido registrada em todo o território nacional (BRASIL, 2010).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) no Brasil, de 1990 a 2014, foram notificados e registrados 99.967 casos de leishmaniose tegumentar americana; em média, cerca de 20 novos casos a cada 100.000 habitantes no Brasil. Deste total, mais de 50% correspondem à região norte e mais de 40%, dos dados nortistas, só ao estado do Pará; equivalendo a 18% dos casos totais brasileiros (vide figura 1).

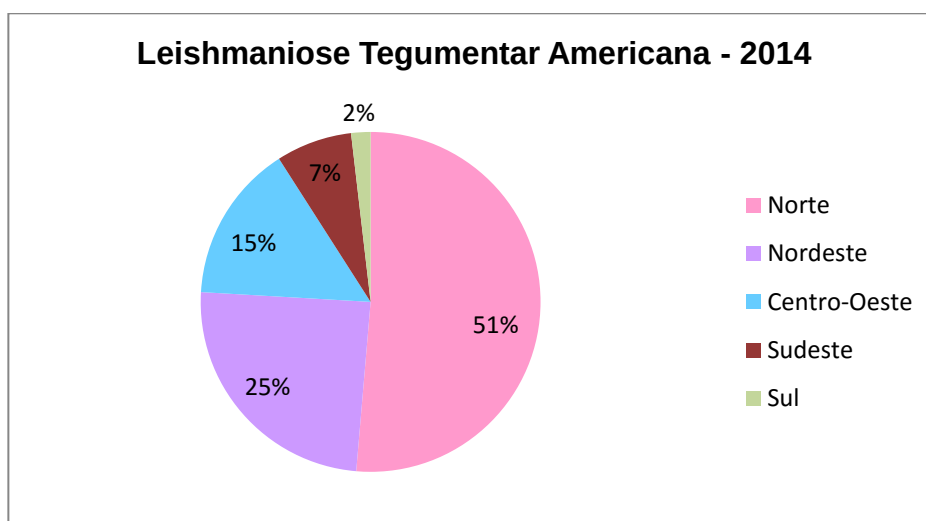


Figura 1 – Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados nas regiões brasileiras entre os anos de 1990 e 2014. Fonte: BRASIL, 2014 (adaptado).

1.1.2. Leishmaniose Tegumentar Americana e suas formas clínicas

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, com baixa letalidade (Brasil, 2010) e as suas manifestações clínicas são bastante amplas, basicamente se apresentam sob as seguintes formas clínicas: cutânea (LC) ou cutânea localizada (LCL), disseminada (LD), mucosa (LM) ou mucocutânea (LMC) e difusa (LCD) (BRASIL, 2016; SILVEIRA, 2009; VELASQUEZ, 2014). Essas características clínicas apresentam variações entre as regiões e dentro de uma mesma região, pois cada uma dessas formas está diretamente relacionada com a espécie do parasito, com o perfil imunológico de resposta imune do hospedeiro e do condicionamento genético da resposta do paciente (Brasil, 2010; SILVEIRA, 2009). A forma cutânea ou cutânea localizada é a apresentação mais comum de leishmaniose, sendo responsável por mais de 90% dos casos do Brasil; dos casos notificados, 3% a 6% apresentam a LM, no entanto, em alguns municípios endêmicos, essa proporção pode ser superior a 25% (Brasil, 2016). Esta forma clínica é causada principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Já a LCD é rara e seu agente causador conhecido é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (Brasil, 2007). A leishmaniose cutânea localizada é caracterizada pela presença de lesões geralmente arredondadas com bordas bem elevadas, podendo ser apresentadas em formas únicas ou múltiplas. Inicialmente, a irritação provocada é bem semelhante a uma simples picada de inseto; com o tempo, a evolução leva ao aumento significativo de tamanho e profundidade. Normalmente esta é a forma mais comum e menos agressiva da doença, já que em alguns casos sua resolução se dá sem a necessidade de terapia, ou seja, através da auto-cura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; VELASQUEZ, 2014; SILVEIRA, 2009). Em alguns pacientes, pode haver ocorrência de infecções secundárias normalmente de origem bacteriana, lesões que apresentam crostas purulentas e eczema (SILVEIRA et al., 2009). Já a forma difusa, se caracteriza pela formação de nódulos cheios de parasitos por todo o corpo, mas sem apresentar ulceração (VELASQUEZ, 2014).

A forma mucosa ou mucocutânea caracteriza-se pontualmente por infiltrado inflamatório na mucosa nasal e oral; ao contrário da forma cutânea, em que há possibilidade de cura espontânea, ela necessita obrigatoriamente de tratamento para regredir (SILVEIRA, 2009; BRASIL, 2016). Alguns poucos portadores da forma clínica cutânea localizada desenvolvem a forma clínica dita mucocutânea, fato

relacionado aos casos onde não houve utilização de terapia ou a mesma foi realizada de forma inadequada (VELASQUEZ, 2014).



Figura 2 - Aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana. A: Lesão cutânea localizada em estágio inicial, com característica de placa infiltrativa. B: Lesão cutânea localizada, ulcerada com bordas elevadas infiltradas com hiperemia ao seu redor; estágio inicial da ulceração. C: Lesão ulcerada, única, pequena, com bordas elevadas, infiltradas com hiperemia ao seu redor e fundo granuloso. D: Lesão ulcerada, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso. E: Lesão em placa infiltrativa com bordas crostosas e áreas satélites de aspecto nódulo infiltrativo. F: Lesão em placa infiltrativa com descamação central e hiperpigmentação ao redor. G: Lesão cutânea múltipla, ulceradas, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso com crosta a nível central. Fonte: BRASIL, 2010.

1.2. LEISHMANIOSE CUTÂNEA E LINFÓCITOS T AUXILIAR

A resposta imunopatológica da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem sido analisada através dos subconjuntos de células T CD4⁺ e CD8⁺ e as diversas citocinas produzidas por estas células no sangue, na pele e lesões mucosas dos pacientes. Há um interesse particular em INF- γ e IL-4, uma vez que se acredita que estas citocinas desempenham um papel crucial na determinação da resistência (resposta imunológica de tipo Th1) ou da susceptibilidade (resposta imune de tipo Th2) contra a infecção por leishmania (SILVEIRA et al., 2009).

Assim, a infecção por *L. amazonensis* pode apresentar padrões de resposta imune de acordo com o parasita envolvido e também com o hospedeiro. Já que até recentemente, acreditava-se que a resposta imune do hospedeiro desempenhava sozinho o principal fator que influenciava o resultado da infecção humana. Mas na verdade, há evidências nítidas mostrando o contrário, uma vez que espécies de *Leishmania* têm sido mostradas como responsáveis por diferentes formas clínicas de doença no homem (SILVEIRA et al., 1997; LAINSON R & SHAW JJ, 2005; SILVEIRA, 2009). Isto é, o papel das espécies de *Leishmania* na determinação do resultado da infecção humana é imprescindível; pois, *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis* apresentam capacidades distintas na direção da dicotomia de resposta imunitária da infecção humana (SILVEIRA et al., 2009).

Inicialmente pensou-se que o desenvolvimento diferencial das respostas Th1 e Th2 se traduziam diretamente nas apresentações clínicas observadas nos pacientes. Este raciocínio baseou-se na descoberta de que as células CD4⁺ Th1 medeiam a resistência em camundongos infectados com *Leishmania major* enquanto que as células CD4⁺ Th2 promovem a susceptibilidade. No entanto, os avanços na compreensão da doença, tanto em humanos, como em camundongos, indicam que uma resposta celular mais complexa determina o resultado da infecção (SCOTT e NOVAIS, 2016). Logo, enquanto *L. (V.) braziliensis* apresenta elevada capacidade de interação com CD para modular uma resposta imunitária preferencial de tipo CD4⁺ Th1; *L. (L.) amazonensis*, em contraste, apresenta uma competência clara para interagir com CD na modulação de uma resposta imune proeminente do tipo CD4⁺ Th2 (SILVEIRA et al., 2009). Porém, estudos posteriores vêm demonstrando que os perfis de resposta imune não são tão bem definidos assim.

Dentre os modelos experimentais utilizados, o de infecção de camundongos BALB/c e C57BL/6 por *L. major* é bem descrito. A primeira linhagem é dita suscetível, desencadeando lesões; enquanto que a segunda, resistente (SILVA, 2011). Tal fato está diretamente relacionado com diferenças no perfil de citocinas produzidas durante o curso da referida infecção em ambos os modelos animais (HEINZEL et al., 1989). Este modelo experimental foi utilizado com o intuito de caracterizar a função desempenhada pelos macrófagos M1 (associados à resposta Th1) e M2 (associados à resposta Th2) (MILLS et al., 2000; LAINSON R & SHAW JJ, 2005). Mostrou-se que o estímulo de macrófagos M1 com LPS levou à produção de óxido nítrico (NO), o qual inibe a divisão ou proliferação celular. Já na linhagem M2, observou-se um aumento na síntese de moléculas responsáveis por estimular a divisão ou proliferação celular, após estímulo com LPS; houve ainda produção de TGF-beta1 por macrófagos M2, molécula esta inibidora da síntese de NO (MILLS et al., 2000).

Heinzel (1989) demonstrou que animais BALB/c infectados por *L. major* apresentam um perfil predominante de resposta imune do tipo Th2, com liberação de citocinas como IL-4 e IL-10, diferente dos C57BL/6, caracterizados pela liberação de citocinas como IFN- γ e IL-12, as quais estimulam a síntese de NO nos macrófagos infectados, sendo esta uma substância conhecidamente leishmanicida. Já em animais suscetíveis, BALB/c, a infecção por *L. major* demonstrou também aumento na expressão de receptores para IL-4, fato que antecede a resposta Th2 e é imprescindível para a diferenciação de linfócitos T CD4 e essa expressão encontra-se relacionada com a presença de IL-12 (VELASQUEZ, 2014). Assim, as citocinas inflamatórias Th1, especialmente IFN- β , TNF- α e IL-12 são os fatores primordiais no início da resposta imune protetora contra a infecção por *L. major*; enquanto as citocinas Th2, tais como a IL-5, IL-4 e IL-13, facilitam a persistência de parasitas por regulação negativa da resposta imunitária Th1 (MASPI et al., 2016). Mas, quando a infecção por *L. amazonensis* acontece em camundongos, o perfil de resposta imune não segue um padrão totalmente dicotômico como observado para o modelo com *L. major* (TRIPATHI et al., 2007; VELASQUEZ, 2014). Observa-se que animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* não são capazes de erradicar o parasito, similar nas infecções por *L. major*, apesar dos animais C57BL/6 apresentarem maior resistência com relação ao BALB/c, fato ratificado pela carga parasitária nas lesões e até morfologia das mesmas (LIMA-JÚNIOR, 2013; SILVEIRA, 2009).

Durante o curso da infecção por *L. amazonensis*, encontra-se citocinas características de uma resposta Th2, como IL-4, mas também citocinas características do tipo Th1, como IFN- γ (MAIOLI, 2004). Então, a suscetibilidade de linhagens como BALB/c e C57BL/10 à infecção por *L. amazonensis* está mais relativo à ausência de uma resposta Th1 do que com o predomínio da resposta Th2 em si; já que animais tratados com anti-IL4 apresentaram uma redução significativa no desenvolvimento das lesões (AFONSO E SCOTT, 1993) e camundongos C57BL/6 que normalmente se auto-curam após a infecção com *L. major*, não conseguem resolver uma infecção com parasitas de *L. amazonensis* devido a uma defeituosa resposta do tipo TH1 (SCOTT e NOVAIS, 2016). No entanto, como determinadas espécies de *Leishmania* atenuam a resposta imunológica, e outras espécies o fazem, exacerbando essas respostas imunes, ainda permanece sendo uma incógnita (SCOTT e NOVAIS, 2016).

A função da IL-17 na LTA causada por diferentes espécies de *Leishmania* ainda é obscuro, pouco explorado (SCOTT e NOVAIS, 2016). Porém, Lopez Kostka (2009) já descreveu que camundongos BALB/c apresentam níveis elevados de IL-17 após a infecção com *L. major* e a deficiência de IL-17 está diretamente relacionada com um melhor controle da doença, mimetizando os baixos níveis de IL-10 observados nas lesões de pacientes; assim como o bloqueio da sinalização de IL-10 em animais, aumenta a produção de IL-17 e provoca uma doença mais grave, situação que é invertida pela neutralização de IL-17 (SCOTT e NOVAIS, 2016).

Em suma, Maspi (2016) afirma que como a LTA é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*; as citocinas pró e anti-inflamatórias desempenham papéis diferentes e decisivos na resistência/susceptibilidade e na imunopatogênese da infecção por *Leishmania*. Então, existem muitas complexidades na resposta imune contra a infecção por *Leishmania spp.* Já encontra-se bem relatado que a resistência à leishmaniose está relacionada com o desenvolvimento de resposta Th1 e sua respectiva produção de citocinas pró-inflamatórias (sendo estas: IL-12, IL-1, IFN- β , TNF- α e IL-2), responsáveis por conduzir a ativação de macrófagos e morte parasitárias (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; MASPI, 2016). Em contrapartida, a susceptibilidade à infecção está relacionada ao desenvolvimento de Th2 e sua respectiva produção de citocinas Th2 (tais como: IL-4, IL-5 e IL-13), responsáveis pela replicação e persistência do parasita (AWASTHI, 2004 ; MASPI, 2016).

Contudo, vários enigmas persistem sobre o exato papel das respostas imunitárias na imunoproteção e imunopatologia da LTA. A exemplo do papel da

resposta Th1 na imunoproteção contra LTA, mas que também atua na sintomatologia grave da imunopatologia da doença quando há produção exacerbada desta resposta; ao contrário, o desenvolvimento do perfil Th2 tem importância fundamental à persistência do parasita no local da infecção, porém se houver produção bem diminuta das suas citocinas anti-inflamatórias, este fato irá acelerar o processo cicatricial (MASPI et al., 2016).

1.2.1. LINFÓCITO T AUXILIAR E SUBTIPOS

Para ABBAS e colaboradores (2012) a ativação das células T gera, a partir de um pequeno *pool* de linfócitos virgens (*nãive*) com receptores predeterminados para qualquer antígeno, um número grande de células efetoras funcionais que são capazes de eliminar o qualquer. Ou então, originar uma população de células de memória para durar longos períodos, sendo estas capazes de rapidamente reagirem contra um determinado antígeno caso este seja reintroduzido (PARHAM, 2001; ABBAS et al., 2012).

Assim, as células T CD4⁺, efetoras da linhagem auxiliar, são classificadas em vários subtipos com base nos seus perfis e em função das citocinas produzidas. Algumas dessas células auxiliares (*helper*) diferenciadas são capazes de expressar moléculas de membrana e também secretar as citocinas que ativam/auxiliam os macrófagos a realizarem fagocitose; outros linfócitos auxiliares secretam citocinas que irão recrutar leucócitos e, assim, estimulam a inflamação. Outros amplificam as funções de barreira de mucosas e ainda há aqueles que permanecem nos órgãos linfóides para ajudarem na diferenciação de células B em células secretoras de anticorpos. Já as células T diferenciadas em células de memória possuem vida longa com uma elevada capacidade de reagir contra o antígeno, respondendo rapidamente a um possível encontro subsequente com o antígeno e também geram novas células efetoras capazes de eliminar o antígeno (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; ABBAS et al., 2012; LORENZI et al., 2012).

De maneira simplificada, os sinais de ativação das células T promovem a proliferação dessas células e sua consequente diferenciação em células efetoras e/ou células de memória. Esses sinais de ativação são divididos em: 1. Reconhecimento

do antígeno; 2. Coestimulação e 3. Citocinas produzidas pelas próprias células T, pelas células apresentadoras de antígeno (ACP) e outras células presentes no local do reconhecimento do antígeno (ABBAS et al., 2012).

O reconhecimento do antígeno é o primeiro sinal necessário para a ativação de linfócitos, sendo o que garante a especificidade da resposta; pois células T CD4⁺ reconhecem os complexos de peptídeo (MHC) exibidos pelas ACP, respondendo apenas aos antígenos proteicos ou aos agentes químicos ligados à proteína. Já a coestimulação se faz necessária, enquanto segundo sinal, pois o reconhecimento do antígeno sem coestimulação pode tornar as células T anérgicas, sem resposta ou induzir a apoptose; assim, as células apresentadoras de antígeno expressam moléculas, além do antígeno, necessário para ativação das células T, essas moléculas são conhecidas como coestimuladores e o “segundo sinal” para ativação das T é a coestimulação que funciona concomitante ao antígeno (“primeiro sinal”) para estimular essas células T. Já o terceiro sinal equivale às citocinas produzidas e, então, diferenciação final das células T CD4⁺ em células efetoras Th1, Th2 e Th17 (PARHAM, 2001; SOUZA *et al.*, 2010; ABBAS et al., 2012).

Então, ABBAS e colaboradores (2012) afirmam que as células ditas efetoras da linhagem CD4⁺ são caracterizadas de acordo com a sua capacidade de expressar moléculas de superfície e secretar citocinas responsáveis pela ativação de diversas outras células do sistema imune, tais como: linfócitos B, macrófagos e células dendríticas, dentre outras atividades biológicas diversificadas. Então, as células T CD4⁺ virgens podem se diferenciar em subtipos diferentes de células efetoras em resposta ao antígeno, coestimuladores e citocinas expressas; funcionando na defesa do hospedeiro contra diferentes tipos de agentes infecciosos e estando envolvidos em diferentes tipos de lesões ao tecido nas patologias imunomediadas. As características definidoras dos tipos diferenciados das células efetoras são as citocinas produzidas por essas células, assim como os fatores de transcrição que elas expressam e as alterações epigenéticas nos *loci* do gene da citocina produzida (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; ABBAS et al., 2012).

Essa diferenciação produzida pelas citocinas no início da resposta imune inata ou adaptativa aos agentes infecciosos, ativa fatores de transcrição estimuladores da produção das citocinas características de cada fenótipo (indução); a ativação progressiva leva a alterações estáveis nos genes expressados (comprometimento) e, assim, as citocinas promovem o desenvolvimento de cada população, suprimindo o

desenvolvimento de qualquer um dos outros subtipos (amplificação). Esses são os princípios que se aplicam aos três principais fenótipos das células T CD4⁺ efectoras (KIDD, 2003; OLIVEIRA et al., 2011; ABBAS et al., 2012).

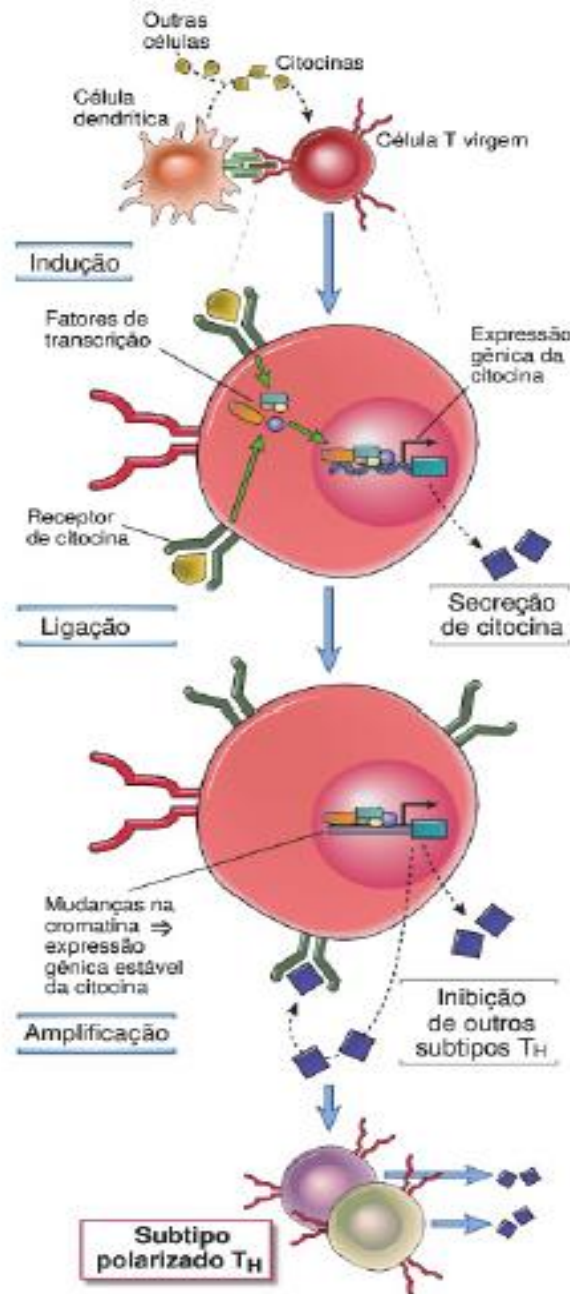


Figura 3 - Desenvolvimento dos subtipos de células efectoras T CD4⁺. Fonte: ABBAS, 2012.

As citocinas que induzem o desenvolvimento do subtipo de célula T CD4⁺ são produzidas pelas ACP (principalmente células dendríticas e macrófagos) e por outras células imunes (como NK, basófilos e macrófagos) presentes no local da resposta imune. As células dendríticas que encontram os microrganismos, e exibem

os antígenos microbianos, são ativadas a produzir citocinas (coestimuladores também) como parte das respostas imunes inatas aos agentes infecciosos (KIDD, 2003; ABBAS et al., 2012).

Os diferentes microrganismos podem estimular as células dendríticas a proteger conjuntos distintos de citocinas. Outras, como NK e mastócitos, também produzem citocinas que influenciam o padrão do desenvolvimento do subtipo de célula T (ABBAS et al., 2012).

1.2.2. Subtipo TH1

De acordo com ABBAS e colaboradores (2012), a diferenciação do subtipo de célula T CD4⁺ em Th1 é induzida principalmente pelas citocinas IL-12 e IFN- γ . Ocorrendo em resposta aos microrganismos que ativam as células NK, dendríticas e macrófagos. Camundongos deficientes em IL-12 são extremamente suscetíveis a infecções por microrganismos intracelulares.

A citocina IL-18 sinergiza com IL-12, e os interferons podem ser importantes para diferenciação de Th1 em resposta a infecções virais, principalmente em humanos. Outros microrganismos induzem IFN- γ por células NK, sendo uma forte indutora do (perfil) fenótipo Th1, agindo sobre células dendríticas e macrófagos para induzir mais secreção de IL-12. Esta citocina também induz a proliferação, aumentando a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8. (KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012).

Já o IFN- γ , que é primordial na ativação de macrófagos infectados com patógenos intracelulares como fungos, micobactérias e protozoários - também apresenta um papel importante na ativação de linfócitos T CD8. A relevância desta citocina produzida por linfócitos Th1 pode ser observada nos pacientes com síndrome de imunodeficiência em que o receptor de IFN- γ está ausente, pacientes estes que sofrem por graves infecções causadas por micobactérias (KAIKO et al., 2007).

Assim, a IL-12 induz a produção de IFN- γ que então atua de maneira autócrina para gerar um *loop* de retroalimentação positiva, acarretando em mais produção de IL-12. Tal produção de IL-12 também pode ativar células *natural killers*

que atuam na liberação de IFN- γ , fato que também reforça a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas em outro circuito de retroalimentação positiva de amplificação. A IL-12 também atua para aumentar a expressão do receptor de IL-18, que atua para potencializar as funções da IL-12 numa fase posterior no desenvolvimento do fenótipo Th1 (KIDD, 2003; CONTI et al., 2014).

Uma vez que as células Th1 se desenvolvem, elas secretam IFN- γ ; esta citocina à medida que vai sendo produzida estimula as células Th *nãive* circundantes a iniciarem a polarização em mais células Th1, em um ciclo parácrino auto-renovável; promovendo mais diferenciação do subtipo Th1, logo amplificando o padrão induzido. Assim, IFN- γ inibe a diferenciação das células T virgens nos subtipos Th2 e Th17, promovendo a polarização da resposta imune em uma determinada direção (KIDD, 2003; KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012).

Para Kaiko e colaboradores, (2007) paradoxalmente, estas citocinas conhecidas como indutoras de Th1 podem estimular citocinas Th2 a partir de células da imunidade inata. Então, para que a diferenciação e ativação de uma célula T *helper* seja completa, tanto a citocina como os sinais dos co-receptores, que são gerados pelo contato direto entre células dendríticas e células T, são imprescindíveis.

1.2.3. Subtipo TH2

A segunda população Th, muito importante nos estudos das repostas imunes humorais, são os linfócitos auxiliares 2, responsáveis pela produção de principalmente IL-4, IL-6 e IL-10, que favorecem a produção de anticorpos (ABBAS et al., 2012). A diferenciação do subtipo de célula T CD4⁺ em Th2 é estimulada primordialmente pela citocina IL-4, ocorrendo em resposta às doenças alérgicas e infecções por helmintos, uma vez que a IL-4 induz a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE e a IL-5 induz a produção e ativação de eosinófilos. Helmintos e alérgenos causam estimulação crônica das células T, frequentemente sem a indução de respostas imunes naturais fortes que são necessárias para a diferenciação de Th1 (KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012).

Como acontece no desenvolvimento das células de perfil Th1 com o IFN- γ ; na proporção que as células Th2 amadurecem, ocorre crescente produção dos

níveis de IL-4, promovendo uma retroalimentação positiva para a via Th2, gerando um ciclo parácrino e induzindo células T *náive* vizinhas a desenvolverem mais células Th2, logo, suprimindo a via Th1. A IL-6 é outra citocina liberada durante os estágios iniciais de uma resposta imunitária de perfil Th2. Essa liberação de IL-6 induz o fenótipo Th2 através da regulação positiva de citocina IL-4 e da inibição da fosforilação de STAT1, impedindo assim a expressão do gene IFN- γ (KAIKO et al., 2007; CONTI et al., 2014).

Diferente do que acontece no perfil Th1, um fator para a liberação de fatores por células dendríticas do tipo 2, que é o responsável pela diferenciação Th2, ainda está para ser identificado ou elucidado. A citocina IL-6 é um potencial candidato; no entanto, a célula dendrítica tipo 2 ativada pode induzir a diferenciação de Th2 indiretamente através da secreção de IL-10, que então inibe a síntese de IL-12 ao nível de RNAm e assim, a via Th1. Esses fatos indicam o desenvolvimento do fenótipo Th2 como sendo a via padrão, ocorrendo naturalmente na ausência de IL-12, sendo o ponto responsável por contínuas divergências no âmbito científico. Então, se células dendríticas tipo 2 secretam outros fatores promotores responsáveis pelo desenvolvimento do fenótipo Th2, ainda não se sabe (KAIKO et al., 2007; MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

Alguns estudos demonstraram que a indução da degranulação de mastócitos e a liberação de histamina têm conseguido polarizar a função das células dendríticas e T helper em um fenótipo Th2. A degranulação reduziu a capacidade das células dendríticas na indução das células Th1 e em vez disso promoveu o desenvolvimento de um maior número celular de T secretoras de IL-4. Isto infere que os mastócitos podem ser responsáveis determinantes no desenvolvimento de células Th2 específicas em doenças mediadas por mastócitos, tais como asma. Outros estudos demonstraram através de bloqueio mediado por anticorpos que as moléculas co-estimuladoras CD28, CD86 podem induzir uma vasta resposta Th1; pois, verificou-se que a regulação positiva de CD80 ou CD86 durante a infecção por *Leishmania major* provoca a secreção de IL-4 e IFN- γ (ELLOSO e SCOTT, 1999; KAIKO et al., 2007).

Assim, em pacientes com situações de hipersensibilidade imediata, a exemplo de doenças alérgicas, a terapia visa a dessensibilização imune Th2 e, consequente, indução de respostas Th1 alérgeno-específicas. Já nos casos de pacientes com doenças sabidamente “causadas” por linfócitos Th1, as citocinas Th2

têm sido consideradas protetoras, então a busca pela alteração no padrão de resposta imune de Th1 para Th2 vem sendo bastante pesquisada no intuito da busca por melhora ou restabelecimento da tolerância imunológica. Porém, o suposto reconhecimento do papel dos linfócitos Th17 nos processos auto-imunes vem questionando essa teoria antes estabelecida (KAIKO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011).

Logo, células Th2 podem se desenvolver em resposta a patógenos e antígenos que causam estimulação persistente ou repetida das células T com pouca inflamação ou pouca produção das citocinas pró-inflamatórias que induzem as respostas Th1 e Th17. Então, a presença da citocina IL-4 amplifica o padrão de resposta do perfil Th2 e, conseqüentemente, inibe os padrões Th1 e Th17 de uma maneira generalista e simplificada (ABBAS et al., 2012).

1.2.4. Subtipo TH17

Os linfócitos Th17 representam um novo subtipo de linfócitos T efetores importantes na proteção contra infecções por microorganismos extracelulares. A diferenciação do subtipo de célula T CD4⁺ em Th17 é estimulada por citocinas pró-inflamatórias (como IL-6, IL-1 e IL-23) produzidas em resposta a infecções provocadas por bactérias e fungos. Tais citocinas são produzidas em resposta aos patógenos citados anteriormente e também quando as células infectadas com várias bactérias e/ou fungos passam por apoptose, sendo fagocitadas pelas células dendríticas. Tais linfócitos foram descritos inicialmente em modelos de doenças auto-imunes experimentais, encefalite auto-imune e artrite induzida por colágeno por exemplo, doenças que antes se pensava serem causadas pelo fenótipo Th1 (KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012; CONTI et al., 2014).

Esta nova via de linfócitos *helper* iniciou-se com a descoberta da citocina IL-23, sendo esta um heterodímero que compartilha uma subunidade com a IL-12 (IL-12p40) e possui uma subunidade específica, a IL-23p19. Em alguns modelos experimentais, percebeu-se que camundongos *knock out* para IL-12p40 desenvolviam exacerbadamente a doença dita auto-imune, já os *knock out* para o complexo do receptor de IL-12 apresentavam a doença de modo comum. A citocina IL-23 por

apresentar importante papel indutor na ativação e diferenciação de células Th17 (produzindo citocinas pró-inflamatórias, IL-22, IL-26 e outras citocinas da família IL-17) é um dos motivos pelos quais juntamente com IL-1 e IL-6, pode levar ao desenvolvimento de doenças auto-imunes. Já que citocinas da família IL-17 são altamente pró-inflamatórias, induzindo a infiltração celular e produção de outras citocinas indutoras da inflamação. A produção desregulada de IL-17 está associada a inúmeros distúrbios auto-imunes, como psoríase, lúpus e esclerose múltipla (KAIKO et al., 2007; MESQUITA-JUNIOR et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

Então, a citocina IL-23 possivelmente é mais importante para a proliferação do subtipo celular e manutenção deste do que pela indução propriamente dita. A via de diferenciação Th17 é antagonizada pelas citocinas Th1 e Th2 e, em alguns modelos experimentais de auto-imunidade causada por células Th17, as citocinas Th1 e Th2 têm se mostrado protetoras. Este perfil, então, é inibido pelos estimuladores dos outros perfis, ou seja, IFN- γ e IL-4. A citocina IL-21 também é descrita como amplificadora para o perfil Th17 (KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012).

As células Th humanas apresentam maior plasticidade de diferenciação quando comparadas às mesmas células em murinos. Assim, os linfócitos T responsáveis pela produção de IL-17 são imediatamente identificáveis em populações linfocitárias de memória em humanos; embora sua relação especificamente com a linhagem Th17 seja menos evidente, pois estas células produzem tanto a citocina IL-17, como IFN- γ (Th1) em humanos. Além de que estas células em humanos, contrariamente às células murinas Th17, são facilmente induzidas pela combinação das citocinas IL-6 e TGF- β , com papel totalmente ineficiente no fenótipo Th17 humano. Em contrapartida, mesmo a IL-23 não sendo o fator principal na indução de diferenciação de Th17 em modelo murino, ela é eficiente na promoção da produção de IL 17 por linfócitos T humanos (KAIKO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; CONTI et al., 2014).

Na presença dos mediadores inflamatórios, citocinas IL-1 e IL-6, a citocina pró-inflamatória TGF- β é responsável pelo desenvolvimento de células Th17; sendo este, então, um supressor dos fenótipos Th1 e Th2 e proliferador indireto para o Th17. Com a identificação da IL-17 como a citocina efetora deste processo mediado por IL-23, revelou-se um novo tipo distinto de células T auxiliares CD4 que dependiam de IL-23 e IL-17, sendo crítico para o desenvolvimento de auto-imunidade e assim a linhagem Th17 foi identificada (KAIKO et al., 2007; ABBAS et al., 2012).

1.4 CAMUNDONGO COMO MODELO EXPERIMENTAL

Em termos de modelos experimentais, animais de distintas espécies vem sendo utilizados nos últimos tempos, sendo os camundongos usados mais intensamente por conta de serem os mais profundamente conhecidos cientificamente (CHORILLI, 2007).

Apesar da atual tendência em preconizar a utilização de métodos alternativos cientificamente (como estudos *in vitro* a partir de culturas secundárias de

células, etc.), os modelos animais, como os camundongos, têm como vantagem principal o fornecimento de informações sobre o organismo em geral, não de maneira isolada; fato não possibilitado a partir de outros métodos, o que ainda justifica o seu emprego em pesquisas científicas (CHORILLI, 2007; SOARES, 2001).

Diversas são as razões da escolha de camundongos como principal modelo experimental atualmente e este fato deve-se a alguns fatores como: 1) seu pequeno porte; podendo ser mantido em lugares menores, ocupando pouco espaço e custo relativamente baixo de manutenção em biotério; o tamanho também facilita o seu manuseio por pesquisadores; 2) perfil prolífico; apresentando gestação curta (aproximadamente 21 dias), várias ninhadas ao ano e possível desdobramento em dez gerações de um casal em aproximadamente 3 anos apenas, ocasionando na possibilidade de executar diversos experimentos de maneira ágil com resultados rápidos, inclusive nos descendentes; 3) anatomia, fisiologia e genética bem descritas na literatura e próximas às características humanas, facilitando o entendimento inclusive comportamental; abrangendo enorme diversidade experimental. Os camundongos são utilizados como excelentes modelos para as mais diversas doenças, como: infecções parasitárias, câncer, obesidade, diabetes, hipertensão, problemas respiratórios, problemas cardíacos, mal de Parkinson, Alzheimer, entre outros (Universidade Federal Fluminense, 2009).

1.4.1. Camundongos isogênicos

Oliveira (2013) afirma que a classificação genética das espécies depende do programa de acasalamento utilizado, este definirá a forma de transmissão dos caracteres genéticos. Eis os grandes sistemas:

- Linhagens que resultam de acasalamento entre irmãos (*inbred*), também chamados de isogênicos;
- Linhagens que resultam de acasalamentos ao acaso (*outbred*), também chamados de heterogênicos.

As colônias de animais *inbred* oferecem uniformidade genética e as de animais *outbred* apresentam grande variabilidade genética. A escolha do padrão genético dos animais de um biotério dependerá do experimento a ser realizado, ou seja, da necessidade de se ter ou não uniformidade genética nas pesquisas a serem desenvolvidas (Oliveira, 2013; Soares, 2001).

O camundongo isogênico é obtido a partir do acasalamento entre irmãos (endocruzamentos) da mesma geração por, no mínimo, 20 gerações consecutivas a partir de um único casal, resultando em coeficiente de endogamia de 98,6%, assegurando, assim, um alto grau de consanguinidade (*inbreeding*). As principais características das linhagens isogênicas são: porte menor, menos fértil e número menor de filhotes por ninhada em comparação aos *outbred*. Porém, apresentam isogenicidade, homozigose, uniformidade fenotípica e estabilidade genética em longo prazo; justificando seu grande valor, já que possibilita a realização de experimentos eliminando a variabilidade de origem genética, o que permite a utilização de um número menor de animais para que seja alcançado o poder estatístico necessário. Hoje, mais de 90% dos trabalhos científicos publicados em diversas áreas usam linhagens isogênicas (Universidade Federal Fluminense, 2009).

Os principais animais isogênicos utilizados em pesquisa científica, atualmente, são os BALB/c e C57BL/6. Os camundongos da linhagem BALB/c são bastante utilizados em pesquisas relacionadas ao sistema imune, pois esses animais apresentam um perfil imunológico de padrão Th2. Já os camundongos da linhagem C57BL/6 são animais de vida longa e baixa susceptibilidade a tumores, porém apresentam alta susceptibilidade à obesidade induzida por diabetes e aterosclerose, além de algumas anormalidades oculares; assim como o BALB/c, são amplamente utilizados em pesquisas do sistema imune, tendo como resposta imune células que apresentam o perfil padrão Th1 frente a diferentes doenças (Oliveira, 2013; Soares, 2001).



Figura 4 - Camundongos isogênicos, *Mus musculus* das linhagens C57BL/6 (A) e BALB/c (B). Fonte: <http://www.criver.com/find-a-model>.

1.4.2. Camundongos como modelos experimentais das Leishmanioses

De acordo com Velasquez (2014), através de estudos sobre a evolução de infecções por diferentes agentes, o camundongo tornou-se o modelo experimental central. Além disso, esse modelo permite o desenvolvimento de diversos estudos imunológicos no animal e, assim, avanço em grande escala sobre o conhecimento das características genéticas desse hospedeiro na evolução da infecção, como, por exemplo, infecções causadas por diferentes espécies de *Leishmania*.

Dessa forma, em linhagens diferentes de camundongo têm sido avaliadas a imunidade natural sobre as leishmanioses a fim de explicar a variação observada na resposta imune. Porém, os parâmetros envolvidos são complexos e em grande quantidade, necessitando a tentativa de elucidação das inúmeras variáveis que possivelmente explicam sua atuação na indução, expressão e regulação da proteção induzida após a infecção experimental com relação à resistência de cepas de camundongos isogênicos ao parasito. Estas variáveis podem ser: dose, via de inoculação, cepa de *Leishmania* e estágio evolutivo do parasita (Bradley, 1987 apud FIOCRUZ, 1997¹).

As principais fontes utilizadas para os mais eficientes estudos acerca da Leishmaniose Tegumentar têm sido os modelos de infecção em camundongos isogênicos. Esses modelos correspondem à maioria dos dados atuais sobre os mecanismos imunológicos, fato que possibilita algumas elucidações, pois as respostas são semelhantes quando comparadas ao modelo humano, sendo fundamentais para o estudo das diversas manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar. (MOURA, 2004; PINHEIRO, 2004; MENDES, 2011; VELASQUEZ, 2014). Estes modelos empregam grande quantidade parasitária (entre 10^5 a 10^7) por inoculação através de via subcutânea ou intradérmica; tendo dois principais perfis de respostas imunológicas estabelecidas: a resposta T helper 1 (Th1) e a resposta T

¹BRADLEY, A. **Production and analysis of chimeric mice.** In “Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, a Practical Approach” (E. J. Robertson, ed.), pp. 113-151. IRL Press Oxford, Wasington, DC.

helper 2 (Th2), associadas aos fenótipos de resistência e susceptibilidade, respectivamente. O primeiro trabalho publicado sobre Leishmaniose apresentou como modelo a infecção por *L. (L.) major*; sendo, a partir de então, o modelo de infecção melhor estudado e o principal responsável, até hoje, por esse paradigma Th1/Th2 estabelecido (MOURA, 2004; PINHEIRO, 2004; MENDES, 2011).

A realidade funcional das sub-populações Th1 e Th2 foram particularmente bem estabelecidas nesse modelo experimental em virtude da existência de camundongos geneticamente ditos suscetíveis ou resistentes à *Leishmania spp*: de uma maneira generalista e inicial, camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção por *L. major*, pois desenvolvem um perfil de resposta imune celular do tipo Th2, em que há produção linfocitária de altos níveis de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ ; com desenvolvimento inicial de lesão onde houve o inóculo, persistência e aumento da lesão com a presença de úlceras e necroses, ou seja, uma doença de caráter progressivo e visceralizante (MOURA, 2004; PINHEIRO, 2004; AWASTHI et al. 2004; CARVALHO et al., 2012).

Em contrapartida, camundongos C57BL/6 apresentam resistência à infecção por *L. major*, pois desenvolvem um perfil de resposta do tipo Th1, com baixos níveis de IL-4 e altos níveis de IFN- γ ; com desenvolvimento de uma pequena lesão onde houve inóculo, mas sem ulceração e cura espontânea e resistentes a novas reinfecções, ou seja, são capazes de controlar a infecção (MOURA, 2004; MASPI et al., 2016). A dicotomia funcional encontra-se relacionada à produção de IL-4 em animais de linhagens sensíveis e de IFN- γ em animais dito resistentes no que concerne à infecção por *Leishmania major* (HEINZEL et al, 1989; PINHEIRO, 2004). Sendo, assim, o fator primordial para o estabelecimento de uma resposta tipo Th1 ou Th2, são as citocinas produzidas localmente, presentes nas primeiras horas da infecção o que, possivelmente, determina resposta subsequente da infecção (SACKS & NOBEN-TRAUTH, 2002; MOURA, 2004; SILVEIRA et al., 2009).

Logo, a leishmaniose murina mostra-se um excelente modelo para estudos sobre as citocinas que medeiam a imunidade contra patógenos como *Leishmania spp*. A incapacidade de animais BALB/c em controlarem a infecção por leishmania está relacionada, principalmente, com a produção de IL-4 (Heinzel et al., 1993) e IL-13 (SOUZA, 2014). Em contraste, a capacidade de animais C57BL/6 em resolverem a infecção parece ser dependente de IFN- γ (SCOTT, 1991). O IFN- γ induz a produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos infectados com *L. major*, sendo esta uma

molécula conhecidamente leishmanicida e de um modo genérico, citocinas do perfil Th1 induzem a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), enquanto as do padrão Th2 a inibem (REIS, 2007; PAPINI, 2011). Assim, a infecção por *L. major* nessas linhagens demonstra que a resolução e a progressão da doença parecem ser determinadas pela ativação preferencial de células Th1 ou Th2. (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002; MENDES, 2011; SCOTT e NOVAIS, 2016).

Entretanto, infecções em murinos com outras espécies de *Leishmania spp.* podem levar a diferentes modelos de resistência e susceptibilidade. Por exemplo, linhagens de camundongos resistentes à infecção por *L. major* (como CBA, C3H ou C57BL/6) são suscetíveis a infecção com *L. amazonensis* ou a *L. mexicana*, sugerindo que fatores específicos do parasita possuem um importante papel no curso da doença (MOURA, 2004; VELASQUEZ, 2014). Ou seja, esta polarização da resposta em Th1 ou Th2 não é tão clara para outras espécies de *Leishmania*. Camundongos da linhagem C57BL/10, enquanto capazes de curar uma infecção por *L. major*, não conseguem resolver a lesão se infectados por *L. amazonensis*. A infecção por *L. major* induz a produção de altos níveis de IFN- γ e nenhuma IL-4, ao passo que a infecção por *L. amazonensis* induz baixa produção de IL-4 e pouca ou nenhuma de IFN- γ (REIS, 2007; MENDES, 2011).

Para Carvalho e colaboradores (2012) e Moura (2004), mesmo com a alta inoculação (2×10^7) de diferentes cepas de *L. braziliensis*, em várias linhagens de camundongos, não foi observado o desenvolvimento de lesão; porém, tais cepas apresentaram infectividade em hamsters; a linhagem BALB/c foi a mais suscetível à infecção por *L. braziliensis*, com presença de lesões, as quais apresentaram cura em até 60 dias após a infecção. Além disso, camundongos infectados por *L. braziliensis*, quando tratados com anti-IFN- γ , não são capazes de controlar a infecção. Portanto, a constante produção de IFN- γ deve estar associada à cura da lesão (MOURA, 2004).

A infecção de camundongos BALB/c com dois isolados de *L. braziliensis*, de diferentes regiões do Brasil, o isolado H3227 (proveniente do Ceará) e o isolado BA788 (proveniente da Bahia), apresentou diferenças tanto no perfil genômico como em características clínicas e parâmetros imunológicos. As principais diferenças nos aspectos clínicos foram relacionadas às características intrínsecas dos isolados, sendo estas a indução de uma lesão transitória e também o recrutamento de

diferentes populações leucocitárias para o sítio parasitado (DE OLIVEIRA et al., 2004 apud MOURA, 2004²).

Mendes (2011) demonstrou que em modelo murino, independente da resposta de linfócitos T auxiliares, os macrófagos de animais C57BL/6 conseguem produzir muito mais NO do que macrófagos de camundongos BALB/c após estimulação com LPS, por isso esses macrófagos possuem capacidade leishmanicida para *L. amazonensis* muito superior do que os macrófagos de BALB/c.

O desenvolvimento de uma resposta predominantemente do tipo Th2 pode ser um componente importante na alta susceptibilidade de camundongos BALB/c à *Leishmania*, mas parece ser menos importante na manutenção das infecções crônicas associadas com as infecções de *L. amazonensis* em camundongos C57BL/10, onde a involução da resposta Th1 é que parece determinar a maior susceptibilidade (MILLS et al., 2000; MENDES, 2011; VELASQUEZ, 2014). Porém, há os que afirmam que a susceptibilidade não parece ser devido ao desenvolvimento preferencial de uma resposta Th2, mas sim à incapacidade ou deficiência no desenvolvimento de uma resposta Th1 adequada. Ao passo que a resistência parece ser pela ausência de uma resposta Th2 e não à presença de uma resposta Th1. Além disso, ainda há um tipo de resposta mista Th1/Th2 que pode ser mantida em alguns modelos de infecção murina por *L. amazonensis* (LAINSON e SHAW, 2005; MENDES, 2011).

Assim, um único hospedeiro reagirá de maneira diversa frente a diferentes espécies *Leishmania* spp. e, portanto, resistência e susceptibilidade, bem como padrão Th1/Th2 de resposta, dependerão tanto do *background* genético da espécie infectante como do hospedeiro. A dicotomia Th1/Th2 da resistência/susceptibilidade é uma simplificação objetiva de um contexto muito mais complexo de interações regulatórias e/ou contra-regulatórias, sendo dependente diretamente da espécie *Leishmania*, o tipo de hospedeiro e o tecido examinado para estudo (SOUZA et al., 2000; TAVARES et al., 2009; MENDES, 2011).

O paradigma Th1 x Th2 também pode ser observado em casos humanos, onde uma infecção por *L. braziliensis* mais grave aparece associada ao perfil Th2. Os pacientes que adquirem a forma leishmaniose cutânea localizada, desenvolvem uma

²DE OLIVEIRA, C. I. et al. ***Leishmania braziliensis* isolates differing at the genome level display distinctive features in BALB/c mice**. Microbes and Infection, v. 6, p. 977–984, 2004.

resposta do tipo Th1 ao nível das lesões, enquanto uma resposta do tipo Th2 aparece no desenvolvimento de lesões mucocutâneas (AWASTHI et al. 2004; PINHEIRO, 2004; TRIPATHI et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado a necessidade equilibrada entre as citocinas regulatórias IL-12 e IL-10, essenciais para a regulação da modulação imunitária, contrastando as primeiras ideias de que as funções antagonicas de IFN- γ e IL-4 eram determinantes à proteção ou patogênese da doença. Logo, a resposta imune na infecção por *Leishmania* spp. é, assim, complexa, já que pode ser determinada tanto por características do hospedeiro, como da espécie parasitária. Em modelos murinos, até se aceita que o perfil de resposta do tipo Th1 seja o responsável pela imunidade protetora, enquanto o papel preciso da resposta do tipo Th2 ainda não é totalmente definido, pois a atividade significativa de IL-4 pode ser redundante diante da atividade compensatória da citocina IL-13 de propriedades similares a IL-4 (AWASTHI et al.2004 ;MENDES, 2011).

Mediante a utilização de camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 e BALB/c como modelos murinos bem caracterizados frente a respostas imunes, a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* como uma das espécies mais responsáveis pelo acometimento da leishmaniose tegumentar (especialmente leishmaniose cutânea ou cutânea localizada) na região Amazônica, este trabalho buscou avaliar a progressão e histopatologia da lesão cutânea, a produção de citocinas em lesões e soros, assim como atividade nitrérgica e carga parasitária especificamente em lesões destes animais infectados.

Dessa forma, tendo em vista que a cura clínica da leishmaniose tegumentar é caracterizada pelo desenvolvimento do processo cicatrizante das lesões cutâneas, assim como o entendimento da resposta imunológica que ocorre no local da infecção cutânea em camundongos com diferentes respostas imunológicas é imprescindível para o entendimento da cura ou não da lesão. Então, se tornam imprescindíveis estudos comparativos com intuito de observar e compreender as vias imunológicas comuns, estabelecendo supostas vertentes da resposta imunológica através da análise da patogenia, da resposta imune do hospedeiro infectado e também da imunomodulação dos mecanismos patogênicos induzidas pelo parasito.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar a progressão da infecção cutânea e a produção de citocinas na pele e no soro de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o desenvolvimento das lesões cutâneas dorsais dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* semanalmente, durante 30 e 60 a partir do aparecimento da primeira lesão;
- Determinar a carga parasitária presente em animais infectados com *L. (L.) amazonensis* após 30 e 60 dias a partir do aparecimento da primeira lesão;
- Quantificar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em biópsias de pele e soro de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* após 30 e 60 dias a partir do aparecimento da primeira lesão;
- Determinar a produção de óxido nítrico (NO) em macerado de pele de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* após 30 e 60 dias de infecção a partir do aparecimento da primeira lesão.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

Parasitologia.

3.2. TIPO DE ESTUDO E LEVANTAMENTO DE DADOS

O presente trabalho apresenta a pesquisa experimental como tipo de estudo, pois este modelo visa perceber fator(es) envolvido(s) no desencadeamento de determinados fenômenos mediante uma amostragem de uma reprodução

controlada da realidade, ou seja, através da determinação de um objeto de estudo, busca-se variáveis capazes de causar influência, delimitando maneiras de controle e observação dos efeitos da(s) variável(is) no objeto em questão (MINAYO, 2007).

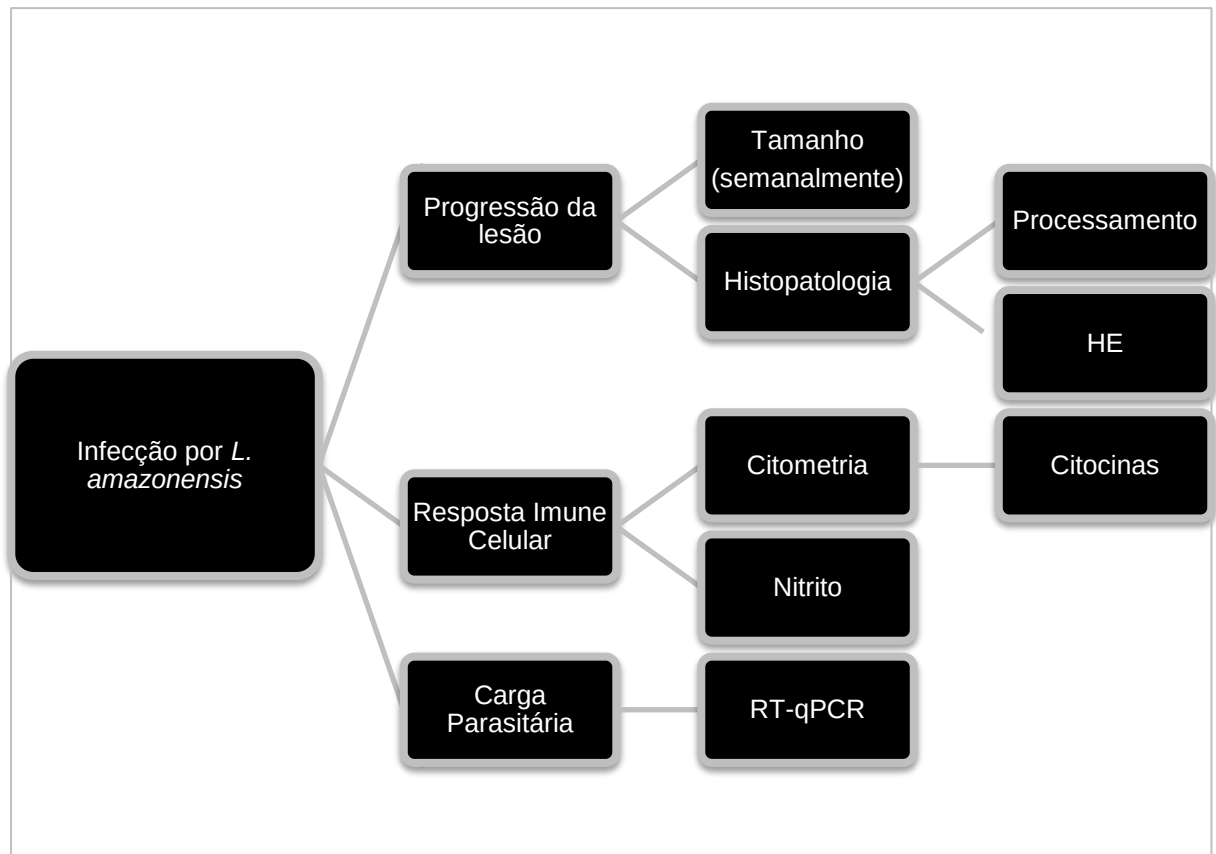


Figura 5 - Desenho experimental do presente estudo.

Dessa forma, este estudo visa analisar a suposta interferência das variáveis: linhagem animal, tempo e desenvolvimento da infecção e resposta imunológica de animais não infectados e infectados. As metodologias utilizadas para avaliação destas variáveis estão descritas em detalhes abaixo.

3.3. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

3.3.1. Animais

Foram utilizados 32 camundongos isogênicos, machos, adultos (7-8 semanas de idade), das linhagens C57BL/6 e BALB/c, provenientes do biotério pertencente ao Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, Brasil. Todos os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno padrão, mantidas em ambiente controlado com ciclo claro/escuro de 12 horas e higienizadas duas vezes por semana, além de receberem água e ração balanceada *ad libitum*.

3.3.2. Cultivo e manutenção dos parasitos

O parasito *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/26361) foi obtido em meio NNN (Neal, Novy, Nicolle) proveniente do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil (IEC) e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SBF) e mantidas em estufa incubadora a 27° C.

3.3.3. Infecção dos animais e grupos experimentais

Inicialmente os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com ketamina (10 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) na razão 2:1, seguido da tricotomização da área próxima à cauda, para posterior inoculação dos parasitos. Foram realizadas duas inoculações intradérmicas no dorso, próximo à cauda dos camundongos, lado direito e lado esquerdo, com volume máximo de 0,1 mL de PBS contendo 1×10^6 promastigotas/mL obtidas na fase estacionária de crescimento (7 dias de cultivo para *L. amazonensis*).

Os grupos experimentais foram divididos conforme quadro abaixo:

Quadro 1 - Distribuição dos grupos experimentais e número de animais por grupo. LA: *L. (L.) amazonensis*.

Grupos Experimentais			
Grupos	BALB/c	Grupos	C57BL/6

	Descrição	N		Descrição	N
1	30 dias + salina	3	5	30 dias+ salina	3
2	60 dias + salina	3	6	60 dias + salina	3
3	30 dias + LA	5	7	30 dias + LA	5
4	60 dias + LA	5	8	60 dias + LA	5

30 dias: animais infectados com *L. (L.) amazonensis* eutanasiados após 30 dias do aparecimento da lesão. 60 dias: animais infectados com *L. (L.) amazonensis* eutanasiados após 60 dias do aparecimento da lesão. LA: *Leishmania (L.) amazonensis*.

3.3.4. Curso da evolução da infecção

O curso da evolução da infecção foi acompanhado através da mensuração do tamanho da lesão. Os dorsos dos animais infectados e controle foram mensurados semanalmente, por até 60 dias após o aparecimento da primeira lesão (em aproximadamente, 15 dias), com o auxílio de um paquímetro universal digital (plástico, 150mm, PD-153; VONDER, Curitiba, Brasil) e registradas por fotografias.

3.3.5. Análise histopatológica das biópsias

3.3.5.1. Processamento para histopatologia

O processamento para histopatologia foi realizado a partir de amostras obtidas da lesão de animais controle e infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As amostras foram coletadas e fixadas por imersão em formol (10%), sendo mantidas sob refrigeração, aproximadamente 4° C, para posterior processamento.

De maneira sucinta, cada amostra foi colocada em um cassete individual e, então, levadas ao Processador de Tecidos (Microm STP-120, Thermo Scientific, Walldorf, Germany) ao qual passaram pelas etapas descritas no quadro 2.

Após esse processo, retirou-se a amostra do cassete e realizou-se a inclusão em molde com parafina líquida pré-aquecida (Paraplast for tissue embedding,

Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany). O material incluído permaneceu em molde até o momento da microtomia, posteriormente foram obtidos cortes de 5-7µm de espessura sob auxílio de micrótomo (Rotary Microtome RM2255, Leica, Nussloch, Germany).

Quadro 2 –Etapas para o processamento histopatológico

Reagente	Tempo	Temperatura
Etapa: Desidratação		
Álcool etílico 50%	1h30	ambiente.
Álcool etílico 60%	1h30	ambiente.
Álcool etílico 70%	1h30	ambiente.
Álcool etílico 80%	1h30	ambiente.
Álcool etílico 90%	1h30	ambiente.
Álcool etílico absoluto I	1h30	ambiente.
Álcool etílico absoluto II	1h30	ambiente.
Etapa: Clarificação		
Xilol I	2hrs	ambiente.
Xilol II	2hrs	ambiente.
Etapa: Infiltração		
Parafina I	2hrs	ambiente.
Parafina II	2hrs	ambiente.
Total	18h30	

3.3.5.2. Coloração com hematoxilina e eosina

Após o processamento para histopatologia, as lâminas contendo o(s) corte(s) histológicos foram desparafinizadas através da imersão destas, sequencialmente, na bateria de álcool e xilol descrita no quadro 3. Então, as lâminas foram enxaguadas com água destilada, mergulhadas em Hematoxilina de Harris (cristais de hematoxilina, álcool absoluto, alumén de potássio, óxido de mercúrio e água destilada) por um minuto, as lâminas foram enxaguadas com água destilada

novamente, mergulhadas em álcool a 70%, submersas em Eosina (eosina, álcool a 95%, ácido acético e água destilada) por 3 minutos e, enfim, desidratadas através da imersão sequencial na bateria de álcool e xilol descrita no quadro 4. Só então, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) e lamínula de vidro para serem observadas sob auxílio de microscópio óptico Axiophot, Zeiss.

Quadro 3 – Bateria de álcool e xilol para desparafinização.

Steps	Reagente	Tempo (minuto)	Observação:
01.	Xilol 1	1'	aproximadamente.
02.	Xilol 2	1'	aproximadamente.
03.	Álcool absoluto 1	1'	aproximadamente.
04.	Álcool absoluto 2	1'	aproximadamente.
05.	Álcool a 90%	1'	aproximadamente.
06.	Álcool a 80%	1'	aproximadamente.
07.	Álcool a 70%	1'	aproximadamente.

Quadro 4 – Bateria de álcool e xilol para desidratação.

Steps	Reagente	Tempo (minuto)	Observação:
01.	Álcool a 70%	1'	aproximadamente.
02.	Álcool a 80%	1'	aproximadamente.
03.	Álcool a 90%	1'	aproximadamente.
04.	Álcool absoluto 1	1'	aproximadamente.
05.	Álcool absoluto 2	1'	aproximadamente.
06.	Xilol 1	1'	aproximadamente.
07.	Xilol 2	1'	aproximadamente.

3.3.6. Dosagem de citocinas em fragmentos de tecido e soro de animais infectados

A dosagem das citocinas foi realizada a partir do sobrenadante obtido do macerado dos tecidos lesionados, de animais controles e infectados após 30 e 60 dias a partir do aparecimento da primeira lesão e do soro dos animais. Amostras de 75mg de tecido foram macerados em tampão 1 mL de tampão Phem2x (MgCl₂, KCl, EGTA, Hepes, Pipes e água mili-q). As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, INF- γ , TNF, IL17A e IL-10

foram dosadas utilizando o kit BD Cytometric bead assay – Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit, seguindo as instruções do fabricante. Os dados foram obtidos a partir da análise em citômetro BD FACSCanto II utilizando o software FACSDiva (BD Biosciences, USA) e a análise foi realizada utilizando o software FCAP Array 3.0. Os resultados foram expressos em pg/mL calculado a partir da curva padrão.

3.3.7. Dosagem de nitrito

A dosagem de nitrito foi realizada através da utilização de sobrenadante do macerado dos tecidos lesionados, de animais controles e infectados após 30 e 60 dias de inoculação obtidos conforme descrito anteriormente. O procedimento foi realizado através da utilização do *Griess Reagent Kit for Nitrite Determination* seguindo instruções do fabricante e lidos em espectrofotômetro (550nm).

3.3.8. Extração de RNA em fragmentos de tecido de animais infectados

A extração de RNA total foi realizada a partir de amostras obtidas da lesão de animais controle e infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. As amostras foram coletadas utilizando-se o reagente RNeasy Lysis Solution (Ambion, Carlsbad, CA, USA) para posterior extração de RNA utilizando um kit específico para tal (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). De maneira resumida, para cada amostra, em um microtubo de fundo cônico de 1,8 mL, foi adicionado o reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA) (1mL/75mg de tecido lesionado), sendo macerado 75 mg de tecido e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos. Para cada 1 mL da suspensão foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) e os tubos centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foi acrescentado etanol 75% em proporções iguais à amostra (v/v).

A solução amostra/etanol foi homogeneizada por pipetagem e transferida para uma coluna de afinidade para RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Foram adicionados tampões específicos do kit em questão (RW1 e RPE), intercalados por rápidas centrifugações por 1 minuto a 8000 g à temperatura ambiente cada. Finalmente, após várias lavagens com estes diferentes tampões, as amostras de RNA

foram eluídas da coluna com 40 μ L de água deionizada e livre de RNase ainda do referido kit, sendo armazenadas a -70° C, até o momento da análise.

Para quantificação foi feita uma curva-padrão, onde foi utilizado 50mg de pele de animal macho adulto e não infectado macerada e acrescentado 5×10^7 promastigotas de *Leishmania spp.*. Posteriormente, foi realizada a extração desse material (pele+parasito)(VAN DER MEIDE et al., 2008). Após a extração desse material, foi feita uma diluição seriada conforme a figura 6 para obtenção de 5 pontos da curva padrão; sendo o ponto de maior concentração 10^6 parasitos/mg de pele seguido de sucessivas diluições de 1:10.

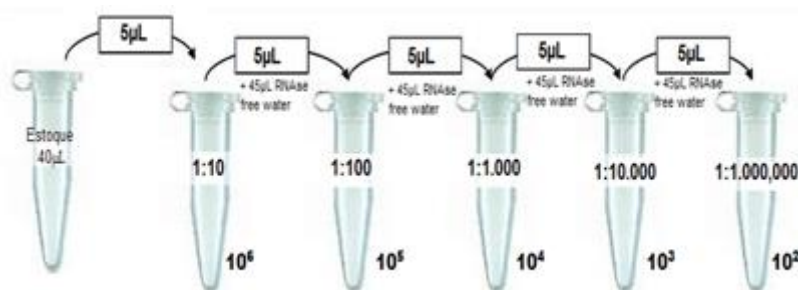


Figura 6 - Diluição seriada para obtenção da curva-padrão para RT-qPCR.

3.3.9. Análise da expressão gênica por meio de reações de RT-qPCR

Após a extração de RNAm pelo RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) e obtenção do DNA complementar; realizou-se, enfim, as amplificações de regiões específicas por RT-qPCR. Assim, os *primers* e *probe* utilizados para RT-qPCR foram baseados nas sequências 170-bp 18S RNAr (descritos nº quadro 5). Para a reação, utilizaram-se os reagentes conforme descritos no quadro 6. A amplificação e a medição em tempo foi realizada no Rotor Gene Q (Qiagen) sob as condições descritas no quadro 7. O número de parasitos foi calculado a partir do ciclo limiar (TC) ou linha de corte, isto é, o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu um dado limiar no qual a fluorescência emitida excedeu a linha de base de 100 unidades de fluorescência de referência. Utilizou-se o Quanti Fast Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. Para análise dos dados foi utilizado o software Rotor–Gene Q Series. Em cada ensaio, havia presença das amostras relativas às distintas e decrescentes concentrações de material genético de *Leishmania spp.* na curva padrão como controle positivo, assim como *RNase free*

water para controle negativo em 5 pontos distintos do ensaio, controle sem amostra (conhecido como *no template* control – NTC, contendo apenas o mix de reagentes) em dois pontos e amostras de animais controle e infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* após 30 e 60 dias de infecção.

Quadro 5 - Primers e probe utilizados na RT-qPCR.

Forward primer	Reverse primer	Probe	Referência
5'-C CAA AGT GTG GAG ATC GAA G-3'	5'-GGC CGG TAA AGG CCG AAT AG-3'	5'-6FAM AC CAT TGT AGT CCA CAC TGC-NFQ- MGB	(VAN DER MEIDE et al., 2008)

Quadro 6 - Reagentes utilizados na RT-qPCR para cada amostra.

Reagentes	Volume
2x Rotor Gene Multiplex RT-PCR Master Mix	12,5 µL
20x Primer-Probe Mix	1,25 µL
Rotor Gene RT Mix	0,25 µL
RNase free water	6 µL
Template RNA	5 µL
Total	25 µL

Quadro 7 - Condições utilizadas na RT-qPCR.

Steps		Tempo	°C
RT		20 mins.	50
PCR <i>initial activation step</i>		5 mins.	95
2-step cycling	<i>Desnaturation</i>	15 segs.	95

	<i>Annealing/extension</i>	30 segs.	60
Número de ciclos		40	

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Graph Pad Prism7, teste-t e Mann-Whitney, sendo considerado como significativo $p < 0,05$. Para todos os ensaios foram considerados o N amostral e grupos experimentais descritos no item 3.3.3.

3.5. ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Todos os experimentos realizados com animais foram realizados de acordo com as normas determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal após aprovação em comitê de ética no uso de animais (CEUA) do Instituto Evandro Chagas, certificado de aprovação nº 30/2016 (Anexo).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. PROGRESSÃO DA INFECÇÃO CUTÂNEA EM CAMUNDONGOS BALB/c E C57BL/6 INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*.

Para avaliação da progressão das lesões e posterior coleta de material para demais análises, animais BALB/c e C57BL/6 foram inoculados intradermicamente com *Leishmania (L.) amazonensis*. As primeiras lesões nos animais da linhagem BALB/c

surgiram após, aproximadamente, 15 dias de infecção com áreas com lesões abertas em 70% dos animais; já nos camundongos C57BL/6, a partir de 30 dias de infecção, surgiram áreas com lesões nodulares, edemaciadas, vermelhas e bem delimitadas, mas sem ulceração, em 50% dos animais. Nesses 30 dias após a infecção, 100% dos animais BALB/c apresentaram lesões abertas no local da inoculação, mas apenas 50% dos animais C57BL/6 apresentaram algum ponto pequeno de lesão aberta como o do local e tamanho da agulha utilizada para inoculação; mantendo o padrão apresentado: a cada 5 animais C57BL/6, 60% dos animais apresentaram lesão aberta, mas os outros 40% apresentaram lesões fechadas ainda nodulares, bem delimitadas, e com descamação cutânea superficial.

Como demonstrado nas figuras 7 e 8, os animais BALB/c desenvolveram lesões semelhantes àsquelas encontradas em pacientes, como demonstrado, anteriormente, na figura 2 (aspectos clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana), ou seja, lesões estas caracterizadas por serem cutâneas, únicas, localizadas exatamente no ponto do inóculo; no decorrer do processo infeccioso, apresentando bordas super elevadas com hiperemia ao seu redor, fundo granuloso, de aspecto vermelho vivo e de sangramento fácil, além de úlceras e fundo necrótico (Figura 7B). Já os animais C57BL/6 apresentaram lesões bem mais próximas à cauda e desenvolvimento tardio em comparação aos BALB/c, com perda da cobertura cutânea mais superficial, mas também consideradas ulcerativas (Figura 7C).

As lesões em camundongos C57BL/6 e BALB/c apresentaram um crescimento acentuado até a 5ª semana e depois mantiveram o crescimento lento e gradual de um modo geral. Nos animais BALB/c, as lesões cresceram até, aproximadamente, 15 mm e se mantiveram até o ápice de quase 17 mm, em média. E nos animais C57BL/6, as lesões se desenvolveram até 10 mm e se mantiveram até o ápice de 18mm, em média; sendo que três mantiveram a média de 11,5 mm e dois destoaram bastante da média, com lesões de aproximadamente 27,5 mm, porém de caráter também distinto, já que estas se apresentavam de forma praticamente toda fechada, sugerindo supostos processos cicatrizantes ao final do período crônico da doença, representado pelos 60 dias.

A análise do curso do crescimento das lesões *in vivo* mostrou seguir um mesmo padrão de crescimento de acordo com o decorrer das semanas entre os

indivíduos envolvidos no processo, com uma média de até 3 unidades como desvio padrão na maioria das amostras. Assim, com a decorrência do tempo, os animais BALB/c apresentaram as primeiras lesões antes dos animais C57BL/6, assim como lesões maiores, apesar de não ser observada uma diferença estatisticamente significativa (vide figura 7 e 8). O acompanhamento das lesões nas diferentes linhagens de camundongos infectadas com *L. (L.) amazonensis* mostrou que a infecção nos camundongos BALB/c e C57BL/6 é progressiva.

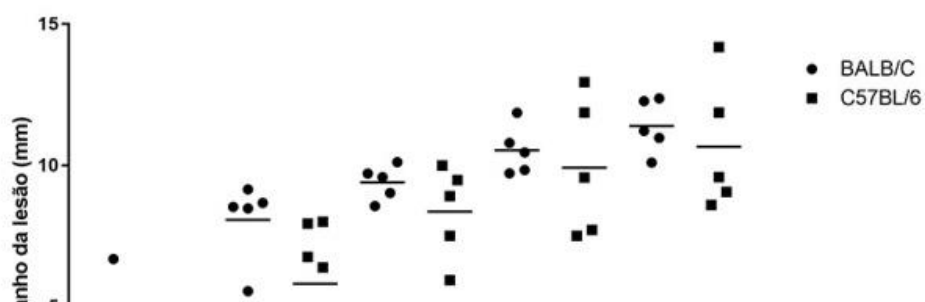
A

Figura 7 – A: Tamanho da lesão (mm) em cada uma das cinco semanas do período de 30 dias após infecção com 1×10^6 promastigotas/mL de *Leishmania (L.) amazonensis* e imagens representativas destas lesões no mesmo período de tempo, em B: animais BALB/c e em C: animais C57BL/6. Fonte: ANASTÁCIA, 2017.

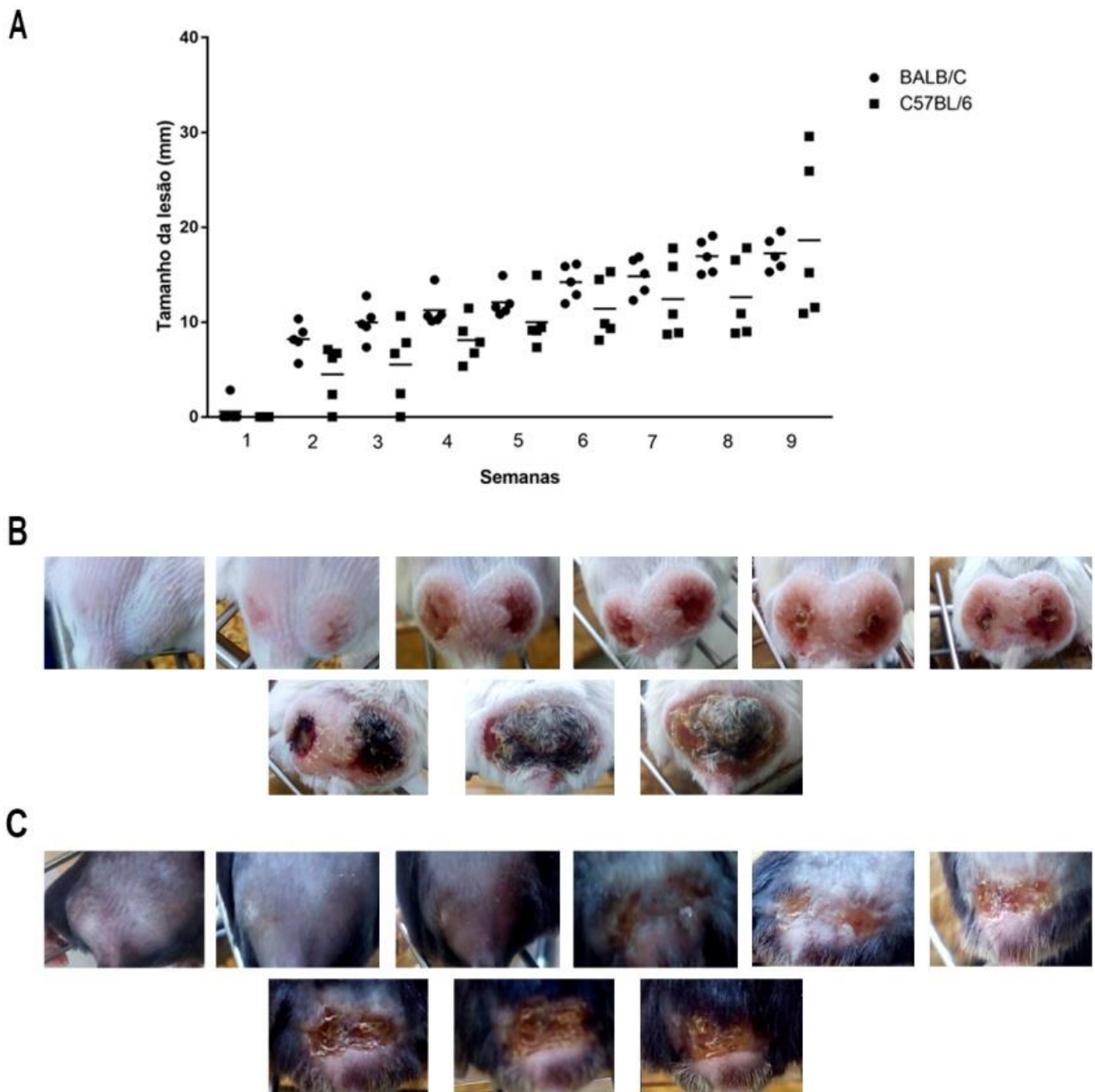


Figura 8 – A: Tamanho da lesão (mm) em cada uma das cinco semanas do período de 60 dias após infecção com 1×10^6 promastigotas/mL de *Leishmania (L.) amazonensis* e imagens representativas destas lesões no mesmo período de tempo, em B: animais BALB/c e em C: animais C57BL/6. Fonte: ANASTÁCIA, 2017.

4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE FRAGMENTOS DE TECIDOS LESIONADOS DE ANIMAIS BALB/c E C57BL/6 INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*.

A análise do processo inflamatório desencadeado pela inoculação intradérmica com 1×10^6 promastigotas na fase estacionária de crescimento (7 dias de cultivo) de *Leishmania (L.) amazonensis* no dorso de camundongos BALB/c e C57BL/6 variou em alguns aspectos segundo a linhagem hospedeira.

Nos animais do grupo controle, após 30 e 60 dias, como observado nas figuras 9 e 10, evidenciou-se a estrutura de colágeno bem característica de tecidos íntegros, ausência de infiltrados inflamatórios em ambas as linhagens de camundongos.

Já nos animais BALB/c do grupo infectado, após 30 dias, observou-se áreas com infiltrados inflamatórios, presença de vacúolos grandes em tamanho e em quantidade (Figura 9F, asteriscos), além de um elevado número de formas amastigotas no interior dos vacúolos (Figura 9F, cabeça de seta), bem como uma acentuada perda de matriz extracelular, quando comparados aos animais C57BL/6 no mesmo período (Figura 9H), onde é possível observar a presença reduzida de infiltrado inflamatório, assim como poucos e pequenos vacúolos, além da presença de fibras de colágeno que compõe a matriz extracelular. Para estas mesmas linhagens infectadas após 60 dias, observaram-se sítios inflamatórios e macrófagos vacuolizados intensamente parasitados mais abundantes, logo, supostamente o número de parasitas na lesão está aumentado, inferindo uma maior degradação tecidual (áreas de necrose) também durante esta fase dita crônica de infecção. Apesar do aumento também em animais C57BL/6, nesta linhagem foi possível observar essas mesmas características descritas anteriormente de maneira notoriamente reduzida; assim como um grande número de formas amastigostas de *Leishmania (L.) amazonensis* fora de vacúolos, no tecido de uma maneira geral.

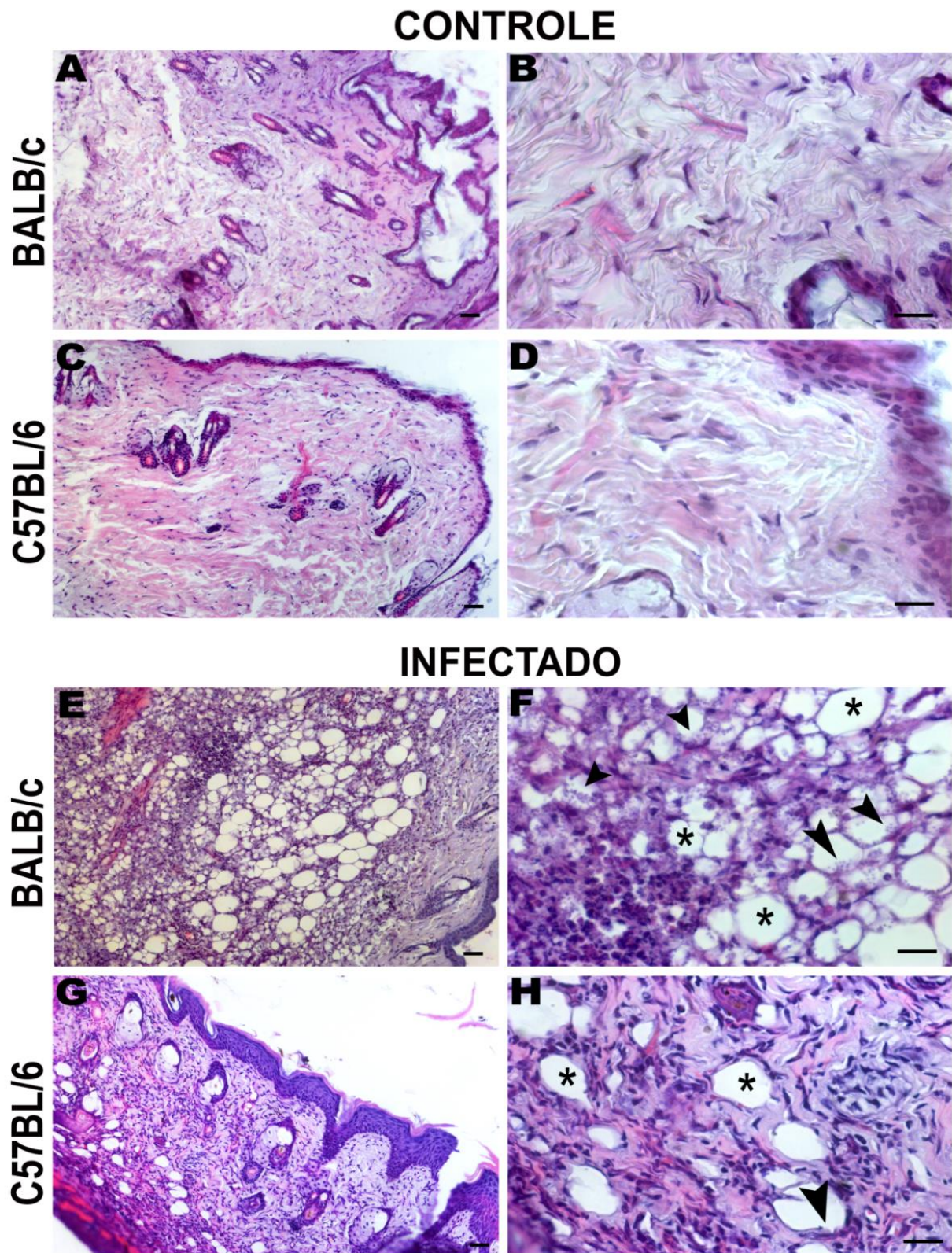
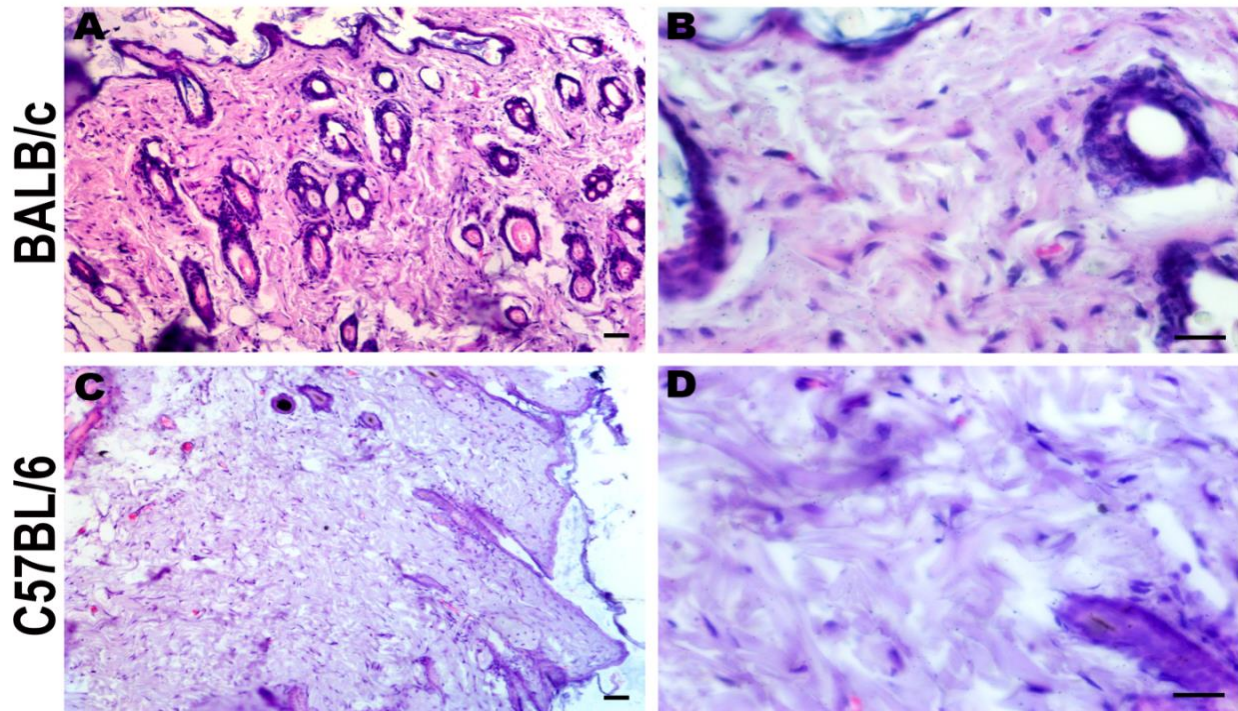


Figura 9 – Análise histopatológica de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados após 30 dias de infecção a partir do surgimento da primeira lesão. Coloração por hematoxilina e eosina. A: BALB/c não infectado, B: BALB/c não infectado, maior aumento de A., C: C57BL/6 não infectado, D: C57BL/6 não infectado, maior aumento de C., E: BALB/c infectado, F: BALB/c infectado, maior aumento de E., G: C57BL/6 infectado, H: C57BL/6 infectado, maior aumento de G. A escala corresponde a 50 μ m. (*): vacúolos. (►): leishmania. Esses dados são representativos dos cinco animais infectados do grupo.

CONTROLE



INFECTADO

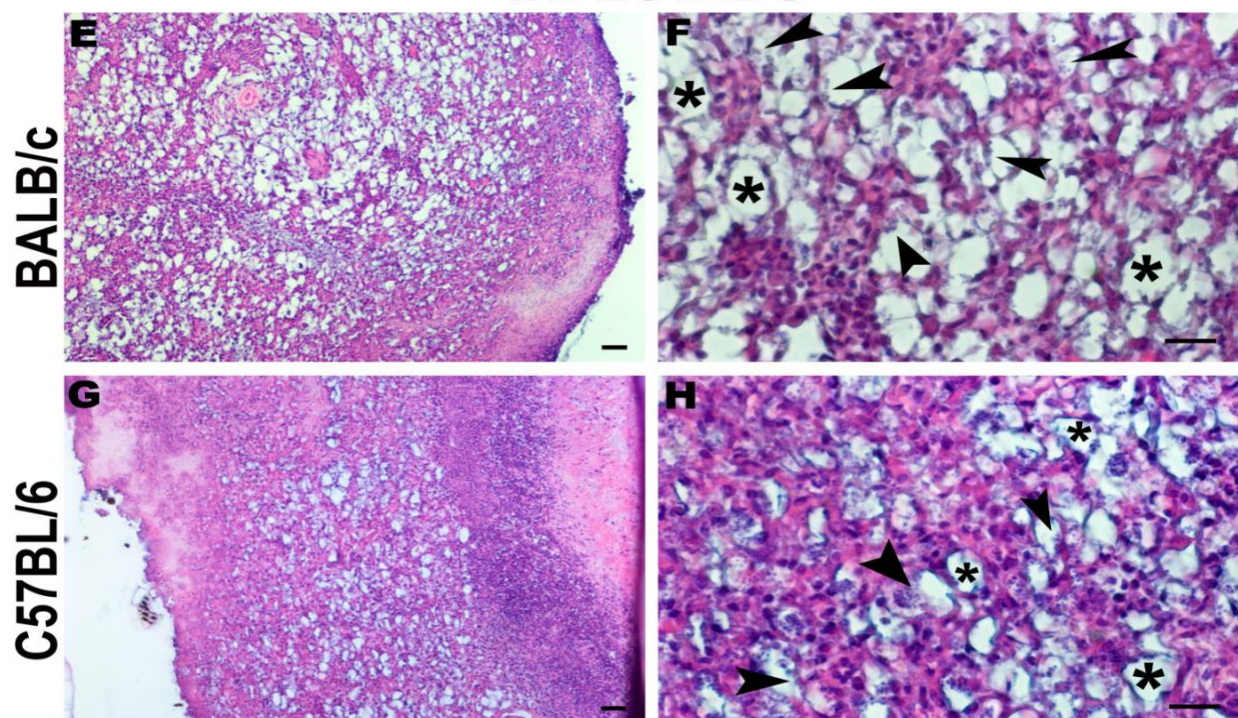


Figura 10 – Análise histopatológica de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados após 60 dias de infecção a partir do surgimento da primeira lesão. Coloração por hematoxilina e eosina. A: BALB/c não infectado, B: BALB/c não infectado, maior aumento de A., C: C57BL/6 não infectado, D: C57BL/6 não infectado, maior aumento de C., E: BALB/c infectado, F: BALB/c infectado, maior aumento de E., G: C57BL/6 infectado, H: C57BL/6 infectado, maior aumento de G. A escala corresponde a 50 μ m. (*): vacúolos. (►): leishmania. Esses dados são representativos dos cinco animais infectados do grupo.

4.3. PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM MACERADOS DE FRAGMENTOS DE TECIDOS LESIONADOS e SORO DE ANIMAIS BALB/c E C57BL/6 INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*.

A dosagem das citocinas foi realizada a partir do sobrenadante obtido do macerado dos tecidos lesionados de animais controles e infectados após 30 e 60 dias e do soro destes mesmos animais. Amostras de 75mg de tecido foram macerados em 1 mL de tampão PHEM 2x (MgCl₂, KCl, EGTA, Hepes, Pipes e água), centrifugadas e, então, esse sobrenadante foi utilizado para avaliar a produção. Já o soro foi obtido a partir do sangue total destes animais controles e infectados.

Respeitando o intuito do trabalho de avaliar a progressão da infecção cutânea e relacionar com a produção de citocinas na pele de camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, analisou-se essa produção das citocinas principais dos perfis TH1/TH2/TH17 entre as linhagens C57BL/6 e BALB/c nos quatro diferentes grupos: controle 30 dias, controle 60 dias, infectado 30 dias e infectado 60 dias.

Para as citocinas IL-2, IL-10, IL-17A, IFN- γ não houve diferenças significativas tanto para a análise do macerado, quanto para análise do soro (vide figura 11, 12, 13 e 14).

A

67

● BALB/c
■ C57BL/6

Figura 11 – Produção da citocina IL-2 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-2 em pele e B: IL-2 em soro.



Figura 12 – Produção da citocina IL-10 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-10 em pele e B: IL-10 em soro.

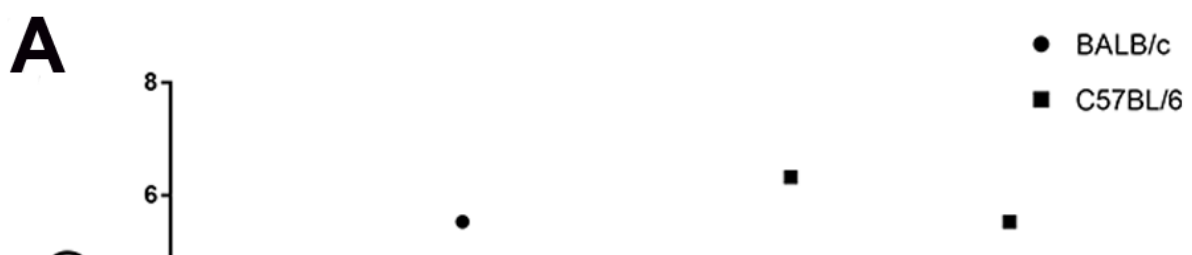


Figura 13 – Produção da citocina IL-17A em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-17A em pele e B: IL-17A em soro.



Figura 14 – Produção da citocina IFN- γ em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IFN- γ em pele e B: IFN- γ em soro.

Já os níveis de produção de IL-4, IL-6 e TNF- α entre animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* por 60 dias, apresentaram

diferenças estatisticamente significativas (vide figura 15, 16 e 17) quando analisada a dosagem em macerado, sendo essa produção maior nos animais C57BL/6.

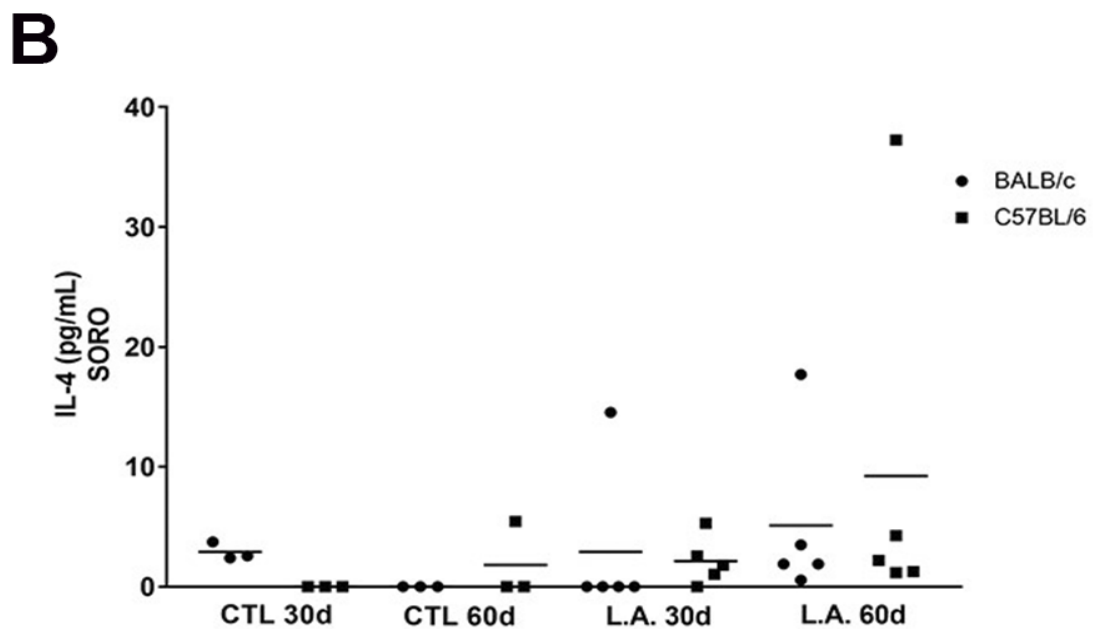
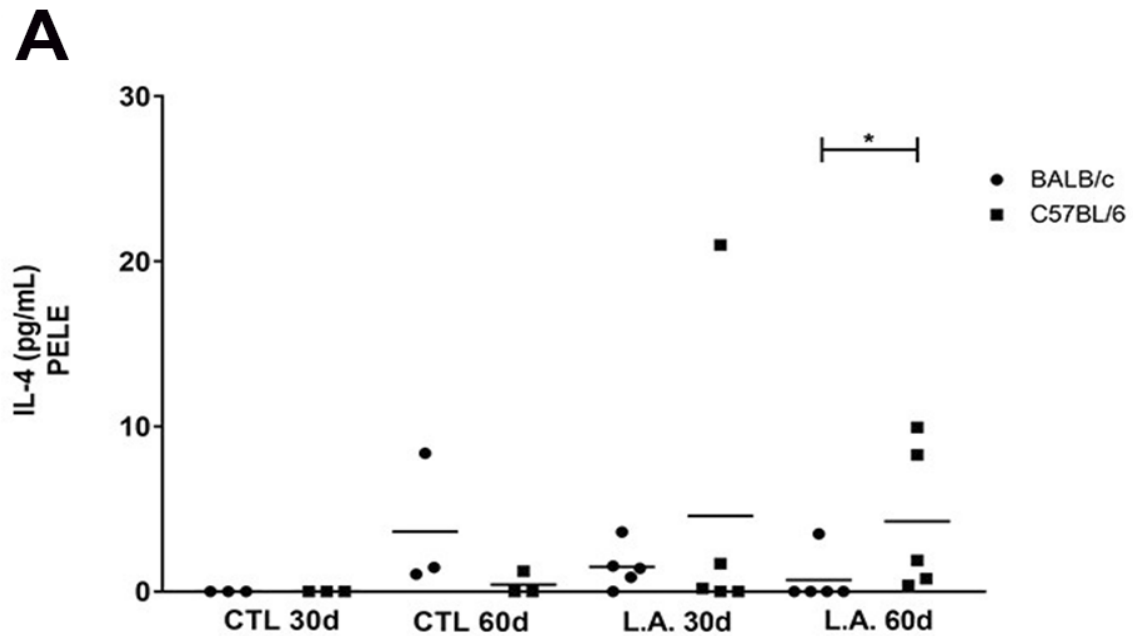


Figura 15 - Produção da citocina IL-4 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-4 em pele e B: IL-4 em soro.



Figura 16 - Produção da citocina IL-6 em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: IL-6 em pele e B: IL-6 em soro.



Figura 17 - Produção da citocina TNF- α em macerado de pele e soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 controle e infectados. A: TNF- α em pele e B: TNF- α em soro.

4.4. PRODUÇÃO DE NITRITO EM MACERADOS DE FRAGMENTOS DE PELE DE ANIMAIS BALB/C E C57BL/6 INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis*.

A dosagem de nitrito foi realizada através da utilização de sobrenadante do macerado dos tecidos lesionados de animais controles e infectados após 30 e 60 dias de inoculação. Amostras de 75mg de tecido foram maceradas como descritos anteriormente e, o sobrenadante foi utilizado para avaliar a produção de nitrito, como forma indireta para determinar a produção de óxido nítrico.

A comparação da produção de nitrito neste modelo de infecção com *L. (L.) amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6 foi de interesse para avaliar a suposta atividade leishmanicida na lesão com relação às linhagens animais apresentadas.

A produção de NO entre as duas linhagens de animais nos quatro grupos: controle 30 dias, controle 60 dias, infectado 30 dias e infectado 60 dias, não apresentaram diferenças significativas estatisticamente, conforme demonstrado na figura 13.

Figura 18 – Produção de nitrito em sobrenadante do macerado dos tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados.

4.5. RESULTADOS PRELIMINARES: RT-qPCR DA CARGA PARASITÁRIA

4.5.1. Curva Padrão

A curva padrão foi caracterizada por um coeficiente de relação de Pearson (R) no valor de 0,99464 e um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98932, ambos corroborando com o valor de eficiência igual a 0,90, indicando a alta eficiência da amplificação conforme a figura 14. A curva apresentou padrão linear com as duplicatas bem próximas, conforme a figura 15, ressaltando que, conforme indicações do fabricante, considerou-se até o 40º ciclo para análise dessa amplificação.

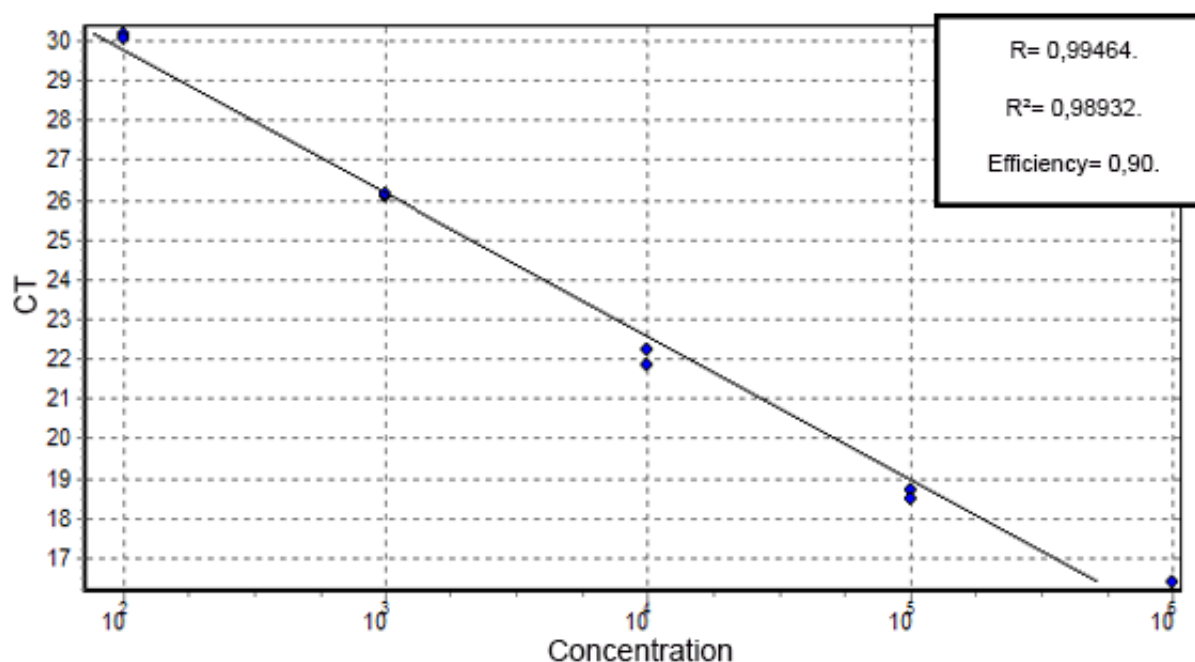


Figura 19 – Equação da reta da curva padrão demonstrando a eficiência da mesma através de valores do coeficiente de correlação de Pearson e do coeficiente de determinação.

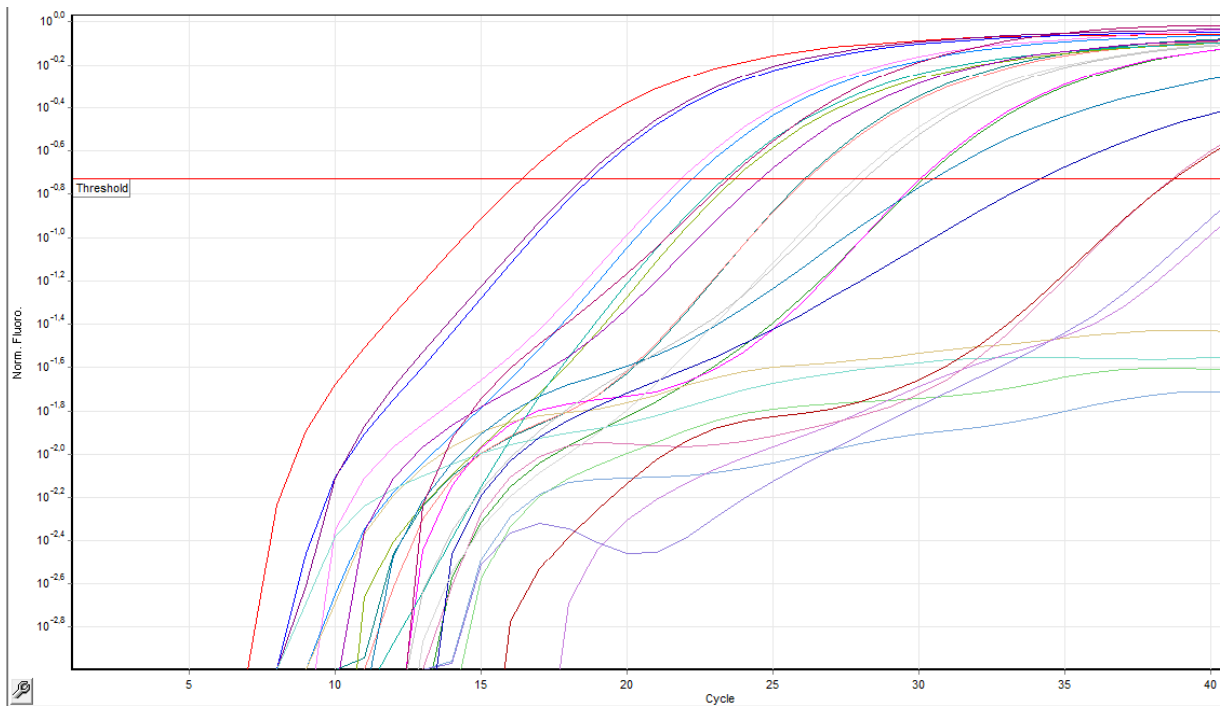


Figura 20 – Ciclos de amplificação da padronização do ensaio de PCR para quantificação da carga parasitária a partir de fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 controle e infectados.

4.5.2. RT-qPCR da carga parasitária em fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*.

Para analisar a carga parasitária em fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*, buscou-se padronizar a técnica de reação de cadeia da polimerase por reação de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) neste modelo de infecção.

De acordo com as amplificações, até o 40° ciclo (Figura 15), as amostras do controle negativo e NTC não sofreram amplificação, assim como as amostras dos animais não infectados. Já amostras coletadas no período de 30 dias, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a carga parasitária presente em camundongos BALB/c e C57BL/6, apesar da maior quantidade de parasitos ser observada para animais BALB/c. Entretanto, amostras coletadas após 60 dias, foi observado que a linhagem BALB/c apresenta maior carga parasitária quando comparados aos camundongos C57BL/6, sendo estatisticamente significante. Entretanto, ainda será necessário determinar a carga parasitária para os 3 animais restantes.

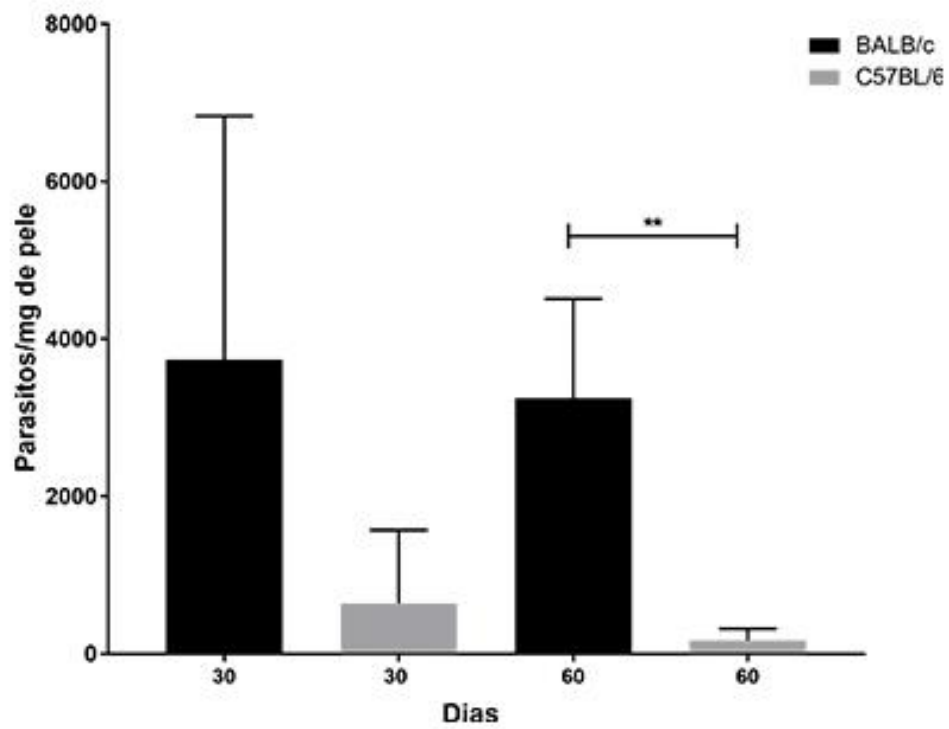


Figura 21 – Carga parasitária (parasitos/mg de pele) em fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 infectados (n=2).

Discussão

5. DISCUSSÃO

O perfil de patogenicidade da Leishmaniose Tegumentar em modelos experimentais murinos é totalmente dependente dos fatores inerentes ao hospedeiro,

características estas relacionadas a seu perfil genético e sua resposta imunológica; assim como também é influenciada por fatores inerentes à espécie parasitária, como a virulência da espécie *Leishmania* em questão, a quantidade inoculada, a via de inoculação empregada e o tempo de infecção. Esse conjunto de diversos fatores implicará no resultado dessa interação parasito-hospedeiro entre as diferentes espécies parasitárias e os mecanismos de suscetibilidade e resistência da resposta imunológica do hospedeiro, um espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas poderá ser observada (PASSERO; LAURENTI; SANTOS-GOMES, 2011).

Estudos demonstraram que camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* pela via intradérmica na orelha, apresentaram perda de material cartilaginoso no local do inóculo no final da fase aguda da doença (aproximadamente 5 semanas de infecção) devido à intensa reação inflamatória desenvolvida (CÔRTEZ, 2008). Além disso, essas mesmas linhagens quando infectadas na pata traseira, apresentaram frequentemente, infecções secundárias, já que esses membros permanecem em contato com a maravalha, sendo de mais fácil acesso ao animal como, por exemplo, pelo focinho e boca, o que permite esse contato com o local da lesão, levando à uma cronicidade da lesão devido à infecções secundárias (Kückelhaus, 2011). Portanto, no presente estudo, foi definido o uso da via intradérmica na área dorsal, próxima à cauda, tanto pelo fato de que esta via mimetiza a infecção em humanos, como pela melhor possibilidade de coleta de material para análise em tecido lesionado.

A infecção por *L. amazonensis* encontra-se associada aos à cepa parasitária, ao local de inoculação e espécie hospedeira. Há muitas diferenças nos fatores de virulência parasitária na espécie *Leishmania*, fatos estes que interferem na consequente patogenia associada à doença, assim como altera os mecanismos imunitários que mediarão a suscetibilidade e/ou a resistência à infecção.

Assim, nossos resultados demonstraram que a análise do curso do crescimento das lesões *in vivo* seguiu um mesmo padrão de crescimento, uma infecção progressiva, porém os animais BALB/c apresentaram as primeiras lesões antes dos animais C57BL/6, assim como lesões maiores e com bordas elevadas, apesar de não ser observada uma diferença estatisticamente significativa. Em

consenso com a literatura, em que o perfil de crescimento das lesões se mostrou similar àquele descrito anteriormente por Cupolilo e colaboradores (2003) que avaliaram o comportamento biológico de isolado humano de *Leishmania (L.) amazonensis* em distintas linhagens isogênicas de camundongos, onde animais BALB/c, C57BL/6 e C57BL/10 desenvolveram lesões nodulares que evoluíram para lesões ulceradas em um período de até 20 semanas, porém no início da infecção, a lesão primária do C57BL/6 apresentou uma curva de crescimento mais rápido em comparação com ratinhos BALB/c, divergindo neste ponto dos nossos dados.

Felizardo e colaboradores (2012), também observaram em um trabalho que visou avaliar o efeito da ausência de sinalização por IL-4 ou por IL-4 / IL-13 em lesão dorsal e em patas murinas causada por *L. amazonensis* que o intervalo de tempo para o surgimento da lesão, progressão e tamanho foram muito semelhantes para animais BALB/c e C57BL/6 até a 17ª semana, em seguida, as lesões cresceram mais rapidamente em BALB/c do que em C57BL/6, de modo que na 24ª semana de infecção eram cerca de 25% maiores do que as observadas em camundongos C57BL/6; assim como a morfologia da lesão, sendo esta ulcerada e profunda na derme. Além disso, Velasquez (2014) avaliou distintos cursos da infecção por *L. amazonensis* em camundongos BALB/c, BALB/c *nude* e C57BL/6 e observou que o intervalo de tempo (6 semanas) para a aparência macroscópica, progressão e tamanho das lesões foram muito semelhantes para os camundongos BALB/c e C57BL/6 até a semana 16-17, onde cada animal apresentou lesão cutânea de maneira ulcerada e profunda na derme em consonância com os nossos resultados obtidos. Dessa maneira, ainda não há um consenso no que diz respeito a avaliação macroscópica do surgimento e progressão da lesão, possivelmente devido as variantes de cada estudo como a cepa parasitária utilizada, assim como os diferentes períodos escolhidos para análise e acompanhamento da progressão das lesões, além das características individuais de cada animal hospedeiro dos grupos experimentais.

Seguindo esta linha lógica de raciocínio, estudos de Passero; Laurenti; Santos-Gomes, 2011 e Velasquez, 2014, observaram a partir a análise histopatológica da lesão de pele de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* padrões de suscetibilidade da resposta tecidual no local da infecção através de grandes lesões localizadas e nódulo fibrótico discreto desenvolvidos 2 meses (8 semanas) após a infecção, fase dita aguda, ainda com uma vasta quantidade de macrófagos

vacuolizados fortemente parasitados e formas amastigotas aderidas à parede dos vacúolos parasitóforos; com o decorrer da infecção, o número de macrófagos parasitados aumentou progressivamente com a presença escassa de linfócitos na periferia do tecido lesionado. Já nos camundongos C57BL/6, também houve desenvolvimento de lesão cutânea, nesta fase aguda, porém, a linhagem BALB/c apresentou um número de amastigotas significativo maior.

Ratificando nossos resultados, animais BALB/c infectados apresentaram áreas com infiltrados inflamatórios, presença de vacúolos grandes em tamanho e em quantidade, além de um elevado número de formas amastigotas no interior dos vacúolos e uma acentuada perda de matriz extracelular, quando comparados aos animais C57BL/6 que no mesmo período de 30 dias (fase dita aguda) apresentaram redução de infiltrado inflamatório, assim como poucos e pequenos vacúolos, além de maior presença de fibras de colágeno que compõe a matriz extracelular.

Para estas mesmas linhagens, infectadas após 60 dias, foi observado sítios inflamatórios e macrófagos vacuolizados intensamente parasitados em maior quantidade, logo, supostamente um número aumentado de parasitos na lesão, inferindo uma maior degradação tecidual (áreas de necrose) também durante esta fase dita crônica de infecção. Apesar de observarmos essas mesmas características aumentadas em animais C57BL/6, notou-se que se apresentavam de maneira notoriamente reduzida, assim como um grande número de formas amastigostas de *L. amazonensis* livres no tecido lesionado. De maneira semelhante, Passero; Laurenti; Santos-Gomes, 2011 e Velasquez, 2014 demonstraram que, aos 70 dias após a infecção, na fase final e dita crônica, foi observada intensa ulceração da pele e metástase parasitária em medula óssea, linfonodo e pele na infecção em BALB/c, enquanto que nos animais C57BL/6 a infecção permaneceu localizada ao local de inoculação. Áreas de fibrose e necrose fibrinóide foram descritas para as duas espécies hospedeiras. Os animais de linhagens mais resistentes que camundongos BALB/c, demonstraram persistência parasitária na pele e linfonodos inferindo que a infecção nesses animais pode ser sustentada pela infecção de outras células, como as células dendríticas e fibroblastos tal como uma maior destruição tecidual. Todos esses dados nossos e citados da literatura corroboram com a descrição de Genaro & Reis (2005) em que afirmam que *L. amazonensis* é uma espécie que geralmente, produz no homem, lesões ulceradas simples e limitadas com numerosos parasitos nas

bordas de tecidos lesionados, modelo este bem mimetizado pela infecção murina, principalmente em animais BALB/c.

Após observarmos o padrão de progressão e a histopatologia dos tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 após infecção por *L. amazonensis*, perguntou-se qual o padrão de resposta imune desenvolvido por cada uma das linhagens hospedeiras com relação a produção das citocinas dos perfis Th1/Th2 e Th17 diretamente na lesão e em soro. Esta comparação dos padrões de citocinas neste modelo de infecção com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c e C57BL/6 foi de interesse para a percepção de que se o perfil de resposta imunológica local diverge da sistêmica com relação às linhagens animais apresentadas, pois compreender como distintos organismos respondem a esse processo infeccioso, além do comportamento parasitário em diferentes órgãos e/ou tecidos, permitirá uma melhor elucidação para o entendimento desta patologia (FREITAS et al., 2010). Pelo fato desta infecção estar associada a um modelo de desenvolvimento de lesão cutânea localizada, em todas as dosagens de citocina pro e anti-inflamatórias o fato de nenhuma ter apresentado diferença estatisticamente significativa em soro, ratificou o esperado, pois acredita-se que não houve visceralização da infecção. Entretanto, a análise de órgãos como baço e fígado serão objeto de estudos posteriores para confirmar tal hipótese. Assim, no presente estudo foi observada, diferenças estatisticamente significativas, nos níveis de produção das citocinas TNF- α , IL-4 e IL-6 entre animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* no tempo de 60 dias quando analisada a dosagem em macerado dos tecidos lesionados, sendo essa produção maior nos animais C57BL/6.

O TNF- α é uma citocina produzida principalmente por macrófagos que desempenham um papel crucial na eliminação do parasito *Leishmania* através do aumento da atividade de macrófagos e consequente síntese de óxido nítrico; sendo bem caracterizada na promoção de respostas Th1 contra a infecção por *L. major* (MASPI, 2016). Dessa forma, Maspi (2016) através de uma revisão sobre citocinas pro e anti-inflamatórias nas leishmanioses cutâneas, nos mostra que camundongos C57BL/6 deficientes em TNF- α infectados com *L. major* apresentaram infecção visceral fatal apesar da produção de IFN- β e IL-12 por macrófagos, e o tratamento de camundongos BALB/c com TNF-alfa diminuiu a carga parasitária e o tamanho da lesão em modelo experimental de leishmaniose cutânea. Em contraste, a neutralização

do receptor TNF- α 1 (TNFR1) levou a lesões não cicatrizantes em camundongos C57BL/6 resistentes à infecção por *L. major*. Tais fatos estão de acordo com nossos resultados, acreditando-se que não há a ocorrência da visceralização desta patologia, pois não houve diferença estatística na detecção de produção desta citocina no soro dos hospedeiros, entretanto, ocorreu o aumento em tecidos lesionados de animais C57BL/6 com 60 dias de infecção, parecendo estar iniciando o controle desta lesão, uma vez que estas passaram a manter um tamanho com mínimas variações. Além disso, as lesões apresentavam perfil de lesão fechada, talvez indicando um possível processo de auto-cura após um ápice de tamanho.

A IL-4, por outro lado, desempenha um papel importante na diferenciação das células Th0 em células Th2; sendo produzida principalmente por Th2, mastócitos, basófilos e eosinófilos ativados (Maspi 2016). Essa produção de IL-4 promove a regulação da arginase e a biossíntese de poliamina que inibe a atividade leishmanicida dos macrófagos e a sobrevivência prolongada dos parasitas; limitando a produção de citocinas Th1 através da produção de IL-12 e regulando negativamente a produção de quimiocinas que recrutam células do tipo Th1 para o sítio de infecção (LAZARSKI et. al, 2013). Estudos demonstraram que a neutralização de IL-4 levou à cura completa em 85% dos camundongos BALB/c infectados com *L. major* e atenuação da infecção em 100% dos animais (Sadick et al., 1990 apud Maspi, 2016³). Comparando com os dados obtidos em nosso estudo, a produção de IL-4 em animais C57BL/6 após 60 dias de infecção pode ter sido um dos motivos da percepção de muitas formas amastigotas de *L. amazonensis* livres no tecido, observado na análise histopatológica. Por outro lado, estudos observaram que a interrupção do gene de IL-4 em camundongos BALB/c infectados com *L. major* não foi capaz de promover a polarização do perfil de resposta Th1, não tendo efeito na cicatrização das lesões e na eliminação do parasita; embora saiba-se que a IL-4 desempenha um papel crucial na susceptibilidade à infecção por *Leishmania*, vários são os fatores contribuintes e decisivos para esta susceptibilidade (NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I, 1996; MASPI, 2016). Ressaltando que não são substâncias isoladas que determinam

³SADICK, M. D. et al. **Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism.** J Exp Med. 1990; 171(1):115-27.

o perfil de resposta do hospedeiro mediante os mecanismos diversos parasitários, e sim o conjunto de muitos fatores que influenciam uns aos outros.

Por sua vez, a IL-6 é uma citocina considerada pleiotrópica, logo atua tanto como em citocinas anti-inflamatórias como em pró-inflamatórias; sendo produzida por vários tipos celulares, sendo estes: macrófagos, células dendríticas e células T, também sendo um fator de crescimento para células B. A IL-6 conjuntamente com TGF- β estimula o desenvolvimento de respostas Th17, produzindo as citocinas IL-17 e IL-10. Vários estudos experimentais em animais, sugerem que a IL-6 promove respostas predominantemente do tipo Th2 em leishmaniose cutânea (MASPI, 2016).

Assim,

Afonso & Scott [17] mostraram que a suscetibilidade de C57BL/10 a infecção por *L. amazonensis* está relacionada com a ausência de resposta imune celular tipo Th1 e não controlada exclusivamente por células Th2. Resultados similares foram descritos por Soong et al. [18] usando camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*. Porém, estes resultados diferem daqueles obtidos em camundongos BALB/c, nos quais a suscetibilidade à infecção por *L. amazonensis* está claramente relacionada a resposta imune celular tipo Th2 (PASSERO; LAURENTI; SANTOS-GOMES, 2011).

Então, Felizardo (2012) afirma que camundongos C57BL/6 são mais resistentes que BALB/c à infecção por *L. amazonensis*, mesmo não havendo cura da lesão; Velasquez (2014) demonstrou que na infecção por *L. amazonensis*, ambos os animais BALB/c e C57BL/6 são considerados suscetíveis apesar dos diferentes cursos clínicos e Cupolilo (2013) relata que as duas linhagens de camundongos consanguíneos, BALB/c e C57BL/6, podem ser classificados como suscetíveis neste modelo de infecção. Fatos todos estes que entram em consonância com os resultados que apresentamos, pois com relação a perfil Th1, Th2 e Th17, ambas as linhagens hospedeiras apresentaram um perfil padrão parecido e, aos 60 dias, essas diferenças na produção de uma citocina característica do padrão Th1 (TNF-alfa) e duas do padrão Th2 (IL-4 e IL-6) nos leva a ratificar os dados citados de que esse padrão suscetível de camundongos C57BL/6 parece estar mais relacionado à uma ausência de resposta Th1 do que um controle específico por citocinas do perfil Th2.

Após a análise do perfil de citocinas, foi verificada a produção de óxido nítrico em macerado da lesão. O óxido nítrico é uma substância conhecida leishmanicida, sendo esta uma molécula gasosa considerada tóxica devido a

presença de radical livre com uma efêmera vida média (aproximadamente 10 segundos) por conta da sua rápida oxidação a nitratos (NO₃) e nitritos (NO₂) (KÜCKELHAUS, 2011). Logo, dosagens de nitratos e nitritos são indicadores da produção indireta de óxido nítrico.

Diaz e colaboradores (2003) observaram que os derivados de óxido nítrico medidos no soro e a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) observada nas lesões por imunohistoquímica, demonstraram que as concentrações de óxido nítrico circulantes e iNOS foram mais elevadas nas lesões cutâneas precoces de camundongos C57BL/6 resistentes em relação a animais BALB/c; corroborando com os nossos resultados, pois mesmo não havendo diferença significativa, consegue-se inferir tal projeção pela média observada apresentada.

Da mesma maneira, o nosso estudo demonstrou que ambas as linhagens animais hospedeiras produzem óxido nítrico durante o curso da infecção por *L. amazonensis*. como observado na infecção por *L. mexicana* (DIAZ, 2003) e *L. major* (BOGDAN et al., 1996 apud DIAZ et al., 2003⁴). Os camundongos suscetíveis apresentaram altas concentrações de óxido nítrico durante a fase crônica da infecção quando a carga parasitária é muito alta de forma que o óxido nítrico provavelmente é incapaz de agir durante esta fase (DIAZ 2003). Passero, Laurenti e Santos-Gomes (2011) observaram que a expressão da iNOS e os níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de células infectadas com *Leishmania spp.* mostraram-se inversamente proporcionais/associadas aos índices de infecção. Assim, infere-se que o óxido nítrico tem um papel importante na eliminação do parasita, principalmente, durante os estágios iniciais da infecção.

Diaz e colaboradores (2003) mostraram também que camundongos C57BL/6 tinham mais células iNOS⁺ em lesões do que camundongos BALB/c durante o curso da infecção; curiosamente, esta alta densidade de células iNOS⁺ durante as primeiras 5 semanas de infecção coincide com a diminuição da carga parasitária descrita anteriormente em camundongos C57BL/6, contrastando com o número de células iNOS⁺ observadas em lesões de camundongos BALB/c suscetíveis que foram

⁴ BOGDAN, B. C. et al. **Murine epidermal Langerhans cells do not express inducible nitric oxide synthase.** Eur J Immunol 1996; 26: 792–6.

insuficientes para controlar a proliferação parasitária. Assim, parece que a produção local e precoce de óxido nítrico se faz necessária para o controle da infecção em camundongos que apresentam perfil imunológico de maior de resistência.

Huang e colaboradores, 1998 apud Diaz e colaboradores, 2003⁵ demonstram em estudo com murinos suscetíveis e resistentes que o aumento de células iNOS⁺ acontece paralelamente a um aumento de IFN- γ e IL-4 em lesões. O paradigma atual, derivado de estudos *in vitro*, afirma que o IFN- γ impulsiona a ativação de macrófagos e expressão de iNOS, enquanto IL-4 e IL-10 fazem *downregulation* de iNOS e produção de óxido nítrico, promovendo assim a doença. No entanto, a densidade de células iNOS⁺ também foi correlacionada positivamente com a produção de IL-4. Isto sugere que *in vivo* todos os mecanismos são ativos simultaneamente e prevalece o efeito do fator predominante (DIAZ et al., 2003).

Com relação à carga parasitária em fragmentos de tecidos lesionados de animais BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, optou-se pela técnica de qRT-PCR, pois conforme descrição de Van der Meide e colaboradores (2008) esta é a mais eficiente opção para quantificação parasitária de *Leishmania spp* e Cupolilo (2013) também demonstra esse fato indiretamente, já que ao utilizar análise de diluição limitante, mostrou que não houve correlação entre lesão e carga parasitária; contrariando vários estudos científicos que demonstram o contrário como na revisão de Passero; Laurenti; Santos-Gomes, 2011, o que nos leva a inferir a baixa sensibilidade desta técnica. Apesar do resultado apresentado no presente estudo ter sido preliminar, devido ao *n* amostral (*n* = 2), observa-se uma tendência de um aumento muito expressivo de parasitas na linhagem BALB/c desde o momento considerado agudo de infecção (30 dias) até os 60 dias; já nos animais C57BL/6, mesmo em quantidades inferiores, ainda foi possível detectar a presença dessas formas amastigotas, tanto pela técnica de qRT-PCR quanto pela análise histopatológica na lesão.

⁵ HUANG, F. P. et al. **Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania* major infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production.** J Immunol 1998; 160: 4143–7.

Dessa maneira, acredita-se que após a análise das outras amostras (n=3), esse padrão irá se manter e o desvio padrão diminuirá, corroborando com os dados anteriores apresentados sobre o tamanho progressivo da lesão cutânea, assim como a também progressiva presença de macrófagos vacuolizados e intensamente parasitados na análise histopatológica, padrão misto de perfil de resposta imune Th1/Th2 especialmente em C57BL/6 e da atividade nitrérgica maiores em C57BL/6 comparados com BALB/c, inferindo lesões mais brandas com áreas menores de necroses.

Portanto, o presente trabalho contribuiu para elucidar ou instigar ainda mais a função e padrão de resposta do sistema imune do hospedeiro no decurso da infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, demonstrando a importância das diferentes respostas dependentes de células T, assim como, a as diferentes linhagens dos animais hospedeiros e seu papel no controle parasitário e, também, a espécie *Leishmania spp.* Apesar de nós utilizarmos cepa de uma espécie causadora de leishmaniose cutânea, certamente essa diferença entre os nossos resultados e vários outros da literatura sofreu influência da cepa utilizada que foi de isolada de um paciente diagnosticado com leishmaniose cutânea localizada causada por *L. amazonensis*. Diferenças na produção de citocinas e, conseqüentemente, óxido nítrico em tecidos lesionados de camundongos BALB/c e C57BL/6 são, provavelmente, os aspectos mais responsáveis pelos diferentes perfis de desenvolvimento da lesão e carga parasitária após infecção por esta cepa.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

A partir de todos os dados apresentados, podemos concluir que o curso da infecção por *L. amazonensis* ocorre de maneira parecida no sentido da progressão gradual em BALB/c e C57BL/6, mas de forma divergente com relação à característica e aspectos histopatológicos das lesões e estes fatos estão relacionados com o perfil ou intensidade de resposta imune desenvolvido por cada um desses animais.

Observamos em BALB/c uma resposta imune com padrão misto Th1/Th2 e um maior e mais precoce (aproximadamente metade do tempo) desenvolvimento de lesões com baixa atividade nitrérgica, assim como tendência a uma carga parasitária no local da infecção muito mais expressiva em comparação a animais C57BL/6.

Já os camundongos C57BL/6 apresentaram uma resposta imune acentuadamente superior no padrão misto Th1/Th2 com lesões caracteristicamente mais fechadas e menos necrosadas em relação a animais BALB/c, assim como maior expressão de atividade nitrérgica e propensão a uma menor carga parasitária.

Mediante tantos fatos instigantes e distintos mesmo frente à infecção por uma mesma espécie parasitária, mesmo modelo e tempo de infecção, temos por perspectivas prolongar o curso desta infecção para análise mais prolongada da infecção por *Leishmania (L.) amazonensis* em animais BALB/c e C57BL/6, assim como analisar outros órgãos, tais como fígado e baço a fim de observar a suposta visceralização em animais BALB/c e observar, também, uma possível auto-cura em animais C57BL/6 após um pico em tamanho de lesão e carga parasitária; assim como analisar as fases ainda mais iniciais dessa infecção e, quem sabe, poder inferir sobre diferentes perfis de resposta Th no curso mais inicial, intermediário e mais tardio nesse modelo murino.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. **Immune response to Leishmania infection**. Indian J Med Res, nº 119, p. 238-258, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 184 p.: il. (Série A. normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.: il. (Série A. normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Leishmania Tegumentar Americana. Brasil, grandes regiões e unidades federais. 1880 a 2014**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/24/LTA-Casos-14.pdf>. Acesso em: 26 mar 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde/CONITEC. **Proposta de Elaboração do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas** (Escopo). Disponível em: http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Escopo_PCDT_LeishmanioseTegumentar_Enquete.pdf. Acesso em: 16 jan 2017.

CARVALHO, A. K. et al. **Leishmania (V.) braziliensis and L. (L.) amazonensis promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model**. Parasite Immunology, v 34, p. 395–403, 2012. CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. **Animais de laboratório: o camundongo**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v 28, n 1, p. 11-23, 2007.

CÔRTEZ, D. F. **Infecções com baixas doses de Leishmania amazonensis: um modelo para o estudo de leishmaniose tegumentar americana**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica e Imunologia, MG, 2008, 133f.

CONTI, B. J.; SANTIAGO, K. B.; SFORCIN, J. M. **Células dendríticas: mini-revisão**. Biossaúde, Londrina, v. 16, n. 1, 2014.

CONVIT, J.; PINARDI, M. E.; RONDON, A. J. **Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect in the host**. Trans R Soc Trop Med Hyg 66:603–610, 1972.

CUPOLILO, S. M. N. et al. **Biological behavior of Leishmania (L.) amazonensis isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice**. Histol Histopathol, v. 18, p. 1059-1065, 2003.

DIAZ, N. L. et al. **Nitric oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis.** Clin. Exp. Dermatol., v. 28, n. 3, p. 288-293, 2003.

ELLOSO, M. M.; SCOTT, P. **Expression and contribution of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in the early immune response to Leishmania major infection.** J Immunol 1999; 162:6708–15.

FELIZARDO, Tania C..et al. **Lack of signaling by IL-4 or by IL-4/IL-13 has more attenuating effects on Leishmania amazonensis dorsal skin – than on footpad-infected mice.** Exp. parasitol., New York, v. 130, p. 48–57, 2012.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. **Leishmanioses: modelos experimentais.** Disponível em: http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/modelos_experimentais.htm. Acesso em: 26 mai. 2016.

FOGANHOLI, Josiane Nobre; ZAPPA, Vanessa. **Importância da leishmaniose na saúde pública.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, v 17, p. 1-45, 2011.

FREITAS, J. C. C. et al. **Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a Leishmania spp.** Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v 105, p. 11-20, 2010.

GENARO, O.; REIS A. B. **Leishmaniose tegumentar americana.** In: David Pereira Neves. Parasitologia Humana. São Paulo, Rio de Janeiro. Editora Atheneu, 11 edição, 2005.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. **IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following Leishmania major Infection.** PLoS Pathog. 2013;9(3):e1003243.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. **Reciprocal expression of interferon gamma or IL4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets.** J Exp Med 169:59–72, 1989.

KAIKO, G. E.; HORVART, J. C.; BEAGLEY, K. W.; HANSBRO, P. M. **Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?** Blackwell Publishing Ltd, Immunology, 123, 326–338, 2007.

KIDD, Parris. **Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease.** Alternative Medicine Review, v 8, n 3, p. 223-246, 2003.

macerados, Carlos dos Santos. **Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator de necrose tumoral- α em camundongos infectados pela *Leishmania (L.) amazonensis*.** 2011. 148 f., il. Tese (Doutorado em Medicina Tropical)—Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins – Patologia básica.** 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LAZARSKI, C. A. et al. **IL-4 attenuates Th1-associated chemokine expression and Th1 trafficking to inflamed tissues and limits pathogen clearance.** PLoS One. 2013;8(8):e71949.

LAINSON R.& SHAW J. J. **Leishmaniasis in the New World.** In Collier L, Balows A & Sussman M (eds): Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 10th edn. London, Parasitology, Arnold, Vol. 5, 2005: 313–349.

LIMA-JÚNIOR, Djalma de Souza. **NLRP3 inflamassoma: uma plataforma molecular importante no controle da infecção por *Leishmania spp.*** Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ribeirão Preto, SP, 2013, 193 f.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. **IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice.** J. Immunol. 182, 3039–3046 (2009).

LORENZI, J. C. C.; BARBOSA-LORENZI, V. C.; ZANETTE, D. L.. **Linfócitos T CD4+ e a resposta imune.** ScireSalutis, Aquidabã, v.2, n.1, p.5-9, 2012.

MAIOLI, T. U. et al. **Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice.** Res Parasitol, v 94, p. 207–212, 2004.

MASPI, Nahid; ABDOLI, Amir; GHAFARIFAR, Fathemeh. **Pro-and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review**. Pathogens and Global Health, 36 p, 2016.

MENDES, P. M. **Mecanismos de Resistência de Camundongos BALB/c e C57BL/6 à Infecção por Leishmania (Viannia) guyanensis**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica e Imunologia, MG, 2011. 68 f.

MESQUITA-JUNIOR, D. et al. **Sistema Imunitário – Parte II Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B**. Revista Brasileira de Reumatologia, v 50, n 6, p. 665-694, 2010.

MILLS, C. D. et al. **M-1/M-2 macrophages and the TH1/TH2 paradigm**. J Immunol, v 164, n 12, p 6166-6173, 2000.

MINAYO MC. **O desafio do conhecimento: pesquisa qualitativa em saúde**. Rio de Janeiro: Abrasco; 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **In: Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2003, 120 f.

MOURA, T. R. **Desenvolvimento de um modelo experimental para Leishmaniose Tegumentar Americana utilizando Leishmania braziliensis**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Patologia, BA, 2004. 89 f.

NOBEN-TRAUTH, N.; KROPF, P.; MULLER, I. **Susceptibility to Leishmania major infection in interleukin-4deficient mice**. Science. 1996;271(5251):987-90.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMAO, R. **Citocinas e dor**. Revista Brasileira de Anestesiologia, v 61, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA, Gabriel Barbosa. **Estudo do perfil genético de linhagens de camundongos mantidos nos biotérios de criação de duas instituições parceiras na Rede Mineira de Bioterismo**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de

Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética, Belo Horizonte, MG, 2013. 54 f.

PAPINI, Tatiane Figueiredo de Moraes. **Variações na temperatura e ações de inibidores de nucleotidasas e suas conseqüências na hidrólise de nucleotídeos por promastigotas *Leishmania infantum chagasi***. Dissertação (mestrado) - Universidade Vale do Rio Doce, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas, Governador Valadares, MG, 2011. 53 f.

PARHAM, Peter. **O sistema imune**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2001.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; SANTOS-GOMES, G. **Modelos Roedores Utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 1 ed. Salvador, BA: CYTED/CNPq, 2011.

PINHEIRO, R. O. **Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia**. Infarma, v.16, nº 7-8, 2004.

REIS, Luiza de. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de leishmaniose tegumentar americana antes e após tratamento quimioterápico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Saúde Pública, Recife, PE, 2007. 124 f.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. **The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice**. Nat VerImmunol 2:845–858, 2002.

SCOTT, Phillip; NOVAIS, Fernanda. **Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis**. Nature Reviews, Immunology, 12 p, 2016.

SCOTT, P. **IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis**. J Immunol 147:3149–3155, 1991.

SCOTT, P. **The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis**. ExpParasitol 68:369–372, 1989.

SILVA, A. A. R. **Análise funcional da proteína LRR17, rica em repetições de leucina e secretada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis***. DATA. 122 folhas. Tese – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R., DE BRITO, A. C. et al. **Leishmaniose tegumentar americana**. In Leão RNG (ed): Doenças Infecciosas e Parasitárias: Enfoque Amazônico, Belém, PA, CEJUP, 1997:619–630.

SILVEIRA, F. T. et al. **Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis**. *Parasite Immunology*, v 31, p. 423–431, 2009.

SOARES, M. B. P.; CARVALHO, L. C. P.; SANTOS, R. R. **Banco de Embriões de Camundongos Geneticamente Modificados: Uma estratégia para a preservação da diversidade genética em modelos experimentais murinos**. *Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento*, v 20, p. 50-54, 2001.

SOUZA, Alexandre Wagner Silva de; et al. **Sistema Imunitário – Parte III: O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade**. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v 50, n 6, p. 665-694, 2010.

SOUZA, Marina de Assis. **Quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta imune contra Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Inovação Terapêutica, Recife, PE, 2014. 138 f.

TAVARES, N. M.; SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C.I. **Estratégias de vacinação contra leishmaniose visceral e cutânea: lições de modelos experimentais**. *Gazeta Médica da Bahia*, v 79, p. 110-121, 2009.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. **Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm**. *FEMS Immunol Med Microbiol*, v 51, n2, p. 229-242, 2007.

UFF – Universidade Federal Fluminense. **Classificação Genética dos Animais de Laboratório**. Disponível em: www.uff.br/animaislab/ap6.doc. Acesso em: 26 mai. 2016.

VAN DER MEIDE, W. et al. **Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites**. *Journal of Clinical Microbiology*, v 46, p. 73-78, 2008.

VELASQUEZ, Leonardo Garcia. **Efeitos da resposta imune no curso da infecção de BALB/c, BALB/c nude e C57BL/6 e na expressão de proteínas específicas em formas de amastigotas de *L. amazonensis* isolado de BALB/c e BALB/c nude.** Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, São Paulo, SP, 2014. 28f. WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis.** WHO Technical Report Series, 949, 2010.

WHO - World Health Organization. **Leishmaniasis.** Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 23 out. 2016.

Anexo

8. ANEXO

8.1 CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (IEC).

CEUA



CERTIFICADO nº 30/2016

Certificamos que a proposta intitulada “**Produção de citocinas em lesões cutâneas órgãos de camundongos C57BL/6 e BALB /c por L. (L.) amazonensis**”, registrada com o nº 30/2016, sob a responsabilidade de **Ana Paula Drummond Rodrigues**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO EVANDRO CHAGAS-IEC.

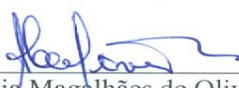
Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2016 a 01/07/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> / Isogênicas: C57BL/6 e BALB/c
Nº de animais	32 (16 da linhagem C57BL/6 e 16 da linhagem BALB/c)
Peso/Idade	20 a 30 gramas / 6 a 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	SACPA/IEC

De acordo com Orientação Técnica nº 8, de 18 de março de 2016 do CONCEA.

Recomendamos que a coordenação mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Deverá ser encaminhado relatório incluindo os resultados finais da pesquisa, no prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Ananindeua-PA, 17 de agosto de 2016.


 Ana Cláudia Magalhães de Oliveira
 CEUA/SEAC/IEC/SVS/MS


 Livia Medeiros Neves Casseb
 Coordenadora da CEUA