

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Melissa Guimarães, Luciana Maria Cortez Marcolino, Juliana Guerra Pinto,
Juliana Ferreira Strixino.

Universidade do Vale do Paraíba/Laboratório PhotoBioS (Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento),
Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000 - São José dos Campos-SP, Brasil,
melissa_guioli@yahoo.com.br, lucianacortez69@gmail.com, juguerra@univap.br,
juferreira@univap.br.

Resumo

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é causada por protozoários do gênero *Leishmania spp*, sendo responsável por mais de 90% dos casos no Brasil. Modelos animais que reproduzam as condições da doença em humanos são necessários, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dessa forma, o objetivo do trabalho é realizar uma revisão bibliográfica acerca dos modelos animais disponíveis para estudo da LT. Para isso, realizou-se uma revisão bibliográfica nas bases de dados PubMed, Google Scholar e BVC, utilizando os descritores, em português e inglês: “Modelos animais” e “Leishmaniose Cutânea”; “Modelos animais” e “*Leishmania braziliensis*”; e “Modelos animais” e “*Leishmania amazonensis*”. Dez artigos foram selecionados para a apresentação dos resultados e posterior discussão. Os artigos evidenciaram que, em geral, o modelo animal com camundongos é o mais utilizado para estudo da doença, variando sua suscetibilidade de acordo com a linhagem do animal e a espécie do parasita. Estas diferenças devem ser conhecidas a fim de proceder com a escolha do melhor modelo que se aplique de acordo com o objetivo do trabalho.

Palavras-chave: Camundongos. *Leishmania braziliensis*. Leishmaniose Cutânea. *Leishmania amazonensis*. Modelos Animais.

Área do Conhecimento: Engenharia Biomédica.

Introdução

As Leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp*, cuja transmissão ocorre pela picada do flebotômio *Lutzomyia longipalpis*, conhecido popularmente como Mosquito-Palha (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). Há 3 classificações de formas clínicas de Leishmaniose de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a Leishmaniose Tegumentar (ou Cutânea), Leishmaniose Mucocutânea e Leishmaniose Visceral (MOKNI, 2019).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é a apresentação clínica mais comum, caracterizada pela formação de lesões delimitadas, ulceradas e de bordos levantados (FERREIRA; MAROCHIO; PARTATA, 2012). As espécies mais comuns causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil são a *L. braziliensis*, *L. guyanensi* e *L. amazonensis*. Já a *L. infantum* (antiga *L. chagasi*) é a principal espécie relacionada com a leishmaniose visceral no Brasil (AZEVEDO; MARCILI, 2020).

A LT é responsável por mais de 90% dos casos no Brasil e tem ampla distribuição mundial, consistindo em um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em 4 continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. A LT requer atenção especial, não somente pela sua magnitude, mas também pelo risco de ocorrência de deformidades que podem ocasionar no indivíduo, cursando com um envolvimento psicológico que reflete no campo social e econômico (VASCONCELOS *et al.*, 2018).

Dada a importância da LT no Brasil, o estabelecimento de modelos experimentais animais para estudo da doença faz-se necessário, de forma a permitir a elucidação de seus mecanismos subjacentes. Dentre os principais modelos utilizados encontram-se os camundongos e hamsters, que possibilitam a investigação das interações entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro, bem como o aprofundamento do entendimento da patogênese da doença (SACKS; MELBY, 2015; MUÑOZ-DURANGO *et al.* (2022).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica acerca dos modelos experimentais disponíveis para o estudo da LT, apresentando as diferenças encontradas entre espécies do parasito, espécies e linhagens dos animais, procedendo posteriormente com a discussão dos achados.

Metodologia

Foi realizado um levantamento bibliográfico nos bancos de dados PubMed, Google Scholar e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS), buscando artigos publicados entre 2013 e 2023 para a apresentação dos resultados, a partir de 3 diferentes combinações de descritores, em português e inglês: “Modelos animais” e “Leishmaniose Cutânea”; “Modelos animais” e “*Leishmania braziliensis*”; e “Modelos animais” e “*Leishmania amazonensis*”. O resultado numérico da busca está exposto na Tabela 1 da seção Resultados.

A partir da busca bibliográfica, foram excluídos da seleção os estudos que fugiam da temática proposta, selecionando-se ao total dez artigos que visavam abordar acerca dos modelos animais disponíveis para o estudo da LT, destacando as diferenças entre as espécies de *Leishmanias*, espécies e linhagens dos animais utilizados para o estudo.

Resultados

O resultado numérico da busca realizada, cruzando-se os termos “Modelos”, “Experimentais” e “Leishmaniose Tegumentar”, em português e inglês, é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 – Levantamento bibliográfico, nas bases de dados PubMed, Google Scholar e BVS, entre 2013 e 2023, utilizando a combinação de descritores, em português e inglês: “Modelos animais” e “Leishmaniose Cutânea” (A); “Modelos animais” e “*Leishmania braziliensis*” (B); e “Modelos animais” e “*Leishmania amazonensis*” (C).

Base de Dados	A (português)	A (inglês)	B (português)	B (inglês)	C (português)	C (inglês)
PubMed	0	344	0	59	0	141
Google Scholar	5540	17000	3080	8760	2960	14100
BVS	301	486	81	106	152	200

Fonte: Autor (2023)

Na Tabela 2 estão elencados os resultados dos dez estudos selecionados a partir do levantamento bibliográfico.

Tabela 2 – Apresentação dos resultados dos artigos selecionados.

Autor e ano	Título	Resultados
Aslan et al. (2013)	A new model of progressive visceral leishmaniasis in hamsters by natural transmission via bites of vector sand flies	O estudo descreveu um novo modelo de leishmaniose visceral progressiva em hamsters sírios, alcançado através da transmissão natural do parasita por meio de picadas de flebotomíneos. Os resultados demonstraram que esse modelo mimetiza a progressão da leishmaniose visceral em humanos, consistindo em uma plataforma útil para estudos futuros sobre a patogênese da doença e a avaliação de novas abordagens terapêuticas e imunológicas.
Gomes-Silva et al. (2013)	Golden hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>) as an experimental model for <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Os resultados demonstraram que o hamster sírio é uma escolha adequada para estudar a LT causada por <i>L. braziliensis</i> (MCAN/BR/98/R619), pois são suscetíveis ao desenvolvimento de úlceras cutâneas semelhantes às observadas na LT em humanos. Eles são capazes de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

	<i>infection</i>	reproduzir aspectos da patogênese e da resposta imune observada em seres humanos.
Araújo et al. (2015)	<i>Hairless mice as an experimental model of infection with Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	Camundongos hairless foram inoculados com 10^6 promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (IFLA/BR/1967/PH8) no coxim plantar direito e o curso da infecção foi acompanhado por 30, 60 e 90 dias. Observou-se um aumento no número de parasitas e na espessura do coxim plantar ao longo do tempo. Após 90 dias, ocorreu um rompimento da epiderme, dando origem a uma úlcera típica com crosta. Houve visceralização identificada pela presença do parasito no linfonodo de drenagem da lesão e no baço.
Coler et al. (2015)	<i>From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE</i>	O artigo apresenta os resultados de um estudo sobre a segurança, imunogenicidade e eficácia de uma vacina candidata contra a leishmaniose visceral em camundongos da linhagem C57BL/6 e BALB/c e em humanos.
Sacks; Melby (2015)	<i>Animal Models for the Analysis of Immune Responses to Leishmaniasis</i>	Os protocolos descrevem métodos usados para inocular parasitas em modelos de LT e visceral em camundongos e hamsters, além de avaliar a progressão da lesão, visceralização e quantificação da carga parasitária.
Sassi; Kaak; Elgaied (2015)	<i>Identification of immunodominant Leishmania major antigenic markers of the early C57BL/6 and BALB/c mice infection stages</i>	Os resultados demonstraram que a resposta imunológica de camundongos C57BL/6 e BALB/c à infecção por <i>L. major</i> (MHOM/TN95/GLC94) é diferente. Verificou-se que durante as fases iniciais do desenvolvimento de lesões, os C57BL/6 apresentaram uma resposta imunológica dominada pela produção de IgG1 que diminui durante a fase de cura. Nos BALB/c a produção de IgG1 foi predominante em todas as fases da infecção.
Tomiotto-Pellissier et al. (2016)	<i>Galleria mellonella hemocytes: A novel phagocytic assay for Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	O estudo apresenta um novo modelo de ensaio fagocitário <i>in vitro</i> utilizando hemócitos de larvas <i>Galleria mellonella</i> para estudar a infecção por <i>L. braziliensis</i> (MCAN/BR/98/R619). Os resultados evidenciam que as células fagocíticas da larva foram capazes de englobar as promastigotas, que se transformaram em amastigotas dentro das células, sugerindo as larvas como um possível novo modelo utilizando animais invertebrados.
Dietze-Schwonberg et al. (2019)	<i>IL-17A/F in Leishmania major-resistant C57BL/6 mice</i>	Este estudo aborda aspectos imunológicos dos camundongos C57BL/6 e BALB/c na leishmaniose e visou investigar especificamente o papel da IL-17A/F na resistência ou suscetibilidade à <i>L. major</i> . Os resultados evidenciaram que a ausência delas não afetou progressão da doença e IL-17A/F.
Freire et al. (2022)	<i>Different inoculum of Leishmania braziliensis concentrations influence immunopathogenesis and clinical evolution in the ear dermis hamster model of cutaneous leishmaniasis</i>	Os resultados da inoculação de diferentes quantidades de <i>L. braziliensis</i> (MCAN/BR/98/R619) na orelha de hamsters sírios (<i>Mesocricetus auratus</i>) revelaram que a quantidade de parasitas influencia a imunopatogênese e evolução clínica da doença. Hamsters infectados com 10^4 e 10^5 promastigotas desenvolveram lesões leves, enquanto o grupo infectado com 10^6 apresentou lesões ulceradas graves e persistentes.
Muñoz-Durango et al.	<i>A Mouse Model of Ulcerative Cutaneous Leishmaniasis by</i>	Camundongos BALB/c foram inoculados pela via intradérmica na orelha com 10^5 promastigotas de <i>L. panamensis</i> . Os animais desenvolveram lesões ulceradas

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(2022) *Leishmania (Viannia) panamensis* to *Investigate Infection, Pathogenesis, Immunity, and Therapeutics* com bordas endurecidas típicas das observadas em humanos, a partir das 11ª semana pós-infecção. A cepa de *L. (Viannia) panamensis* utilizada foi a UA-946 (MHOM/CO/93/UA-946). O estudo demonstra que camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção por *L. (Viannia) panamensis*.

Fonte: Autor (2023)

Discussão

Os camundongos são os modelos mamíferos mais conhecidos e utilizados no estudo de diversas doenças. Esta ampla utilização justifica-se por serem modelos práticos, devido ao seu porte pequeno, facilidade de se reproduzir em cativeiro, rápida geração de prole, baixo custo de manutenção e amabilidade. Além disso, questões genéticas como sua grande semelhança com o genoma humano, e a capacidade de suportar bem a consanguinidade, os tornaram modelo de escolha para o estudo de diversas doenças humanas (COSTA; VALLE, 2014).

Dessa forma, grande parte dos estudos acerca da LT foram realizados utilizando este modelo animal. Por meio de estudos realizados com camundongos C57BL/6 e BALB/c, utilizando uma cepa de *L. major* isolada no Mediterrâneo foi possível estabelecer o paradigma Th1/Th2 (COSTA; VALLE, 2014), evidenciando o papel da dicotomia T1/Th2 na resistência ou suscetibilidade à infecção por *Leishmania* (LOEUILLET; BANULS; HIDE, 2016). Observou-se que a inoculação de *L. major* em camundongos C57BL/6 causa o desenvolvimento de pequenas lesões cutâneas que se resolvem espontaneamente (SASSI; KAAK; ELGAIED, 2015). Por isso são considerados os modelos adequados para estudo da LT causada por *L. major* (COSTA; VALLE, 2014). Em contrapartida, os BALB/c evoluem para uma doença progressiva e fatal (SASSI; KAAK; ELGAIED, 2015).

A resistência da linhagem C57BL/6 justifica-se pela predominância na resposta Th1, com produção dos mediadores IL-12 e IFN- γ , que promovem ativação dos macrófagos para combater o parasita. Em contrapartida, os BALB/c são sensíveis à infecção, pois desenvolvem predominância de resposta Th2, com produção de citocinas como IL-4, IL-10 e IL-17A, que possuem papel imunossupressor. Muitos aspectos da resposta imunológica dos camundongos C57BL/6 e BALB/c têm paralelos significativos, respectivamente, com humanos imunocompetentes e imunossuprimidos (DIETZE-SCHWONBERG *et al.*, 2019). Além disso, a dominância do tipo de anticorpo também está relacionada com a resposta Th predominante. Camundongos C57BL/6 mostram que os níveis de IgG1, que está associado com resposta imunológica Th2 (imunossupressora), diminui na fase de cura da doença. Já os BALB/c possuem alta expressão de IgG1 em todas as fases da infecção, mantendo a resposta Th2 ativa (SASSI; KAAK; ELGAIED, 2015).

Os resultados dos experimentos realizados com *L. major* foram extrapolados para outras espécies de *Leishmanias*, determinando que os camundongos C57BL/6 são resistentes à infecção por *Leishmania*. Entretanto, essa generalização levou a uma conclusão equivocada, visto que se verificou em estudos que a linhagem C57BL/6 é sensível à espécie *L. amazonensis* (STEBUT, 2007). Quando infectados por *L. amazonensis* isolada de um paciente acometido pela forma difusa da doença, desenvolveram metástases nas patas, focinho e mucosa oral. Percebe-se, assim, que a linhagem C57BL/6 é sensível à infecção por *L. amazonensis*, e a ideia de que estes camundongos são resistentes à *Leishmania* deve se restringir apenas à espécie *L. major*. Além disso, devido à possibilidade de acometimento difuso e de mucosas, também são considerados bons modelos para estudo da forma mucocutânea (CUPOLILO *et al.*, 2003).

Além da linhagem C57BL/6, os camundongos BALB/c também são bons modelos animais para leishmaniose tegumentar induzida por *L. amazonensis*, pois apresentam sensibilidade à espécie em questão. Camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis* desenvolvem lesões progressivas que tendem a ser menos ulcerativas comparadas com *L. major*, podendo, ainda, desenvolver lesões metastáticas tardias em locais distais (SACKS; MELBY, 2015). Outro modelo experimental promissor para estudo da LT são os camundongos hairless, uma vez que minimizam as desvantagens da presença de pelos, como infecções secundárias. Além disso, a ausência de pelos abre espaço para a utilização de diferentes sítios de infecção, otimizando o acompanhamento da lesão cutânea e avaliação do tratamento aplicado (ARAÚJO *et al.*, 2015). Por meio do estudo feito por Araújo *et al.*

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

(2015), verificou-se que esta linhagem de camundongos é suscetível à infecção por *L. amazonensis*, a partir do desenvolvimento de lesões crônicas no local da infecção, com rompimento da epiderme originando lesão ulcerada crostosa após 90 dias da infecção. Ainda são necessários mais estudos para estabelecer lesão cutânea em outros sítios de infecção nestes animais.

Embora amplamente utilizado, ensaios com o modelo murino apresenta dificuldades com algumas espécies de *Leishmanias*, como é o caso da *L. braziliensis*. Camundongos são, em geral, hospedeiros pobres ou não permissivos para espécies do subgênero *Viannia*, como *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis*, responsáveis pela maioria das doenças cutâneas e mucocutâneas nas Américas. Em contrapartida, o hamster sírio (*Mesocricetus auratus*) é altamente suscetível a essas espécies, com a ocorrência de lesões ulcerativas e crônicas, muito similares com as úlceras observadas em humanos, demonstrando bons resultados ao induzir lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* (GOMES-SILVA *et al.*, 2013) e *L. panamensis* (MUÑOZ-DURANGO *et al.*, 2022). Entretanto, seu uso ainda é limitado devido à baixa disponibilidade de anticorpos específicos para hamsters para estudar o papel da resposta imune na doença (GOMES-SILVA *et al.*, 2013).

Alguns fatores além dos imunológicos, também exercem influência no desenvolvimento da doença, como o perfil genético dos camundongos (presença ou ausência de locus relacionado com o controle da infecção), genótipo do parasita (que interfere em sua virulência) (LOEUILLET; BANULS; HIDE, 2016), e dose do parasita a ser inoculada (FREIRE *et al.*, 2022).

Novas estratégias estão sendo testadas para induzir o desenvolvimento de outra forma de apresentação da doença, a leishmaniose visceral, por meio da transmissão via vetor (flebotomíneos), cujas proteínas da saliva modulam o local da picada, facilitando a infecção das *Leishmanias* (ASLAN *et al.*, 2013). Novos modelos experimentais promissores utilizando invertebrados também estão sendo testados, como é o caso da utilização de hemócitos de larvas *Galleria mellonella*, que foram infectados com sucesso por formas promastigotas de *L. braziliensis*, que posteriormente se transformaram em amastigotas dentro das células (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2016).

Uma aplicação da importância dos modelos experimentais no estudo da Leishmaniose é o desenvolvimento de vacinas. No estudo desenvolvido por Coler *et al.* (2015) a fim de testar a vacina LEISH-F3+GLA-SE contra leishmaniose visceral, foram utilizadas duas linhagens de camundongos, C57BL/6 e BALB/c, que permitiram avaliar a segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina em um organismo vivo antes de testá-la em humanos. Além disso, devido às duas linhagens diferirem em termos de suas respostas imunológicas, o uso de ambas pode fornecer informações mais abrangentes sobre a capacidade da vacina de induzir uma resposta imunológica protetora.

Dessa forma, dada a importância dos modelos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas para a Leishmaniose, mais estudos acerca de modelos animais ainda são necessários de forma a promover o contínuo aprimoramento dos modelos *in vivo* para estudo da doença.

Conclusão

Conclui-se que devido à facilidade na utilização de camundongos, este constitui-se no modelo animal mais utilizado para estudo da LT. Entretanto, há variações na suscetibilidade ou resistência à doença de acordo com a espécie de *Leishmania*, com a espécie e linhagem dos animais. As diferenças devem ser conhecidas e o melhor modelo deve ser escolhido para desenvolvimento das lesões causadas pela LT de acordo com o objetivo de cada estudo em específico.

Referências

- ARAÚJO, V. C. P. *et al.* Hairless mice as an experimental model of infection with *Leishmania* (*Leishmania*) amazonenses. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 138-144, 2015.
- ASLAN, H., *et al.* A New Model of Progressive Visceral Leishmaniasis in Hamsters by Natural Transmission via Bites of Vector Sand Flies. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 8, p.1328-1338, 2013.
- AZEVEDO, R. C. F.; MARCILI, A. Alterações cutâneas secundárias à infecção por leishmania sp.:revisão de literatura. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p.19328-19346, 2020.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

COLER, R. N. *et al.* From mouse to man: safety, immunogenicity and efficacy of a candidate leishmaniasis vaccine LEISH-F3+GLA-SE. **Clinical & Translational Immunology**, v. 4, n. 4, 2015.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. Disponível em: <<https://books.scielo.org/id/dgkx2/pdf/conceicao-9788575415689.pdf>>. Acesso em: 25 jul. 2023.

COSTA, S. C. G., VALLE, T. Z. Modelos Experimentais na Leishmaniose Tegumentar Americana. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, p. 293-307.

CUPOLILO, S. M. *et al.* Biological behavior of Leishmania (L.) amazonensis isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. **Histology and Histopathology**, v. 18, n. 4, p. 1059-1065, 2003.

DIETZE-SCHWONBERG, K. *et al.* IL-17A/F in Leishmania major-resistant C57BL/6 mice. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 321-323, 2019.

FERREIRA, C. C.; MAROCHIO, G. G.; PARTATA, A. K. Estudo Sobre a Leishmaniose Tegumentar Americana Com Enfoque na Farmacoterapia. **Revista Científica do ITPAC**, v. 5, n. 4, 2012.

FREIRE, R. P. *et al.* Different inoculum of Leishmania braziliensis concentrations influence immunopathogenesis and clinical evolution in the ear dermis hamster model of cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 44, n. 11, 2022.

GOMES-SILVA, A. G. *et al.* Golden hamster (Mesocricetus auratus) as an experimental model for Leishmania (Viannia) braziliensis infection. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 771-779, 2013.

LOEUILLET, C. *et al.* Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 144, 2016.

MOKNI, M. Leishmanioses cutanées. **Annales de Dermatologie et de Vénéréologie**, v. 146, p. 232-246, 2019.

MUÑOZ-DURANGO, N. M. *et al.* A Mouse Model of Ulcerative Cutaneous Leishmaniasis by Leishmania (Viannia) panamensis to Investigate Infection, Pathogenesis, Immunity, and Therapeutics. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

SACKS, D. L.; MELBY, P. C. Animal Models for the Analysis of Immune Responses to Leishmaniasis. **Current Protocols in Immunology**, v. 108, 2015.

SASSI, A.; KAAK, O.; ELGAIED, A. B. A. Identification of immunodominant Leishmania major antigenic markers of the early C57BL/6 and BALB/c mice infection stages. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 10, p. 544-552, 2015.

STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 340-346, 2007.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. T. *et al.* A novel phagocytic assay for Leishmania (Viannia) braziliensis. **Microbiol Methods**, v. 131, p. 45-50, 2016.

VASCONCELOS, J. M. *et al.* Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, p. 221-227, 2018.