



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



ANANDA ISIS LIMA DE MARINHO

**DIFERENÇAS ENTRE SEXOS REPERCUTEM NA CARGA
PARASITÁRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *LEISHMANIA INFANTUM***

Salvador, Ba

2015

ANANDA ISIS LIMA DE MARINHO

**DIFERENÇAS ENTRE SEXOS REPERCUTEM NA CARGA
PARASITÁRIA E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *LEISHMANIA INFANTUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan

Salvador, Ba

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Processamento Técnico, Biblioteca Universitária de Saúde,
Sistema de Bibliotecas da UFBA

M338 Marinho, Ananda Isis Lima de.

Diferenças entre sexos repercutem na carga parasitária e parâmetros bioquímicos na infecção experimental por *Leishmania infantum* /

Ananda Isis Lima de Marinho. - Salvador, 2015.

49 f. ; il.

Orientadora: Profa. Dra. Gyselle Chrystina Baccan.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2015.

1. Leishmaniose visceral. 2. *Leishmania infantum*. 3. Mesocricetus. 4. Modelos animais de doenças. 5. Caracteres sexuais. 6. Susceptibilidade a doença. I. Baccan, Gyselle Chrystina. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 616.993.161

Á minha mãe Marleyne (*in memoriam*) pelo exemplo de mulher batalhadora." Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que precisava para voar". Meu alicerce. Penso em você todos os dias. Amo-te!

Á minha filha Gabriella a sua existência me fortalece e me motiva. Ao meu esposo Frank pela compreensão e exemplo de amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Meishu Sama por estar sempre comigo e ter me conduzido até estas pessoas.

Ao amigo Paulo Lucas por acreditar em mim.

A minha orientadora sou imensamente grata, pela acolhida, por todo o apoio, carinho e dedicação. Está no meu coração toda a minha GRATIDÃO. Tive o prazer de viver momentos únicos e de muito aprendizado. Muito Obrigada por tudo!!!!

As mestrandas Adenilma, Danielle, Fabine e Profa.Rosângela por todo o apoio, carinho e atenção.

As IC'S Andréia, Cinira, Elaine e Monique pela acolhida.

Ao funcionário do biotério da FIOCRUZ, Pedro pela atenção e dedicação, o seu apoio foi fundamental.

Aos familiares pelo apoio, preocupação e compreensão.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento.

As secretárias do colegiado pelo carinho dispensado.

As agências de fomento FAPESB e CNPQ pelo financiamento do Projeto e bolsa de estudo, seria inviável realizar este trabalho.

A todos aqueles que diretamente e indiretamente me ajudaram, acalentaram e tiveram palavras de conforto para acalmar o meu coração.

A todos minha sincera Gratidão!

RESUMO

Nas infecções parasitárias alguns fatores estão associados com a susceptibilidade do hospedeiro, dentre eles o sexo, a idade, condição genética, fatores ambientais e o estado imunológico. Diferenças entre os sexos são observadas em diversas infecções. Acredita-se que isto ocorra devido a ações de hormônios sexuais, podendo afetar os diferentes tipos de resposta imune. A Leishmaniose é um grave problema de saúde pública apresentando aumento da prevalência e afetando grande parte da população mundial. No Brasil é endêmica e o Nordeste é a região mais afetada. A forma visceral é a mais grave podendo levar o indivíduo a óbito se não tratada. Objetivamos determinar se existe diferença entre sexos no modelo experimental de LV. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas foram infectados com *L. infantum/chagasi* através da injeção intradérmica e comparados com animais controles, após 5 meses de infecção. Após eutanásia sangue, baço e fígado foram coletados para as análises de carga parasitária, histológicas e de parâmetros bioquímicos. As fêmeas infectadas apresentaram um maior tamanho de baço que os machos infectados. Porém, foram os machos que apresentaram maior carga parasitária. As alterações bioquímicas foram maiores nas fêmeas, podendo estar relacionadas às alterações histológicas observadas no fígado das mesmas. As fêmeas infectadas apresentaram concentrações séricas inferiores de estradiol quando comparadas com fêmeas não infectadas. Essa redução não foi detectada nos machos. Nossos resultados indicam que existem diferenças entre sexos na LV experimental. A determinação de diferenças entre os sexos nas respostas às infecções é de fundamental importância na escolha da melhor abordagem terapêutica para o tratamento das enfermidades, incluindo as leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. Diferenças entre sexos. *L. infantum*. Hamster

ABSTRACT

In parasitic infections some factors are associated with the susceptibility of the host, including sex, age, genetic condition, environmental factors and immune status. Gender differences are observed in various infections. It is believed it occurs due to sex hormones, which may affect different types of immune responses. Leishmaniasis is a serious public health problem presenting increased prevalence and affecting much of the world population. In Brazil it is endemic and the Northeast is the most affected region. The visceral form is the most severe and may cause death if left untreated. We aimed to determine whether there is gender difference in the experimental model of LV. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) males and females were infected with *L. infantum* / *chagasi* by intradermal injection and compared with control animals after 5 months of infection. After euthanasia, blood, spleen and liver were collected for parasite load, histological and biochemical parameters analysis. Infected females showed an increase in the size of spleen compared to infected males. However, males had higher parasite burden. Biochemical changes were higher in females, which may be related to the histological changes observed in their liver. Infected females had lower serum concentrations of estradiol compared to uninfected females. This reduction was not detected in males. Our results indicate that there are gender differences in experimental LV. The determination of sex differences in responses to infection is very important in choosing the best therapeutic approach for the treatment of diseases, including leishmaniasis.

Keywords: Visceral leishmaniasis. Sex differences. *L. infantum*. Hamster

LISTA DE SIGLAS

[gb1] Comentário:

[gb2] Comentário: todas estas siglas estão em sua dissertação? Tem várias que parece que não vi

CD4	Cluster de diferenciação
CD8	Cluster de diferenciação
DC's	Células dendríticas
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase indutível
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
NK	Natural <i>killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido Nítrico Sintase tipo 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
TNF	Fator de necrose tumoral
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Evolução do peso corporal dos animais.....	28
Figura 2.	Peso dos órgãos.....	29
Figura 3.	Carga parasitária dos animais.....	29
Figura 4.	Dosagem de Glicose e Albumina sérica	30
Figura 5.	Dosagem sérica de colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL e VLDL.....	31
Figura 6.	Aspectos histológicos do fígado.....	32
Figura 7.	Aspectos histológicos do baço.....	33
Figura 8.	Dosagem de estradiol.....	34

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	9
2.	REVISÃO DA LITERATURA	11
2.1	Leishmaniose.....	11
2.1.1	Leishmaniose Visceral	12
2.1.1.1	Modelos experimentais de LV.....	14
2.1.1.2	Resposta imune na leishmaniose visceral	15
2.2	Diferenças entre sexos e infecções	17
2.3	Diferenças entre sexos nas Leishmanioses.....	18
2.4	Hormônios sexuais e regulação da resposta Imune.....	20
3.	HIPÓTESE E OBJETIVOS	23
4.	CAPÍTULO 1: Artigo Científico: Machos e Fêmeas apresentam diferenças na carga parasitária e parâmetros bioquímicos durante a LV experimental	24
4.1	Introdução.....	25
4.2	Materiais e métodos.....	26
4.3	Resultados.....	28
4.4	Discussão.....	34
4.5	Referências.....	37
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
6	ANEXO	49

1 INTRODUÇÃO GERAL

Diferenças entre sexos na função imunológica estão bem estabelecidas nos vertebrados. Nos estudos clínicos de seres humanos e de animais não-humanos, vários fatores são sugeridos, incluindo as taxas de exposição, comportamento social, habitat e dieta que poderiam contribuir para as diferenças observadas na infecção parasitária (KLEIN, 2004). As diferenças afetam as respostas imune inata e adaptativa, contribuindo na patogênese das doenças infecciosas em machos e fêmeas (PENNELL et al., 2012).

Alguns estudos realizados no Brasil em áreas endêmicas de Leishmaniose visceral (LV) tem avaliado perfil clínico e laboratorial entre crianças e adultos com a doença. As complicações, gravidade e níveis de citocinas. Perfil de citocinas envolvidas na patogênese (CALDAS,2006; COSTA, 2013; SILVA,2012). Não foram encontrados estudos em humanos, que avaliam aspectos das diferenças entre sexos quanto ao perfil hormonal, parâmetros bioquímicos e a doença.

A LV é uma zoonose causada pelo parasita *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*). A doença é transmitida ao homem pela picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie de vetor do Novo Mundo (BELO et al., 2013). É também conhecida como kala-azar, é geralmente fatal no período de até dois anos sem tratamento (WHO, 2010).

Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS) a Leishmaniose é endêmica em 98 países com prevalência mundial de 12 milhões de pessoas infectadas e com mais de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a doença. Sendo 500 mil casos de LV. Com mortalidade estimada em 50 mil óbitos a cada ano no mundo. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países, Índia, Bangladesh, Etiópia, Nepal, Sudão e Brasil (WHO, 2010).

Nas Américas são diagnosticados anualmente em média, 4.000 casos de LV, com taxa de mortalidade de 7%. A maioria dos casos relatados na América Latina é proveniente do Brasil. A LV é um problema de saúde pública relevante em todo o mundo (MESCOUTO-BORGES et al., 2013).

A infecção visceralizante leva a manifestações clínicas variadas em humanos e nos modelos experimentais (WILSON et al.,2005). Contudo, a progressão da doença é dependente da espécie de *Leishmania* envolvendo a genética e o estado imunológico do hospedeiro (NIETO et al., 2011).

[N3] Comentário: Rever menor resposta

Muitos aspectos imunológicos da doença têm sido estudados em modelos experimentais, tais como ratos, hamster, cães domésticos e primatas. Os hamsters mimetizam características clínicas e imunológicas da doença humana (LORIAN-CERVERA & ANDRADE-NARVAEZ, 2014). Muitas vezes revelam vários sinais clínicos da progressão da LV como, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunodepressão (NIETO et al., 2011). Apesar da expressão das citocinas T helper 1 (Th1) no fígado, baço e medula óssea há um descontrole na replicação parasitária levando a progressão da doença (MELBY et al., 2001). O controle da doença está associado com a resposta imune celular do tipo Th1 com produção de Interleucina-12 (IL-12) e Interferon-gama (IFN- γ). A IL-12 estimula a produção de IFN- γ nos pacientes quando respondem ao tratamento (SOARES et al., 2010).

No entanto os mecanismos de defesa eficazes requerem uma coordenação complexa das atividades dos sistemas nervoso e imunológico, e anormalidades nesta interação podem instigar aberrações patofisiológicas (HADDAD, 2008).

Estudos em humanos e em modelos de roedores sugerem que as influências dos hormônios sexuais sobre a resposta imune, particularmente no equilíbrio de citocinas, desempenham um papel significativo (MCCLELLAND & SMITH, 2011).

Durante a infecção e inflamação, ocorrem diversas alterações no metabolismo. Estas são parte da reação do corpo conhecida como a resposta de fase aguda que induz alterações na concentração de proteínas específicas do plasma que ajudam a proteger o hospedeiro de um agravamento e facilita o processo de reparação. O aumento das proteínas de fase aguda modula a resposta inflamatória (KHOVIDHUNKIT et al., 2000).

Diversos estudos relataram variação na composição de lipídios em condições que possam promover uma resposta de fase aguda, tais como nas infecções parasitárias, microbianas e sepse (ERDEVE et al., 2004). As lipoproteínas ou partículas de lipoproteínas são capazes de modular as respostas imunes celulares. Os macrófagos são possíveis alvos para as atividades imunomodulatórias das lipoproteínas (SOARES et al., 2010).

No nosso estudo avaliamos as diferenças nos parâmetros bioquímicos, carga parasitária, alterações histológicas e o estrógeno entre machos e fêmeas durante a fase inicial da LV para melhor compreender a dicotomia sexual na resposta imune.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leishmaniose

Segundo a OMS a incidência global da Leishmaniose é de 2 milhões de novos casos por ano (WHO, 2010). Continua a ter um grande impacto sobre grande parte da população mundial (HANDMAN, 2001). É uma doença tropical das mais negligenciadas. Seu perfil epidemiológico apresenta aumento da prevalência e, portanto, novos instrumentos e abordagens para alcançar seu controle são urgentemente necessários (LORIA-CERVERA & ANDRADE-NARVAEZ, 2014).

As leishmanioses são infecções causadas por tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos através da picada do flebótomo infectado (MELBY et al., 1998b). Insetos do gênero *Phlebotomus* são os principais vetores destas enfermidades na África, Ásia e Europa e do gênero *Lutzomyia*, nas Américas (KUMAR & NYLÉN, 2012).

A forma promastigota flagelada metacíclica do parasita é injetada no hospedeiro vertebrado pelo vetor, onde rapidamente invade o macrófago ou células dendríticas (Dc's) para replicação (STANLEY, 2007; TEIXEIRA, 2006). Dentro do fagolisossomo do macrófago a promastigota converte para a forma não flagelada amastigota do parasita (STANLEY & ENGWERDA, 2007). O inseto vetor ingere a amastigota quando se alimenta de um animal infectado. Em seu trato digestivo, a amastigota desenvolve-se em promastigota, que em seguida, irá ser injetada no hospedeiro susceptível durante o repasto sanguíneo (PISCOPO & AZZOPARDI, 2006).

As leishmanioses representam um complexo de doenças com importância clínica e diversidade epidemiológica. Apresentam um espectro de formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), muco-cutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea (LC) (DESJEUX, 2004). As manifestações clínicas dependem da espécie do parasita, da resposta imune e das características genéticas do hospedeiro (CABRITA, 2011; GOTO, 2004; ROGERS, 2002).

Parasitas que causam LC *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* e *Leishmania major* no Velho Mundo e *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* no Novo Mundo. A infecção induz uma lesão no local da picada do inseto, que leva meses para curar (ROGERS et al., 2002). No entanto, as cepas que são normalmente dermatrópicas podem migrar para os gânglios linfáticos e podem

visceralizar. As espécies de *L. donovani* (Índia e África), *L. infantum* (região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia) e *L. chagasi* (América do Sul), vão para os órgãos viscerais e levam às alterações marcantes na função do baço, fígado e medula óssea (HANDMAN, 2001). Estudos moleculares revelaram que as espécies *L. chagasi* e *L. Infantum* correspondem à mesma espécie, sendo que atualmente o nome *L. Infantum* é o mais utilizado (LIMA, 2012; WILSON, 2005).

A interação entre o hospedeiro e o parasita pode influenciar o curso da infecção. Após a infecção por *Leishmania* na pele, um processo inflamatório local é iniciado, isto envolve o acúmulo de leucócitos no local de entrada do parasita. As populações de células recrutadas na fase inicial da infecção parecem ser essenciais para definir o resultado da doença. Durante este processo as quimiocinas são fundamentais na atração de leucócitos específicos para o local da infecção (TEIXEIRA et al., 2006)

2.1.1 Leishmaniose Visceral

A LV é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, que infecta as células do sistema fagocítico mononuclear de diversas espécies animais (ALVARENGA et al., 2010). Diferentes espécies de flebotomíneos transmitem a *Leishmania* para os seres humanos, que são hospedeiros ocasionais, sendo que os cães são os reservatórios do parasita (CHAPPUIS et al., 2007).

Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado a importância da LV em saúde pública. É a mais grave entre as formas clínicas da leishmaniose (SERAFIM et al., 2010). Está associada com um elevado número de parasitas e a ausência de uma resposta imunológica do tipo Th1 eficiente, como observado em pacientes (TEIXEIRA et al., 2006).

As formas visceralizante são *L. donovani* e *L. infantum* no velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo (LIMA, 2012; WILSON, 2005). A doença é caracterizada por febre progressiva, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia. Nas complicações ocorrem imunossupressão, infecção bacteriana secundária, hemorragia e anemia (BERN et al., 2008). Nos indivíduos infectados com as mesmas espécies de *Leishmania*, existe variabilidade na resolução da infecção. Fatores ambientais contribuem, mas não são determinantes nas diferenças da evolução na infecção. Fatores do hospedeiro que podem influenciar as consequências clínicas da infecção

(JERONIMO et al., 2007). No entanto, os fatores que determinam a susceptibilidade ou resistência à leishmaniose visceral permanecem obscuros (HANDMAN, 2001).

A associação de comorbidades com a desnutrição, o diagnóstico tardio da doença e a presença de complicações, como as infecções bacterianas e as hemorragias concorrem para o aumento da letalidade (OLIVEIRA et al., 2010).

Estudos prévios em modelos experimentais de LV, utilizando-se hamster, demonstraram comprometimento da resposta proliferativa esplênica e de células mononucleares do sangue periférico (MOOKERJEE et al., 2003).

A susceptibilidade do hospedeiro no curso da infecção por *L. infantum* varia imensamente com fatores intrínsecos do parasita e esses fatores exibem marcada variação intraespecífica (SULAHIAN et al., 1997). Embora as características do vetor e do hospedeiro influenciam a progressão da doença sintomática, características parasitárias são importantes que distinguem a doença cutânea da visceral. Por exemplo, apesar de *L. infantum* estar associada predominantemente com LV, algumas subespécies pode também causar LC (MCCALL et al., 2013).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica nas áreas rurais e muitos surtos epidêmicos têm sido relatados na região Nordeste do país (CAVALCANTE & VALE, 2014). Nos últimos dez anos, a média anual de casos de LV foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000. A letalidade aumentou de 3,4%, em 1994, para 5,5% em 2008, e nos últimos 4 anos foi de 6,3%. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. Com a expansão para outras regiões, essa situação vem se modificando e recentemente, verificou-se que a região Nordeste representa 48% dos casos do país (MS, 2010).

Durante a infecção e inflamação, que são reações de fase aguda, algumas alterações no metabolismo de lipoproteínas resultam em alterações nas concentrações e composição de lipídios plasmáticos e lipoproteínas. Um dos mecanismos responsáveis pelo perfil lipídico alterado em pacientes com LV pode ser o sequestro e ou degradação de lipoproteínas no baço e fígado (SEÇMEER et al., 2006).

As lipoproteínas plasmáticas são veículos lipídicos, pode-se esperar que a interação de proteínas de fase aguda com lipoproteínas poderia ter consequências metabólicas importantes durante a doença aguda (ERDEVE et al., 2004).

2.1.1.1 Modelos experimentais na LV

Hamster e camundongo são os dois modelos bem estudados e adequados para o estudo da infecção (AWASTHI et al., 2004). No entanto, o hamster é o modelo experimental mais utilizado para estudos sobre a patogênese e a imunossupressão da LV, porque mimetiza características clínicas patológicas na doença humana ativa (ASLAN et al., 2013). A infecção sistêmica do hamster com *Leishmania donovani* resulta em um aumento da carga parasitária, progressiva caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia até a morte (MELBY et al., 1998a). Os anticorpos que formam complexos imunes nos rins podem levar ao desenvolvimento de glomerulonefrite. A infecção visceral induz alterações em hepatócitos, que levam a um distúrbio do metabolismo no fígado (NIETO et al., 2011).

No fígado ocorre a proliferação parasitária. É considerado um órgão monitor capaz de apresentar em sua estrutura respostas biológicas das alterações do ambiente. As alterações patológicas significativas nos hepatócitos consistem em ruptura do sistema de endomembranas, alterações do compartimento peroxissomal e mudanças na distribuição de glicogênio hepático. Tais alterações ocorrem na infecção crônica de hamster infectado com *L. donovani* (VIANNA et al., 2002). Em camundongos, o fígado é o local de uma infecção aguda e de resolução, enquanto que uma infecção crônica estabelece no baço e na medula óssea (FALEIRO et al., 2014).

Aumento do parasitismo esplênico foi demonstrado por outros estudos que utilizaram hamsters experimentalmente infectados por *L. infantum* e ou *L. donovani* com diferentes formas infecciosas amastigotas ou promastigotas (MOREIRA et al., 2012).

No entanto o hamster, ainda não é um modelo perfeito de doenças humanas (WILSON et al., 2005). Sendo a sua utilização limitada devido à escassez de reagentes (anticorpos, citocinas e marcadores de células) de especificidade definida disponíveis para estudar o papel da resposta imune na patologia da doença (LORIA-CERVERA & ANDRADE-NARVAEZ, 2014).

A maioria dos estudos de LV envolvem injeção intravenosa, intracardíaca ou intraperitoneal de parasitas em animais de laboratório (ASLAN et al., 2013). A infecção, através da via subcutânea, intradérmica é a que mais se aproxima do curso natural da doença (AHMED et al., 2003).

No modelo de camundongo BALB/c a infecção intravenosa é a rota de infecção mais usada no estudo da LV (MCCALL et al., 2013). Embora esse camundongo seja considerado susceptível, a infecção progride durante as duas primeiras semanas, em seguida a infecção é controlada pela resposta imune do hospedeiro (GOTO & LINDOSO, 2004). Na maioria dos camundongos, os parasitas são eventualmente eliminados do fígado, e a resistência hepática para à infecção resulta de uma resposta coordenada do hospedeiro envolvendo mecanismos efetores e reguladores dentro dos granulomas (KAYE et al., 2004). Neste caso, é comparável a casos oligossintomáticos, auto-controlado sendo útil para o estudo da resposta imune protetora (GOTO & LINDOSO, 2004).

O resultado da infecção experimental é dependente do número de parasitas inoculados e da rota de inoculação (ROLÃO et al., 2004).

2.1.1.2 Resposta imune na leishmaniose visceral

LV humana causada por *L. donovani* ou *L. infantum/ chagasi* é uma doença grave, com propagação generalizada dos parasitas para o sistema reticuloendotelial, tais como baço, fígado e medula óssea (GARG & DUBE, 2006). Dentro do hospedeiro mamífero, o protozoário reside como amastigotas em células fagocíticas, tais como macrófagos, Dc's e neutrófilos. A resposta imune que define a proteção contra a doença não está bem definida, em LV (TRIPATHI et al., 2007).

A resposta imunitária a *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasita, através das células sentinelas, incluindo Dc's e macrófagos, onde as formas promastigotas são interiorizadas (por um processo chamado) de fagocitose, formando um fagossomo que se une com lisossomos para formar um fagolisossomo (FREITAS & PINHEIRO, 2010). Este protozoário possui moléculas fortemente imunogênicas, com capacidade de induzir o sistema imunitário do hospedeiro a desenvolver uma resposta ineficaz. Estudos demonstraram que ocorre a inibição da síntese de óxido nítrico (NO) nos macrófagos e que o parasita tem a habilidade de resistir ao pH ácido das células onde se desenvolve, multiplicando-se dentro do fagolisossomo (CABRITA et al., 2011).

O sistema imune inato reconhece microrganismos através de um número limitado de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs) que reconhece componentes de microrganismos, conhecidos como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), que são essenciais para a sua sobrevivência

(AKIRA et al., 2006). Além disso, a estratégia adotada pelo protozoário para evadir das respostas imunes protetoras, permanecem desconhecidas (STÄGER et al., 2010).

As células Th1 desempenham um papel importante na proteção contra agentes patogênicos intracelulares, enquanto que as células T helper 2 (Th2), definidas pela sua capacidade de produzir IL-4, mas não IFN- γ , desempenham um papel importante na defesa contra organismos extracelulares (AHUJA et al., 1999). A resposta Th1, com produção predominante de IFN- γ , se associa com resistência em todas as formas de leishmaniose (BARRAL & BARRAL-NETTO, 2009), enquanto que células Th2 causam a exacerbação da doença (NAGILL & KAUR, 2011).

Os macrófagos, as DC's, as citocinas tais como IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral (TNF) são cruciais para a resolução da infecção e para uma imunidade protetora de longa duração. As citocinas derivadas de macrófagos, as quais inibem a morte do parasita, incluem fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e IL- 10 (BOGDAN & RÖLLINGHOFF, 1998). A IL-10 é uma citocina regulatória que pode ser produzida por células T, células B, macrófagos, DC's e células epiteliais (NYLÉN & SACKS, 2007). Ela inibe a função dos macrófagos ativados, incluindo a produção de NO e a expressão de Moléculas do Complexo de Histocompatibilidade (MHC) de classe II (MOORE et al., 2001).

As células mononucleares do sangue periférico de indivíduos assintomáticos ou subclínicos respondem para o antígeno de *Leishmania* com proliferação e produção de IL-2, IFN- γ e IL-12. Os indivíduos que evoluíram para a LV ativa devem-se a uma possível falha na proliferação das células mononucleares do sangue periférico e produção de IFN- γ (WILSON et al., 2005). A indução de imunidade protetora contra a leishmaniose geralmente depende da produção de IL -12. Esta citocina associada a macrófagos conduz uma resposta Th1 CD4+(Cluster de Diferenciação) e induz a produção de IFN- γ por natural killer (NK) e células T. O IFN- γ por sua vez medeia proteção por induzir a expressão de NOS2 (óxido nítrico sintase tipo 2) e a produção de NO. Consequentemente, a neutralização de IL-12 conduz a exacerbação da doença em *L. major* e *L. donovani* (ALEXANDER et al., 1999).

Estudos em humanos e hamsters indicam que a incapacidade para controlar a replicação do parasita na LV pode estar relacionada com uma ineficácia na ativação clássica de macrófagos (OSORIO et al., 2012). A ausência de resposta de

[N5] Comentário: Ver esta sigla

células T tem sido atribuída à incapacidade de células apresentadoras de antígeno em induzir as células T específicas. Essa disfunção é considerada fundamental na progressão da LV, no modelo de hamster, que também poderia desempenhar um papel importante nas doenças humana e canina. Como consequência da ausência de resposta das células T, ocorre a replicação descontrolada do parasita, apesar da produção de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ , e TNF) no fígado, baço e medula óssea de animais, levando a um padrão de doença progressiva neste modelo (MOREIRA et al., 2012).

Ao contrário dos macrófagos de camundongos, os macrófagos de hamsters não produzem NO em resposta a IFN- γ , sendo incapazes de controlarem a replicação parasitária (PEREZ et al., 2006). No entanto, em camundongos ocorre uma forte resposta tipo 1 CD4+ e resposta de células T CD8+ que conduz o controle da infecção principalmente através da regulação positiva de iNOS (óxido nítrico sintase indutível) e geração de NO no baço e no fígado (OSORIO et al., 2012). A característica mais marcante de NOS2 é a sua proeminente regulação através da ativação de citocinas IFN- γ e TNF ou citocinas inibidoras IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Estas afetam fortemente o grau de expressão de NOS2 (BOGDAN et al., 2000).

A susceptibilidade nos camundongos infectados por *L. donovani* está relacionada com a expressão de IL-10 e TGF- β (OSORIO et al., 2012). Nos modelos de camundongos ficou demonstrado que a IL-10 promove a progressão da doença e que a inibição da atividade de IL-10 (IL-10 por meio de bloqueio dos receptores) leva à formação de granulomas e morte do parasita (KUMAR & NYLÉN, 2012).

As citocinas Th2 IL-4 e IL-13 desempenham um papel importante na promoção da doença em alguns modelos experimentais da infecção por *Leishmania*, em alguns estudos foram encontradas aumentadas no soro de alguns pacientes com LV ativa (OSORIO et al., 2012).

O resultado de infecções por *Leishmania* não depende apenas das espécies, mas também da competência imunológica do indivíduo para combater o crescimento do parasita (ALEXANDER et al., 1999).

[N6] Comentário: Rever il 10 e TGF TH1 e Th2 ok consertei

2.2 Diferenças entre sexos e infecções

O dimorfismo sexual nas infecções, incluindo as parasitárias, é notavelmente semelhante, apesar da diversidade de organismos infecciosos (MCCLELLAND & SMITH, 2011).

Existem muitos casos em que os machos e fêmeas diferem na susceptibilidade a infecções e a razão para estas diferenças é multifatorial. Pode ser devido a diferenças induzidas pelos hormônios sexuais e seus efeitos na expressão gênica, bem como no sistema imune. Além disso, também podem ser incluídas às diferenças fisiológicas inatas entre machos e fêmeas (MCCLELLAND & SMITH, 2011). Alguns estudos propõem que diferenças entre sexos nas respostas imunes podem ser devido a diferenças na produção de citocinas. As citocinas dos tipos Th1 e Th2 têm sido implicadas em várias respostas imunes relativas à infecção, alergia e autoimunidade (BOUMAN et al., 2004).

Estudos clínicos e experimentais designados para avaliar diferenças entre sexos na progressão da resposta imune nas infecções, lesões e capacidade de resposta ao tratamento são muito específicas (SCOTLAND et al., 2011). Várias observações in vivo sugerem que os hormônios sexuais podem influenciar monócitos a produzir TNF. Nos machos as endotoxinas estimulam monócitos a produzir mais TNF em comparação com as fêmeas (BOUMAN, 2005).

Estudo com camundongo BALB/c avaliou-se a relação entre o ciclo estral e resistência do hospedeiro com *Paracoccidioides brasiliensis* mostrou que o estrógeno em todos os grupos de fêmeas apresentou maior remoção das células de levedura do que o grupo do sexo masculino (SANO et al., 1992).

Em outro estudo com camundongo C57Bl / 6 foram comparados os níveis de anticorpos no soro em macho e fêmea durante o desafio de infecção com *Giardia muris*. As fêmeas tiveram mais anticorpos anti-parasitas do que os machos (DANIELS & BELOSEVIC, 1994).

A incidência e gravidade das infecções parasitárias naturais são diferentes entre machos e fêmeas de muitas espécies, incluindo os seres humanos (ROBERTS & WALKER, 2001).

2.3 Diferenças entre sexos nas Leishmanioses

A maioria das doenças parasitárias, incluindo leishmaniose, geralmente resultam em doença mais grave em machos comparado com fêmeas (ROBERTS & WALKER, 2001). Especula-se que isso se deva a ações de diferentes hormônios sexuais e outros esteróides, que modulam vários aspectos na imunidade do hospedeiro (KLEIN, 2000).

O sexo pode influenciar na resolução da infecção por *Leishmania* (SATOSKAR et al., 1998). Respostas da imunidade inata, respostas mediadas por anticorpos e respostas celulares normalmente são maiores em mulheres que homens (KLEIN, 2004).

A susceptibilidade às infecções nos animais depende de vários fatores, incluindo gênero e a idade do hospedeiro (SINGH et al., 2007). Os estudos epidemiológicos com LC indicam ser mais frequente em machos. Não está claro se esta diferença é devido apenas a riscos diferentes quanto a exposição ao patógeno, devido às distintas atividades de machos e fêmeas ou se estão relacionadas com a resposta imune do hospedeiro quanto a resistência e susceptibilidade à infecção (TRAVI et al., 2002).

No entanto, sob condições controladas de laboratório, uma clara dicotomia na susceptibilidade de machos e fêmeas também pode ser observada. Em humanos, os níveis de hormônios sexuais, não só variam entre homens e mulheres, mas também alteram com a idade (ROBERTS & WALKER, 2001). Considerando que os estrógenos podem modular várias respostas pró-inflamatórias, muitos aspectos das diferenças de sexo em respostas inflamatórias agudas permanecem indefinidos (SCOTLAND et al., 2011).

Hamsters machos infectados com *L. donovani* também são mais susceptíveis à doença e têm maior carga parasitária do que os homólogos fêmeas (ANURADHA et al., 1990).

Estudo experimental que utilizou hamster de mesma idade machos e fêmeas, foi demonstrado que os machos foram mais susceptíveis à infecção com *Leishmania viannia spp.* do que as fêmeas (TRAVI et al., 2002). Em outro estudo com camundongos DBA/2 infectados com *L. mexicana* observou-se que os machos foram mais susceptíveis à infecção, desenvolveram lesões maiores que não

cicatrizaram, enquanto que as fêmeas não produziram lesões ou pequenas lesões que cicatrizaram (SATOSKAR & ALEXANDER, 1995).

Estudos em roedores em ambiente laboratorial controlado, no entanto, revelam que diferenças sexuais estão presentes e podem ser mediadas por interações endócrinas e imunes (KLEIN, 2004).

2.4 Hormônios sexuais e regulação da resposta Imune

Evidência sugere que o eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal (HPG) pode também modular a função imune (TANRIVERDI et al., 2003).

Os estrógenos são hormônios esteróides derivados da molécula do colesterol, produzidos principalmente pelas células ovarianas da teca e granulosa. Seus representantes são o estriol (E_3), a estrona (E_1) e o estradiol (E_2), sendo o último o principal estrogênio ovariano sintetizado e de maior ação fisiológica (LAZZARETTI et al., 2008).

Os hormônios sexuais, tais como o estradiol, testosterona e progesterona têm mostrado, modular as respostas imunitárias, o que pode resultar na diferença da resolução na doença entre os machos e as fêmeas (SNIDER, et al., 2009).

Testosterona e estradiol exercem uma influência reguladora na citotoxicidade e na migração de células NK e modificam a resposta do hospedeiro contra patógenos (WRONA, 2006). A testosterona pode aumentar a apoptose em células T (BOUMAN, 2005).

O estrogênio pode atuar em vários processos imunes, incluindo desenvolvimento de linfócitos e monócitos, na função de DC's, respostas de células T, regulação de citocinas, proliferação e a sobrevivência de células B, no desenvolvimento da resposta de anticorpos e atividade de células NK (LANG, 2004). Nas células maduras do sistema imune há expressão dos receptores de estrogênio e receptores de androgênio, sugerindo que os hormônios sexuais esteróides influenciam diretamente o desenvolvimento e a função das células dos sistemas imunes inatos e adaptativos (TAUB, 2008).

O estradiol e a progesterona afetam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos, resultando em alterações nas contagens de células circulantes e efeitos sobre a ativação celular (PENNELL et al., 2012). Podem também agir modulando aspectos da apresentação de antígenos (PEREZ et, 2009).

O estradiol tem sido mencionado por modular a função de macrófagos. O estradiol e seus derivados sintéticos aumentam a atividade fagocítica e modulam a expressão de iNOS e citocinas em macrófagos (YOU, et al., 2003). A geração de espécies reativas de oxigênio é um fator pró-inflamatório importante evolutivamente conservado para controlar a infecção (STRAUB, 2007).

O estrogênio é conhecido por alterar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) modulando a liberação de ambos os peptídeos hipotalâmicos e da pituitária, tais como a prolactina (PRL) e hormônio do crescimento (GH) que por sua vez pode modificar respostas imunes e a secreção de citocinas (PFEILSCHIFTER et al., 2002).

Há evidências que os hormônios testosterona e progesterona são imunossupressores, reduzem a atividade de células NK, prejudicam macrófagos na produção de TNF e NO. No entanto, a capacidade do estradiol para conduzir uma resposta pró-inflamatória, associada a Th1 e de testosterona para inibir essa resposta imune ajuda a explicar por que as mulheres têm uma maior incidência de doenças auto-imunes e uma menor incidência de infecções parasitárias (SNIDER et al., 2009).

O mecanismo pelo qual o esteroide liga-se aos receptores de membrana, tal como descrito para o estrógeno e testosterona, afetam a função das células imunes permanece obscuro (BOUMAN, 2005).

O estrógeno promove a ativação de célula B, através da estimulação de citocinas Th2 tais como, IL-4 e IL-6 (VERTHELYI, 2001). Várias condições patológicas e fisiológicas podem alterar os níveis de estrógenos no soro (CUTOLO & LAHITA, 2005). Os estrógenos têm ação antiinflamatória ou pró-inflamatória, dependendo dos fatores que influenciam (STRAUB, 2007).

O envelhecimento altera o sistema endócrino e imune, aumentando a susceptibilidade às doenças infecciosas (GIEFING-KRÖLL et al., 2015). A regulação dos hormônios sexuais no sistema imunitário varia com o envelhecimento; por exemplo, a expressão de IL-6 está sob o controle de hormônios sexuais como o estrógeno e testosterona (WEBSTER et al., 2002). Aspectos funcionais das diferenças específicas da idade e do sexo relacionadas ao sistema imune e sua interação com a mudança dos níveis de hormônio esteróide sexual não foram investigados extensivamente (GIEFING-KRÖLL et al., 2015).

Vários estudos clínicos e experimentais demonstram efeitos significativos de hormônios sexuais sobre respostas imunes mediadas por células (ANGELE et al., 2014).

A determinação de diferenças entre os sexos nas respostas às infecções é de fundamental importância na escolha da melhor abordagem terapêutica para o tratamento das enfermidades, incluindo as leishmanioses. Neste estudo, descrevemos, pela primeira vez, diferenças entre machos e fêmeas durante a LV experimental causada pela *L. Infantum*. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar melhor os mecanismos envolvidos nas diferenças observadas.

3 HIPÓTESE

Existem diferenças do perfil bioquímico entre hamsters machos e fêmeas na Leishmaniose visceral experimental por *L. infantum*.

OBJETIVO GERAL:

Determinar se existem diferenças entre hamsters machos e fêmeas infectados com *L. infantum*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Comparar machos e fêmeas em relação a tamanho de baço e fígado.

Determinar se existem diferenças em relação à carga parasitária entre machos e fêmeas.

Avaliar se as alterações histológicas causadas pela infecção, no baço e fígado, são similares entre hamsters machos e fêmeas.

Avaliar as concentrações séricas de glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e albumina entre os animais machos e fêmeas.

Investigar se as alterações bioquímicas das concentrações séricas provocadas pela infecção são similares entre os animais machos e fêmeas.

Detectar se a infecção dos hamsters com *L. infantum* causa alterações nas concentrações séricas de estradiol e se estas são as mesmas em machos e fêmeas.

DIFERENÇAS ENTRE MACHOS E FÊMEAS DA CARGA PARASITÁRIA E DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DURANTE A LEISHMANIOSE VISCERAL EXPERIMENTAL

MARINHO, A.I.L.¹, SOUSA, A.D.¹, PASSOS, F.C.¹, BRITO, E. N.¹, SOUZA, M. S.¹, BARRAL, A. P.², BACCAN, G.C.¹

RESUMO

Nas infecções parasitárias alguns fatores estão associados com a susceptibilidade do hospedeiro, dentre eles o sexo, a idade, condição genética, fatores ambientais e o estado imunológico. Diferenças entre os sexos são observadas em diversas infecções. Acredita-se que isto ocorra devido a ações de hormônios sexuais, podendo afetar os diferentes tipos de resposta imune. A Leishmaniose é um grave problema de saúde pública apresentando aumento da prevalência e afetando grande parte da população mundial. No Brasil é endêmica e o Nordeste é a região mais afetada. A forma visceral é a mais grave podendo levar o indivíduo a óbito se não tratada. Objetivamos determinar se existe diferença entre sexos no modelo experimental de LV. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas foram infectados com *L. infantum/chagasi* através da injeção intradérmica e comparados com animais controles, após 5 meses de infecção. Após eutanásia sangue, baço e fígado foram coletados para as análises de carga parasitária, histológicas e de parâmetros bioquímicos. As fêmeas infectadas apresentaram um maior tamanho de baço que os machos infectados. Porém, foram os machos que apresentaram maior carga parasitária. As alterações bioquímicas foram maiores nas fêmeas, podendo estar relacionadas às alterações histológicas observadas no fígado das mesmas. As fêmeas infectadas apresentaram concentrações séricas inferiores de estradiol quando comparadas com fêmeas não infectadas. Essa redução não foi detectada nos machos. Nossos resultados indicam que existem diferenças entre sexos na LV experimental. A determinação de diferenças entre os sexos nas respostas às infecções é de fundamental importância na escolha da melhor abordagem terapêutica para o tratamento das enfermidades, incluindo as leishmanioses.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral. *L. infantum*. Hamster. Sexo

4.1 Introdução

Diferenças entre os sexos afetam as respostas imune inata e adaptativa contribuindo na patogênese das doenças infecciosas em machos e fêmeas (PENNELL et al., 2012). Ainda não está claro, se esta diferença deve-se apenas a riscos diferentes de exposição, devido às distintas atividades de machos e fêmeas ou se diferenças entre gêneros na resposta imune do hospedeiro desempenham um papel na resistência e susceptibilidade à infecção (TRAVI et al., 2002). Essas diferenças também são observadas em doenças parasitárias, incluindo a leishmaniose (ROBERTS & WALKER, 2001).

As leishmanioses são infecções causadas pelos tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos através da picada do flebótomo infectado (MELBY et al., 1998). A Leishmaniose visceral (LV) é causada por um protozoário heteroxênico, intracelular obrigatório, que infecta as células do sistema fagocítico mononuclear de diversas espécies animais (ALVARENGA et al., 2010). *L. donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e *L. chagasi* no Novo Mundo. Com nome e origem geográfica diferentes, dados moleculares sugerem que *L. infantum* e *L. chagasi* podem ser uma mesma espécie (WILSON et al., 2005). No Brasil, a *Leishmania infantum/chagasi* é a etiologia mais comum da LV, sendo transmitida por um vetor da espécie *Lutzomyia longipalpis* (ALVARENGA et al., 2010). Esta enfermidade é caracterizada por febre progressiva, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e pancitopenia (BERN et al., 2008).

Ainda não se sabe se existem diferenças entre sexos na LV transmitida por *L. infantum*. A dificuldade de encontrar diferenças entre sexos em estudos epidemiológicos se deve provavelmente à inclusão de pacientes em diferentes fases da doença. Estas discrepâncias são suplantadas em estudos com modelos experimentais, principalmente utilizam-se roedores.

Neste estudo, usamos como modelo experimental hamsters infectados com *L. infantum*, por que mimetiza características clínicas patológicas na doença humana ativa (ASLAN et al., 2013). Avaliamos diferenças entre sexos na fase aguda da infecção e encontramos importantes diferenças entre machos e fêmeas nesse modelo experimental de LV.

4.2 Material e Métodos

Animais

Foram utilizados hamster (*Mesocricetus auratus*), obtidos do biotério da Faculdade de Medicina Veterinária –UFBA. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências da Saúde (CEUA-ICS) conforme protocolo nº 034/2012.

Os animais foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz. Após a infecção, foram realizadas semanalmente as medidas de peso dos animais.

Cultura de *Leishmania infantum*

Formas promastigotas de *L. infantum*, (MHOM/BROO/Ba262) foram obtidas pelo cultivo em meio Schneider's (Schneider insect medium, Sigma Chemical Co. St Louis, Missouri, USA) suplementado com 20% de soro bovino fetal inativado, L-glutamina (2mM), penicilina (100U/ml), estreptomicina (100µg/ml), até a fase estacionária a 23°C.

Infecção

Para a infecção experimental, utilizamos promastigotas estacionárias de *L. infantum*. Os parasitas foram obtidos na fase estacionária sendo lavados três vezes com salina a 3000 rpm por 10 minutos e foram ajustados para uma concentração de 5×10^5 /ml. Os parasitas foram lavados com salina por 4 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi lavado com salina por 10 minutos a 4°C.

Os hamsters foram infectados com 5×10^5 promastigotas (20 µl) de *L. infantum* (MHOM/BR00/Ba262), por inoculação intradérmica na orelha direita.

Estimativa da carga parasitária

A carga parasitária foi realizada por meio da técnica modificada de diluição limitante (HONDOWICZ & SCOTT, 2002). O baço e o fígado foram removidos após a eutanásia dos animais e pesados separadamente, os fragmentos de 0,2mg dos órgãos foram macerados assepticamente em um separador de célula 40 µm apoiada numa placa de Petri contendo 1 ml de meio Schneider completo LGC suplementado

com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de estreptomicina (Gibco). Foram feitas diluições seriadas das células e estas foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo meio Schneider completo. As placas foram incubadas a 24° C por 7 dias e analisadas em microscópio invertido para verificação do aparecimento de formas promastigotas de *L. infantum*. A carga parasitária foi estimada com base na concentração dos parasitas vivos no poço de maior diluição.

Parâmetros Bioquímicos

Foram mensuradas no soro, em todos os grupos experimentais, glicose, triglicérides, colesterol total, HDL, LDL, VLDL e albumina. A coleta do sangue foi realizada posteriormente à eutanásia por decapitação após 5 meses de infecção experimental. O soro foi separado do sangue por centrifugação. As concentrações foram determinadas usando Kits comerciais para humanos (Kit Bioclin, Santa Branca, MG, Brasil) usando metodologia enzimática e colorimétrica.

Histopatologia

Fragmentos de baço e fígado foram coletados após a eutanásia e preservados em formol a 10%. Após desidratação, foram incorporados em parafina para a rotina de diagnóstico histopatológico. Secções de fragmentos de tecido, 5 µm de espessura, foram obtidos e corados com hematoxilina-eosina sendo avaliadas por microscopia óptica.

Determinação hormonal

O hormônio estradiol foi quantificado através da técnica de quimioluminescência utilizando-se kits comerciais (ACCESS, Beckman Coulter).

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o GraphPad Prism software, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc, 2007). Nas comparações entre apenas dois grupos, foi empregado o teste de Mann-Whitney e nas análises de vários grupos, foi utilizado teste de ANOVA, com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

4.3 Resultados

Peso corporal, peso dos órgãos (fígado e baço) e carga parasitária

O peso corporal foi avaliado semanalmente durante o período de 5 meses pós infecção experimental, neste período não foram evidenciados sinais clínicos. Os animais dos grupos controles e infectados de ambos os sexos não apresentaram diferença estatística significativa em relação à evolução do peso corporal (Fig.1A e 1B). Em relação ao peso corporal no momento da eutanásia os animais machos e fêmeas (Fig.1C) e os grupos controles e infectados (Fig.1D) não apresentaram diferença estatística significativa.

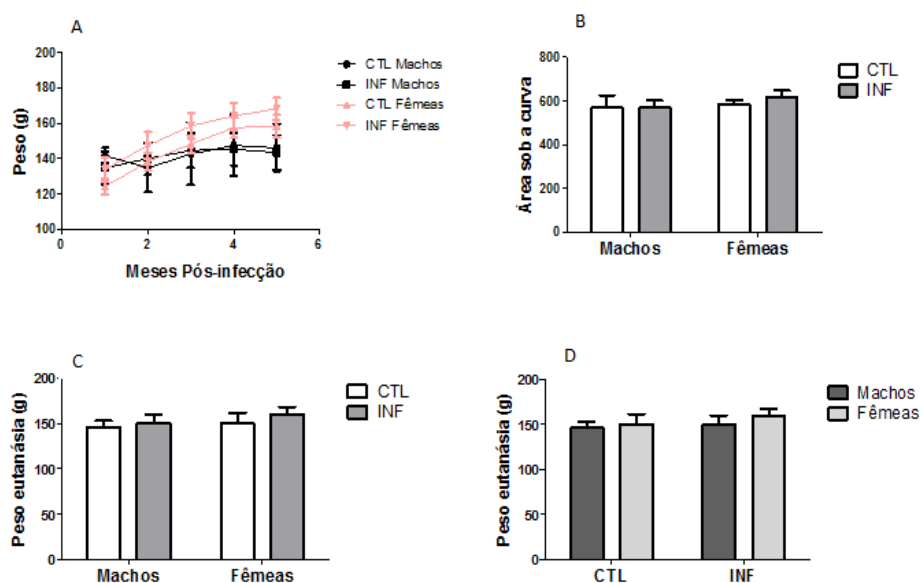


Figura 1. Evolução do peso corporal dos animais. Peso corporal (g) dos animais durante os 5 meses de infecção (A). Área sob a curva dos animais machos e fêmeas (B). Peso dos animais de ambos os sexos controles (CTL) e infectados (INF) no momento da eutanásia (C e D). Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Em relação ao peso dos órgãos, retirados e pesados imediatamente após a eutanásia, não foi observada diferença estatística significativa entre o peso do fígado dos animais (Fig. 2A). O peso do baço das fêmeas infectadas apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (Fig. 2B).

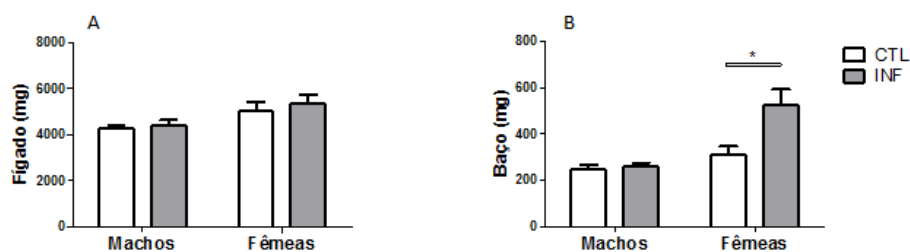


Figura 2. Peso dos órgãos. Peso do fígado (A) e do baço (B) dos animais de ambos os sexos controles (CTL) e infectados (INF) com *L. infantum*. O peso do fígado (mg) e do baço (mg) foram obtidos após a eutanásia. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

A carga parasitária do fígado e do baço foi realizada para verificação da presença das formas promastigotas de *L. infantum*, avaliada desde o terceiro até o sétimo dia de cultura, analisadas em microscópio invertido. Não houve diferença estatisticamente significativa da carga parasitária no fígado entre machos e fêmeas (Fig.3A). No entanto o baço dos machos apresentou carga parasitária significativamente maior que no baço das fêmeas (Fig.3B).

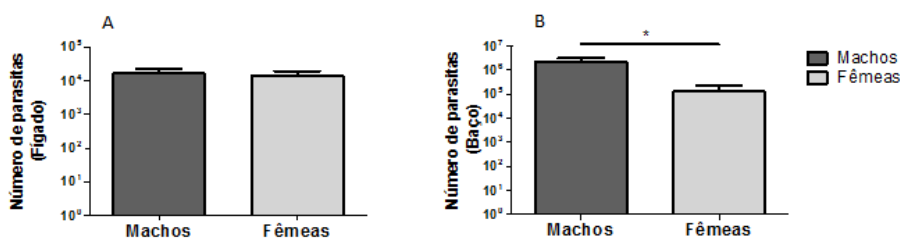


Figura 3. Avaliação da carga parasitária. A carga parasitária no fígado (A) e no baço (B) de hamsters infectados com 5×10^5 promastigotas de *L. infantum* dos animais machos e fêmeas, foram quantificadas por meio da técnica de diluição limitante. A carga foi estimada com base na concentração dos parasitas vivos no poço de maior diluição. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

Análise de parâmetros bioquímicos

Não houve diferença estaticamente significativa nos níveis de glicose sérica entre os animais controles e infectados de ambos os sexos (Fig.4A). No entanto em relação aos níveis de albumina sérica as fêmeas infectadas apresentaram níveis significativamente menores quando comparadas com as fêmeas controles (Fig.4B).

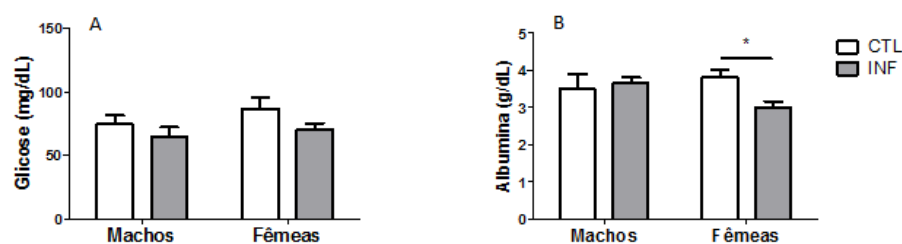


Figura 4. Dosagem de Glicose e Albumina sérica. Dosagem de glicose sérica (A) e de albumina sérica (B) dos animais controles (CTL) e infectados (INF) de ambos os sexos, realizadas utilizando kits comerciais para humanos por metodologia enzimática e colorimétrica. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

As concentrações de colesterol total, triglicerídeos, LDL, HDL e VLDL foram dosados no soro dos animais. Os níveis de colesterol total das fêmeas infectadas apresentaram níveis significativamente menores quando comparadas com as fêmeas controles (Fig. 5A), ocorrendo o mesmo com os níveis de LDL (Fig.5C). No entanto não houve diferença estatística significativa nos níveis de triglicerídeos, HDL e VLDL (Fig.5B, 5D e 5E, respectivamente) dos grupos avaliados.

Aspectos histológicos

A análise histológica do fígado e do baço foi realizada para avaliar alterações morfológicas nos hepatócitos e nos esplenócitos dos hamster. Nos hepatócitos dos animais infectados de ambos os sexos se observou a presença de infiltrados inflamatórios (Fig.6). Em relação aos esplenócitos dos animais infectados tanto dos machos quanto das fêmeas apresentaram desorganização histológica (Fig.7).

Determinação hormonal

As concentrações de estradiol foram dosadas no soro dos animais. Os níveis de estradiol das fêmeas infectadas apresentaram-se significativamente menores quando comparadas com os níveis das fêmeas controles (Fig. 8).

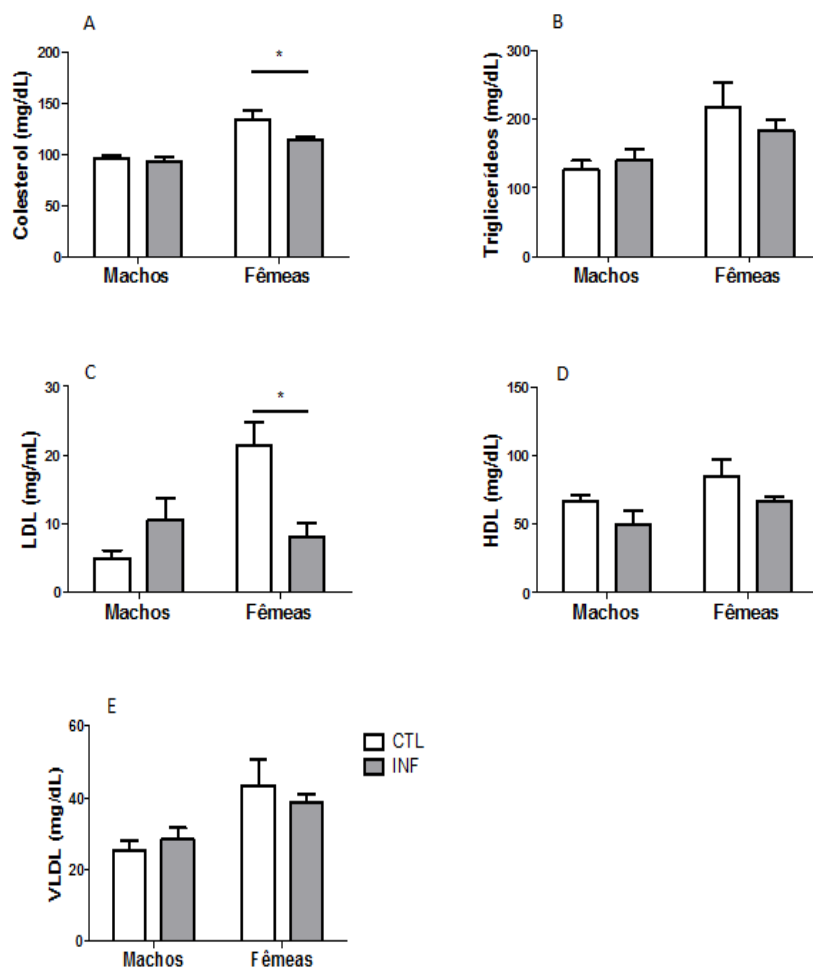


Figura 5. Dosagem sérica de colesterol total, triglicérides, LDL, HDL e VLDL. Níveis de colesterol total (A), triglicérides (B), LDL (C), HDL (D) e VLDL (E) dos animais controles (CTL) e infectados (INF), de ambos os sexos, dosados com a utilização de kits comerciais para humanos por metodologia enzimática e colorimétrica. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

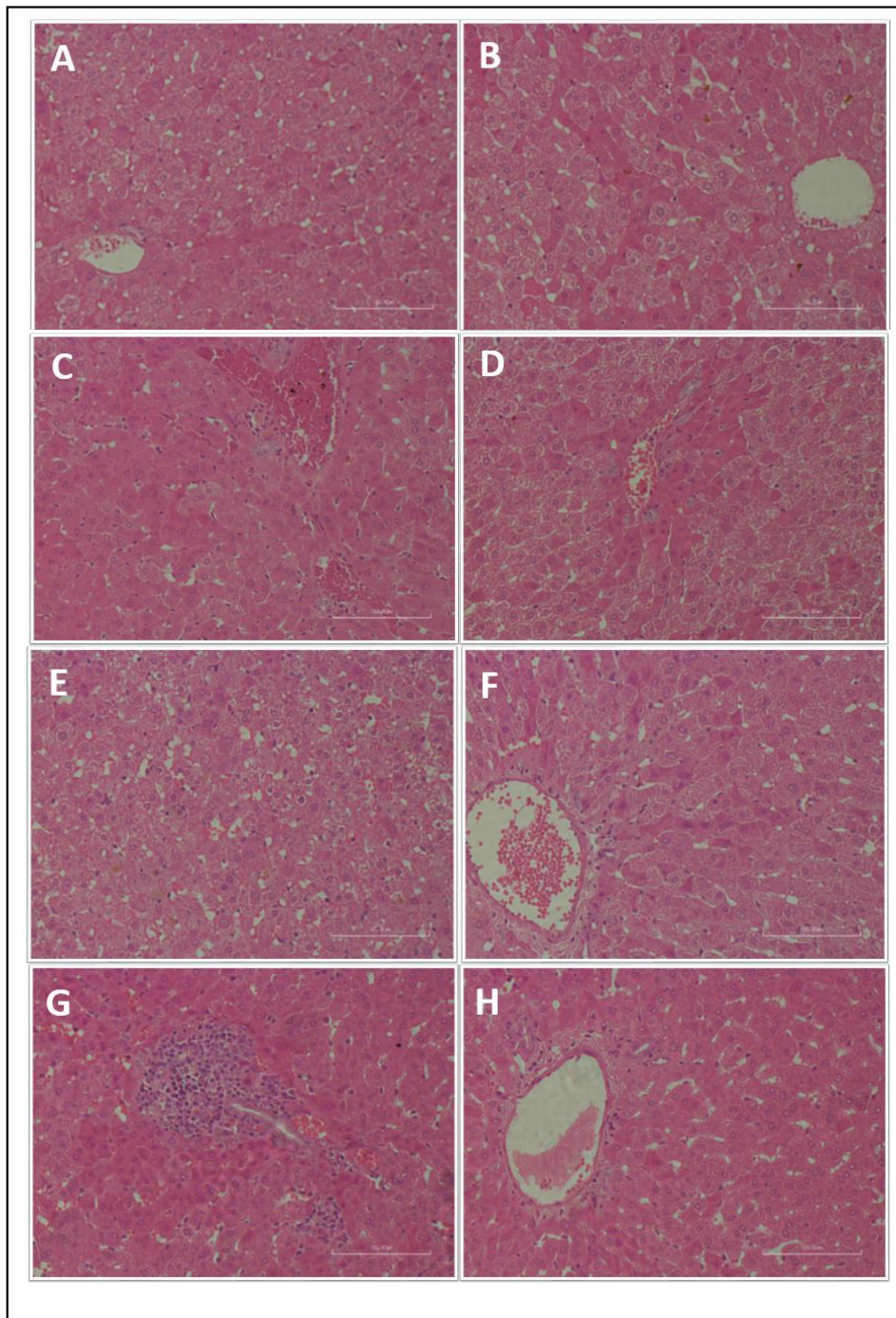


Figura 6. Aspectos histológicos do fígado. Secções do fígado dos animais machos (A e B) e fêmeas (E e F) grupo controle, e dos animais machos (C e D) e fêmeas (G e H) grupo infectados, corados com hematoxilina-eosina. Aumento 20X.

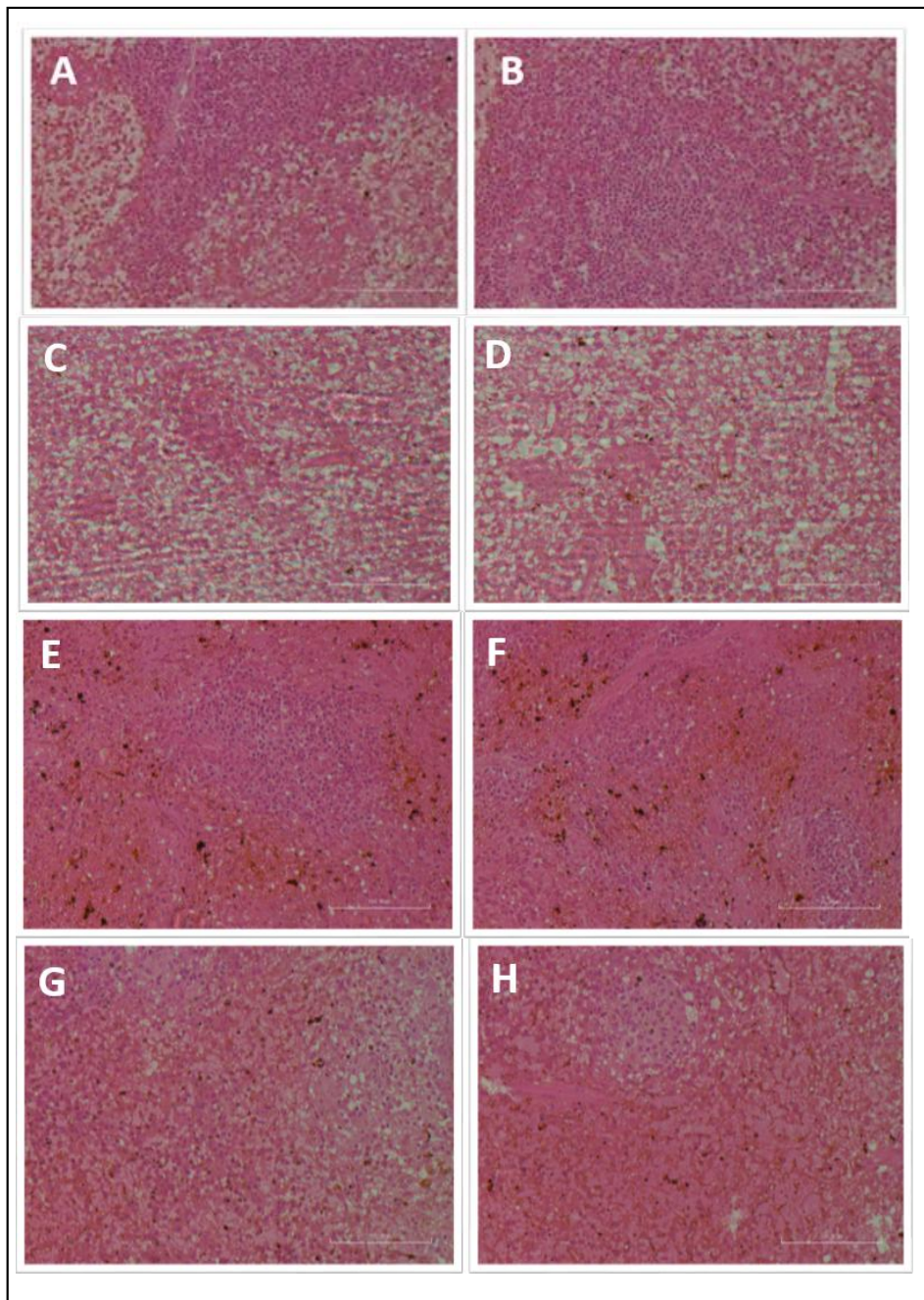


Figura 7. Aspectos histológicos do baço. Secções do baço dos animais machos (A e B) e fêmeas (E e F) grupo controle, e dos animais machos (C e D) e fêmeas (G e H) grupo infectados, corados com hematoxilina-eosina. Aumento 20X.

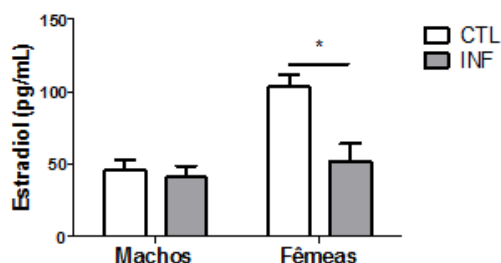


Figura 8. Dosagem de Estradiol. O estradiol dos animais de ambos os sexos controles (CTL) e infectados (INF) foi dosado através da técnica de quimioluminescência. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média. Os grupos foram comparados pelo teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

4.4 Discussão

Embora diversos estudos epidemiológicos e experimentais indiquem importantes diferenças entre sexos durante infecções, ainda não está claro se essas distinções ocorrem durante a LV. Neste estudo, foram comparados hamsters machos e fêmeas experimentalmente infectados com *L. infantum*, principal espécie que causa LV no Brasil. Os resultados indicam que mesmo controlando melhor a infecção, as fêmeas apresentam algumas alterações nos padrões bioquímicos.

O hamster é considerado um modelo experimental importante, devido à sua susceptibilidade à infecção por diferentes espécies de *Leishmania* e do desenvolvimento de sinais clínicos e patológicos semelhantes aos observados na doença humana e canina (MOREIRA et al., 2012). Muitas vezes revelam vários sinais clínicos da progressão da LV como, hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia, caquexia e imunodepressão (NIETO et al., 2011). Uma vez que, o resultado da infecção experimental é dependente do número de parasitas inoculados e da rota de inoculação (GOMES, 2008; NIETO, 2011; ROLÃO, 2004), as diferenças entre nossos resultados e os descritos na literatura podem ser devido ao baixo número de parasitas inoculados (5×10^5) ou ao período de tempo em que os animais foram avaliados (5 meses). A rota da infecção utilizada foi a intradérmica, porque é a que mais se assemelha à infecção natural (AHMED et al.,

2003). Outro estudo com hamsters machos infectados com *L. infantum* através da injeção cardíaca foi evidenciado esplenomegalia acentuada em todos os animais infectados, independentemente da dose administrada, no período de 155 dias pós-infecção (DEA-AYUELA et al., 2007).

Os animais desenvolveram-se normalmente após a Infecção intradérmica com *leishmania*, não apresentando reduções no peso corporal, como era o esperado, visto que outros autores utilizando o mesmo modelo experimental descrevem tais alterações. Serafim e col., em estudo com camundongos infectados com *L. chagasi*, não detectaram diferenças no peso dos animais, que foram avaliados até 28 dias pós-infecção (SERAFIM et al., 2010). No entanto, estudo com hamsters inoculados com *L. donovani*, foi observado diferenças dos mecanismos efetores da doença quando comparados aos camundongos. Os hamsters que tiveram o peso avaliado (para análise da evolução clínica patológica), após 56 dias da inoculação foram observados que os animais infectados perderam 18% do seu peso corporal em relação aos controles (MELBY et al., 2001).

Em relação ao peso do baço e do fígado dos animais, nossos resultados assemelham-se aos encontrados na literatura. Em hamsters infectados com *L. infantum* foi observado que o peso do fígado não apresentou diferença entre os grupos infectados e controles. Um aumento significativo foi observado no peso do fígado dos animais infectados por *L. donovani* (ASLAN et al., 2013). Isso pode ter ocorrido porque os parasitas replicam-se no fígado, baço e medula óssea. E eventualmente, causam a morte do hospedeiro (WILSON et al., 2005). No entanto, estudo realizado em camundongos demonstrou a diferença no curso da infecção do fígado e do baço sugerindo a importância da interação dos macrófagos e ou linfócitos no local específico na progressão da *L. infantum* (SULAHIAN et al., 1997).

Nos modelos experimentais de leishmanioses, utilizando-se camundongos ou hamsters, os estudos mostram que camundongos machos BALB/c e DBA/2 são mais susceptíveis que fêmeas para infecção sistêmica com *L. major* (SATOSKAR et al., 1998). Em outro estudo foi avaliado a influência do sexo na LC, foi observado que a infecção cutânea de hamsters com *L. (V.) panamensis* ou *L. (V.) guyanensis* os machos apresentaram maior tamanho da lesão e gravidade, um aumento da taxa de disseminação para locais distantes das lesões cutâneas e uma maior carga parasitária no linfonodo drenante ocorreu nas fêmeas (TRAVI et al., 2002). No modelo de LV de hamsters machos infectados com *L. donovani*, demonstrou que

esses animais são mais susceptíveis à doença e têm maior carga parasitária do que os homólogos fêmeas (ANURADHA et al., 1990).

O aumento do parasitismo esplênico e hepático foi demonstrado em um estudo que utilizou hamster experimentalmente infectado por *L. infantum* através da injeção intraperitoneal após 32 semanas de infecção com as formas infecciosas amastigotas e promastigotas a carga parasitária aumentou com o tempo de infecção (RIÇA-CAPELA et al., 2003).

Os hamsters infectados apresentaram alterações histopatológicas no fígado e baço e essas são mais significativas nas fêmeas. As alterações observadas foram infiltrado inflamatório no fígado, e no baço uma desorganização histológica. As alterações patológicas significativas nos hepatócitos consistem em ruptura do sistema de endomembranas, alterações do compartimento peroxissomal e mudanças na distribuição de glicogênio hepático, tais alterações ocorrem na infecção crônica de hamsters infectados com *L. donovani* (VIANNA et al., 2002). Outras alterações histopatológicas foram evidenciadas em estudo com hamster infectados com *L. infantum* após 32 semanas de infecção. A hipoplasia revelada na polpa branca do baço e do fígado mostrou uma infiltração de células inflamatórias periportal e pequenos granulomas (RIÇA-CAPELA et al., 2003). Em camundongos o fígado é o local de infecção aguda e de resolução, enquanto que a infecção crônica se estabelece no baço e na medula óssea (FALEIRO et al., 2014).

As fêmeas apresentaram alterações histológicas do fígado mais acentuadas, isto podem estar relacionadas com as alterações bioquímicas encontradas. Os dados obtidos são semelhantes aos descritos na literatura. Alguns autores têm relatado alterações nas concentrações plasmáticas e composição de lipídios e lipoproteínas, como a hipertrigliceridemia, sendo também associadas com a diminuição do HDL e os níveis do colesterol (SEÇMEER et al., 2006). Uma vez que as lipoproteínas plasmáticas são veículos lipídicos, pode-se esperar que a interação de proteínas de fase aguda com lipoproteínas poderia ter consequências metabólicas importantes durante a doença aguda. Diversos estudos relataram variação na composição de lipídios em condições que possam promover uma resposta de fase aguda, tais como infecções microbiana e parasitária (ERDEVE et al., 2004). Seçmeer e col., avaliaram o perfil lipídico plasmático de crianças com LV e observaram concentrações de HDL no plasma, antes do tratamento, significativamente baixas, enquanto que os níveis plasmáticos de triglicérides estavam significativamente aumentados (SEÇMEER et

al., 2006). Outro relato de caso de um paciente do sexo masculino, de 36 anos de idade, com LV que apresentava marcada hipocolesterolemia, leve hipertrigliceridemia, níveis séricos de HDL e LDL severamente diminuídos (LIBEROPOULOS et al., 2002). Em outro estudo, realizado no Brasil em pacientes com LV aguda, foram encontrados níveis elevados de triglicérides e VLDL e níveis diminuídos de colesterol total, LDL e HDL (SOARES et al., 2010). Sendo que, a hipertrigliceridemia em LV pode ser causada por atividade da lipoproteína lipase hepática diminuída, resultando em retardamento da lipoproteína de muito baixa densidade a VLDL (ERDEVE et al., 2004). Sequestro e ou degradação de lipoproteínas podem ocorrer no baço e no fígado aumentados. Na leishmaniose, a ligação entre o HDL e o parasita, pode refletir sequestro de HDL nos tecidos onde o parasita se acumula. Um dos mediadores responsável pela atividade prejudicada da lipase é o TNF, que é elevado em infecções crônicas parasitárias (LIBEROPOULOS et al., 2002).

As diferenças entre machos e fêmeas observadas na carga parasitária, tamanho do baço, histologia e em parâmetros bioquímicos pode ser decorrente da ação de hormônios esteroides, como a testosterona e o estradiol, entre outros, no desenvolvimento do sistema imunológico e em suas respostas efetoras. Neste estudo, foi detectada uma diminuição nos níveis de estradiol nas fêmeas infectadas, que poderia estar relacionada com as alterações descritas acima. O estradiol apresenta importantes ações imunorregulatórias e níveis elevados deste hormônio estão relacionados a uma maior lesão e a dose de antimoniato de N-metilglucamina necessária no tratamento de pacientes com LCL (BACCAN et al., 2011).

A determinação de diferenças entre os sexos nas respostas às infecções é de fundamental importância na escolha da melhor abordagem terapêutica para o tratamento das enfermidades, incluindo as leishmanioses. Neste estudo, descrevemos, pela primeira vez, diferenças entre machos e fêmeas durante a LV experimental causada pela *L. Infantum*. Entretanto, novos estudos são necessários para avaliar melhor os mecanismos envolvidos nas diferenças observadas.

4.5 Referências

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intra dermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis.

Infection and Immunity, v. 71, n. 1, p. 401–410, 2003.

ANURADHA, PAL R, KATIYAR JC. Sex-influenced population kinetics of *Leishmania donovani* in hamsters. **Indian J Exp Biol** 28:876–879,1990.

ALVARENGA, D. G. De; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V. Da; MONREAL, M. T. F. D. [Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality]. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194–197, 2010.

ASLAN, H.; DEY, R.; MENESES, C.; CASTROVINCI, P.; JERONIMO, S. M. B.; OLIVA, G.; FISCHER, L.; DUNCAN, R. C.; NAKHASI, H. L.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1328–1338, 2013.

BACCAN, G. C.; OLIVEIRA, F.; SOUSA, A. D.; CERQUEIRA, N. A.; COSTA, J. M. L.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Hormone levels are associated with clinical markers and cytokine levels in human localized cutaneous leishmaniasis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 3, p. 548–554, 2011.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, 2008.

DEA-AYUELA, M. a.; RAMA-ÍÑIGUEZ, S.; ALUNDA, J. M.; BOLÁS-FERNANDEZ, F. Setting New Immunobiological Parameters in the Hamster Model of Visceral Leishmaniasis for In Vivo Testing of Antileishmanial Compounds. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 6, p. 703–717, 2007.

ERDEVE, O.; DALLAR, Y.; SIKLAR, Z. Is hypertriglyceridaemia a new concept for visceral leishmaniasis? **Annals of tropical paediatrics**, v. 24, n. 4, p. 369, 2004.

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014. ,

GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M. J.; SILVA, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; MIRANDA, J. C.; ELNAIEM, D.-E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G.; BRODSKY, C. I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 22, p. 7845–7850, 2008.

HONDOVICZ, B.; SCOTT, P. Influence of Parasite Load on the Ability of Type 1 T Cells To Control *Leishmania major* Infection. v. 70, n. 2, p. 498–503, 2002.

LIBEROPOULOS, E.; ALEXANDRIDIS, G.; BAIRAKTARI, E.; ELISAF, M. Severe hypocholesterolemia with reduced serum Lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 32, n. 3, p. 305–308, 2002.

MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of immunology**, v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 2001.

MELBY, P. C.; YANG, Y.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional Differences in the Cellular Immune Response to Experimental Cutaneous or Visceral Infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 18–27, 1998.

MOREIRA, N. D. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M. D. A.; KER, H. G.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. a.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

PENNELL, L. M.; GALLIGAN, C. L.; FISH, E. N. Sex affects immunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2-3, p. J282–J291, 2012.

RIÇA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M. C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology research**, v. 89, n. 3, p. 163–169, 2003.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 476–488, 2001.

ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 123–126, 2004.

SATOSKAR, A.; AL-QUASSI, H. H. K.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN- γ production by female but not male DBA/2 mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, n. 2, p. 159–166, 1998.

SEÇMEER, G.; CENGİZ, A. B.; M.; GURGEY, A.; KARA, A.; CULTU, O.; TAVIL, B.; DEVRİM, I. Hypertriglyceridemia and Decreased High-density Lipoprotein Could be a Clue for Visceral Leishmaniasis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 14, n. 6, p. 401–402, 2006.

SERAFIM, T. D.; MALAFAIA, G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; REZENDE, S. A. Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 811–817, 2010.

SOARES, N. M.; LEAL, T. F.; FIÚZA, M. C.; REIS, E. A. G.; SOUZA, M. A. L. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on Leishmania -infected macrophages. **Parasite Immunology** n. 32, p. 259–266, 2010.

SULAHIAN, A.; GARIN, Y. J. F.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; DEROUIN, F. Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of Leishmania infantum from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 131–138, 1997.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. G. Gender Is a Major Determinant of the Clinical Evolution and Immune Response in Hamsters Infected with Leishmania spp. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

VIANNA, V.; TAKIYA, C.; DE BRITO-GITIRANA, L. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with Leishmania donovani. **Parasitology Research**, v. 88, n. 9, p. 829–836, 2002.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

5 REFERÊNCIAS

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intra-dermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 401–410, 2003.

AHUJA, S. S.; REDDICK, R. L.; SATO, N.; MONTALBO, E.; KOSTECKI, V.; ZHAO, W.; DOLAN, M. J.; MELBY, P. C.; AHUJA, S. K. Dendritic cell (DC)-based anti-infective strategies: DCs engineered to secrete IL-12 are a potent vaccine in a murine model of an intracellular infection. **Journal of immunology**, v. 163, n. 7, p. 3890–3897, 1999.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 783–801, 2006.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, a R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 2993–3002, 1999.

ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P.M.F.; COSTA A.S.V.; MONREAL, M.T.F.D. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194–197, 2010.

ANGELE, M. K.; PRATSCHKE, S.; HUBBARD, W. J.; CHAUDRY, I. H. Cardiovascular and immunological aspects. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 12–19, 2014.

ANURADHA, PAL R, KATIYAR JC. Sex-influenced population kinetics of Leishmania donovani in hamsters. **Indian J Exp Biol**. 28:876–879, 1990.

ASLAN, H.; DEY, R.; MENESES, C.; CASTROVINCI, P.; JERONIMO, S. M. B.; OLIVA, G.; FISCHER, L.; DUNCAN, R. C.; NAKHASI, H. L.; VALENZUELA, J. G.; KAMHAWI, S. A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p. 1328–1338, 2013.

AWASTHI, A.; KUMAR, M. R.; SAHA, B. Immune Response to Leishmania infection. **Indian J. Med. Res.**, v. 119, n. JULY, p. 238–258, 2004.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD). **Gazeta Médica da Bahia** v. 79, p. 35–39, 2009.

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; SIMÕES, T. C.; NASCIMENTO, B. W. L.; DA SILVA, E. S.; STRUCHINER, C. J. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 10, 2008.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: Mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134, 1998.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 64–76, 2000.

BOUMAN, A.; SCHIPPER, M.; HEINEMAN, M. J.; FAAS, M. M. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **American journal of reproductive immunology**. v. 52, n. 1, p. 19–26, 2004.

BOUMAN, A. Sex hormones and the immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 4, p. 411–423, 2005.

CABRITA, É.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Resposta imune na infecção por leishmania infantum em modelo murino. **Saúde & tecnologia**. p. 17–22, 2011.

CALDAS, A. J. M.; COSTA, J.; AQUINO, D.; SILVA, M.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Are there differences in clinical and laboratory parameters between children and adults with American visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**. v. 97, p. 252–258, 2006.

CAVALCANTE, Í. J. M.; VALE, M. R. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, n. 4, p. 911–924, 2014.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

COSTA, D. L.; ROCHA R. L.; CARVALHO, R. M. A.; LIMA-NETO, A. S.; Harhay, M. O.; COSTA, C. H. N.; Barral- Neto M.; A. Barral. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

CUTOLO, M.; LAHITA, R. G. Estrogens and arthritis. **Rheumatic diseases clinics of North America**, v. 31, n. 1, p. 19–27, 2005.

DANIELS, C. W.; BELOSEVIC, M. Serum antibody responses by male and female C57Bl/6 mice infected with *Giardia muris*. **Clinical and experimental immunology**, v. 97, n. 3, p. 424–9, 1994.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318,

2004.

ERDEVE, O.; DALLAR, Y.; SIKLAR, Z. Is hypertriglyceridaemia a new concept for visceral leishmaniasis. **Annals of tropical paediatrics**, v. 24, n. 4, p. 369, 2004.

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

FREITAS, J. De; PINHEIRO, D. Aspectos celulares e moleculares da resposta imunitária a *Leishmania* spp Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 109, n. 55, p. 11–20, 2010.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 439–454, 2006.

GIEFING-KRÖLL, C.; BERGER, P.; LEPPERDINGER, G.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging Cell**, 14, pp309–321, 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 4, p. 615–623, 2004.

HADDAD, J. J. On the mechanisms and putative pathways involving neuroimmune interactions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 370, n. 4, p. 531–535, 2008.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

JERONIMO, S. M. B.; DUGGAL, P.; ETTINGER, N. a; NASCIMENTO, E. T.; MONTEIRO, G. R.; CABRAL, A. P.; PONTES, N. N.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, P. V; GOMES, C. E. M.; PEARSON, R. D.; BLACKWELL, J. M.; BEATY, T. H.; WILSON, M. E. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. **The Journal of infectious diseases**, v. 196, n. 8, p. 1261–1269, 2007.

KAYE, P. M.; SVENSSON, M.; ATO, M.; MAROOF, A.; POLLEY, R.; STAGER, S.; ZUBAIRI, S.; ENGWERDA, C. R. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–253, 2004.

KHOVIDHUNKIT, W.; MEMON, R. a; FEINGOLD, K. R.; GRUNFELD, C. Infection and inflammation-induced proatherogenic changes of lipoproteins. **The Journal of infectious diseases**, v. 181 Suppl 3, p. S462–S472, 2000.

KLEIN, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: From genes to behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 6, p. 627–638, 2000.

- KLEIN, S. L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v. 26, n. 6-7, p. 247–264, 2004.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–10, 2012.
- LANG, T. J. Estrogen as an immunomodulator. **Clinical Immunology**, v. 113, n. 3, p. 224–230, 2004.
- LAZZARETTI, C.; ANTUNES, M. V.; DA SILVA, C. C.; BORSOI, M.; ARDENGHI, P. G.; SUYENAGA, E. S.; GAMARO, G. D. Comparação da Resposta Inflamatória Aguda entre Animais Machos e Fêmeas da Linhagem Wistar. **Revistas.Ucg.Br**, v. 35, n. 1151, p. 1151–1167, 2008. .
- LIMA, I. D.; QUEIROZ, J. W.; LACERDA, H. G.; QUEIROZ, P. V. S.; PONTES, N. N.; BARBOSA, J. D. a; MARTINS, D. R.; WEIRATHER, J. L.; PEARSON, R. D.; WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B. Leishmania infantum chagasi in Northeastern Brazil: Asymptomatic infection at the urban perimeter. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 1, p. 99–107, 2012.
- LORIA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVAEZ, F. J. Animal Models for the Study of Leishmaniasis Immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.
- MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.
- MCCLELLAND, E. E.; SMITH, J. M. Gender Specific Differences in the Immune Response to Infection. **Arch. Immunol.** p. 203–213, 2011.
- MESCOUTO-BORGES, M. R. M.; MAUÉS, É.; COSTA, D. L.; DA SILVA PRANCHEVICIUS, M. C.; ROMERO, G. A. S. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 263–266, 2013.
- MELBY, P. C.; TRYON, V. V.; CHANDRASEKAR, B.; FREEMAN, G. L. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998a.
- MELBY, P. C.; YANG, Y.; CHENG, J.; ZHAO, W. Regional Differences in the Cellular Immune Response to Experimental Cutaneous or Visceral Infection with *Leishmania donovani*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 1, p. 18–27, 1998b.
- MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J. E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **Journal of immunology**. v. 166, n. 3, p. 1912–1920, 2001.

MESCOUTO-BORGES, M. R. M.; MAUÉS, É.; COSTA, D. L.; DA SILVA PRANCHEVICIUS, M. C.; ROMERO, G. A. S. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 263–266, 2013.

Ministério da Saúde, BRASIL. Leishmaniose visceral. In: Doenças infecciosas e parasitárias – **Guia de bolso**. 8ª Ed. Brasília: Ministério da Saúde, p.277-83, 2010.

MOOKERJEE, A.; SEN, P. C.; GHOSE, A. C. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis is associated with an impairment of protein kinase C activity in their lymphocytes that can be partially reversed by okadaic acid or anti-transforming growth factor ?? antibody. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2439–2446, 2003.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. D. W.; ROBERT, L.; GARRA, A. O. Interleukin -10 and the Interleukin -10. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 1, p. 683–765, 2001.

MOREIRA, N. D. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA, P. M. D. A.; KER, H. G.; DE OLIVEIRA CARDOSO, J. M.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of Leishmania (Leishmania) infantum: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–11, 2012.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, 2011.

NIETO, A.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; ORDEN, J. a.; DE LA FUENTE, R.; MADRID-ELENA, N.; CARRIÓN, J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. **Veterinary Research**, v. 42, n. 1, p. 39, 2011.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.

OLIVEIRA, J. M. De; FERNANDES, A. C.; DORVAL, M. E. C.; ALVES, T. P.; FERNANDES, T. D.; OSHIRO, E. T.; OLIVEIRA, A. L. L. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 188–193, 2010.

OSORIO, E. Y.; ZHAO, W.; ESPITIA, C.; SALDARRIAGA, O.; HAWEL, L.; BYUS, C. V.; TRAVI, B. L.; MELBY, P. C. Progressive visceral leishmaniasis is driven by dominant parasite-induced STAT6 activation and STAT6-dependent host arginase 1 expression. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 1, 2012.

PENNELL, L. M.; GALLIGAN, C. L.; FISH, E. N. Sex affects immunity. **Journal of Autoimmunity**, v. 38, n. 2-3, p. J282–J291, 2012.

PEREZ, L. E.; CHANDRASEKAR, B.; SALDARRIAGA, O. a; ZHAO, W.; ARTEAGA, L. T.; TRAVI, B. L.; MELBY, P. C. Reduced nitric oxide synthase 2 (NOS2) promoter activity in the Syrian hamster renders the animal functionally deficient in NOS2 activity and unable to control an intracellular pathogen. **Journal of immunology**, v. 176, n. 9, p. 5519–5528, 2006.

PÉREZ, A. R.; BOTTASSO, O.; SAVINO, W. The impact of infectious diseases upon neuroendocrine circuits. **NeuroImmunoModulation**, v. 16, n. 2, p. 96–105, 2009.

PFEILSCHIFTER, J.; KÖDITZ, R.; PFOHL, M.; SCHATZ, H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 90–119, 2002.

PISCOPO, T. V; MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, 2006.

ROBERTS, C. W.; WALKER, W. Sex-Associated Hormones and Immunity to Protozoan Parasites. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 3, p. 476–488, 2001.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; Æ, R. G. TITUS. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **Fems microbiology letters** v. 209, p. 1–7, 2002.

ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 123–126, 2004.

SANO, A.; MIYAJI M.; NISHIMURA K. Studies on the relationship between the estrous cycle of BALB/c mice and their resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, 119, 141-5, 1992.

SATOSKAR, A.; CENTRE, T. T. Sex-determined susceptibility and differential IFN- γ and TNF- α mRNA expression in DBA / 2 mice infected with *Leishmania mexicana*. **Control**, p. 5–8, 1995.

SATOSKAR, A.; AL-QUASSI, H. H. K.; ALEXANDER, J. Sex-determined resistance against *Leishmania mexicana* is associated with the preferential induction of a Th1-like response and IFN- γ production by female but not male DBA/2 mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 76, n. 2, p. 159–166, 1998.

SCOTLAND, R. S.; STABLES, M. J.; MADALLI, S.; WATSON, P.; GILROY, D. W. Sex differences in resident immune cell phenotype underlie more efficient acute inflammatory responses in female mice. **Blood**, v. 118, n. 22, p. 5918–5927, 2011.

SEÇMEER, G.; CENGİZ, A. B.; M.; GURGEY, A.; KARA, A.; CULTU, O.; TAVIL, B.; DEVRİM, I. Hypertriglyceridemia and Decreased High-density Lipoprotein Could be a Clue for Visceral Leishmaniasis. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 14, n. 6, p. 401–402, 2006.

SERAFIM, T. D.; MALAFAIA, G.; SILVA, M. E.; PEDROSA, M. L.; REZENDE, S. A.

Immune response to *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection is reduced in malnourished BALB/c mice. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 811–817, 2010.

SILVA, A.; COSTA, A.; COSTA, G. C.; MARIA, D.; AQUINO, C. De; ROSA, V.; MENDONÇA, R. De; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; JESUS, A. De; CALDAS, M. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6. p. 735–739, 2012.

SINGH, N.; SAMANT, M.; GUPTA, S. K.; KUMAR, A.; DUBE, A. Age-influenced population kinetics and immunological responses of *Leishmania donovani* in hamsters. **Parasitology Research**, v. 101, n. 4, p. 919–924, 2007.

SNIDER, H.; LEZAMA-DAVILA C.; ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R. Sex Hormones and Modulation of Immunity against Leishmaniasis. **Neuroimmunomodulation**. 16(2), 106–113, 2009.

SOARES, N. M.; LEAL, T. F.; FIÚZA, M. C.; REIS, E. A. G.; SOUZA, M. A. L. Plasma lipoproteins in visceral leishmaniasis and their effect on *Leishmania* -infected macrophages. **Parasite Immunology**, n. 16, p. 259–266, 2010.

STÄGER, S.; JOSHI, T.; BANKOTI, R. Immune evasive mechanisms contributing to persistent *Leishmania donovani* infection. **Immunologic Research**, v. 47, n. 1-3, p. 14–24, 2010.

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. **Endocrine Reviews**, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007.

SULAHIAN, A.; GARIN, Y. J. F.; PRATLONG, F.; DEDET, J. P.; DEROUIN, F. Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 131–138, 1997.

TAUB, D. D. Neuroendocrine Interactions in the Immune System, **Cell Immunol**. 252(1-2): 1–6. 2008.

TANRIVERDI, F.; SILVEIRA, L. F. G.; MACCOLL, G. S.; BOULOUX, P. M. G. The hypothalamic – pituitary – gonadal axis: immune function and autoimmunity. **Journal of Endocrinology**. n.176.p. 293–304, 2003.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, C. R.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Chemokines in host – parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in parasitology**. v. 22, n. 1, 2006.

TRAVI, B. L.; OSORIO, Y.; MELBY, P. C.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. G. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.

VERTHELYI, D. Sex hormones as immunomodulators in health and disease. **International Immunopharmacology**, v. 1, n. 6, p. 983–993, 2001.

VIANNA, V.; TAKIYA, C.; DE BRITO-GITIRANA, L. Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. **Parasitology Research**, v. 88, n. 9, p. 829–836, 2002.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. NEUROENDOCRINE REGULATION OF IMMUNITY. **Annu. Rev. Immunol.** 20:125–63,. 2002.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. B.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing *Leishmania* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 38, n. 4, p. 147–160, 2005.

World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. TRS N°949 2010. Geneva: WHO

WRONA, D. Neural-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. **Journal of Neuroimmunology**, v. 172, n. 1-2, p. 38–58, 2006.

YOU, H. J.; KIM, J. Y.; JEONG, H. G. 17β Estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 4, p. 1129–1134, 2003.