



Universidade de Brasília – UnB

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Laboratório Interdisciplinar de Biociências – LabIBC

Ilana Mazzoleni

**ESTUDO DOS EVENTOS INICIAIS DA INFECÇÃO HUMANA POR
Leishmania braziliensis EM EXPLANTES DE PELE HUMANA**

Brasília-DF,

2025

Ilana Mazzoleni

**ESTUDO DOS EVENTOS INICIAIS DA INFECÇÃO HUMANA POR
Leishmania braziliensis EM EXPLANTES DE PELE HUMANA**

Dissertação apresentada como requisito à
obtenção do grau Mestre em Biologia das
doenças infecciosas e parasitárias, Programa
de Pós-graduação em Medicina Tropical,
Universidade de Brasília - UnB

Orientadora: Prof^a. Dr^a Juliana Lott de
Carvalho

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Nadjar Nitz Silva
Lociks de Araújo

Brasília-DF,

2025

FICHA

MM478e Mazzoleni, Ilana
ESTUDO DOS EVENTOS INICIAIS DA INFECÇÃO HUMANA POR
Leishmania braziliensis EM EXPLANTES DE PELE HUMANA / Ilana
Mazzoleni; orientador Juliana Lott de Carvalho;
co-orientador Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo. --
Brasília, 2025.
114 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --
Universidade de Brasília, 2025.

1. Pele humana ex vivo. 2. hOSEC. 3. Leishmaniose. I.
Lott de Carvalho, Juliana , orient. II. Nitz Silva Lociks de
Araújo, Nadjar , co-orient. III. Título.

Brasília - DF, de 2025

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Juliana Lott de Carvalho (Orientadora/Presidente)

Universidade de Brasília – UnB

Prof^a. Dr^a Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo (Co-orientador)

Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr Fernando de Queiroz Cunha (membro externo)

Universidade de São Paulo – USP

Dr Ciro Martins Gomes (membro externo)

Ministério da Saúde

Prof^a. Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali (suplente)

Universidade de Brasília

DEDICATÓRIA

Ao meu pai (*in memoriam*), minha mãe e minha irmã

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Juliana Lott, que me acolheu e me ensinou tanto desde que cheguei no laboratório. Obrigada por confiar em mim com esse lindo projeto, ele é um reflexo do aprendizado, apoio, incentivo, carinho e paciência que recebi durante essa trajetória. Sua dedicação e conhecimento foram fundamentais para o meu crescimento profissional. Você é uma grande inspiração.

À minha co-orientadora, Nadjar Nitz, obrigada pela parceria, conselhos valiosos, apoio contínuo e pelo olhar sempre otimista diante dos desafios deste projeto, que tornaram essa caminhada tão enriquecedora.

Aos professores do LabIBC, Mariana Hecht, Luciana Hägstrom, Bruno Dallago e Dora Rabello, obrigada pelo compartilhamento de conhecimento, pela paciência e disponibilidade de cada um para auxiliar, esclarecer dúvidas e incentivar o aprendizado. A troca de experiências, as conversas e o apoio mútuo tornaram o laboratório não apenas um espaço de pesquisa, mas também um ambiente de crescimento e inspiração.

Ao Laboratório de Patologia e ao Laboratório de Microscopia e Microanálise da UnB, pela ajuda essencial para a realização deste trabalho, em especial aos professores Florêncio Figueiredo, Eliza Duarte e Karine Barros Cordeiro pela disponibilidade, assistência e todo o ensino repassado. Ao médico Dr. Carpaneda, obrigada por disponibilizar o material da sua clínica para a realização desta pesquisa.

Agradeço à CAPES pela concessão de bolsas e pelo financiamento da pesquisa, e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pelos aprendizados.

À equipe incrível do LabIBC, Ananda, Filipe, Fábio, Marina, Edson, Elias e Peter. Vocês foram sensacionais nesta jornada, obrigada pelo trabalho em equipe, a troca de conhecimentos e a disposição de cada um. A parceria e amizade de vocês tornaram o ambiente do laboratório muito mais leve e divertido.

Ao grupo de pesquisa da professora Juliana Lott, Amandda, Emãnuella, Mayra, Carolina, Luana, Ágata e Alen. Este trabalho tem um pouco de cada um e ele é um reflexo da incrível parceria e amizade de vocês. Obrigada por tantas contribuições, aprendizados, risadas e bons momentos compartilhados ao longo dessa jornada.

Às minhas extraordinárias amigas, Ludmilla, Mavi, Marina, Stefhani, Vitória, Antônio e Kim. Vocês foram os maiores presentes que ganhei no mestrado, a amizade de vocês foi essencial para completar essa jornada. Durante tantos momentos difíceis, vocês foram a minha fonte de motivação e apoio, e vou ser eternamente grata por ter encontrado amigos tão especiais. Eu amo muito vocês.

Aos meus amigos Lucas Emanuel, Lucas Miranda, Rafael, Felipe e Uriel. Meu imenso agradecimento por sempre acreditarem em mim e me apoiarem a cada passo desse caminho. A amizade de vocês foi um grande acalento, sou muito grata por todos os nossos momentos juntos, todo o cuidado, companhia e conselhos. Eu amo vocês.

À minha família, obrigada por todo o amor e apoio, sempre me dando forças para continuar e acreditando no meu potencial. Cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho e cada demonstração de confiança foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

À minha mãe, Eliane, e minha irmã, Martina. Tudo na minha vida é para vocês e graças a vocês. Obrigada por serem a minha maior fonte de apoio, confiança e amor incondicional, e por sempre acreditarem nos meus sonhos, mesmo quando eu não acreditei. Vocês são as maiores bênçãos da minha vida.

Ao meu pai, Atilio, que, mesmo não estando mais aqui, permanece cada dia mais vivo na minha trajetória. Senti sua presença em diversos momentos dessa aventura, e sei que todos os teus ensinamentos me trouxeram até aqui. Que este trabalho seja um recorte dos valores que aprendi contigo nos nossos anos juntos.

*“Em toda caminhada na natureza, recebemos muito mais do que
buscamos.” – John Muir*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa epidemiológico dos casos de Leishmaniose

Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania spp.*

Figura 3. Impacto da infecção por *Leishmania spp.* nas células imunes

Figura 4. Esquema de obtenção e cultivo de fragmentos de pele *ex vivo*

Figura 5. Ilustração da infecção de hOSEC com *Leishmania braziliensis*

Figura 6. Linha do tempo da infecção de hOSEC com *L.braziliensis* e análises subsequentes

Figura 7. Avaliação da viabilidade de hOSEC em cultivo

Figura 8. Avaliação histológica de hOSEC ao longo de 7 dias de cultivo

Figura 9. Corte histológico de hOSEC para imuno-histoquímica

Figura 10. Corte histológico de hOSEC corado com hematoxilina e eosina (HE) infectados com 10^7 de *L.braziliensis*

Figura 11. Corte histológico de hOSEC corado com hematoxilina e eosina (HE) infectados com 10^5 de *L.braziliensis*

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Leishmania braziliensis* presentes em hOSEC infectados no dia 0 de cultivo

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Leishmania braziliensis* presente em hOSEC infectado no dia 3 de cultivo

Figura 14. Corte histológico de hOSEC corado com azul de toluidina e infectados com 10^5 de *L. braziliensis*

Figura 15. Corte histológico de hOSEC infectado com *L. braziliensis* corado com hematoxilina e eosina (HE).

Figura 16. Carga parasitária de *L. braziliensis*

Figura 17. Quantificação de citocinas em amostras de hOSEC controle ou infectados por *L. braziliensis*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore e classificação dos achados histológicos

Tabela 2. Sexo e idade dos doadores

Tabela 3. Classificação das observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* em cultivo durante 7 dias

LISTA DE ABREVIATURAS

Ct - cycle threshold

DMSO - dimetilsulfóxido

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

ELISA - imunoenzimático

HE - Hematoxilina e Eosina

IFI - imunofluorescência indireta

IFN- γ - interferon-gama

IHQ - Imunohistoquímica

IL-2 – interleucina 2

IL-4 – interleucina 4

IL-6 – interleucina 6

IL-10 - interleucina-10

IL-12 - interleucina-12

ITS 1 - Internal Transcribed Spacer 1

LC - Leishmaniose cutânea

LV - Leishmaniose visceral

MEC - matriz extracelular

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

NETs - Neutrophil extracellular traps

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPs - Pathogen-associated Molecular Patterns

PBS - phosphate buffered saline

PRRs - Pattern Recognition Receptors

qPCR - quantitative Polymerase Chain Reaction

RPMI - Roswell Park Memorial Institute 1640

SFB - Soro Fetal Bovino

Th1 - células T helper 1

Th2 - células T helper 2

TLRs - Toll-like Receptors

TNF - fator de necrose tumoral

TTC - 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	19
1.	Leishmaniose.....	19
1.1	Histórico.....	19
1.2	Epidemiologia	20
1.3	Vetor e agente etiológico	22
1.4	Manifestações clínicas	25
1.4.1	Leishmaniose tegumentar.....	25
1.4.2	Leishmaniose visceral.....	26
1.5	Resposta imune	27
1.6	Diagnóstico e tratamento	30
1.7	Modelos experimentais para estudo da leishmaniose	32
2.	Modelo hOSEC	34
2.1	A pele e sua estrutura	34
2.2	Imunidade da pele	35
2.3	Modelo de pele <i>ex vivo</i>	36
II.	JUSTIFICATIVA.....	39
III.	OBJETIVOS	40
1.	Objetivo geral.....	40
2.	Objetivos específicos.....	40
IV.	MÉTODOS	41
1.	Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana (<i>hOSEC</i>)	42
2.	Cultivo de <i>Leishmania braziliensis</i>	42
3.	Avaliação de contaminação por micoplasma.....	43

4. Ensaio de metabolização de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC)	44
5. Avaliação histológica da viabilidade tecidual do modelo hOSEC	44
6. Avaliação da população de células imunes por meio de imuno-histoquímica	45
7. Infecção do modelo <i>hOSEC</i> com <i>L. braziliensis</i>	45
8. Verificação da infecção	48
a. Extração de DNA.....	48
b. Avaliação da carga parasitária por meio de qPCR	48
c. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	49
9. Avaliação das alterações histológicas e presença dos parasitos após a infecção por <i>L. braziliensis</i>	50
10. Avaliação da produção de citocinas em modelo hOSEC infectado por <i>L. braziliensis</i>	50
11. Análises estatísticas.....	51
V. RESULTADOS	52
VI. DISCUSSÃO.....	69
VII. CONCLUSÃO	79
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
IX. ARTIGO.....	97

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças de grande relevância para a saúde pública, sendo causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada do flebotomíneo. Apesar dos avanços nos estudos sobre a imunobiologia da infecção, os mecanismos iniciais da interação parasito-hospedeiro ainda não são completamente compreendidos, e, embora modelos *in vitro* e *in vivo* sejam a base para a geração de novos conhecimentos no assunto, nenhum reproduz fielmente a infecção humana. Modelos *ex vivo*, como os explantes de pele humana, representam uma alternativa promissora para esses estudos, pois preservam a complexidade estrutural e celular do tecido cutâneo, incluindo células imunológicas. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi padronizar o uso de culturas organotípicas de explantes de pele humana (do inglês, human organotypic skin explant cultures - hOSEC) como modelo experimental para o estudo da infecção por *Leishmania braziliensis*. A viabilidade dos fragmentos foi determinada por meio de avaliação metabólica (ensaio de metabolização do sal TTC) e estrutural (avaliação histológica) da pele. A presença de células imunes nas peles foi determinada por meio de imunohistoquímica. A infecção por *L. braziliensis* foi padronizada e determinada em 3×10^5 parasitas por fragmento de pele, inoculados por meio de 3 injeções de 5 uL cada. A presença do parasita foi confirmada diretamente a partir da visualização dos parasitas em cortes histológicos e microscopia eletrônica de varredura. Molecularmente, a carga parasitária foi quantificada ao longo do período de cultivo por meio de qPCR. Por fim, as consequências da presença dos parasitos foram determinadas por meio de avaliação histológica, e quantificação de citocinas, por meio de citometria de fluxo. Os resultados mostraram que foi possível otimizar o cultivo de hOSEC de modo a manter a viabilidade inalterada durante os sete primeiros dias de cultivo. Ademais, demonstrou-se a presença de células imunes nas amostras de hOSEC coletadas e cultivadas. Após a otimização da infecção, foi possível demonstrar a presença de *L. braziliensis*, sua conversão progressiva de formas promastigotas para

amastigotas e a diminuição progressiva da carga parasitária ao longo dos dias de cultivo. Por fim, foi possível demonstrar que os modelos hOSEC produzem níveis detectáveis de IL-10, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-2 ao longo dos dias de cultivo. No sétimo dia de infecção, houve modulação da produção de IL-2, com menor síntese de produção da citocina nas amostras infectadas. Tomados juntos, os resultados sugerem a imunocompetência dos modelos hOSEC e seu grande potencial para o estudo dos estágios iniciais da infecção por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Leishmaniose, modelo ex vivo, hOSEC, reposta imune

ABSTRACT

Leishmaniasis comprises a group of diseases of great public health significance, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted through the bite of *Phlebotomine* sandflies. Despite advances in studies on the immunobiology of infection, the initial mechanisms of parasite-host interaction remain incompletely understood. Although *in vitro* and *in vivo* models serve as the foundation for generating new knowledge on the subject, none faithfully reproduce human infection. *Ex vivo* models, such as human skin explants, represent a promising alternative for these studies as they preserve the structural and cellular complexity of cutaneous tissue, including immune cells. Thus, the objective of this study was to standardize the use of human organotypic skin explant cultures (hOSEC) as an experimental model for studying *Leishmania braziliensis* infection. The viability of the skin fragments was assessed through metabolic evaluation (TTC salt metabolism assay) and structural analysis (histological assessment). The presence of immune cells in the skin explants was determined by immunohistochemistry. Infection by *L. braziliensis* was standardized and set at 3×10^5 parasites per skin fragment, inoculated through three injections of 5 μ L each. Parasite presence was confirmed directly by visualization in histological sections and scanning electron microscopy. Molecularly, the parasite load was quantified throughout the cultivation period using qPCR. Finally, the consequences of parasite presence were determined through histological assessment and cytokine quantification using flow cytometry. The results demonstrated that it was possible to optimize hOSEC cultivation while maintaining unchanged viability during the first seven days of culture. Furthermore, immune cells were present in the collected and cultivated hOSEC samples. Following infection optimization, the presence of *L. braziliensis* was confirmed, alongside its progressive conversion from promastigote to amastigote forms and a gradual decrease in parasite load over the cultivation period. Lastly, it was shown that the hOSEC models produce detectable levels of IL-10, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-2 over the culture period. By the seventh day of infection, IL-2 production was modulated, with lower cytokine synthesis in

infected samples. Taken together, the results suggest the immunocompetence of the hOSEC models and their great potential for studying the early stages of *L. braziliensis* infection.

Key words: Leishmaniasis, ex vivo model, hOSEC, immune response

I. Introdução

1. Leishmaniose

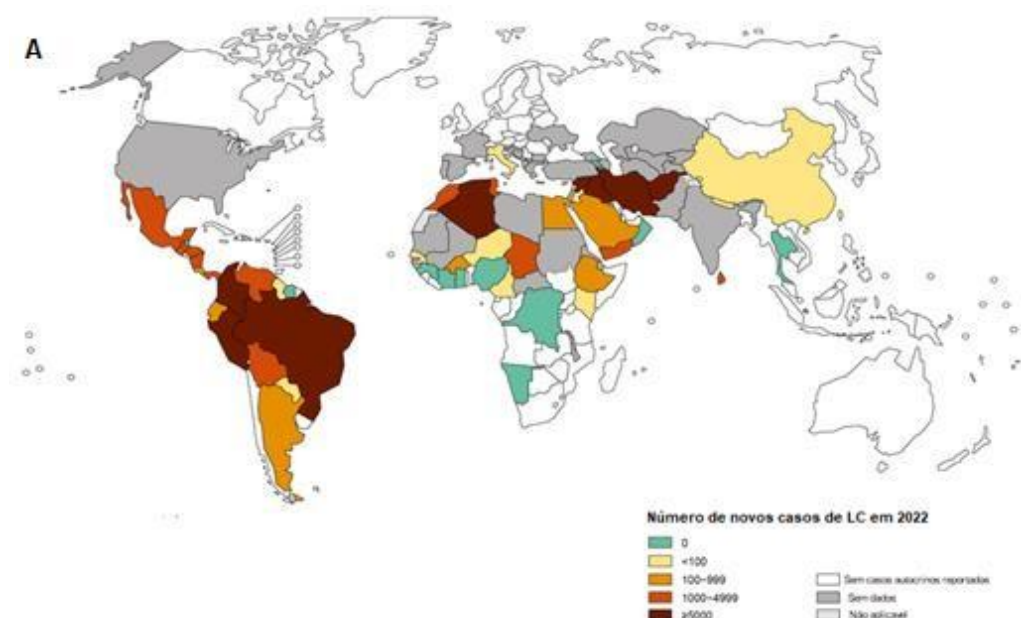
1.1 Histórico

A leishmaniose é uma doença que possui grande relevância histórica, com registros datando de milhões de anos antes da era comum. O gênero *Leishmania* provavelmente evoluiu durante a era Mesozóica, antes da fragmentação do supercontinente Pangeia (Steverding, 2017). Em 1903, foram feitas as primeiras descrições de *Leishmania*, de forma independente, pelo patologista escocês William Boog Leishman e o pelo médico irlandês Charles Donovan que descobriram corpos ovóides em esfregaços feitos *in vivo* e em autópsias de pacientes com baço aumentado (Donovan, 1903; Leishman, 1903). No mesmo ano, Ronald Ross concluiu que os corpos ovóides se tratavam de um novo protozoário cuja infecção provocava um quadro clínico que se assemelhava ao do calazar e o nomeou de *Leishmania donovani* (Ross, 1903). Em 1922, Henrique de Beaurepaire Rohan Aragão propôs a hipótese de que a mosca-das-areias atuava como vetor da leishmaniose na América do Sul, posteriormente identificada e classificada como *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Akhoundi et al., 2016).

Os primeiros registros de leishmaniose no Brasil datam de 1895, quando o médico e pesquisador Juliano Moreira observou sintomas indicativos de leishmaniose cutânea na região amazônica (Brasil, 2005). Em 1912, Gaspar Vianna descreveu a espécie *Leishmania braziliensis*, além de descrever tratamento com antimônio trivalente para a leishmaniose cutânea (LC), posteriormente, a primeira menção oficial à leishmaniose cutânea no Brasil ocorreu em um relatório governamental de 1917 (Altamirano-Enciso et al., 2003; Sousa C Pearson, 2009). Em 1972, Lainson e Shaw propuseram uma nova classificação das leishmanias do Novo Mundo com base em critérios clínicos, epidemiológicos e biológicos. Eles dividiram os parasitas em dois grandes grupos: o complexo *Leishmania mexicana* e o complexo *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, em 1987, os mesmos autores revisaram essa classificação, adotando os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Brasil, 2005; Lainson et al., 1990).

1.2 Epidemiologia

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que geram significativo impacto na saúde pública. Essas infecções constituem um complexo de doenças caracterizado por um amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo endêmicas em 92 países e relatadas em 83 territórios (WHO, 2010). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as seis doenças infecciosas mais importantes que acometem populações negligenciadas, com uma incidência estimada de 0.9 a 1.6 milhões de casos todos os anos, sendo aproximadamente 0.2 a 0.4 milhões de casos da forma visceral e 0.7 a 1.2 milhões de casos da Leishmaniose cutânea (PAHO, 2020) (Figura 1).



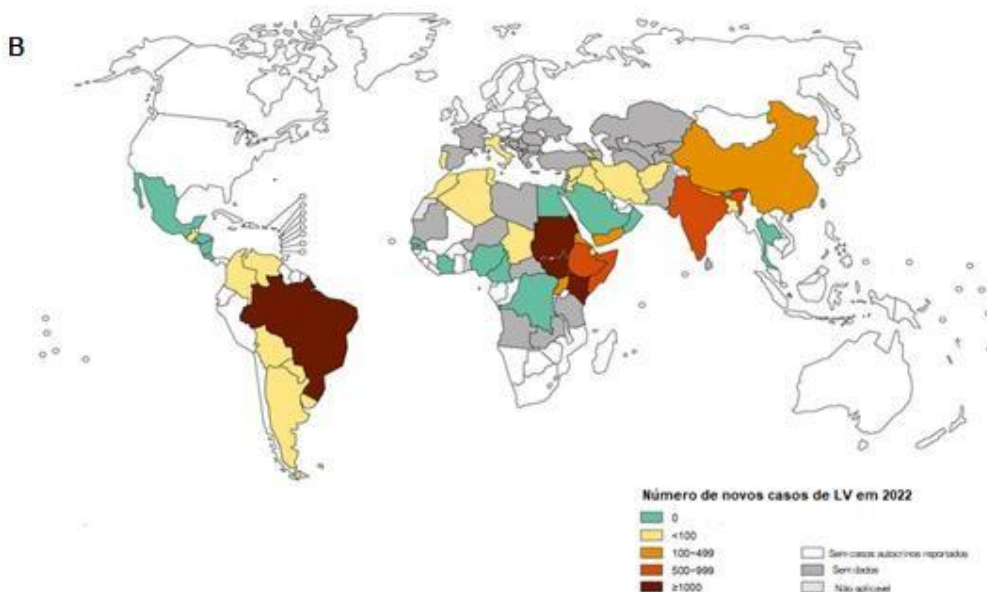


Figura 1. Mapa epidemiológico de casos de Leishmaniose. Número de casos reportados de leishmaniose cutânea (A) e visceral (B) no ano de 2022 (OMS, 2023)

Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* podem causar Leishmaniose, sendo transmitidas por diversas espécies de flebotomíneos. A doença apresenta alta prevalência, especialmente entre populações de baixa renda em países subdesenvolvidos, onde os programas de controle são subfinanciados e a infraestrutura de saúde é inadequada (Choi et al., 2021; Knight et al., 2023). As doenças tropicais negligenciadas afetam principalmente populações com baixa visibilidade e limitada representação política, gerando estigma, discriminação e aumento na morbidade e mortalidade. Entre as doenças tropicais, a leishmaniose ocupa o segundo lugar em mortalidade e o sétimo em anos de vida perdidos ajustados por incapacidade. Mais de 1 bilhão de pessoas estão em risco de infecção em países com alta presença da doença (Burza et al., 2018; Choi et al., 2021; Kassebaum et al., 2016).

Segundo a Organização Pan Americana de Saúde, durante os anos 2001 a 2021, foram notificados 1. 105. 545 casos de LC e Muco-cutânea nas Américas, com mais de 37% dos casos sendo registrados no Brasil. A pandemia de COVID-19 afetou diretamente as ações de vigilância e controle das leishmanioses, devido ao impacto nas atividades em campo, repercutindo nas ações de busca ativa, detecção precoce e tratamento de casos (PAHO, 2020).

Em todo o território nacional, existem diferentes distribuições geográficas das espécies de *Leishmania*. Por exemplo, *Leishmania (Viannia) guyanensis* tem casos registrados na região Norte, já *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é principalmente relatada nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná, enquanto *Leishmania (Viannia) braziliensis* é reportada em todos os estados do país. Assim, as espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são consideradas epidemiologicamente mais relevantes devido à sua ampla distribuição geográfica (Brasil, 2017). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2023 foram registrados 312.149 casos no Brasil, com 95 casos registrados no DF (MINISTERIO DA SAÚDE, 2023).

A Leishmaniose Visceral (LV) tem distribuição mundial, entretanto a maior parte dos casos ocorre no Brasil, leste da África e Índia, com estimativa de 50.000 a 90.000 novos casos em todo o mundo anualmente, onde apenas 25–45% são relatados à OMS (WHO, 2023). A migração de populações das áreas rurais para urbanas, o desmatamento e a construção de grandes projetos que impactam o meio ambiente e resultam no reassentamento populacional são eventos associados ao aumento contínuo da incidência de leishmaniose visceral em diversas regiões do Brasil. Apesar das ações do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, que foca no controle de reservatórios entomológicos e animais, o Brasil ainda concentra cerca de 96% dos casos de LV na América Latina (L. C. de Oliveira C Moreira, 2021; OMS, 2019). De acordo com o Ministério da Saúde, em 2023 foram registrados 50.478 novos casos de leishmaniose visceral no Brasil (MINISTERIO DA SAÚDE, 2023).

Mudanças genéticas no parasita da *Leishmania (Leishmania) infantum* favorecem a sua disseminação por todo o país, principalmente nas regiões nordeste e sudeste, apresentando um importante perfil epidemiológico no Brasil (Boité et al., 2020; Reis et al., 2019).

1.3 Vetor e agente etiológico

A leishmaniose é transmitida pela picada do Flebotomíneo infectado, inseto díptero, representante da família Psychodidae que podem ser classificados em dois grandes gêneros de importância médica: *Phlebotomus* no

Velho Mundo (Europa, África e Ásia) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (Steverding, 2017). Cerca de 100 espécies são suspeitas de atuar como vetores de *Leishmania* spp., embora menos de 50 tenham sido comprovadamente envolvidas na transmissão (Lainson & Rangel, 2005). A aproximação cada vez maior dos vetores do ambiente peridomiciliar e domiciliar devido a invasão humana em áreas florestais, combinada com as mudanças ambientais e modificações da situação ecológica entre vetores e parasitos, favorece a transmissão do parasito *Leishmania* de forma extra silvestre (Pessoa et al., 2007).

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários da família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, pertencentes ao gênero *Leishmania*. O parasita apresenta dois estágios principais em seu ciclo de vida: amastigota e promastigota. Esses protozoários são parasitas obrigatórios que alternam entre um vetor invertebrado e um hospedeiro vertebrado, que pode ser humano, canino, roedor ou outras espécies. A infecção é adquirida pela fêmea do flebotomíneo ao se alimentar do sangue de um hospedeiro vertebrado infectado (Arenas et al., 2017; Claborn, 2010).

A forma promastigota tem formato alongado com um corpo celular medindo 5-20 x 1-4 μm e um flagelo anterior de até 20 μm de comprimento, e as formas amastigotas são células ovaladas medindo cerca de 2 x 4 μm . No entanto, a configuração celular básica é conservada entre as duas formas celulares de *Leishmania* (Aleman, 1969; Vannier-Santos et al., 2005). Os parasitas, como outras células eucarióticas típicas, são envolvidos por uma membrana plasmática e apresentam em seu citoplasma núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, lisossomos, ribossomos e outras organelas (Chang, 2014).

A *Leishmania* apresenta um ciclo de vida digenético, alternando entre as formas amastigotas, que tem sobrevivência intracelular dentro do macrófago do mamífero infectado, e as formas promastigotas metacíclicas, que são adaptadas e se replicam no ambiente extracelular intestinal do vetor (Gluezn et al., 2010; Soong, 2009). O ciclo de vida da *Leishmania* inicia-se no vetor quando a fêmea de um flebotomíneo ingere formas amastigotas junto com o sangue de um hospedeiro vertebrado infectado. No interior do bolo alimentar, o parasita

diferencia-se em promastigotas ao longo de 0 a 2 dias após a alimentação, enquanto o sangue é envolvido por uma matriz composta de proteínas, glicoproteínas e quitina, denominada matriz peritrófica. As promastigotas iniciais, conhecidas como promastigotas procíclicas, apresentam intensa atividade replicativa dentro do revestimento intestinal do vetor. Após cerca de três dias, as formas procíclicas rompem a membrana peritrófica e migram para a porção anterior do intestino médio, onde aderem às células epiteliais. Neste estágio, inicia-se a metaciclogênese, durante a qual as promastigotas procíclicas transformam-se em promastigotas metacíclicas, que são formas infecciosas, mas incapazes de se replicar. As promastigotas metacíclicas migram então do intestino para a cavidade bucal do vetor. Durante um novo repasto sanguíneo, o flebotômíneo inocula as formas promastigotas metacíclicas no local da picada, onde são fagocitadas por macrófagos, neutrófilos ou células de Langerhans epidérmicas. No interior do fagolisossoma, as promastigotas rapidamente se diferenciam em amastigotas, uma transformação desencadeada por estímulos como o pH ácido e o aumento da temperatura. As amastigotas adaptam-se ao ambiente ácido e hostil do fagolisossoma, onde se replicam por divisão binária. À medida que a *Leishmania* se multiplica dentro dos macrófagos, ela eventualmente rompe a membrana celular, liberando amastigotas, que podem infectar células adjacentes ou disseminar-se para outras regiões do organismo através da circulação. O ciclo se completa quando outro flebotômíneo ingere amastigotas livres ou macrófagos infectados durante um novo repasto sanguíneo (Conceição-Silva & Alves, 2014; Filemon et al., 2012; Kaufer et al., 2017; Sunter & Gull, 2017). O ciclo de vida da *Leishmania* está representado na figura 2.

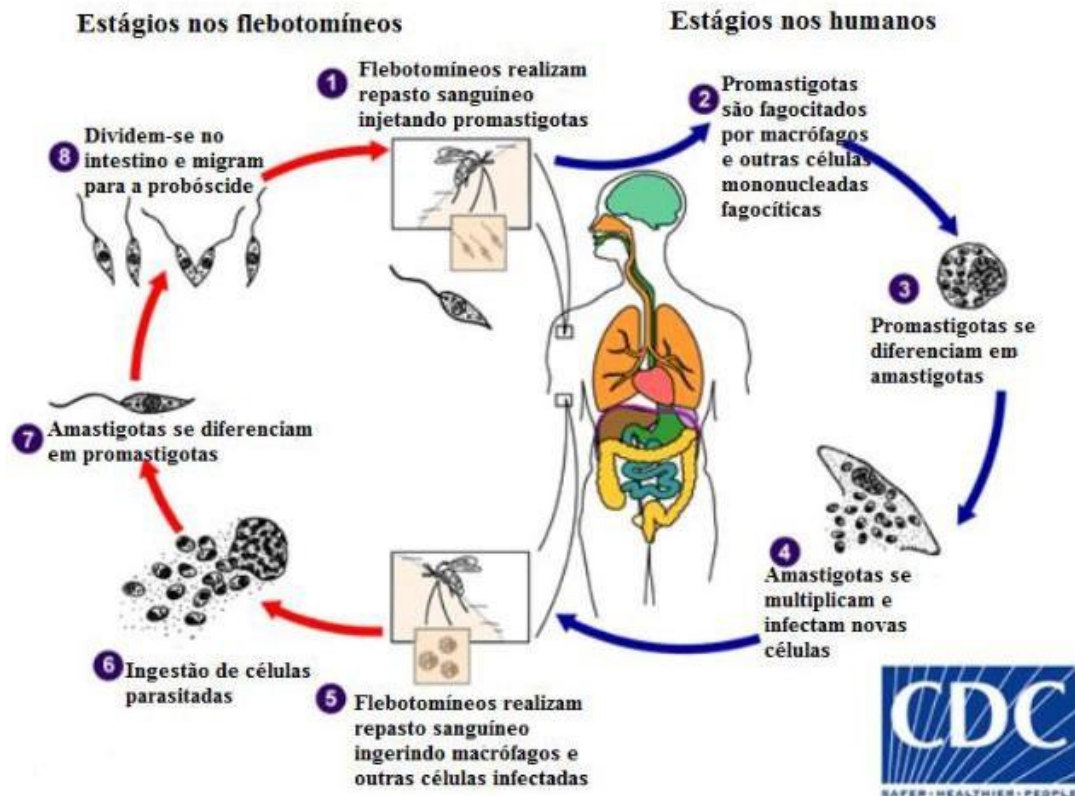


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Adaptado de Division of Parasitic Diseases and Malaria (DPDx), Centers of Diseases Control and Prevention (CDC).

1.4 Manifestações clínicas

1.4.1 Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões que aparecem exclusivamente na pele, iniciando no local onde os parasitas foram inoculados. Embora geralmente ocorra uma única lesão, múltiplas picadas ou a disseminação local podem resultar em várias lesões (Gontijo, 2003). A pápula cresce e forma um nódulo, que lentamente úlceriza ao longo dos meses. Geralmente, os pacientes permanecem sem sintomas sistêmicos, e as lesões, embora possam causar coceira, não provocam dor (Burza et al., 2018). Mesmo não sendo fatal, a LC está associada a estigmatização social e efeitos psicológicos negativos, devido ao impacto estético causado (Bennis et al., 2017).

A forma cutânea localizada é a manifestação mais frequente, com lesões únicas ou em poucas quantidades e caracteriza-se por aumento local da temperatura e inchaço. No local da picada surge uma pápula eritematosa de tamanho varia de 1 a 10 mm de diâmetro. Após 2 dias, transforma-se em pústula, e quando se rompe, seja espontaneamente ou por traumatismo devido à coceira, resulta numa úlcera arredondada (Arenas et al., 2017; Burza et al., 2018).

A forma mucocutânea ocorre como resultado do desenvolvimento secundário da forma cutânea localizada e é caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato, causada por uma forte resposta imunopatológica. No início, há infiltração da mucosa com ulcerações superficiais; posteriormente, as úlceras se desenvolvem, com suas bordas apresentando aspecto necrótico (Cincurá et al., 2017; Goto & Lindoso, 2010).

A Leishmaniose Cutânea Difusa está relacionada a um espectro subjacente de respostas imunes contrastantes e desenvolve-se como múltiplas pápulas e nódulos disseminados, não dolorosos e não ulcerados. A condição reflete a ausência de uma resposta imune celular, e a derme é tipicamente infiltrada por parasitas. A condição reflete a falta de resposta imune celular, resultando em um intenso acúmulo de parasitas na derme. Ela geralmente se manifesta como nódulos eritematosos duros e placas lisas ou verrucosas, de coloração marrom-avermelhada. Linfedema, linfadenopatia, mal-estar geral e febre também podem ocorrer (Cincurá et al., 2017; Goto & Lindoso, 2010; Reithinger & Dujardin, 2007).

1.4.2 Leishmaniose Visceral

Na LV, a infecção se inicia na pele, onde os parasitas migram para fagócitos do sistema retículo endotelial, acometendo principalmente o fígado, baço e a medula óssea. Devido à grande proliferação dos parasitas nestes órgãos, indivíduos acometidos com essa forma da doença frequentemente apresentam pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso (Burza et al., 2018; Evans & Kedzierski, 2012). Após um período de incubação de 2 a 6 meses, pacientes com leishmaniose visceral (LV) desenvolvem sintomas de infecção sistêmica persistente, com invasão

parasitária do sangue e do sistema retículo-endotelial, incluindo aumento dos linfonodos, baço e fígado (Chappuis et al., 2007)

1.5 Resposta imune

A patogênese da leishmaniose segue uma complexa interação entre diversos fatores, desencadeada pelas respostas imunológicas inatas e adquiridas do hospedeiro. Essas respostas imunológicas desempenham um papel crucial na expressão clínica da doença, podendo resultar em formas assintomáticas, subclínicas ou crônicas, com a presença de sintomas graves. As respostas inflamatórias desempenham um papel central na modulação da progressão e manifestação da infecção (Scott, 2005).

Tanto a imunidade inata quanto a adaptativa são fundamentais na defesa contra *Leishmania*. Macrófagos e neutrófilos são as principais células que respondem à infecção, outras células imunes, como monócitos, células dendríticas, células natural killer e células T CD4+ e CD8+, também desempenham papéis importantes na resposta do hospedeiro (Dos-Santos et al., 2016; Solbach & Laskay, 2000) (Figura 2)

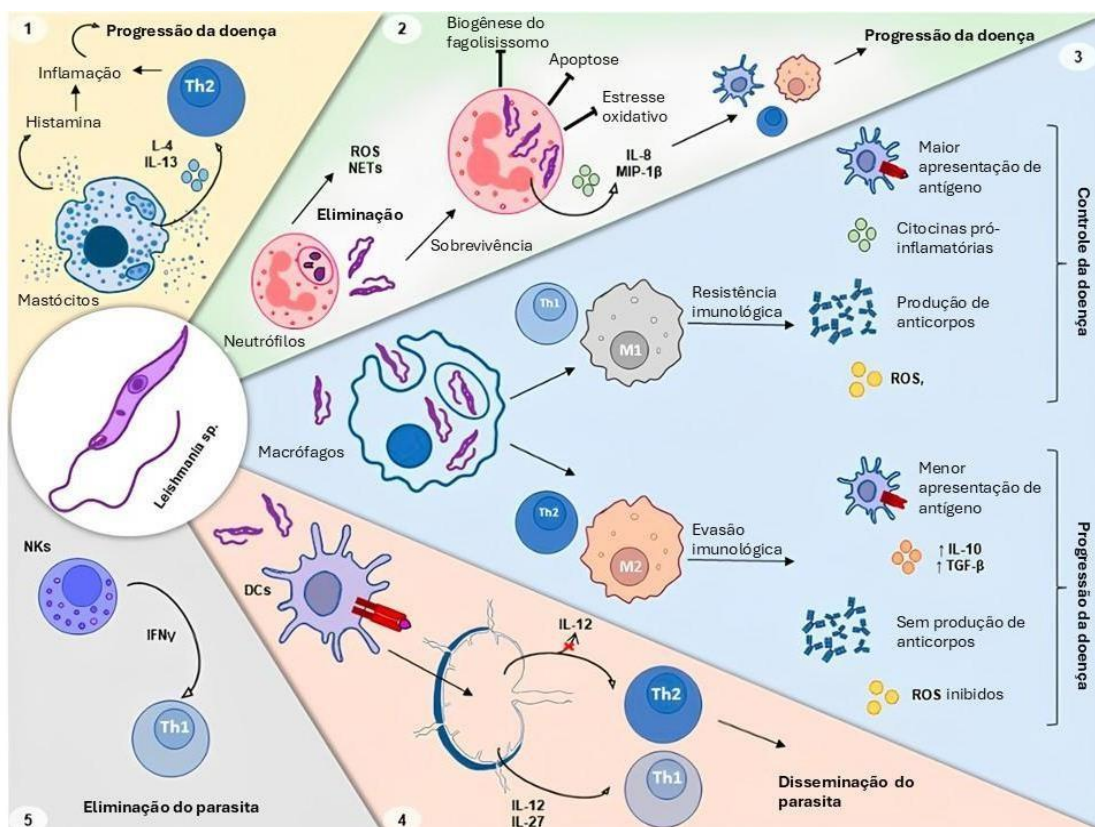


Figura 3. Impacto da infecção por *Leishmania* nas células imunes. Adaptado de COSTA-DA-SILVA *et al.*, 2022

Após a inoculação de *Leishmania* na derme, as promastigotas ativam o sistema complemento, levando à opsonização e lise de cerca de 90% dos parasitas. No entanto, alguns desenvolvem mecanismos de resistência, sendo fagocitados por diversas células. Dentro do fagolisossomo dos macrófagos, as promastigotas se transformam em amastigotas (Filho *et al.*, 2021; Von Stebut, 2007). Células residentes da derme, como macrófagos, mastócitos e células de Langerhans, expressam receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors*, PRRs), incluindo receptores do tipo Toll (do inglês *Toll-like Receptors*, TLRs). Esses receptores identificam padrões moleculares associados a patógenos (do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*, PAMPs), desencadeando a fagocitose dos microrganismos e ativando cascatas de resposta imune inata e adaptativa (Costa-Da-silva *et al.*, 2022; Pacheco-Fernandez *et al.*, 2021).

Os macrófagos são as principais células efectoras que fagocitam o parasita e combatem a infecção, ativados por células dendríticas e pela deposição de complemento. Eles podem se polarizar em dois subconjuntos: macrófagos M1, que têm alta atividade microbicida através de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e secretam citocinas pró-inflamatórias; e macrófagos M2, que produzem citocinas anti-inflamatórias, auxiliando na remodelação tecidual e resolução da inflamação (Saha *et al.*, 2017; Ty *et al.*, 2019).

Os macrófagos do fenótipo M1 desempenham um papel crucial na resposta inflamatória, caracterizada pela produção de mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral (TNF). A polarização desses macrófagos para o fenótipo M1 é induzida principalmente pelo interferon-gama (IFN- γ), um mediador inflamatório essencial produzido por células Th1 (Chen *et al.*, 2023; Murray *et al.*, 2014). Os macrófagos do fenótipo M2 possuem elevada capacidade fagocítica e são caracterizados pela produção de componentes da matriz extracelular (MEC), fatores angiogênicos, quimiotáticos e interleucina-10 (IL-10). Essas características contribuem para a promoção da proliferação celular e o reparo

tecidual, favorecendo a sobrevivência do parasita nos macrófagos (Italiani & Boraschi, 2014; C. P. Thakur et al., 2003).

Nos estágios iniciais da infecção, os neutrófilos migram pela vasculatura até o local da infecção, estes expressam receptores de reconhecimento de padrões, como TLRs, que reconhecem moléculas do parasita *Leishmania*, ativando respostas microbidas, como explosão respiratória, produção de óxido nítrico, liberação de proteínas granulares e formação de armadilhas extracelulares (do inglês, Neutrophil extracellular traps, NETs). Além disso, modulam as respostas das células T por meio da secreção de quimiocinas e citocinas (Kupani et al., 2021; Passelli et al., 2021). Os Neutrófilos, sendo as primeiras células a chegar ao local, podem apresentar um papel benéfico ou prejudicial, dependendo da espécie de *Leishmania* e do hospedeiro. A *Leishmania* pode sobreviver temporariamente dentro destas células, inibindo a formação do fagolisossomo, evitando o estresse oxidativo e retardando a apoptose das células (Hurrell et al., 2016; Laskay et al., 2003).

A resposta imune adaptativa frente a infecção depende da atuação e diferenciação das células T auxiliares após o reconhecimento dos antígenos específicos. Assim, as células T auxiliares virgens se dividem e podem se diferenciar em linfócitos Th1, Th2, Th17 dentre outras (Anversa et al., 2018; Dos-Santos et al., 2016; Suman et al., 2018).

As células T helper 1 (Th1) desempenham um papel crucial na resposta imune contra protozoários intracelulares, especialmente na eliminação de parasitas do gênero *Leishmania* presentes em macrófagos infectados. As células Th1 são caracterizadas pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , interleucinas 1, 6, 8, 12, 18 e 27, TNF- α e linfotoxina, todas as quais desempenham papéis essenciais na ativação de mecanismos imunológicos envolvidos na destruição de parasitas intracelulares (Nateghi-Rostami & Sohrabi, 2024; Ritter & Körner, 2002; Scott, 2005; Scott & Novais, 2016). Já as células de perfil Th2 são estimuladas por Interleucina-4. Os linfócitos TCD4⁺ Th2 estão associadas com a suscetibilidade a infecções por *Leishmania* devido a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Cunha et al., 2020; Gomes et al., 2017). Sendo assim, a equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 e

os mecanismos regulatórios são determinantes para o desfecho da infecção por *Leishmania* (Costa-Da-silva et al., 2022).

Diversos modelos animais experimentais, incluindo camundongos, hamsters, cães domésticos e primatas não humanos, têm sido utilizados para estudar os aspectos imunológicos da leishmaniose. Os modelos murinos tem sido amplamente utilizado nos últimos 40 anos para elucidar os tipos de células, citocinas e mecanismos efetores antileishmania necessários para o controle da doença. Embora esses modelos ofereçam a vantagem de permitir o controle genético do parasita e do hospedeiro, nenhum consegue replicar completamente a infecção humana por *Leishmania spp* (Handman, 2001; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a).

1.6 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da leishmaniose requer a integração de fatores clínicos, epidemiológicos e a aplicação de técnicas laboratoriais para a detecção do parasito. A escolha do método diagnóstico é influenciada pelas diferentes formas clínicas da doença, o estágio de evolução das lesões e a espécie de *Leishmania* envolvida (F. Bahrami et al., 2018; Boni et al., 2017). Embora o diagnóstico da leishmaniose frequentemente represente um desafio, ele pode ser realizado por meio de métodos clínicos, com confirmação direta (parasitológica) ou indireta (imunológica). No entanto, a confirmação diagnóstica nem sempre é viável em países com recursos limitados (Mann et al., 2021).

Métodos parasitológicos de diagnóstico continuam sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de leishmaniose e pode ser obtido por exame direto de amastigotas em lâminas de lesões, biópsias ou esfregaços de impressão corados com Giemsa ou hematoxilina-eosina. Amastigotas também podem ser identificadas em amostras como camada leucocitária de sangue periférico, linfonodos e biópsias de fígado (de Vries et al., 2015; Elmahallawy et al., 2014).

O teste cutâneo de Montenegro é um método amplamente utilizado no Brasil, e se baseia na reação de hipersensibilidade do tipo tardia, caracterizada por espessamento no local onde se é aplicado uma solução contendo antígenos inativados. Este método tem sido amplamente utilizado como diagnóstico complementar da leishmaniose devido à sua alta sensibilidade e especificidade,

além de apresentar baixo custo e fácil realização (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; Guedes et al., 2017).

Os testes sorológicos também podem ser utilizados para o diagnóstico da leishmaniose, destacando-se o teste de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA). Estes se baseiam na identificação de anticorpos anti-*Leishmania* no soro de pacientes, apresentando alta sensibilidade e sendo pouco invasivos, entretanto nas manifestações cutâneas a resposta humoral e a titulação de anticorpos tende a ser baixa. Estes testes são pouco utilizados em áreas endêmicas, e, além disso, reações cruzadas podem ocorrer em pacientes infectados por outros tripanossomatídeos como é o caso de *Trypanosoma cruzi* (Costa et al., 2016; Reithinger & Dujardin, 2007; S. Singh et al., 2005).

As técnicas parasitológicas e sorológicas convencionais apresentam restrições e limitações ao diagnóstico da leishmaniose, sendo assim, os métodos moleculares são recomendados devido à sua excelente precisão e velocidade. As técnicas moleculares servem como um complemento e um método alternativo de diagnóstico (de Paiva-Cavalcanti et al., 2015; S. Thakur et al., 2020). Na detecção baseada em amplificação de DNA, diversos alvos genéticos são utilizados, cuja sensibilidade varia de acordo com o número de cópias desses alvos no genoma do organismo. Técnicas como a PCR em tempo real permitem a quantificação da carga parasitária e a avaliação da resposta à terapia, sendo também úteis para identificar indivíduos assintomáticos ou detectar a infecção antes do surgimento dos sintomas. Essa abordagem é crucial para o desenvolvimento de medidas de controle efetivas (Galluzzi et al., 2018; Gow et al., 2022).

O tratamento da leishmaniose pode ser bastante desafiador, devendo ser adaptado individualmente ao paciente e com base na apresentação clínica, hospedeiro e tipo de espécie (Mann et al., 2021). Os antimoniais pentavalentes são os fármacos mais amplamente utilizados no tratamento da leishmaniose, embora sua eficácia varie entre as formas visceral e cutânea da doença. Esses compostos podem se acumular nos tecidos, levando a efeitos adversos significativos, como vômitos, náuseas, anorexia, mialgia, dor abdominal, cefaleia, artralgia e letargia, e, em casos raros, arritmias cardíacas fatais.

Atualmente, estão disponíveis duas formulações de antimoniais pentavalentes no mercado internacional: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último indisponível no Brasil (Brasil, 2017; Croft & Coombs, 2003; WHO, 2010).

A anfotericina B é considerada uma segunda opção para o tratamento de leishmaniose quando ocorre a perda de eficácia dos medicamentos antimoniais ou limitações ao seu uso. O desoxicolato de anfotericina B é normalmente usado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, entretanto, apresenta boa atividade na destruição da leishmaniose, com taxas de cura de mais de 97% para CL e VL, atuando nas formas amastigotas e promastigotas do parasita, por meio de ligação preferencial com ésteres presentes na membrana plasmática (Anversa et al., 2018; Croft & Olliaro, 2011). As diferentes formulações de anfotericina B, como lipídica, coloidal e lipossomal, foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e a biodisponibilidade. Estas formulações alternativas apresentam menor toxicidade, entretanto, apresentam limitações para uso em países em desenvolvimento, como alto custo e demanda de ambientes refrigerados para estoque (Croft & Olliaro, 2011; De Menezes et al., 2015).

Outro fármaco utilizado é a pentamidina, um derivado sintético da amidina aplicado via intravenosa ou intramuscular, atuando no DNA da *Leishmania*, impedindo sua replicação. Este medicamento é pouco utilizado devido a resistência de algumas cepas do parasito, assim como apresenta alta toxicidade, podendo desencadear efeitos adversos, como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, hipotensão, miocardite e toxicidade renal. Atualmente, a pentamidina é recomendada principalmente quando usada em protocolos terapêuticos combinados (Jain & Jain, 2013; Santiago et al., 2021; N. Singh et al., 2012).

1.7 Modelos experimentais para estudo da leishmaniose

Um modelo experimental adequado deve ser fundamentado em estudos prévios que garantam sua precisão e evidenciam suas limitações em relação à realidade. O uso de modelos experimentais permite a possibilidade de compreender a fisiologia e patogenia de diversas doenças, sendo imprescindível o respeito aos princípios éticos. Assim, os modelos experimentais são essenciais

para aprofundar o entendimento dos fenômenos naturais (Ferreira et al., 2005). Muitos aspectos imunológicos da leishmaniose têm sido estudados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, que também são utilizados na avaliação de candidatos a medicamentos e vacinas.

Os modelos *in vitro* são amplamente utilizados para estudo de potencial de compostos com ação letal direta sobre o parasita, e para triagem de processos associados à resposta imune (Gupta & Nishi, 2011). Os sistemas *in vitro* que utilizam células linfóides de camundongos inoculados com promastigotas de *L. major* conseguem reproduzir as respostas observadas *in vivo* na leishmaniose murina. Além disso, estudos *in vitro* que utilizam células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com *Leishmania* demonstram resultados semelhantes aos observados durante a infecção *in vivo* em humanos (Cohen & Azas, 2021; C. I. De Oliveira et al., 2004). Entretanto, estes modelos não replicam eventos iniciais da infecção por *Leishmania* e apresentam dificuldades para incluir o metabolismo e capturar interações entre diferentes tipos de células nos ensaios (Tice et al., 2013).

Diversos eventos da resposta imune ao parasito foram estudados em modelos animais, como camundongos e hamsters, empregados para explicar os tipos de células, citocinas e mecanismos anti leishmania para o controle de parasitas (De Moura et al., 2005). Utilizando esse modelo foi descoberto o esquema de susceptibilidade e resistência à leishmaniose, onde camundongos C57BU/6 apresentaram resistência à infecção com *L. major*, pois desenvolvem uma resposta imune celular do tipo Th1, com produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4, em contraposição a camundongos BALB/c, que exibiram suscetibilidade à infecção por *L. major*, desenvolvendo uma resposta do tipo Th2, na qual são produzidos baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4 (Gumy et al., 2004; Sacks & Noben-Trauth, 2002). O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) tem se mostrado útil para o estudo da leishmaniose cutânea causada por espécies do subgênero *Viannia* devido a sua susceptibilidade à infecção, na qual a inoculação de promastigotas é capaz de causar doença evidente, entre um e dois meses pós-inoculação. (Rey et al., 1990).

Atualmente, é consenso que tanto modelos experimentais *in vivo* quanto *in vitro* apresentam limitações quanto à replicação da biologia humana, pois vários

fatores influenciam a resistência ou suscetibilidade à leishmaniose, incluindo características genéticas do hospedeiro, dos parasitas, diferenças entre espécies e cepas, além de fatores causais, como tamanho do inóculo e número de picadas infecciosas (Dunning, 2009). Nos modelos animais, apesar da conservação de alguns loci no genoma, existem diferenças significativas entre camundongos e humanos no desenvolvimento do sistema imunológico inato e adaptativo, ativação e resposta ao desafio (Mestas & Hughes, 2004).

2. Modelo de Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana (hOSEC)

2.1 A pele e sua estrutura

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 15% do peso corporal total e abrangendo uma área de superfície entre 1,5 e 2 m². Este órgão integra diversos sistemas de suporte fundamentais, incluindo vascularização, inervação, musculatura, imunocompetência e funções endócrinas, desempenhando um papel essencial na manutenção da homeostase cutânea e dos seus anexos. Além disso, a pele exerce múltiplas funções, funcionando como uma interface dinâmica entre o meio interno e o externo, e constitui a primeira linha de defesa do organismo. A pele é constituída de três camadas, a mais externa é a epiderme, que é fixada e sustentada pelo tecido conjuntivo na derme subjacente. Abaixo da derme há a hipoderme, que geralmente contém gordura abundante. (JUNQUEIRA, 2017; Lai-Cheong & McGrath, 2021; Tobin, 2017; WELLER, 2008).

A epiderme desempenha a função primordial de proteger a pele contra ameaças ambientais potencialmente prejudiciais, atuando como uma barreira física, química, antimicrobiana e imunológica, tanto inata quanto adaptativa. Sua estrutura celular é composta por queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, que contribuem de maneira integrada para essas funções de defesa e homeostase (Baroni et al., 2012; Wickett & Visscher, 2006; Yousef et al., 2020). A derme é a camada de tecido conjuntivo localizada entre a epiderme e o tecido subcutâneo, desempenhando funções estruturais e nutricionais para a epiderme. Composta principalmente por colágeno e fibras elásticas, a derme apresenta uma rica vascularização e abriga vasos linfáticos,

terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas. Essa camada é composta por componentes intersticiais, como fibras colágenas e tecido elástico, e celulares, como fibroblastos, mastócitos, plasmócitos, linfócitos, células dendríticas dérmicas e histiócitos (Baroni et al., 2012; Lai-Cheong & McGrath, 2021; WELLER, 2008).

2.2 A imunidade da pele

A pele atua como uma barreira essencial contra invasores externos, utilizando barreiras físicas, biomoléculas e uma rede de células imunes e não imunes residentes. Essas células, incluindo subconjuntos mieloides e linfoides, mantêm a homeostase tecidual e funcionam como sentinelas (Nguyen & Soulika, 2019). Na epiderme, os queratinócitos desempenham um papel ativo no sistema imunológico inato. Eles expressam diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e produzem uma ampla gama de citocinas em resposta à inflamação. Essas citocinas são fundamentais tanto para a ativação de células imunes residentes quanto para o recrutamento de células imunes para a pele (Kabashima et al., 2019; Nestle et al., 2009).

As células mieloides da pele, como células de Langerhans, dendríticas dérmicas, macrófagos, mastócitos e eosinófilos, desempenham papéis essenciais na resposta imune, produzindo mediadores pró-inflamatórios que ativam células vizinhas e recrutam células imunes periféricas. Além disso, essas células atuam como um elo entre os sistemas imunológico inato e adaptativo (Nguyen & Soulika, 2019).

As células de Langerhans, pertencentes à família de células dendríticas e macrófagos, são fundamentais na resposta imune inata e adaptativa. Localizadas na epiderme, elas detectam proteínas estranhas e modulam a resposta imune. Em condições normais, promovem a ativação de células T reguladoras, contribuindo para a homeostase. Sendo migratórias, as células de Langerhans transitam para os linfonodos drenantes da pele, onde induzem tolerância ou iniciam respostas imunes adaptativas conforme necessário (Clayton et al., 2017; Ghigo et al., 2013; Seneschal et al., 2012).

As células dendríticas dérmicas são apresentadoras de antígenos altamente eficientes localizadas na derme. Semelhantes às células de

Langerhans, as células dendríticas dérmicas migram para os linfonodos, onde desempenham um papel crucial na indução de respostas imunes adaptativas. Como principal população imunocompetente da pele, elas monitoram os tecidos periféricos, promovendo tolerância ou iniciando respostas imunes. Ao reconhecer patógenos, elas se ativam, amadurecem e migram para os linfonodos, desencadeando uma resposta coordenada para eliminar o material antigênico, atuando como uma linha de frente da defesa imunológica cutânea (Guttman-Yassky et al., 2019; Hain et al., 2019; Toebak et al., 2009).

Os macrófagos desempenham funções essenciais tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. Essas células fazem parte de um grupo dinâmico que sofre modificações fenotípicas, expressando uma variedade de receptores, moléculas co estimulatórias e citocinas que modulam respostas imunológicas, podendo induzir respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Os macrófagos residentes atuam na vigilância tecidual, realizando a detecção precoce de antígenos que penetram o corpo através da derme, com capacidade de migrar para os linfonodos em resposta a estímulos. A função efetora dos macrófagos pode ser classificada em dois perfis principais: os macrófagos "M1", que são pró-inflamatórios, e os macrófagos "M2", que possuem características anti-inflamatórias ou pró-reparadoras. Os macrófagos M1 expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e secretam citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Por outro lado, os macrófagos M2 estão envolvidos em processos pró-fibróticos, sendo caracterizados pela produção de TGF- β (Gordon, 2003; Mills, 2015; Nguyen & Soulika, 2019; Pasparakis et al., 2014).

2.3 Modelo de pele *ex vivo*

Para investigar critérios dermatológicos, como a fisiopatologia de doenças, os processos de cicatrização e a avaliação de fármacos, diversos modelos experimentais têm sido amplamente utilizados. Entretanto, nas últimas décadas, tem havido um aumento na contestação ética e científica ao uso de animais em pesquisas experimentais. Na década de 1950, Charles Hume, fundador da Federação Universitária de Bem-Estar Animal, introduziu o conceito dos "3Rs" (Redução, Refinamento e Substituição). Esse princípio visa reduzir o número de animais utilizados, minimizar a dor e o desconforto durante os experimentos e incentivar o desenvolvimento de métodos alternativos para

substituir o uso de animais em pesquisas científicas (Andersen & Winter, 2019; N. & I.J., 2012).

O uso de modelos de explantes de pele tem se expandido significativamente como ferramentas valiosas para o estudo de processos como a cicatrização de feridas, inflamações, doenças autoimunes e ensaios de triagem. Devido à sua fácil obtenção, os explantes de pele apresentam grande potencial para pesquisas dermatológicas (Alencar-Silva et al., 2019, 2023; Masson-Meyers et al., 2020). Modelos de explante de pele consistem em cultivar pequenos fragmentos de pele humana saudável, advindo de cirurgias plásticas, em meio artificial por meios de culturas específicos que contém nutrientes para crescimento e proliferação, além de condições ótimas de temperatura e oxigenação, sendo um método de baixo custo e com maior facilidade de obtenção. Podem ser de espessura total (epiderme, derme e hipoderme) ou parcial (epiderme e derme), proveniente de doadores saudáveis (Companjen et al., 2001; Jacobs et al., 2006; Lebonvallet et al., 2010).

O modelo hOSEC (human organotypic skin explanted culture) apresenta uma grande aproximação à pele humana *in vivo*, configurando-se como um modelo tridimensional composto integralmente por melanócitos, células de Langerhans, queratinócitos, fibroblastos dérmicos, glicosaminoglicanos e colágeno. Essa estrutura reproduz de maneira fiel a complexidade da pele humana, tornando-o ideal para testes laboratoriais. Um dos principais benefícios desse modelo é sua imunocompetência, pela presença de células imunológicas residentes na pele explantada, o que aumenta sua precisão e a relevância nas pesquisas. Essas características são fundamentais para diferenciá-lo de outros modelos tridimensionais (Andrade et al., 2015; Bergers et al., 2016; Frade et al., 2015; Pérez-Salas et al., 2023).

O modelo hOSEC tem sido amplamente utilizado em diversas pesquisas, incluindo a avaliação do perfil de distribuição cutânea de fármacos (Leite et al., 2021), a análise dos danos induzidos por UVB (Khalil, 2018), estudos de toxicidade e dermatocinética do Ibrutinib (IBR) para o tratamento de melanoma (Souto-Silva et al., 2024), além de investigações sobre migração celular, dermatite de contato alérgica e toxicidade (Jacobs et al., 2004). Os explantes de pele têm sido um modelo interessante para o estudo de cicatrização de feridas,

processos inflamatórios, transformação maligna, estresse e testes de triagem, assim apresentando grande potencial em pesquisas dermatológicas sobre respostas teciduais e celulares. Esses estudos destacam a versatilidade e a utilidade do modelo em uma ampla gama de doenças e processos dermatológicos (Frade et al., 2015; Lebonvallet et al., 2010).

II. Justificativa

Os avanços na dermatologia têm se beneficiado significativamente dos estudos realizados com modelos *in vitro* e animais. Contudo, esses modelos não reproduzem com precisão a fisiologia da pele humana frente a patógenos e doenças cutâneas. Alternativamente, a epiderme humana reconstruída e os equivalentes de pele mais complexos têm sido amplamente utilizados para investigar condições dermatológicas e a segurança de novos produtos. No entanto, esses modelos também apresentam limitações, como a ausência de diversos tipos celulares e componentes da matriz extracelular presentes na pele nativa. Nesse contexto, o modelo de pele humana *ex vivo* oferece um ambiente mais próximo das condições *in vivo* e apresenta um crescente espectro de aplicações (Atwood & Plikus, 2021; Hofmann et al., 2023; Wurbs et al., 2024).

Embora os estudos sobre a imunobiologia da leishmaniose tenham gerado um considerável acúmulo de conhecimento, ainda não se alcançou uma compreensão completa dos fatores iniciais da interação parasito-hospedeiro responsáveis por controlar e regular o desenvolvimento e a manutenção da imunidade (Okwor et al., 2012). Diversos sistemas *in vitro* e *in vivo* têm sido empregados em pesquisas sobre *Leishmania*. Apesar das vantagens desses modelos experimentais, como o controle genético do parasita e do hospedeiro, nenhum é capaz de replicar com precisão os resultados da infecção humana por *Leishmania sp.* (Handman, 2001). Nesse contexto, o modelo de pele humana *ex vivo* surge como uma abordagem inovadora e promissora. Evidências de pesquisas em diferentes áreas demonstram que esse modelo tem se consolidado como uma alternativa relevante à substituição do uso de animais, oferecendo resultados satisfatórios e confiáveis (Eberlin et al., 2020). Assim, o estabelecimento do modelo de pele humana *ex vivo* (hOSEC) para o estudo das leishmanioses mostra-se de grande relevância.

III. Objetivos

1. Objetivo geral

Estabelecer o uso de hOSEC como modelo experimental para o estudo da infecção por *Leishmania braziliensis*.

2. Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade de hOSEC em diferentes tempos de cultivo;
- Caracterizar a população de células imunes nas amostras de hOSEC;
- Padronizar a infecção de hOSEC com *Leishmania braziliensis*;
- Observar a presença das formas promastigotas e amastigotas no tecido;
- Monitorar a parasitemia ao longo dos dias de cultivo;
- Avaliar as alterações teciduais e a expressão de citocinas nas amostras após a infecção.

IV. Métodos

1. Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana

Os procedimentos deste estudo foram previamente aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Protocolo nº 30175020.0.0000.5558).

Explantos de pele foram obtidos de pacientes submetidos à abdominoplastia que assinaram o termo de consentimento. Após a desinfecção da pele, foram cortados fragmentos cilíndricos de 8 mm de diâmetro e aproximadamente 5 mm de profundidade, utilizando um punch dermatológico. Os fragmentos foram posicionados sobre uma grade metálica estéril em placas de 6 poços, mantendo a derme em contato com o meio de cultura e a epiderme em contato com o ar. Os fragmentos foram cultivados em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco®) suplementado com 10% v.v. de soro fetal bovino (SFB) (Nova Biotecnologia) e 100 U/ml de penicilina/estreptomicina (Gibco®) e incubados a 37°C, 95% de umidade e 5% CO₂ (LEITE et al., 2021). As trocas de meio de cultura foram realizadas a cada 2 dias, retirando-se 50% do volume de meio antigo e adicionando-se o mesmo volume de meio fresco. Os fragmentos foram cultivados nos tempos experimentais de 0, 1, 3, 5 e 7 dias, exceto nos ensaios de viabilidade tecidual, em que os fragmentos foram cultivados nos tempos de 0, 7, 14 e 21 dias. O cultivo e coleta para análises subsequentes estão ilustrados na figura 4.

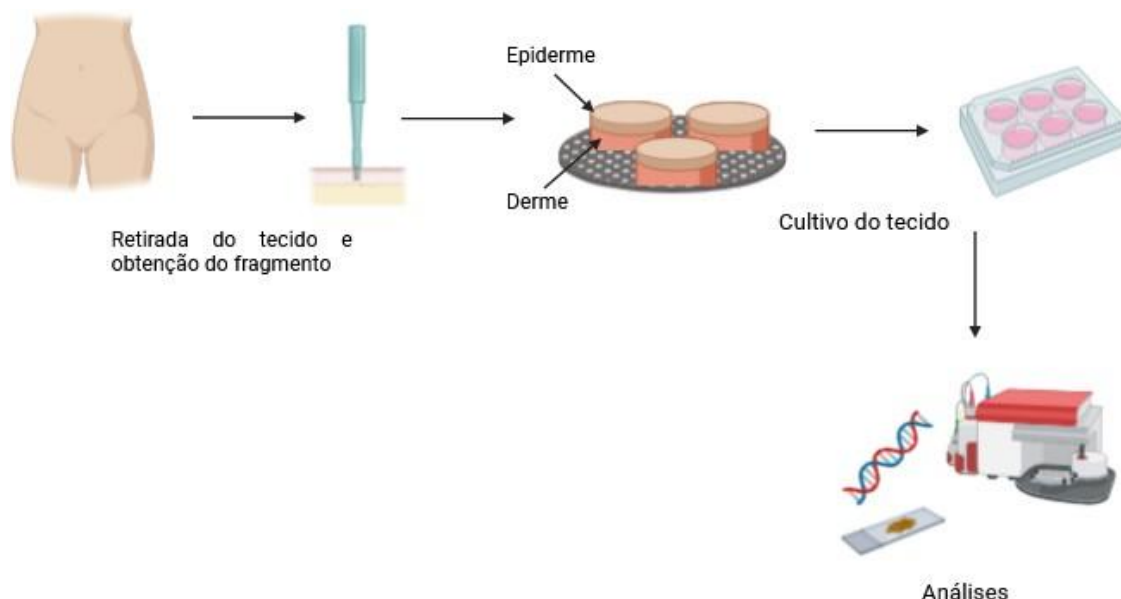


Figura 4: Esquema de obtenção e cultivo dos fragmentos de pele *ex vivo*.

2. Cultivo de *Leishmania braziliensis*

Cultivos de formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (IOCC566), gentilmente cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz em abril de 2024, foram realizados em meio de cultura Schneider® (Sigma S9895) suplementado com 1% de antibiótico Penicilina-Estreptomicina 100X (Gibco®) e 10% v.v. de SFB, e mantidos à temperatura ambiente. Os parasitos foram mantidos em cultivo até a realização dos experimentos de infecção, com manutenção e expansão da cultura sendo realizada 1 vez por semana. Para acompanhar a proliferação, amostras foram coletadas e os parasitos contados utilizando-se uma câmara de Neubauer.

Para congelamento, avaliou-se a viabilidade dos parasitas utilizando um microscópio óptico. Para cada criotubo, foram contadas entre 3 e 6 x 10⁶ promastigotas. O meio de cultura contendo *Leishmania braziliensis* foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugado a 5000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 1,5 mL de solução de congelamento, composta por 82 µL de PBS 1x, 18 µL de glicerina e 40 mg de gentamicina, para cada criotubo. A suspensão foi homogeneizada e, em seguida, transferida para o criotubo. O criotubo foi mantido inicialmente em um freezer a -20°C por 1 hora.

Posteriormente, as amostras foram transferidas para armazenamento definitivo em freezer a -80°C.

3. Avaliação de contaminação por micoplasma

Para verificação da ausência de contaminação por bactérias micoplasmas nos cultivos teciduais e dos parasitos, foi realizado o isolamento de DNA das amostras, tanto da cultura de parasitas quanto o meio de cultura de hOSEC, utilizando-se o kit de extração de DNA *Mini Spin* (Kasvi), de acordo com as instruções do fabricante, o sobrenadante foi lisado, o DNA foi filtrado e lavado duas vezes, e posteriormente ressuspendido em 30µl de água RNAfree. A determinação absoluta foi realizada através da reação em cadeia da DNA polimerase quantitativa (do inglês, *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) utilizando-se primers direcionados a região 16S rRNA, com as seguintes sequências: GPO-3 - 5' GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT 3' e MGSO - 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTTACCCTC 3'. As condições de amplificação foram: 1 min a 60 °C, 5 min a 95 °C e 40 ciclos nas condições de 30 seg a 90 °C, 30 seg a 55 °C e 1 min a 70 °C. Para determinação de positividade da amostra, foram considerados valores de Ct (cycle threshold) iguais ou menores a 36, sendo que amostras com Ct acima deste valor ou com resultado indeterminado foram consideradas negativas. A avaliação foi realizada mensalmente.

4. Ensaio de metabolização de cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC)

Para avaliar a viabilidade dos modelos hOSEC, foi utilizado um método colorimétrico de metabolização do cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC). O ensaio serve como um indicador do estado metabólico do tecido, distinguindo partes metabolicamente ativas e inativas (Vostálová et al., 2018). O método de coloração com TTC identifica células viáveis por meio de uma reação que depende de uma cadeia respiratória funcional e do potencial de membrana mitocondrial, resultando em coloração avermelhada. Células danificadas permanecem incolores, permitindo a análise quantitativa da viabilidade celular e tecidual (Schiffner et al., 2017).

Para determinar o tempo máximo de cultivo do explante, foram cultivados fragmentos em triplicatas técnicas (fragmentos independentes derivados da

mesma amostra biológica, cultivados no mesmo poço da placa) e biológicas (amostras derivadas de doadores diferentes) nos tempos experimentais de 0, 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo. Após os determinados períodos de cultivo, os fragmentos foram processados conforme (Vostálová et al., 2018). Brevemente, os fragmentos foram transferidos para uma placa de 24 poços, sendo um fragmento por poço. Em seguida, foi adicionado a cada poço 1 mL de solução de TTC a 2% p.v., diluída em meio DMEM sem vermelho de fenol. A placa foi incubada novamente por 2 horas a 37°C. Após o tempo de incubação, os fragmentos foram lavados com PBS e em seguida foi acrescentado 1mL de uma mistura de etanol 70% e solução de DMSO (1:1, v/v). A extração foi realizada durante a noite, à temperatura ambiente, em agitador de placas protegido da luz. Posteriormente, amostras de 200 µL foram retiradas de cada poço e transferidas para uma placa de 96 poços, onde a absorbância foi medida a 485 nm, utilizando-se o espectrofotômetro (Synergy™ HTX).

5. Avaliação histológica da viabilidade tecidual do modelo hOSEC

Após os diferentes períodos de cultivo, os fragmentos de pele foram fixados em formol a 10% e armazenados em álcool 70% até o envio ao laboratório de Patologia para inclusão em parafina e produção de cortes histológicos. Para tanto, as amostras foram desidratadas em banhos de etanol de grau crescente de concentração e clarificados com xileno antes de serem incluídos em parafina, seccionados em cortes de 5 µm e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). Imagens dos cortes histológicos foram obtidas utilizando o microscópio Olympus BX51 (Olympus System Microscopes).

As avaliações estruturais dos hOSEC foram realizadas por uma patologista que desconhecia os grupos experimentais, garantindo imparcialidade nas análises, conforme descrito por Matarrese et al., 2021. Foram avaliados e quantificados de maneira semi-quantitativa critérios como: espongiose (edema intercelular), acantólise, vesículas, edema, necrose de células da epiderme (intensa eosinofilia celular), edema Perinuclear (epiderme), edema intranuclear, picnose nuclear, separação junção dermo-epidérmica/ células Basais não conectadas, exocitose e células inflamatórias na derme. Esses critérios formam julgados de acordo com os escores da tabela 1.

Tabela 1. Escore e classificação dos achados histológicos

Escore	Classificação
0	Ausente
1	Raro
2	Discreto
3	Moderado
4	Intenso

6. Avaliação da população de células imunes por meio de imuno-histoquímica

A etapa de imunodeteção foi realizada pelo LIB, laboratório parceiro do grupo de pesquisa. Para realizar a imuno-histoquímica (IHQ), os tecidos foram inicialmente seccionados em cortes finos e desidratados em soluções de álcool com concentração crescente. As amostras foram então incubadas em solução de bloqueio (1% de albumina sérica bovina) por 10-30 minutos. Em seguida, os anticorpos citoqueratinas, proteína S-100, CD56, CD138, CD8 e CD68 foram diluídos na solução de bloqueio e as amostras foram incubadas por 1-2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram lavadas com PBS para remover o excesso de anticorpo primário e incubadas com o anticorpo secundário (conjugado com peroxidase) por 30-60 minutos à temperatura ambiente. Após incubação com a solução de substrato cromogênico por alguns minutos, as amostras foram lavadas com água para interromper a reação. Por fim, as lâminas foram montadas e examinadas por um patologista que desconhecia os grupos experimentais (Deaver, 1995).

7. Infecção do modelo *hOSEC* com *L. braziliensis*

Primeiramente, verificou-se a viabilidade de formas promastigotas de *L. braziliensis* por meio da observação de sua motilidade após serem coradas com azul de tripan 0,4% em solução salina tamponada com fosfato (PBS). Depois, foi feita a concentração dos parasitos, por meio de centrifugação a 2200 G por 15 min e pellet ressuscitado em 1 mL de meio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI) (Sigma - Aldrich) suplementado com 10% de SFB, e contagem em câmara de Neubauer.

Após a contagem de parasitos viáveis, os explantes de pele foram divididos em grupo controle não infectado e grupo infectado. A inoculação intradérmica

dos fragmentos do grupo infectado foi realizada utilizando-se seringa para insulina (BD Ultra-Fine II 0,3 ml 8 x 0,3 mm) com o auxílio de uma agulha com 8 mm de comprimento e 0,30 mm de calibre (30G).

Nas etapas de otimização do protocolo, os hOSEC foram mantidos sem infecção durante o período de cultivo (amostras controle), ou infectados com diferentes cargas parasitárias, especificamente: 10.000, 100.000 ou 1.000.000 parasitas inoculados em cada injeção feita nos fragmentos de pele. Para que os parasitos se distribuíssem por todo o fragmento de pele, 3 injeções foram realizadas por fragmento, conforme ilustrado na Figura 5. Desta forma, durante a otimização do protocolo de infecção, cada fragmento de pele recebeu 3×10^4 , 3×10^5 , ou 3×10^7 parasitos no total, sempre em volume de 5 μ l. Este método foi adaptado de de Paula et al., 2024 e Reuter et al., 2023).

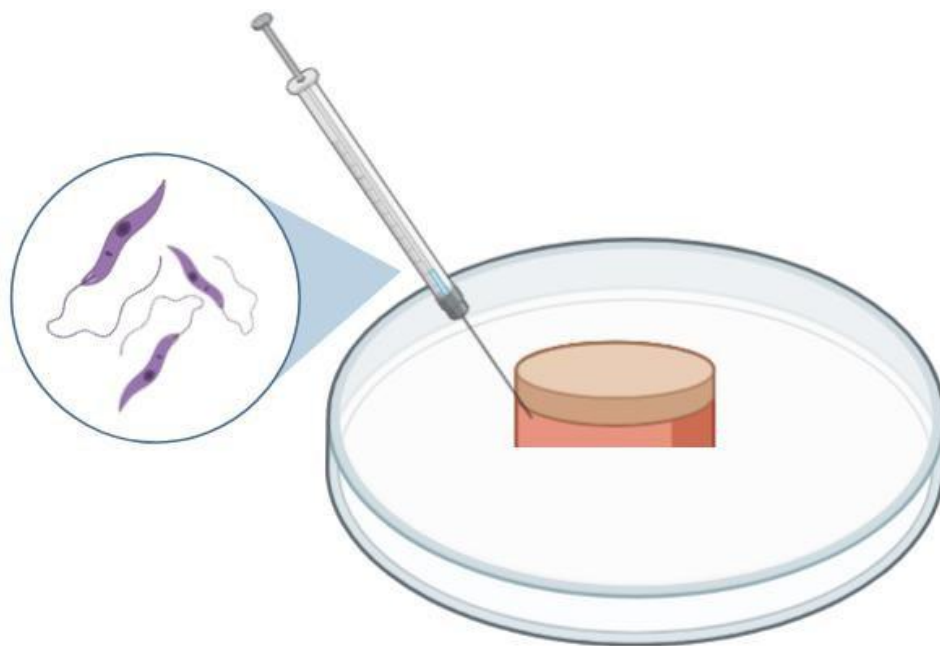


Figura 5: Ilustração da infecção de hOSEC com *Leishmania braziliensis*.

Após a padronização e escolha da carga parasitária total de 3×10^5 parasitos, esta quantidade de promastigotas foi inoculada em cada hOSEC por meio de 3 injeções intradérmicas de 5 μ l de meio de cultura contendo 10^5 promastigotas cada. Os hOSEC controle e infectados foram mantidos em cultura até a realização dos experimentos que ocorreram aos 0 (i.e. 2 hs), 1 (i.e. 24 hs), 3 (i.e. 72 hs), 5 (i.e. 120 hs) e 7 (i.e. 168 hs) dias pós infecção.

A cada troca de meio, o sobrenadante dos hOSEC foi coletado, centrifugado a 180 G por 5 min, filtrado em filtro de 0,22 µm (Kasvi), e armazenado a -80°C até utilização para determinação da concentração de citocinas.

Após os determinados tempos de cultivo pós infecção, os hOSEC foram processados para análises, da seguinte forma: 2 replicatas técnicas (i.e. dois fragmentos originados do mesmo doador) dedicadas a análises moleculares, 1 replicata dedicado a avaliação histológica e análises de microscopia eletrônica de varredura.

Os fragmentos usados para isolamento de DNA foram cortados em fragmentos menores com o uso de bisturi e armazenados em RNA/later™ Stabilization Solution (Invitrogen™) a 4°C *overnight* e posteriormente a -80°C até processamento subsequente. O fragmento processado para análise histológica foi fixado e armazenado como descrito previamente. O fragmento utilizado para análises de microscopia eletrônica foi incubado inicialmente em 200 µl de solução de Karnovsky (2% de aldeído glutárico; 2% de paraformaldeído; cloreto de cálcio a 1,5 mM em tampão cacodilato a 0,01 M; pH 7,2-7,4) *overnight* e posteriormente em 200 µl de tampão cacodilato de sódio [Na (CH₃)₂ AsO₂ – 3H₂O] e armazenado a 4°C até visualização em microscopia eletrônica de varredura (MEV).

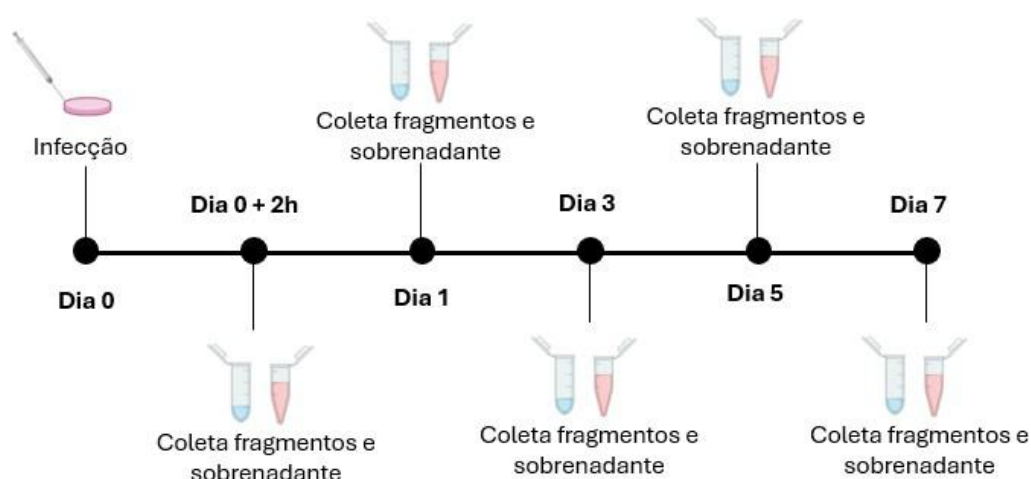


Figura 6. Linha do tempo de infecção de hOSEC com *Leishmania braziliensis* e avaliações subsequentes.

8. Verificação da infecção

a. Extração de DNA

Para verificação e acompanhamento da infecção, foi realizado o isolamento de DNA genômico das amostras, utilizando-se o kit de extração de DNA *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen™) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Em resumo, foram utilizados 50 mg de tecido para a obtenção do DNA genômico. As amostras ficaram de quatro a cinco horas no banho-maria, passaram por duas etapas de lavagem e eluição do DNA extraído em 50 µL de tampão de eluição. Após as extrações, foi feita a quantificação da concentração do DNA por meio de espectrofotometria utilizando o equipamento *NanoVue Plus®* (GE Healthcare Life Science) com 3 µL de cada amostra. A qualidade e a pureza do DNA foram analisadas através da avaliação da relação da absorbância da luz UV no comprimento de onda 260/280 nm. Em seguida, o DNA foi armazenado a -20°C até utilização nas reações de qPCR.

b. Avaliação da carga parasitária por meio de qPCR

A determinação da carga parasitária absoluta foi realizada através de qPCR utilizando iniciadores direcionados a região Espaço Transcrito Interno 1 (do inglês, *Internal Transcribed Spacer*, ITS1) com os primers: LITSR-5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S-5'TGATACCACTTATCGCACTT 3' (Davila & Momen, 2000).

Em cada reação, utilizou-se 50 ng de DNA, 0,2 µM de cada iniciador, 10 µL de *LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™* (Sigma-Aldrich), em um volume final de 20 µL. As qPCRs foram realizadas em placas de 96 poços (*Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®*), em triplicata, no termociclador *7500 Real-time PCR System* (Applied Biosystems), nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50 °C, 10 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos nas condições de 15 seg a 94 °C, 40 seg a 53 °C e 10 seg a 72 °C. Em todas as reações foram inclusos 2 controles negativos (amostras sem DNA) e 2 controles positivos (DNA extraído de culturas de *L. braziliensis*).

A curva padrão para quantificação da carga parasitária absoluta de *Leishmania* sp. foi realizada com diferentes concentrações de DNA de

Leishmania braziliensis em diluições seriadas (1:10) para obter amostras contendo 10^6 a 10 par./mL. A eficiência da curva padrão foi de 97,5% e o R^2 de 0,99.

c. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Inicialmente, as amostras foram submetidas à prefixação em solução de Karnovsky por um período de 24 horas e posteriormente armazenadas em tampão CaCo a 4°C. Após essa etapa, realizou-se a criofratura, que consistiu na infiltração das amostras em soluções de glicerol em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. As concentrações utilizadas foram de 15% de glicerol, incubadas à temperatura ambiente, seguidas por 30% de glicerol overnight a 4°C. Posteriormente, as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e fraturadas com lâminas, permitindo a separação dos folhetos das membranas biológicas. Após a criofratura, as amostras passaram por pós-fixação em tetróxido de ósmio a 2% durante 1 hora, realizado em capela química. As amostras foram então lavadas duas vezes com água destilada.

A desidratação foi realizada em séries crescentes de acetona, as concentrações empregadas foram 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com cada etapa durando 15 minutos. Após a desidratação, as amostras foram submetidas à secagem no ponto crítico utilizando CO₂. Nesse processo, o equipamento foi programado para operar entre 4°C e 37°C, com lavagens em CO₂ líquido realizadas três vezes. O CO₂ líquido foi então evaporado gradualmente com o aumento da temperatura, minimizando a tensão superficial sobre as amostras. Em seguida, as amostras foram montadas em suportes metálicos (stubs) utilizando fita de carbono para assegurar a condução de elétrons durante a análise. Finalmente, foi realizada a metalização, aplicando-se uma camada de 10 nm de ouro ou platina na superfície das amostras, proporcionando uma superfície condutora ideal para observação no MEV. Após a preparação, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura para obtenção de imagens detalhadas e dados estruturais.

9. Avaliação das alterações histológicas e presença dos parasitos após a infecção por *L. braziliensis*.

Após os diferentes períodos de cultivo, os fragmentos de pele foram fixados em formol a 10% até o envio ao laboratório de Patologia para inclusão em parafina e produção de cortes histológicos como descritos no item 4b. O exame histológico foi realizado por um patologista experiente, que classificou o infiltrado inflamatório conforme a intensidade e a composição celular. A análise incluiu a identificação de células mononucleadas, como linfócitos e macrófagos, bem como a avaliação da presença de parasitas tanto extra quanto intracelulares. Além disso, a viabilidade dos parasitas foi estimada com base em critérios morfológicos, como integridade da membrana celular e preservação do citoplasma.

10. Avaliação da produção de citocinas em modelo hOSEC infectado por *L. braziliensis*

Citocinas pertencentes aos perfis Th1 (INF- γ , IL-2, TNF- α) e Th2 (IL-6, IL-4, IL-10) foram dosadas por citometria de fluxo nas amostras de meio de cultura condicionado dos hOSEC dos grupos controle e infectado coletadas nos dias experimentais definidos. Para isso, foi utilizado o kit comercial Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, após o descongelamento das amostras de sobrenadantes de cultura armazenados em -20°C, 50 μ L das amostras foram adicionados a um tubo eppendorf contendo 10 μ L de solução das *beads* de captura revestidas com anticorpos monoclonais específicos para cada citocina. Em seguida, foram acrescentados 50 μ L do reagente de detecção, composto por anticorpos monoclonais específicos para as citocinas a serem testadas, conjugados com ficoeritrina. Após incubação de 3 hs à temperatura ambiente, protegida da luz, adicionou-se 1 mL de tampão de lavagem a cada amostra, seguido de centrifugação a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 300 μ L de tampão de lavagem. A quantificação em pg/mL de cada citocina foi baseada em uma curva de calibração realizada com diluições conhecidas de cada citocina (0; 20; 40; 80; 156; 312,5; 625; 1250; 2500 e 5000 pg/mL). A intensidade de fluorescência em cada amostra foi capturada

no citômetro de fluxo BD *Accuri™* C6 Flow Cytometer usando o programa DIVA versão 7 (BD Bioscience). Os dados de fluorescência foram processados usando o programa FCAP array versão 3 (BD Bioscience).

11. Análises estatísticas

Os dados da análise histológica foram analisados qualitativamente. Os demais resultados foram analisados quantitativamente. Os dados coletados foram submetidos à análise de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. e apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) ou erro padrão. As variáveis viabilidade, carga parasitária e viabilidade tecidual foram analisadas por ONE-WAY ANOVA, já a análise de citocinas foi realizada TWO-WAY ANOVA, posteriormente foram realizados os testes post hoc de Tukey. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

V. Resultados

1. Otimização do cultivo de hOSEC

A cultura de explantes de pele foi previamente descrita pelo grupo de pesquisa para estudo de permeação e ação do Ibrutinibe (Alencar-Silva et al., 2024; Souto-Silva et al., 2024), assim como em estudos do potencial regenerativo de peptídeos (Alencar-Silva et al., 2019, 2023). Neste estudo foram realizados ajustes para a padronização do uso de hOSEC para infecção com *Leishmania braziliensis*. As amostras derivaram majoritariamente de pessoas do sexo feminino e de idade de 35 a 48 anos (Tabela 2).

Tabela 2. Sexo e idade dos doadores

Sexo	Idade
Feminino	35
Feminino	56
Feminino	42
Feminino	49
Feminino	48
Feminino	58

A princípio, para a cultura de hOSEC, a pele obtida era cortada em fragmentos de 6 mm de diâmetro. Após testes iniciais, concluiu-se que para a finalidade deste experimento os fragmentos deveriam ser maiores, assim viabilizando a infecção e análises subsequentes. Diante desta mudança de tamanho no fragmento de pele *ex vivo* (de fragmentos de 6 para 8 mm de diâmetro), foram feitos ajustes no volume de meio de cultura adicionado a cada poço (de 3 ml para 4 ml), assim como a frequência de troca de meio, de três para um intervalo de 2 dias. Ademais, avaliou-se se seria possível manter os hOSEC por período superior a 7 dias de cultivo.

As alterações de protocolo tornaram necessária a avaliação da viabilidade de hOSEC ao longo do período experimental, realizada por meio de avaliação histológica e avaliação metabólica pelo ensaio de TTC. O TTC é considerado o melhor teste para esse tipo de avaliação, sendo mais adequado e sensível para a demonstração de danos no tecido de uma forma claramente visual e

quantitativa, sendo preferível para testes de viabilidade em vez de outros ensaios (Vostálová et al., 2018). Os fragmentos foram cultivados durante 21 dias, e sua viabilidade foi analisada semanalmente. Durante os primeiros 7 dias de cultivo, a pele não perdeu viabilidade metabólica, não apresentando diferença estatística entre os dias 0 e 7. Entretanto, a análise da viabilidade do modelo hOSEC ao longo dos demais períodos de cultivo revelou uma redução de 46,47% após 14 dias, quando comparada ao dia 0 ($p < 0,05$). Este declínio também foi observado após 21 dias de cultivo, quando comparado com os dias 0 e 7, com uma redução média de 54,45% ($p < 0,05$) (Figura 7). Os resultados indicam que, apesar de o modelo manter características metabólicas nos primeiros dias de cultura, sua viabilidade começa a ser comprometida com o passar do tempo, especialmente após duas semanas. Desta forma, a avaliação da viabilidade tecidual por meio de avaliação histológica foi realizada apenas até o sétimo dia de cultivo.

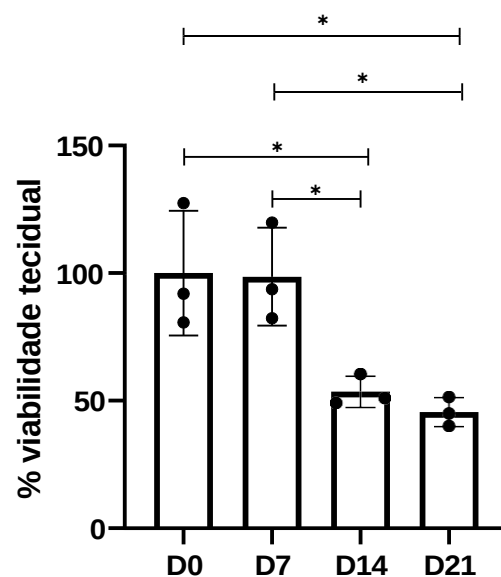


Figura 7. Avaliação da viabilidade de hOSEC em cultivo. Culturas de explantes de pele humana foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, durante o período de 21 dias. A viabilidade foi avaliada por meio do teste de TTC em intervalos de 7 dias. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Resultado referente a três replicatas biológicas realizadas em triplicatas técnicas. * $p < 0,05$.

As análises histológicas do modelo hOSEC ao longo dos diferentes períodos de cultivo também revelaram danos celulares progressivos. Em todos

os períodos avaliados, células inflamatórias mononucleares foram detectadas de maneira discreta. Ademais, não foram identificadas alterações como edema intercelular ou lesões celulares, indicando a ausência dessas lesões específicas ao longo de todo o período de cultivo. Por outro lado, edema perinuclear na epiderme foi identificado de forma discreta nos dias 0, 1, 3 e 5 (Figura 8), intensificando-se para um grau moderado no dia 7 (Figura 8E). Alterações importantes, como a separação na junção dermoepidérmica e a desconexão das células basais, também foram observadas no dia 7 de cultivo (Figura 8F). Estas avaliações foram avaliadas de maneira semi-quantitativa, como mostrado na tabela 3.

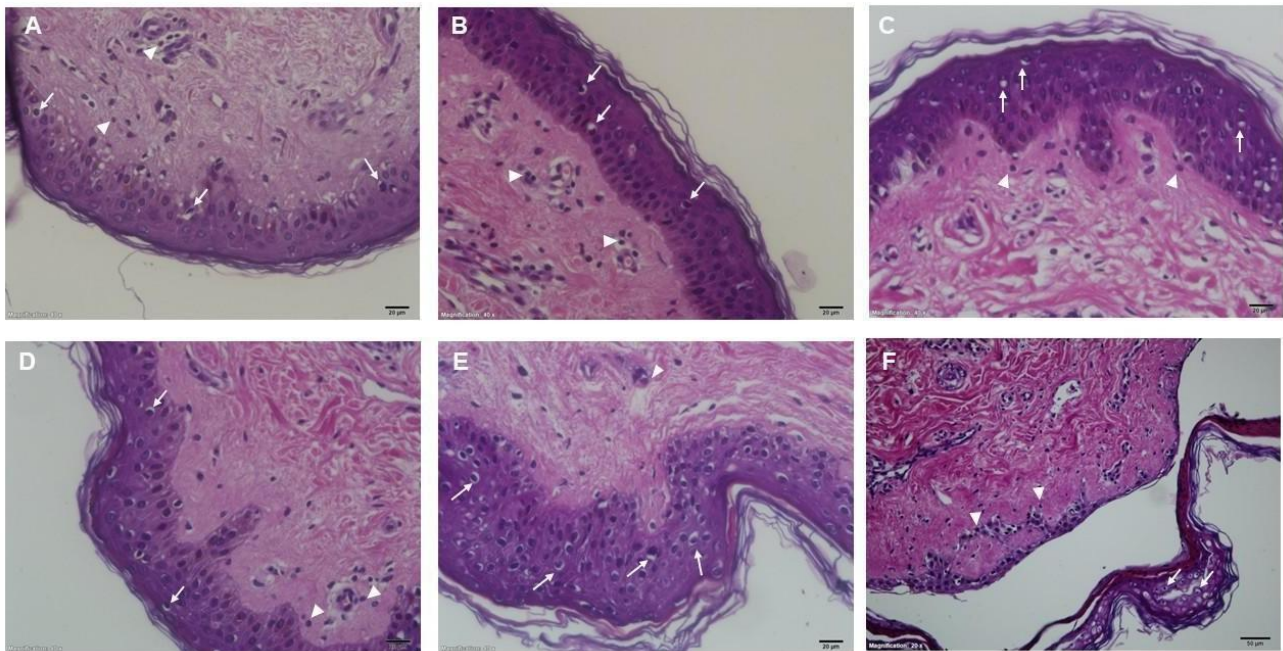


Figura 8. Avaliação histológica de hOSEC ao longo de 7 dias de cultivo. Culturas de explantes de pele humana foram cultivados em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, durante o período de 7 dias. Os cortes histológicos foram corados com H/E e registrados utilizando o microscópio. As alterações de edema perinuclear estão indicadas pelas setas brancas. Células inflamatórias mononucleares na derme estão apontadas com cabeça de setas brancas. Dia 0 (A), dia 1 (B), dia 3 (C), dia 5 (D), dia 7 (E e F).

Tabela 3: Classificação das observações histológicas de amostras de pele ex vivo em cultivo durante 7 dias.

Identificação	Dia 0	Dia 1	Dia 3	Dia 5	Dia 7
Espongiose (edema intercelular)	0	0	0	0	0
Acantólise	0	0	0	0	0
Vesículas - devido a ruptura de desmossomos levando a separação de queratinócitos	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0
Necrose de células da epiderme (intensa eosinofilia celular)	0	0	0	0	0
Edema Perinuclear (Epiderme)	2	2	2	2	3
Edema intranuclear	0	0	0	0	0
Picnose nuclear	0	0	0	0	0
Separação junção dermo-epidérmica/ Células Basais não conectadas	0	0	0	0	Obs.: epiderme desprendida da derme
Exocitose	0	0	0	0	0
Na derme	Células inflamatórias	Células inflamatórias	Células inflamatórias	Células inflamatórias	Células inflamatórias

	mononucleares discretas	mononucleares discretas	mononucleares discretas	mononucleares discretas	mononucleares discretas
--	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

2. Caracterização da população de células imunes nos explantes de pele

A análise dos explantes de pele cultivados no modelo hOSEC revelou a presença de diversas populações celulares imunologicamente ativas ao longo dos diferentes dias experimentais. Foram identificadas células positivas para marcadores específicos para células de Langerhans (S100+) (Figura 9 A e B), macrófagos (CD68+) (Figura 9 C e D), e diferentes subtipos de linfócitos T (CD4+, CD8+) (Figura 9 E e F). Além disso, foram observados plasmócitos (CD138+) (Figura 9 G e H), células efectoras da resposta humoral, reforçando a diversidade imunológica presente nos explantes.

A detecção dessas populações celulares em todos os tempos de cultura indica que o modelo hOSEC mantém a integridade das células imunes residentes da pele, preservando sua distribuição ao longo do tempo. A presença de células apresentadoras de antígeno, como células de Langerhans e macrófagos, sugere que o modelo pode fornecer uma plataforma confiável para a investigação da ativação imune cutânea. Da mesma forma, a identificação de linfócitos T auxilia na compreensão das respostas imunológicas adaptativas nesse sistema.

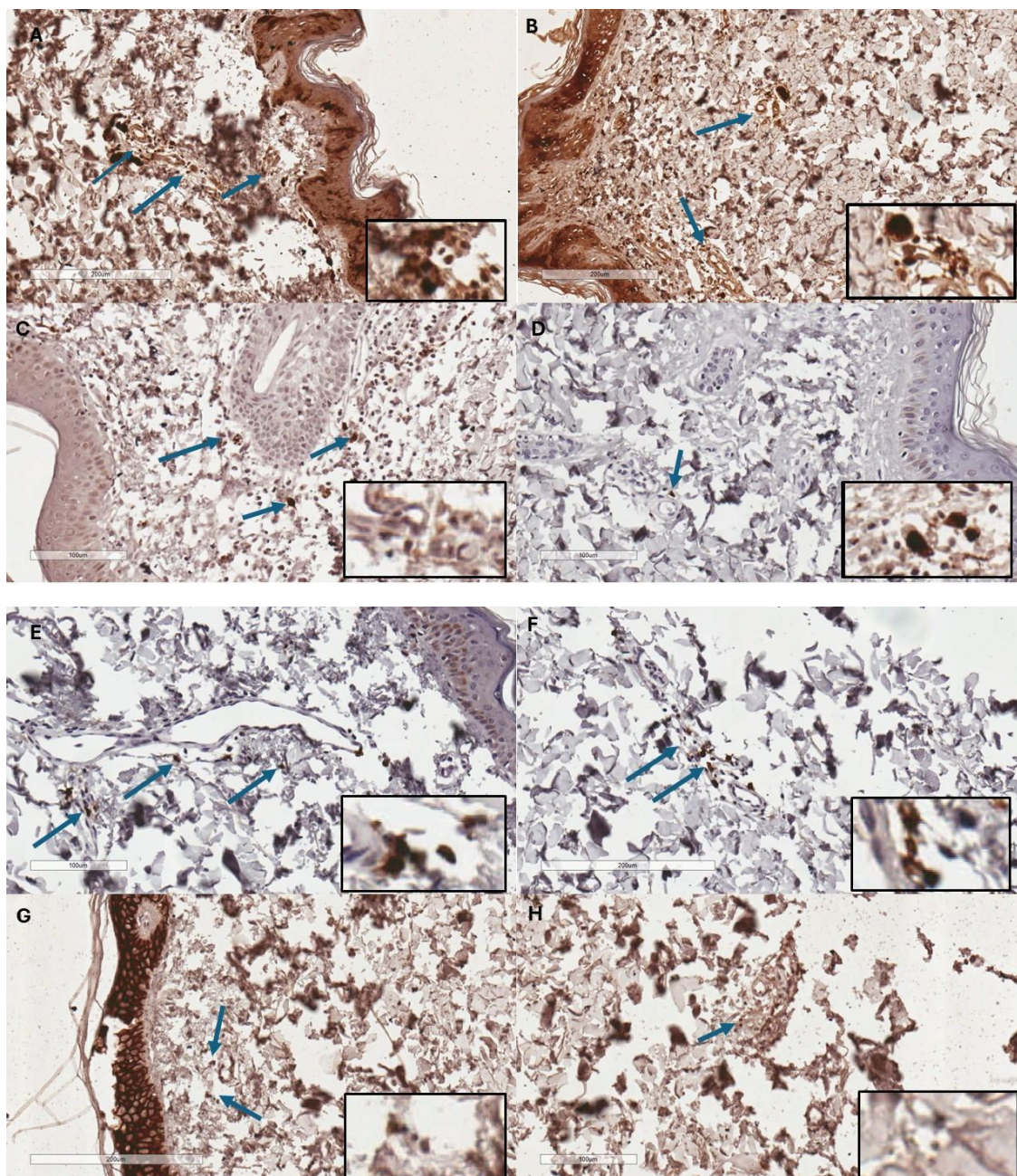


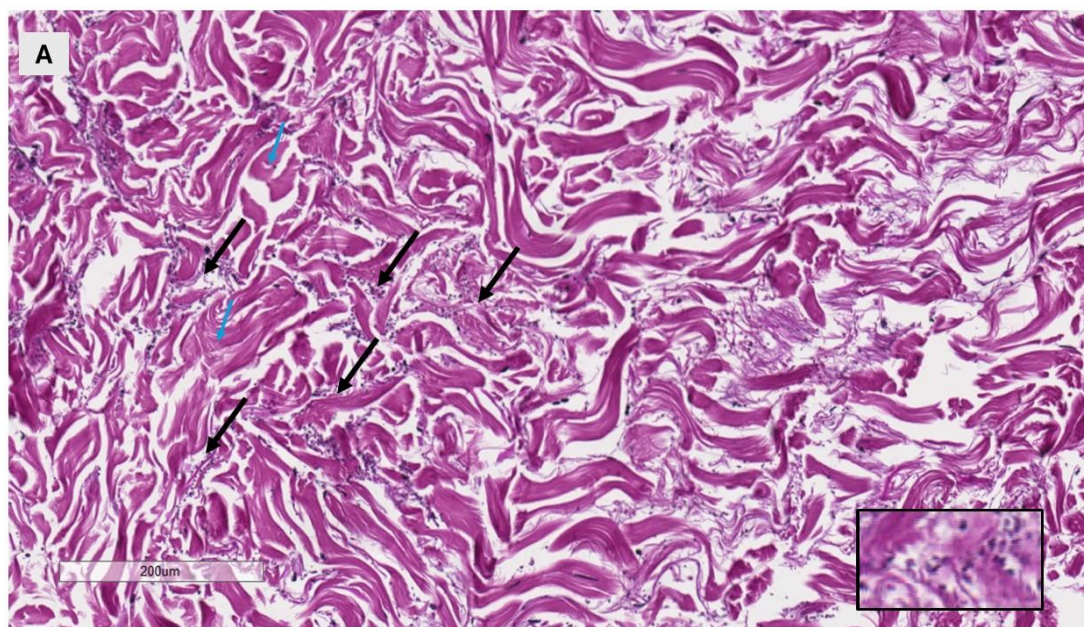
Figura 9. Corte histológico de hOSEC para imuno-histoquímica. Lâminas histológicas de hOSEC marcadas com S100 (A e B), CD68 (C e D), CD4 e CD8 (E e F) e CD138 (G e H). As setas azuis indicam a presença das células imunes. As imagens são representativas de amostras derivadas de 3 pacientes diferentes.

3. Padronização da carga parasitária injetada no modelo hOSEC

A padronização da carga parasitária injetada no modelo de pele *ex vivo* foi inicialmente testada com a carga de 3×10^7 parasitas (Figura 10). No entanto, foi observada uma quantidade excessiva de parasitas no ambiente extracelular nos primeiros dias de cultivo (Fig 10A), resultando em uma sobrecarga no tecido

e extrapolando os limites desejados para a análise. Nos dias 5 e 7 de cultivo também foram verificadas muitas formas extracelulares nos tecidos, não sendo notadas formas amastigotas intracelulares, além de uma redução na viabilidade dos parasitas, de acordo com critérios qualitativos de avaliação histológica, realizada por patologista (Fig 10 B e C).

Diante disso, optou-se por reduzir a carga parasitária para 3×10^5 parasitas, a fim de garantir a reprodução do parasita no tecido sem causar danos excessivos, permitindo uma avaliação mais controlada da interação parasita-hospedeiro e do ciclo de infecção sem comprometer a integridade do modelo experimental (Figura 11).



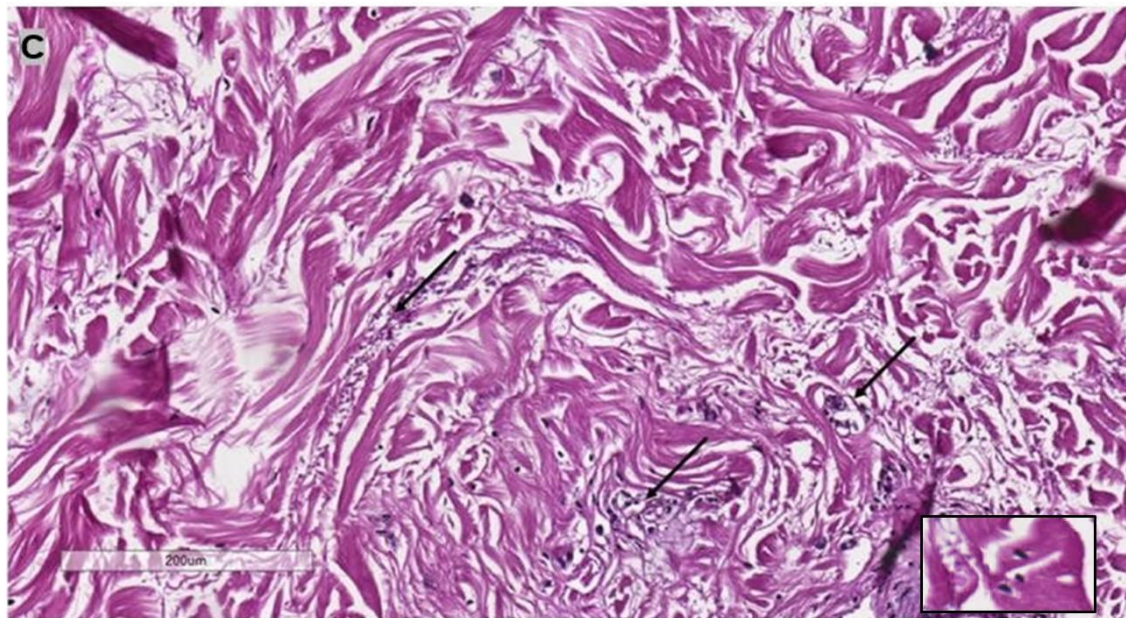
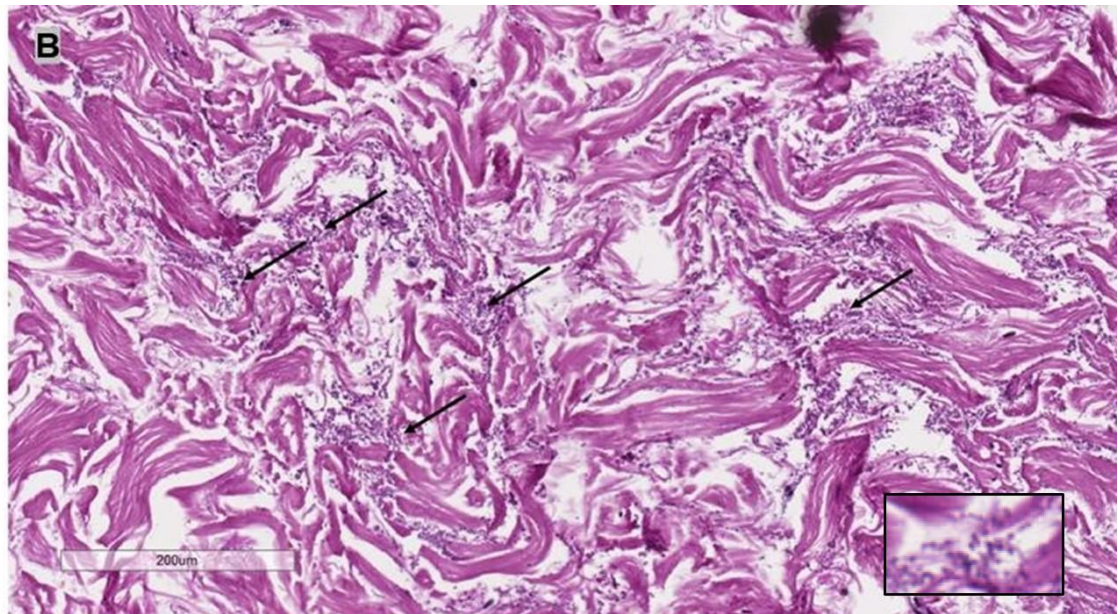


Figura 10. Corte histológico de hOSEC corado com hematoxilina e eosina (HE) infectados com 10^7 de *L.braziliensis*. Lâmina histológica do dia 0 (A), dia 5 (B) e dia 7 (C) de cultivo de hOSEC infectado com 10^7 de *L. braziliensis*. As setas pretas indicam possíveis formas promastigotas e as setas azuis as fibras de colágeno .

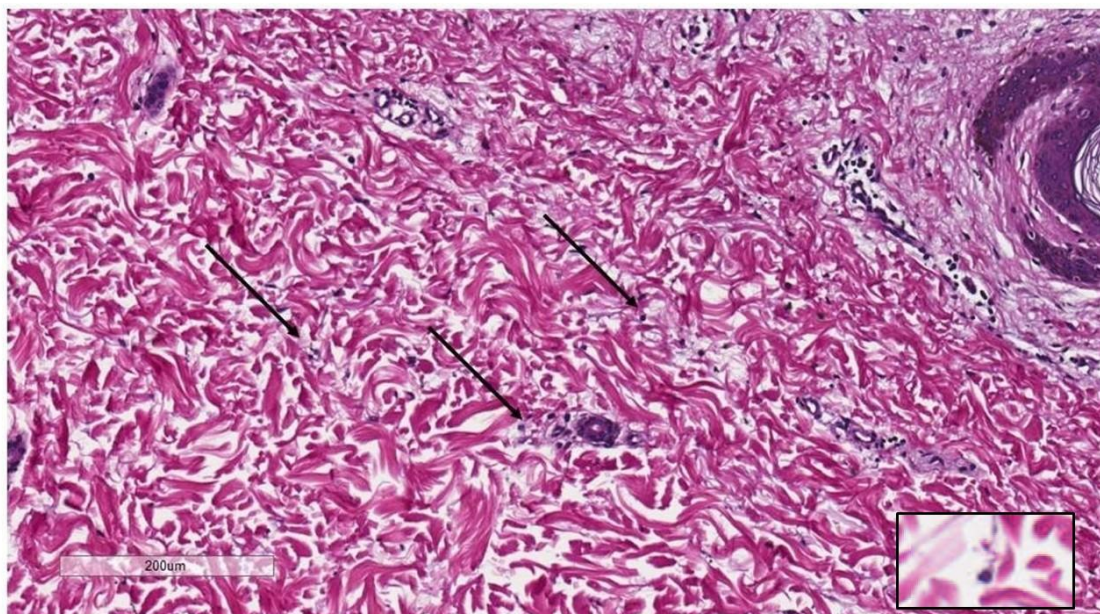


Figura 11. Corte histológico de hOSEC corado com hematoxilina e eosina (HE) infectados com 10^5 de *L. braziliensis*. Lâmina histológica do Dia 0 de cultivo de hOSEC infectada com 3×10^5 de *L. braziliensis*. As setas pretas indicam possíveis formas promastigotas.

4. Avaliação da presença de *L. braziliensis* em hOSEC por meio de microscopia eletrônica de varredura

A presença dos parasitos nos hOSEC também foi confirmada por meio de microscopia eletrônica de varredura das amostras de pele ex vivo infectadas com *L. braziliensis*. Nesta análise, foi possível notar aspectos importantes do comportamento do parasita e da interação com o tecido hospedeiro ao longo dos diferentes períodos de cultivo. Nos dias 0 e 1 de cultivo, foi possível observar predominantemente formas promastigotas do parasita aderidas à superfície das células da pele (Figura 12). No entanto, no dia 3 de cultivo, observou-se a presença de formas amastigotas, caracterizando a transformação morfológica do parasita no ambiente ex vivo (Figura 13).

Nas amostras coradas com azul de toluidina, que foram posteriormente processadas para a microscopia eletrônica de varredura, foi possível visualizar formas amastigotas intracelulares (Figura 14).

Esses achados sugerem tanto o potencial fagocítico das células presentes na pele, como macrófagos e outras células imunes residentes, quanto a capacidade adaptativa do parasita de alternar entre formas promastigotas e amastigotas, essencial para a sobrevivência e progressão da infecção.

Esses resultados reforçam a relevância do modelo de pele humana ex vivo no estudo da biologia de *Leishmania braziliensis* e de suas interações com o hospedeiro.

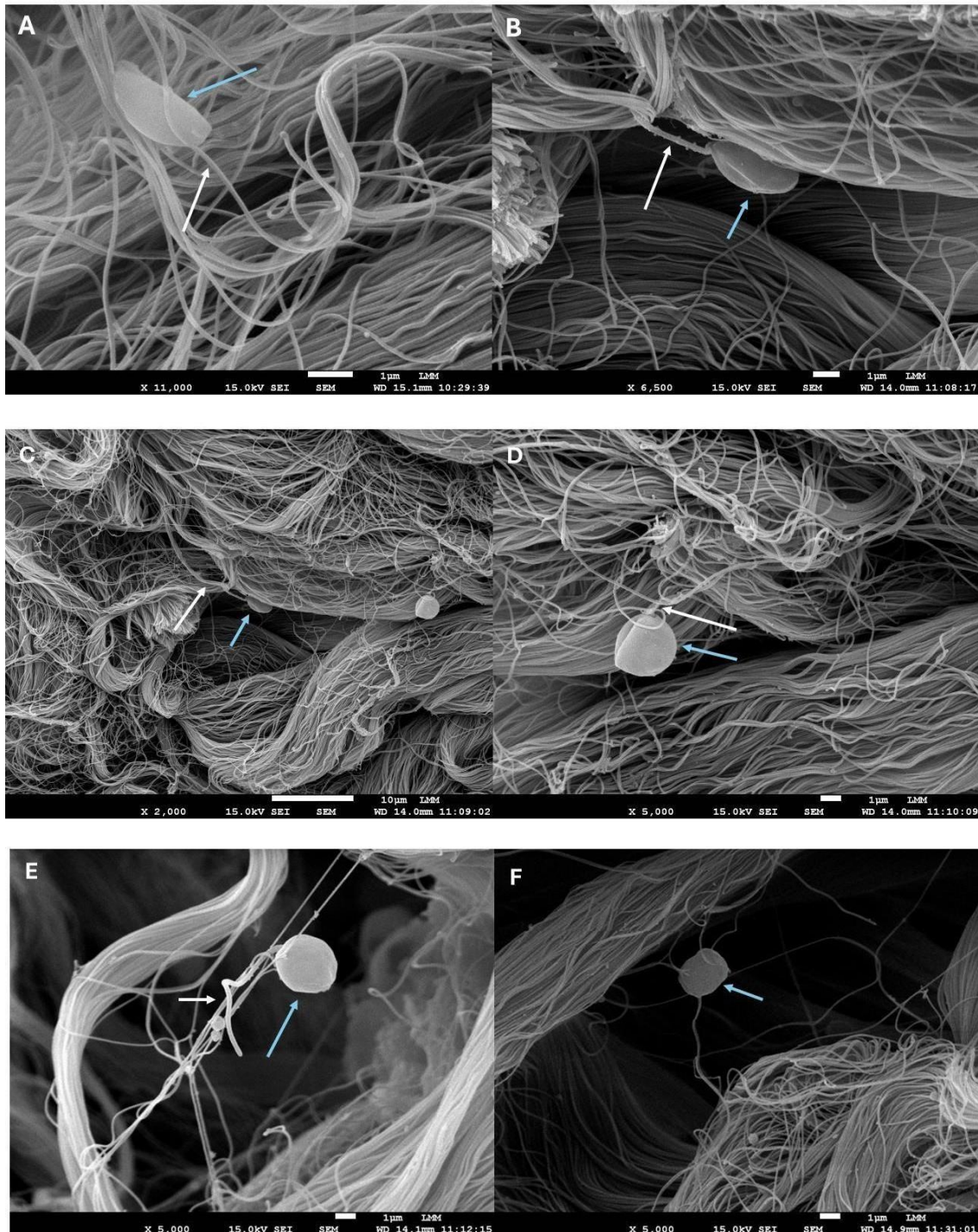


Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Leishmania braziliensis* presentes em hOSEC infectados no dia 0 de cultivo. hOSEC foram infectadas com 3×10^5 parasitas e cultivadas por 2 hs, até o processamento para microscopia eletrônica de varredura. Micrografias eletrônicas mostrando as formas alongadas das promastigotas (seta azul) com um pequeno flagelo livre (seta branca) no dia 0 de cultura. As imagens são representativas de amostras derivadas de 3 pacientes diferentes.

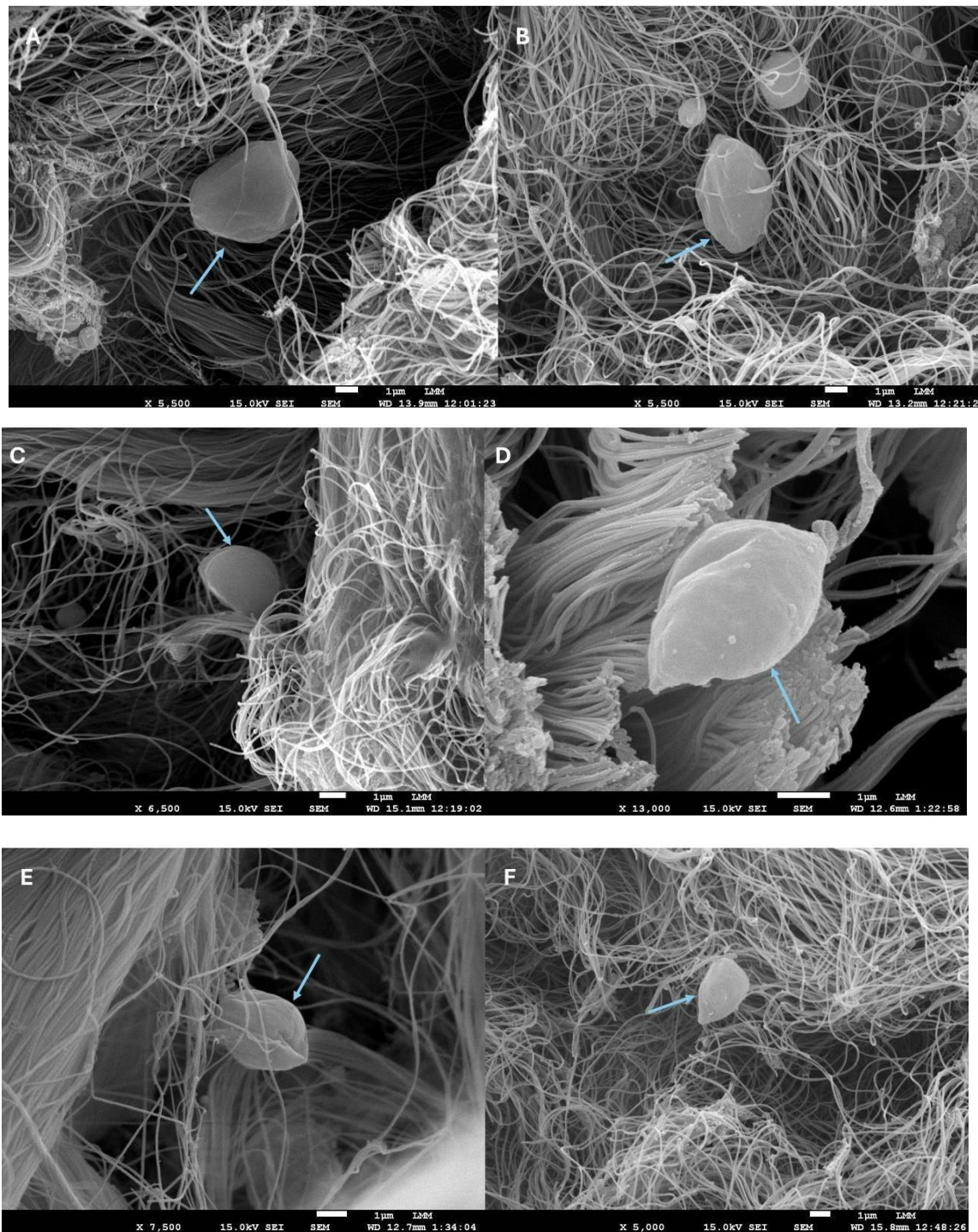


Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura mostrando *Leishmania braziliensis* presente em hOSEC infectado no dia 3 de cultivo. hOSEC foram infectadas com 3×10^5 parasitas e cultivadas por 3 dias, até o processamento para microscopia eletrônica de varredura. Micrografias eletrônicas mostrando as formas arredondadas amastigotas no dia 3 de cultura (seta azul). As imagens são representativas de amostras derivadas de 3 pacientes diferentes.

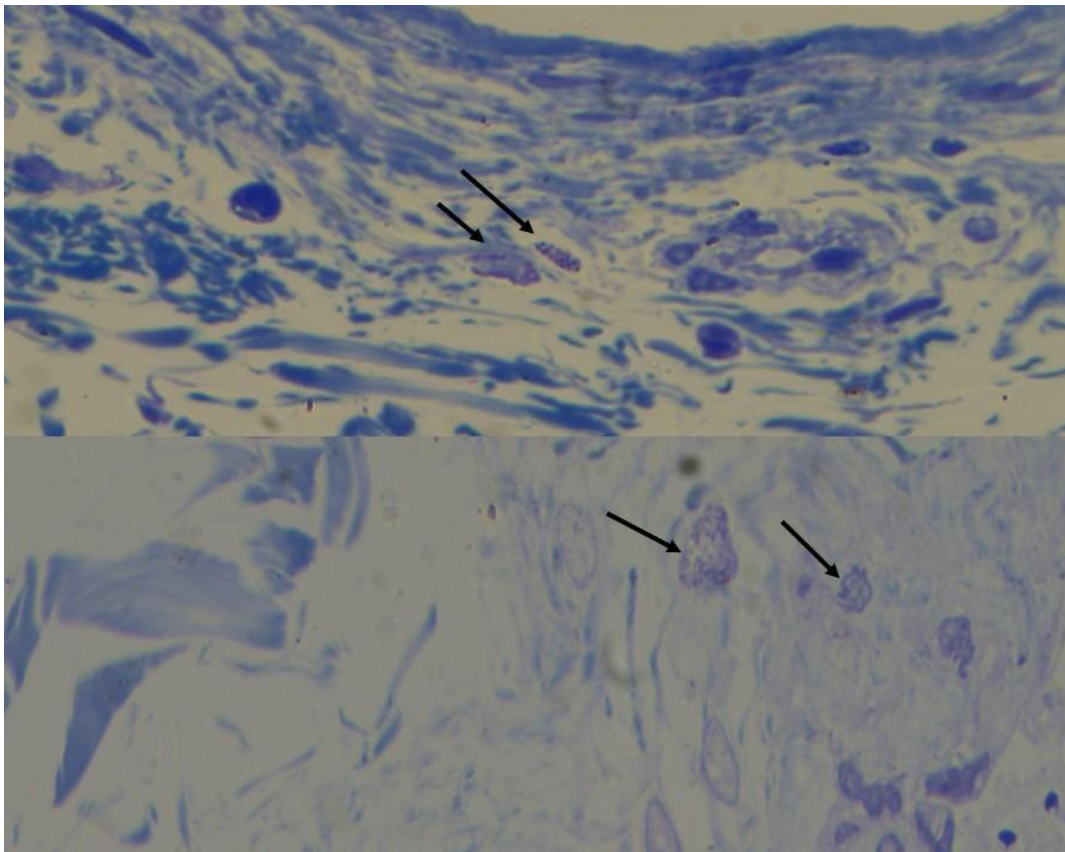


Figura 14. Corte histológico de hOSEC corado com azul de toluidina e infectados com 10^5 de *L. braziliensis*. Lâmina histológica do Dia 03 de cultivo de hOSEC infectada com 10^5 de *L. braziliensis*. As setas pretas indicam possíveis formas promastigotas intracelulares.

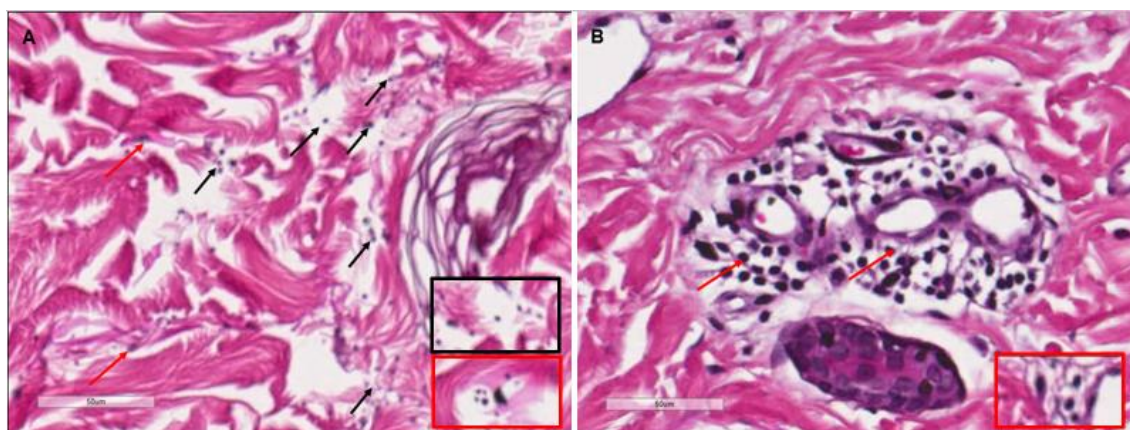
5. Avaliação histológica da presença de *L. braziliensis* em hOSEC e alterações teciduais pós-infecção

No dia 0 (Figura 15 A e B), a epiderme dos fragmentos apresentava-se recoberta por uma camada de queratina com espessura e estratificação dos queratinócitos dentro do padrão esperado. A camada basal contém melanócitos e células de citoplasma amplo que se estendiam até a camada média da epiderme, possivelmente células de Langerhans. Na camada papilar, observavam-se vasos capilares de pequeno calibre circundados por estroma frouxo e células mononucleares. Além disso, na derme, havia dissociação edematosa dos feixes de colágeno e estruturas arredondadas sugestivas de *Leishmania braziliensis* (setas pretas), bem como vasos capilares dilatados e leve infiltrado de células mononucleares organizadas em manguitos leucocitários perivasculares (setas vermelhas). Algumas dessas células apresentavam

escassez de citoplasma, enquanto outras exibiam citoplasma mais abundante, compatível com linfócitos e monócitos.

No dia 3 (Figura 15 C), verificou-se um aumento significativo da quantidade de formas arredondadas de amastigotas, associado a intensa dilatação dos vasos capilares e infiltrado expressivo de células mononucleares, com características morfológicas predominantemente de linfócitos. Além disso, observou-se dissociação edematosa do estroma ao redor dos vasos, sugerindo que esse período corresponde ao pico da resposta imune à infecção.

No dia 5 (Figura 15 D), foi possível notar a persistência do edema, acompanhada por uma redução no número de parasitas e o aumento da presença de células inflamatórias migrando para o local da infecção. Já no dia 7 (Figura 15E), a derme demonstrou uma diminuição da área afetada em comparação aos dias anteriores, com redução do calibre dos vasos capilares e um leve infiltrado inflamatório composto por células mononucleares. Além disso, foram observadas apenas formas amastigotas de *Leishmania braziliensis* ocasionais, indicando uma redução da carga parasitária ao longo do experimento.



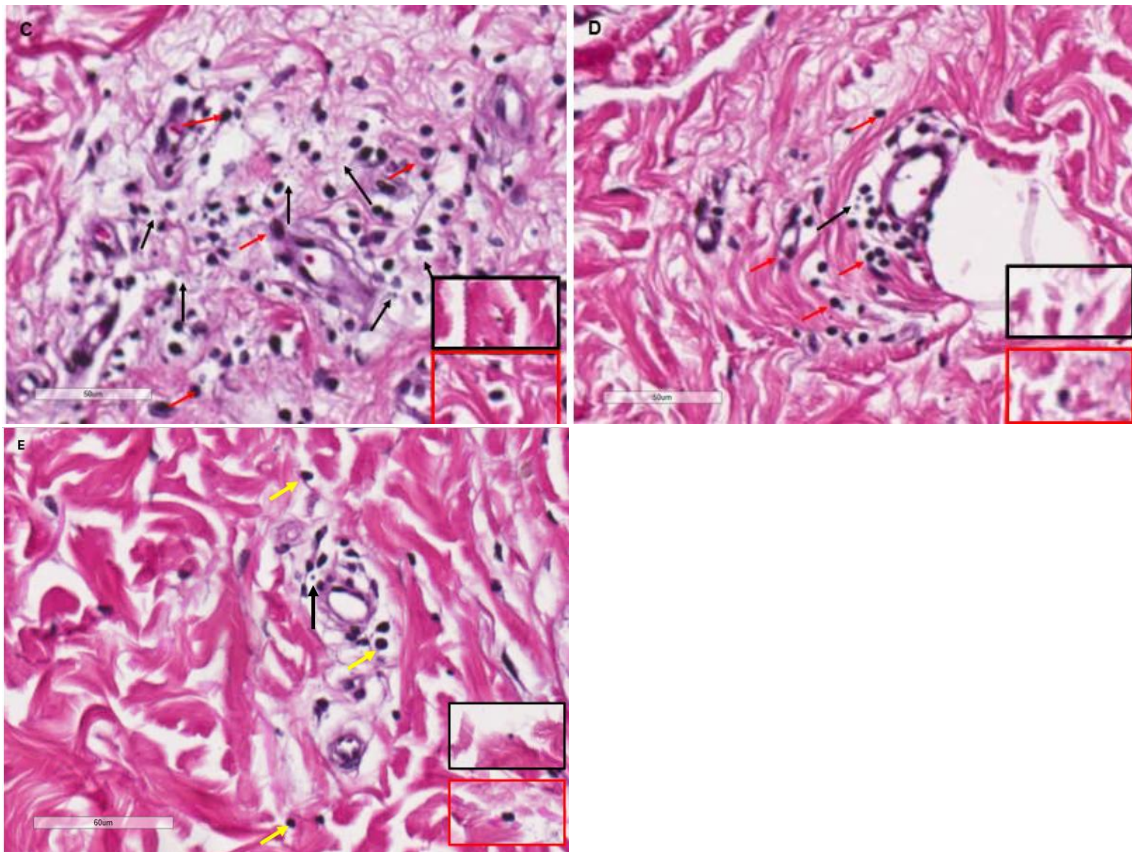


Figura 15. Corte histológico de hOSEC infectado com *L. braziliensis* corado com hematoxilina e eosina (HE). As amostras de hOSEC foram infectadas e processadas nos dias 0 (A) (B), 3 (C), 5 (D) e 7(E) de cultivo. As setas pretas indicam a presença do parasita no tecido e as setas vermelhas indicam células imunes mononucleadas que migraram para o local da infecção. As imagens são representativas de amostras derivadas de 3 pacientes diferentes.

6. Avaliação da carga parasitária ao longo de 7 dias de cultivo

Paralelamente à verificação da presença de parasitos nos hOSEC de maneira qualitativa, foi realizada a quantificação de parasitos, por meio da determinação da carga parasitária utilizando-se qPCR. Os resultados obtidos indicaram uma redução progressiva na quantidade de parasitas ao longo do tempo. A partir do quinto dia de infecção, foi observada uma diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 0 ($p < 0,05$), com uma diminuição consistente na carga parasitária ($3,2 \pm 0,89$). Já no dia 7, também ocorreu uma diminuição na quantidade total de parasitas presentes nos explantes em comparação ao dia 0 ($2,77 \pm 0,04$) ($p < 0,05$) (Figura 16).

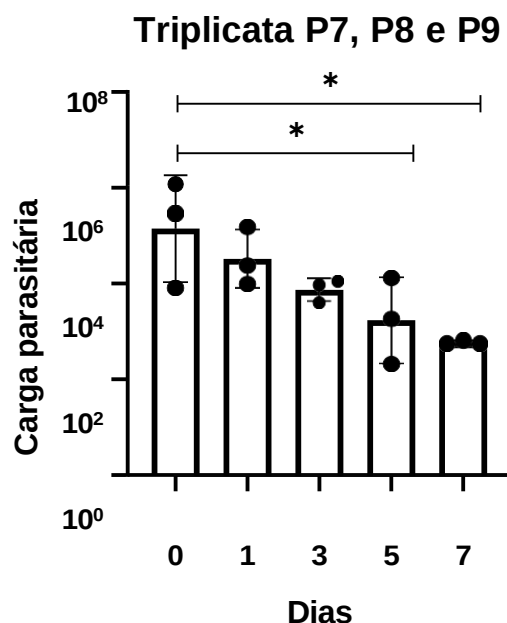


Figura 16. Carga parasitária de *L. braziliensis*. hOSEC foram infectados com 3×10^5 parasitos por fragmento e cultivados. Nos dias 0 (+2 horas), 1, 3, 5 e 7, foram coletados para extração de DNA e realização da PCR para determinação da carga parasitária por meio do gene ITS. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Resultado referente a três replicatas biológicas. * $p < 0,05$.

7. Avaliação da produção de citocinas por hOSEC infectado com *L. braziliensis*

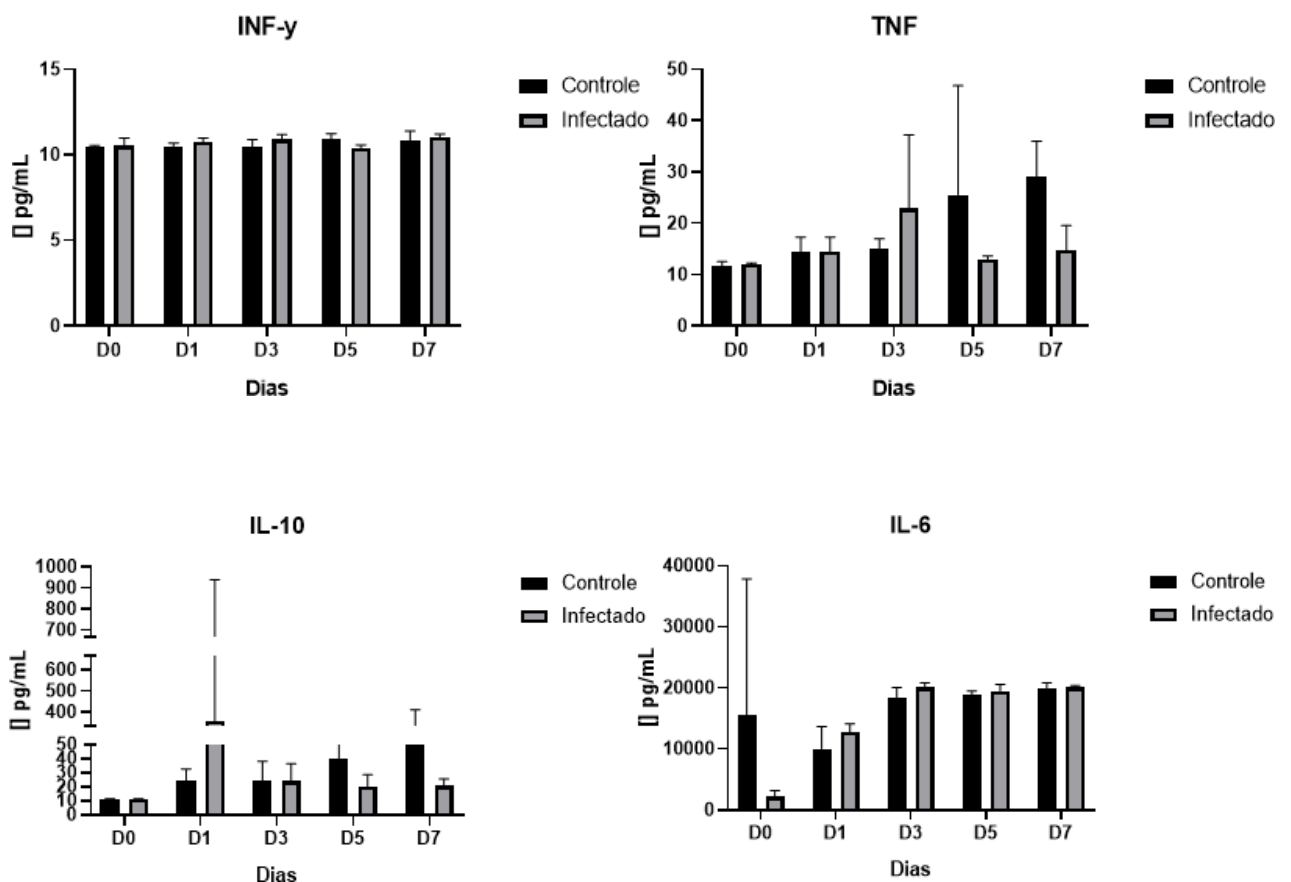
A produção de citocinas no meio condicionado das peles cultivadas foi monitorada ao longo do período de cultivo (Fig. 17). As citocinas avaliadas foram IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-4 e representam os perfis Th1 e Th2. Os resultados demonstraram que houve aumento estatisticamente significativo da produção de IL-2 nas amostras, ao longo do tempo, indicando uma variação temporal na sua produção. Observou-se ainda tendência de aumento progressivo da produção de IL-10, IL-4 e TNF- α ao longo dos 7 dias de cultivo, porém, sem significância estatística. Por outro lado, a produção de IFN- γ se manteve constante ao longo do período de observação.

Comparando-se a produção de citocinas entre amostras infectadas e não infectadas, não se observou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em relação à produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-4 em nenhum dos tempos analisados.

Para a citocina IL-2, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos no sétimo dia de cultivo, com maior concentração no grupo

controle em comparação ao grupo infectado ($p < 0,05$). Dentro do grupo controle, houve um aumento nos níveis de IL-2 com diferença estatisticamente significativa entre os dias 0 e 3, 0 e 7, 1 e 7 e os dias 5 e 7 ($p < 0,05$). No grupo infectado, ocorreu aumento entre os dias 0 e 3, e diminuição entre os dias 3 e 5 ($p < 0,05$).

A quantificação das citocinas ao longo do tempo permitiu uma avaliação detalhada do comportamento dessas moléculas inflamatórias nos meios condicionados. Os dados evidenciam a viabilidade dos hOSEC e a dinamicidade de seu metabolismo quando em cultura e sugerem que a produção de IL-2 foi modulada pela infecção por *L. braziliensis*, enquanto as outras citocinas analisadas mantiveram níveis semelhantes entre os grupos controle e infectado.



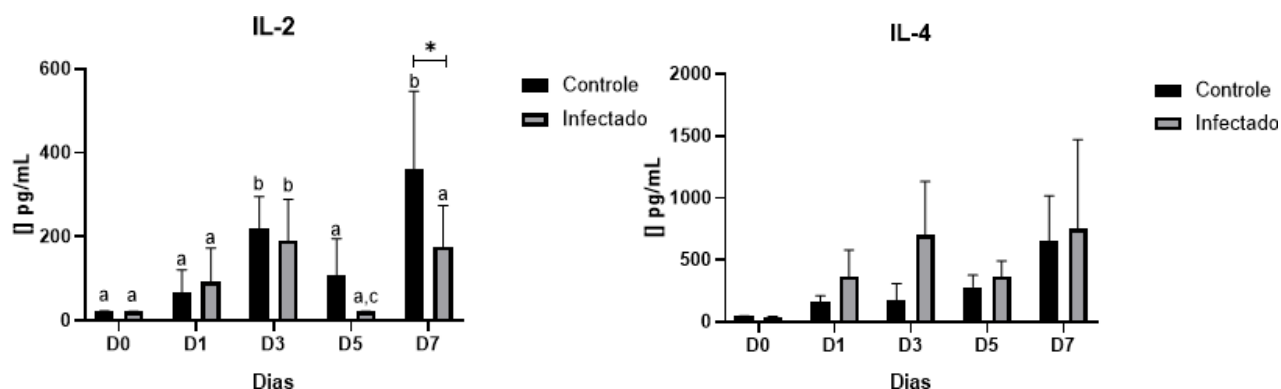


Figura 17. Quantificação de citocinas em amostras de hOSEC controle ou infectados por *L. braziliensis*. hOSEC foram infectados com 3×10^5 parasitos por fragmento e cultivados. Nos dias 0 (+2 horas), 1, 3, 5 e 7, o meio condicionado das culturas foi coletado e processado para a determinação da concentração de IL-10, IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6 (Unidade: picograma/mL). Os valores são representados como média $\pm$ desvio-padrão. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. Resultado referente a três replicatas biológicas. * $p < 0,05$.

VI. Discussão

As leishmanioses constituem um grupo de doenças que afetam predominantemente populações negligenciadas em nível global. Apesar de sua importância para a saúde pública, ainda existem diversas lacunas no conhecimento sobre a imunobiologia da doença. As manifestações clínicas variam de acordo com múltiplos fatores, incluindo a espécie e a cepa do parasita, além das respostas imunológicas do hospedeiro, que são influenciadas por fatores genéticos e ambientais. A ampla diversidade ecológica e genética entre as populações humanas expostas ao parasita dificulta uma compreensão definitiva dos parâmetros que determinam resistência e controle da infecção em humanos. Além disso, os dados imunológicos disponíveis são limitados, e os eventos iniciais da infecção por *Leishmania* em humanos, cruciais para a progressão e o desfecho da doença, permanecem em grande parte desconhecidos (Costa-Da-silva et al., 2022; Elmahallawy et al., 2021; Okwor et al., 2009).

Diversos aspectos imunológicos da leishmaniose foram investigados em modelos experimentais utilizando modelos animais como camundongos, hamsters, cães domésticos e primatas não humanos. Embora esses modelos apresentem a vantagem de permitir o controle genético tanto do parasita quanto do hospedeiro, nenhum deles consegue reproduzir integralmente a resposta imunológica e os desfechos da infecção humana por *Leishmania* spp (Handman, 2001; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a).

Modelos murinos, por exemplo, são amplamente utilizados para esse tipo de estudo. Porém, as espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* demonstram baixa infectividade em camundongos, devido à dificuldade em induzir, de forma reprodutível, lesões cutâneas mensuráveis e sustentadas nesses animais (Espitia et al., 2010; Martinez et al., 1991; Osorio et al., 2003; Travi et al., 2002). Essas e outras diferenças significativas entre camundongos e humanos influenciam o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, a ativação celular e a resposta a desafios imunológicos, tanto na imunidade inata quanto na adaptativa. A organização distinta dos sistemas imunológicos dessas espécies influencia ainda a maneira como respondem a patógenos, tornando a transposição direta de achados em camundongos para

humanos um desafio. Além disso, a ativação de células imunes apresenta variações relevantes, sendo que, em humanos, vias relacionadas à fagocitose e à sinalização por receptores como os TLRs são mais ativadas em comparação aos camundongos, nos quais essas vias podem ser menos responsivas (Mestas & Hughes, 2004; Råberg et al., 2007; Zschaler et al., 2014).

Outro modelo utilizado para pesquisa em leishmaniose é o modelo do hamster sírio. Ele apresenta similaridades com a resposta imune humana a infecções causadas por *Leishmania* do subgênero *Viannia*, caracterizando-se pela persistência prolongada do parasita, disseminação para linfonodos drenantes e tecidos distantes, além da indução de um perfil imunológico misto Th1/Th2, semelhante ao observado em humanos. No entanto, a ausência de linhagens consanguíneas geneticamente homogêneas, aliada à limitação de ferramentas imunológicas e moleculares, bem como à escassez de sistemas de manipulação genética específicos para hamsters, restringiu seu uso na investigação das vias imunológicas do hospedeiro envolvidas na patogênese e imunidade (Jiménez-Antón et al., 2019; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a; Saini & Rai, 2020).

Os primatas não humanos são modelos valiosos para pesquisa devido às suas semelhanças com os humanos em termos de anatomia, imunologia e fisiologia. Essa proximidade filogenética os torna modelos relevantes para a avaliação da patogenicidade de doenças infecciosas, bem como para o desenvolvimento de vacinas e terapias medicamentosas (André et al., 2020; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014b). Algumas espécies de primatas não humanos têm sido utilizadas como modelos para o estudo da infecção por *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*, pois, assim como ocorre em indivíduos infectados, apresentam ulcerações cutâneas localizadas e podem desenvolver cura espontânea após infecção experimental (Amaral et al., 2000; Probst et al., 2001; Souza-Lemos et al., 2008). Embora esse modelo possa reproduzir de forma mais fiel a infecção por leishmaniose em humanos, seu uso na pesquisa médica é limitado por questões éticas e custos elevados (Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a).

Diante do desafio em se obter modelos animais relevantes e acessíveis, lacunas sobre a imunologia da leishmaniose permanecem. Neste cenário, o

presente trabalho propôs o uso de modelos de cultura de pele humana *ex vivo* para melhor compreensão dos momentos iniciais da infecção por *L. braziliensis*, sendo a primeira vez que este modelo experimental é descrito para esta finalidade.

O modelo hOSEC representa um modelo experimental de abordagem *ex vivo* que se assemelha ao máximo ao ambiente *in vivo* da pele humana, consistindo inteiramente de melanócitos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais e células imunes residentes, como células de Langerhans, além da matriz extracelular (Frade et al., 2015). O uso de modelos experimentais baseados em explantes da pele tem se expandido e se consolidado como uma abordagem promissora para o estudo da cicatrização de feridas, e dos processos inflamatórios, dentre outros (Hofmann et al., 2023; Wilkinson et al., 2021). Os explantes de pele apresentam fácil obtenção, simplicidade ética e elevado potencial para pesquisas dermatológicas, permitindo a análise das respostas teciduais e celulares a partir de fragmentos de tecido que seriam descartados. O modelo hOSEC é capaz de reproduzir condições observadas *in vivo*, mantendo temporariamente a viabilidade do tecido por meio de um meio de cultura que fornece os nutrientes necessários para sustentar o metabolismo celular. Sua principal vantagem é a preservação do estrato córneo e a manutenção de todos os tipos celulares presentes na pele, em sua densidade e distribuição originais. Além disso, a manutenção do hOSEC na interface ar-líquido possibilita investigações sobre a aplicação e permeação de produtos tópicos acabados e de aplicação transdérmica (Frade et al., 2015; Lebonvallet et al., 2010; Leite et al., 2021; Masson-Meyers et al., 2020).

A fim de determinar o tempo máximo de cultivo de hOSEC, neste trabalho foram testados cultivos de até 21 dias. O cultivo de explantes de pele já foi descrito em diferentes tempos, sendo que alguns autores demonstraram que a pele mantém sua arquitetura natural por 14 dias. Pontualmente, é possível encontrar na literatura trabalhos relatando culturas bem-sucedidas de hOSEC por 60 e 75 dias (de Paula et al., 2024; Frade et al., 2015). Entretanto, estes estudos não aplicaram os mesmos parâmetros de viabilidade tecidual no presente trabalho, sendo analisados apenas alterações histológicas e detecção de células basais da epiderme, estrato córneo e queratinócitos proliferativos por

imuno-histoquímica. Também foi observado que a pele manteve sua arquitetura natural até o 7º dia, sendo que nos tempos de cultivo subsequentes, houve uma diminuição progressiva no número de camadas de queratinócitos, a epiderme se apresentou mais retificada e a espessura da camada córnea aumentou.

No presente trabalho, foi possível manter os fragmentos de pele em cultivo por 7 dias, com a viabilidade metabólica preservada e morfologia muito próxima à pele nos tempos iniciais de cultivo, com conservação das junções dérmicas e não observação de edema intercelular ou lesões celulares. Nossos achados estão em consonância com a literatura, que reporta de maneira consistente a preservação funcional e estrutural da pele humana cultivada em diferentes plataformas, desde que mantida em condições adequadas de meio de cultivo, temperatura e oxigenação similares às do organismo humano por este período. Dessa forma, o modelo hOSEC é capaz de atender às exigências de um sistema experimental robusto, permitindo observações e intervenções de forma reprodutível e biologicamente relevante (Andrade et al., 2015; Danso et al., 2015; Xu et al., 2012).

A pele desempenha um papel essencial na proteção do hospedeiro contra a invasão de agentes externos, atuando por meio de barreiras físicas, biomoléculas e uma rede complexa de células imunes e células residentes. Em condições homeostáticas, as células imunes residentes contribuem para a manutenção das funções fisiológicas da pele. Queratinócitos e melanócitos também atuam na resposta imune local, liberando citocinas que modulam processos inflamatórios. Dessa forma, a pele se configura como um órgão imunologicamente dinâmico, capaz de detectar e responder a estímulos infecciosos e não infecciosos por meio de mecanismos de imunidade inata e adaptativa (Nestle et al., 2009; Nguyen & Soulika, 2019; Ono & Kabashima, 2016; Quaresma, 2019).

Os achados deste estudo demonstram a presença de células imunes nos hOSEC, incluindo macrófagos, células de Langerhans e linfócitos T, evidenciando a viabilidade desse modelo para investigações sobre a resposta imune cutânea. A identificação de macrófagos, células especializadas na fagocitose e na modulação da inflamação, reforça a capacidade do tecido em

manter mecanismos inatos de defesa e sua relevância para a investigação de processos imunobiológicos no contexto de infecções cutâneas. Da mesma forma, a detecção de células de Langerhans, fundamentais na captura, processamento e apresentação de antígenos, indica a manutenção do potencial imunomodulador da pele mantida *ex vivo*. Além disso, a presença de linfócitos T sugere a preservação de componentes da resposta imune adaptativa, essencial para a vigilância imunológica e a resposta inflamatória específica. Esses achados ressaltam que os explantes de pele humana constituem um modelo experimental relevante para estudos sobre a dinâmica celular do sistema imune cutâneo, permitindo a investigação de mecanismos de inflamação e resposta imune frente à infecção por *L. braziliensis*.

Em algumas amostras de hOSEC, observou-se discretos infiltrados inflamatórios já no dia 0 de cultura, e nas amostras não infectadas. Em se tratando de amostras derivadas de pacientes de cirurgias estéticas eletivas, é relevante mencionar que é possível que algumas amostras já estivessem passando por processos inflamatórios diversos e além do nosso controle. Ademais, não foi possível coletar informações acerca de detalhes clínicos dos pacientes, além da idade e sexo biológico. Sendo estes processos discretos e eventuais, consideramos esta limitação como sendo característica intrínseca das pesquisas com hOSEC. Ainda assim, em futuros estudos, considera-se relevante ampliar as informações coletadas acerca da saúde e estilo de vida dos doadores de amostras biológicas utilizadas para pesquisa.

Neste estudo, o modelo hOSEC foi utilizado pela primeira vez para investigação de infecções iniciais pelo protozoário *L. braziliensis*. Em infecções naturais, o número de parasitos inoculados pelo vetor na derme do hospedeiro é amplamente variável, sendo detectados de 10 a 100.000 parasitos na pele após inoculação. Entre as variáveis responsáveis por tamanha variação, está a carga parasitária no vetor, porém é possível que outros fatores estejam associados (Kimblin et al., 2008).

Diante da ausência de dados prévios sobre a leishmaniose cutânea neste modelo, foi realizada a padronização do inóculo. Diferentes concentrações parasitárias foram testadas a fim de identificar a mais adequada para a infecção

do tecido. Na literatura, o modelo *ex vivo* já foi empregado para o estudo da infecção por *Herpes simplex vírus 1* e *Mycobacterium leprae*, com esses estudos indicando que inóculos entre 10^4 e 10^5 microrganismos apresentam melhor desempenho na infecção do tecido (Corzo-León et al., 2019; De La Cruz et al., 2021; de Paula et al., 2024). Mais recentemente, investigou-se também a infecção de equivalentes de pele humana com o trypanosomatídeo *T. brucei*, na carga de $2,5 \times 10^4$ parasitos (Reuter et al., 2023). Nestes estudos, além da concentração parasitária, foi padronizado o volume de inóculo a ser administrado, variando entre 5 e 25 μL . Estes parâmetros influenciam diretamente a replicação e a disseminação do patógeno no tecido, sendo utilizados como base em nossos experimentos de infecção com *Leishmania* spp. Em nossos experimentos-piloto, decidimos iniciar a avaliação das infecções de hOSEC com um inóculo significativamente maior: 3×10^7 parasitos em um volume aproximado de 10 μL por inóculo (total de 3 inóculos de 1×10^7 em cada hOSEC). Nossos achados indicaram um excesso de parasitos extracelulares nos períodos após infecção, com poucos representantes intracelulares. Desta forma, seguimos diminuindo a carga parasitária até definir que as inoculações seriam realizadas com 3×10^5 parasitos por hOSEC, e volume de 5 μL por inoculação. Com esta carga parasitária, observamos maior número de parasitos intracelulares, e menor número de parasitos sem viabilidade nas avaliações histológicas. Ainda assim, observou-se grande número de parasitos no ambiente extracelular.

Além disso, avaliando-se a carga parasitária ao longo dos dias de cultivo dos hOSEC, observou-se contínua diminuição do número de parasitos nos tecidos. Uma vez que os parasitos foram inoculados na derme e que os hOSEC foram mantidos em cultura com a derme em contato com o meio de cultura, é possível que parasitos tenham abandonado o tecido. Ademais, considerando que os parasitos foram cultivados em meio Schneider para insetos até o momento da inoculação e que os hOSEC foram cultivados em meio DMEM, é possível que a redução da carga parasitária seja resultado também da redução da viabilidade dos parasitos frente à troca súbita de meio de cultura. A manutenção *in vitro* de parasitos do gênero *Leishmania* é um processo complexo que envolve múltiplas variáveis. O meio de cultura desempenha um papel fundamental nesse

processo, fornecendo os nutrientes e o suporte necessários para a sobrevivência, proliferação e funcionalidade do parasito, impactando diretamente os resultados experimentais (de Oliveira Filho et al., 2024; Visvesvara & Garcia, 2002; Yao & Asayama, 2017). Os parasitas do gênero *Leishmania* são comumente mantidos in vitro na forma de promastigotas, utilizando-se meios líquidos, como RPMI 1640, meio de inseto de Schneider e DMEM, suplementados com antibióticos e soros de origem animal (S. Bahrami et al., 2011; Cattaneo et al., 2024; Paiva & Careta, 2019). Esses componentes fornecem nutrientes essenciais que não estão presentes em meios convencionais, permitindo o crescimento em altas densidades celulares e possibilitando a escalabilidade da cultura. Entre os meios utilizados, o DMEM é amplamente empregado para a manutenção rotineira desses parasitas em cultura (de Oliveira Filho et al., 2024; Kropf et al., 2010), portanto, hipotetiza-se que a mudança de meio de cultura não seja um importante influenciador nos achados de carga parasitária. Porém, as hipóteses levantadas precisam ser testadas experimentalmente.

A resposta da pele aos parasitos também pode constituir um elemento que contribuiu para a redução da carga parasitária, hipótese esta que também carece de investigação experimental. Os resultados obtidos demonstram que a pele, mesmo sem a presença de circulação sistêmica, foi capaz de recrutar células residentes para o local da infecção, evidenciando um mecanismo local de resposta imunológica. A presença de vasos capilares de pequeno calibre circundados por estroma frouxo e células mononucleares sugere um ambiente predisposto a interações celulares iniciais da resposta imune. A partir do dia 3, observou-se um aumento expressivo das formas amastigotas do parasita, acompanhado por dilatação vascular e um infiltrado significativo de linfócitos, sugerindo uma ativação do sistema imunológico inato e adaptativo no local da infecção. Nos dias subsequentes, a redução do número de parasitas associada à persistência do edema e à presença aumentada de células inflamatórias sugere que a pele estava ativamente combatendo a infecção. Os achados sugerem que a pele, mesmo isolada da circulação sistêmica, pode desempenhar um papel ativo na resposta imunológica contra *Leishmania braziliensis*, por meio do recrutamento de células residentes e da indução de mecanismos

inflamatórios eficazes. A redução da carga parasitária ao longo do experimento reforça a hipótese de que a pele é capaz de coordenar uma resposta imune eficiente contra a infecção, independentemente da presença de circulação sistêmica, sendo um modelo relevante para o estudo das interações imunológicas locais em leishmanioses.

Portanto, maiores esforços de otimização da infecção de hOSEC por *Leishmania spp* serão fundamentais para a validação do modelo hOSEC no estudo da resposta imune contra *L. braziliensis*, permitindo investigações futuras sobre a permanência dos parasitos nos tecidos após a infecção, a sua viabilidade após a modificação do meio de cultura, além do papel da resposta da pele à infecção.

A análise de citocinas realizada nos explantes de pele demonstrou sua capacidade de liberação de mediadores no meio de cultivo, em níveis detectáveis experimentalmente. É importante citar que os altos níveis basais de produção de IL-6 por hOSEC já foi relatado na literatura. Os níveis baixos e estáveis de IFN- γ também já foram observados, assim como a produção dinâmica de TNF α (Jardet et al., 2020; Neil et al., 2020).

Comparando-se a produção de citocinas pelas amostras infectadas e controle, não foi detectada diferença estatística na expressão das citocinas IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6 e IL-4. Esses resultados podem estar associados ao fato de que queratinócitos, quando danificados, enviam os primeiros sinais chamados alarminas, secretando moléculas endógenas que são consideradas padrões moleculares associados a danos reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões presentes em células imunes e não imunes para provocar uma resposta imune. A ativação da via leva à transcrição de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF (Frevet et al., 2018; Pérez-Salas et al., 2023). A pele também apresenta uma subpopulação de células T CD8 $^{+}$ que se localizam especificamente na camada basal da epiderme, produzem preferencialmente IFN- γ e exibem alta capacidade citotóxica após estimulação (Cheuk et al., 2017).

A citocina IL-2 apresentou uma variação estatisticamente significativa no grupo infectado, caracterizada por um aumento expressivo entre os dias 0 e 3, seguido por uma redução entre os dias 3 e 5. Essa modulação sugere um papel dinâmico da IL-2 na resposta imune inicial à infecção. Sabe-se que essa citocina é essencial para a ativação e proliferação de células T do subconjunto Th1, que, ao serem estimuladas, promovem a ativação de macrófagos parasitados, potencializando a eliminação de amastigotas intracelulares (Cheuk et al., 2017; Elmahallawy et al., 2021).

A análise histológica realizada no terceiro dia de infecção evidenciou um recrutamento significativo de células mononucleadas para o sítio infeccioso. Esses achados reforçam os resultados obtidos por citometria, sugerindo que a elevação da IL-2 nesse período pode estar associada à intensificação da resposta inflamatória mediada por células do sistema imune inato e adaptativo, contribuindo para a tentativa do organismo de conter a infecção. Porém, nos períodos subsequentes, possivelmente devido à modulação imunológica pelos parasitos, houve diminuição na produção de IL-2, apenas nas amostras infectadas.

Modelos *ex vivo* frequentemente proporcionam uma representação mais fiel da pele humana, pois preservam sua arquitetura tridimensional e vias de sinalização celular. No entanto, esses modelos carecem da conexão com órgãos linfoides periféricos, que fornecem um suprimento adicional de células imunes. Como resultado, a resposta imune nesses modelos depende predominantemente das células imunes residentes, o que pode restringir a amplitude das respostas imunológicas (Wang et al., 2023).

Diante dos resultados apresentados e das análises de literatura sobre o potencial do modelo hOSEC para estudo de doenças infecciosas, o presente trabalho demonstrou que é possível utilizar hOSEC a fim de observar os momentos iniciais da infecção por *L. braziliensis* em um contexto fisiológico no ser humano. Como importantes limitações dos dados apresentados estão o número de amostras investigadas, e a impossibilidade de aprofundar as avaliações dos processos celulares que estão ocorrendo nas amostras. Por exemplo, a investigação molecular de eventos de morte celular do tecido e do hospedeiro, eventos de polarização macrófágica, e processos de

amastigogênese dos parasitos, enriqueceriam a presente avaliação. De maneira importante, apesar de extremamente limitado, o uso de triplicatas biológicas para o estudo de hOSEC é observado em outros trabalhos publicados (Jardet et al., 2020; Neil et al., 2020). Portanto, é essencial interpretar os resultados atuais como um ponto de partida e explorar novas abordagens, ajustes metodológicos ou a ampliação do estudo do uso de hOSEC no contexto da leishmaniose cutânea.

VII. Conclusão

Neste estudo, foi padronizado o cultivo do modelo hOSEC por um período de sete dias, demonstrando que os explantes de pele se mantiveram metabolicamente viáveis e conservaram sua estrutura histológica ao longo do experimento. Além disso, a análise dos fragmentos de pele revelou a presença de populações de células imunes residentes, incluindo macrófagos, células de Langerhans e linfócitos. Documentou-se uma capacidade de produção de citocinas dinâmica e passível de ser influenciada pela infecção parasitária, evidenciando o potencial do modelo para investigações relacionadas à resposta imunológica cutânea e processos infecciosos.

Um dos avanços deste trabalho foi a descrição inédita da infecção de hOSEC com *Leishmania braziliensis*, sendo esse protocolo padronizado ao longo do estudo. Observou-se que, após a injeção de formas promastigotas, houve a diferenciação para formas amastigotas dentro dos explantes ao longo dos dias de cultivo, o que reforça a capacidade do modelo de reproduzir aspectos da infecção *in vivo*. Além disso, foi possível detectar um recrutamento de células imunes para o local da infecção, reforçando ainda mais a aplicabilidade do hOSEC para o estudo da dinâmica celular na infecção por *L. braziliensis*.

Apesar dos avanços apresentados, ainda são necessários estudos adicionais para uma compreensão mais aprofundada da resposta imune desencadeada nesse sistema e para a otimização do cultivo de hOSEC, visando aumentar o tempo de observação e ampliar as possibilidades de investigação. No entanto, os achados deste estudo fornecem informações relevantes sobre a dinâmica celular nos estágios iniciais da infecção por *L. braziliensis*, trazendo contribuições importantes para o campo da imunobiologia da leishmaniose cutânea.

Dessa forma, conclui-se que o modelo experimental hOSEC pode ser utilizado como uma ferramenta promissora para o estudo dos momentos iniciais da leishmaniose cutânea, abrindo novas perspectivas para futuras investigações sobre a interação entre o parasita e o sistema imune da pele.

VIII. Referências

- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 10, Issue 3). Public Library of Science. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Aleman, C. (1969). Finestructure of cultured Leishmania brasiliensis. *Experimental Parasitology*, 24(2). [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(69\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0014-4894(69)90163-5)
- Alencar-Silva, T., Díaz-Martín, R. D., Zonari, A., Foyt, D., Guiang, M., Pogue, R., Saldanha-Araujo, F., Dias, S. C., Franco, O. L., & Carvalho, J. L. (2023). The Combination of Synoeca-MP Antimicrobial Peptide with IDR-1018 Stimulates Proliferation, Migration, and the Expression of Pro-Regenerative Genes in Both Human Skin Cell Cultures and 3D Skin Equivalents. *Biomolecules*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/biom13050804>
- Alencar-Silva, T., Zonari, A., Foyt, D., Gang, M., Pogue, R., Saldanha-Araujo, F., Dias, S. C., Franco, O. L., & Carvalho, J. L. (2019). IDR-1018 induces cell proliferation, migration, and reparative gene expression in 2D culture and 3D human skin equivalents. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(11). <https://doi.org/10.1002/term.2953>
- Altamirano-Enciso, A. J., Marzochi, M. C. A., Moreira, J. S., Schubach, A. O., & Marzochi, K. B. F. (2003). On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *História, Ciências, Saúde--Manguinhos*, 10(3).
- Amaral, V., Pirmez, C., Gonçalves, A., Ferreira, V., & Grimaldi, G. (2000). Cell populations in lesions of cutaneous leishmaniasis of Leishmania (L.) amazonensis- infected rhesus macaques, Macaca mulatta. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000200012>
- Andersen, M. L., & Winter, L. M. F. (2019). Animal models in biological and biomedical research – experimental and ethical concerns. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 91. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>
- Andrade, T. A., Aguiar, A. F., Guedes, F. A., Leite, M. N., Caetano, G. F., Coelho, E. B., Das, P. K., & Frade, M. A. (2015). Ex vivo model of human skin (hOSEC) as alternative to animal use for cosmetic tests. *Procedia Engineering*, 110. <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2015.07.011>
- André, S., Rodrigues, V., Picard, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2020). Non-human primates and Leishmania immunity. *Cytokine: X*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100038>

- Anversa, L. s., Tiburcio, M. G. S., Richini-Pereira, V. nia B., & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. In *Revista da Associacao Medica Brasileira* (Vol. 64, Issue 3). <https://doi.org/10.1590/1806-9282.64.03.281>
- Arenas, R., Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., & Ruiz-Esmenjaud, J. (2017). Leishmaniasis: A review. In *F1000Research* (Vol. 6). <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>
- Atwood, S. X., & Plikus, M. V. (2021). Fostering a healthy culture: Biological relevance of in vitro and ex vivo skin models. In *Experimental Dermatology* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/exd.14296>
- Bahrami, F., Harandi, A. M., & Rafati, S. (2018). Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>
- Bahrami, S., Hatam, G. R., Razavi, M., & Nazifi, S. (2011). In vitro cultivation of axenic amastigotes and the comparison of antioxidant enzymes at different stages of *Leishmania tropica*. *Tropical Biomedicine*, 28(2).
- Baroni, A., Buommino, E., De Gregorio, V., Ruocco, E., Ruocco, V., & Wolf, R. (2012). Structure and function of the epidermis related to barrier properties. In *Clinics in Dermatology* (Vol. 30, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2011.08.007>
- Bennis, I., Thys, S., Filali, H., De Brouwere, V., Sahibi, H., & Boelaert, M. (2017). Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infectious Diseases of Poverty*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0267-5>
- Bergers, L. I. J. C., Reijnders, C. M. A., van den Broek, L. J., Spiekstra, S. W., de Gruijl, T. D., Weijers, E. M., & Gibbs, S. (2016). Immune-competent human skin disease models. In *Drug Discovery Today* (Vol. 21, Issue 9). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.008>
- Boité, M. C., Späth, G. F., Bussotti, G., Porrozzi, R., Morgado, F. N., Llewellyn, M., Schwabl, P., & Cupolillo, E. (2020). Trans-atlantic spill over: Deconstructing the ecological adaptation of *leishmania infantum* in the americas. In *Genes* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/genes11010004>
- Boni, S. M., Oyafuso, L. K., Soler, R. de C., & Lindoso, J. A. L. (2017). Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing american tegumentary leishmaniasis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201759038>
- Brasil. (2005). *Atlas de leishmaniose tegumentar Americana*. <http://www.saude.gov.br/editora>

- Brasil. (2017). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. In *Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis*.
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. In *The Lancet* (Vol. 392, Issue 10151, pp. 951-970). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Cattaneo, G. M., Varotto-Boccazzi, I., Molteni, R., Ronchetti, F., Gabrieli, P., Mendoza-Roldan, J. A., Otranto, D., Montomoli, E., Bandi, C., & Epis, S. (2024). A novel chemically defined medium for the biotechnological and biomedical exploitation of the cell factory *Leishmania tarentolae*. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60383-1>
- Chang, K.-P. (2014). Leishmaniasis. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.00254-3>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(S11). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748z>
- Chen, S., Saeed, A. F. U. H., Liu, Q., Jiang, Q., Xu, H., Xiao, G. G., Rao, L., & Duo, Y. (2023). Macrophages in immunoregulation and therapeutics. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01452-1>
- Cheuk, S., Schlums, H., Gallais Sérézal, I., Martini, E., Chiang, S. C., Marquardt, N., Gibbs, A., Detlofsson, E., Introini, A., Forkel, M., Höög, C., Tjernlund, A., Michaëlsson, J., Folkersen, L., Mjösberg, J., Blomqvist, L., Ehrström, M., Stähle, M., Bryceson, Y. T., & Eidsmo, L. (2017). CD49a Expression Defines Tissue-Resident CD8+ T Cells Poised for Cytotoxic Function in Human Skin. *Immunity*, 46(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.009>
- Choi, H. L., Jain, S., Ruiz Postigo, J. A., Borisch, B., & Dagne, D. A. (2021). The global procurement landscape of leishmaniasis medicines. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009181>
- Cincurá, C., De Lima, C. M. F., Machado, P. R. L., Oliveira-Filho, J., Glesby, M. J., Lessa, M. M., & Carvalho, E. M. (2017). Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(3). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0349>
- Claborn, D. (2010). The biology and control of leishmaniasis vectors. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2). <https://doi.org/10.4103/0974-777x.62866>
- Clayton, K., Vallejo, A. F., Davies, J., Sirvent, S., & Polak, M. E. (2017). Langerhans cells-programmed by the epidermis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01676>

- Cohen, A., & Azas, N. (2021). Challenges and tools for in vitro leishmania exploratory screening in the drug development process: An updated review. In *Pathogens* (Vol. 10, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/pathogens10121608>
- Companjen, A. R., Van Der Wel, L. I., Wei, L., Laman, J. D., & Prens, E. P. (2001). A modified ex vivo skin organ culture system for functional studies. *Archives of Dermatological Research*, 293(4). <https://doi.org/10.1007/s004030100219>
- Conceição-Silva, F., & Alves, C. R. (2014). Leishmanioses do continente americano. In *Leishmanioses do continente americano*. <https://doi.org/10.7476/9788575415689>
- Corzo-León, D. E., Munro, C. A., & MacCallum, D. M. (2019). An ex vivo human skin model to study superficial fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 10(JUN), 1172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.01172/BIBTEX>
- Costa, L. E., Salles, B. C. S., Alves, P. T., Dias, A. C. S., Vaz, E. R., Ramos, F. F., Menezes-Souza, D., Duarte, M. C., Roatt, B. M., Chávez-Fumagalli, M. A., Tavares, C. A. P., Gonçalves, D. U., Rocha, M. O. C., Goulart, L. R., & Coelho, E. A. F. (2016). New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *Journal of Immunological Methods*, 434. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2016.04.005>
- Costa-Da-silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-lima, C. G. (2022). Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. In *Trends in Parasitology* (Vol. 19, Issue 11). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>
- Croft, S. L., & Olliaro, P. (2011). Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 17, Issue 10). <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x>
- Cunha, C. F., Ferraz-Nogueira, R., Costa, V. F. A., Pimentel, M. I. F., Chometon, T. Q., Lyra, M. R., Schubach, A. O., Da-Cruz, A. M., & Bertho, A. L. (2020). Contribution of Leishmania braziliensis antigen-specific CD4+ T, CD8+ T, NK and CD3+CD56+NKT cells in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis patients: Cytotoxic, activation and exhaustion profiles. *PLoS ONE*, 15(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229400>
- Danso, M. O., Berkers, T., Mieremet, A., Hausil, F., & Bouwstra, J. A. (2015). An ex vivo human skin model for studying skin barrier repair. *Experimental Dermatology*, 24(1). <https://doi.org/10.1111/exd.12579>

- Davila, A. M. R., & Momen, H. (2000). Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94(6). <https://doi.org/10.1080/00034983.2000.11813588>
- De La Cruz, N. C., Möckel, M., Wirtz, L., Sunaoglu, K., Malter, W., Zinser, M., & Knebel-Mörsdorf, D. (2021). Ex Vivo Infection of Human Skin with Herpes Simplex Virus 1 Reveals Mechanical Wounds as Insufficient Entry Portals via the Skin Surface. *Journal of Virology*, 95(21). <https://doi.org/10.1128/jvi.01338-21>
- De Menezes, J. P. B., Guedes, C. E. S., De Oliveira Almeida Petersen, A. L., Fraga, D. B. M., & Veras, P. S. T. (2015). Advances in development of new treatment for leishmaniasis. In *BioMed Research International* (Vol. 2015). <https://doi.org/10.1155/2015/815023>
- De Moura, T. R., Novais, F. O., Oliveira, F., Clarêncio, J., Noronha, A., Barral, A., Brodskyn, C., & De Oliveira, C. I. (2005). Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity*, 73(9). <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005>
- De Oliveira, C. I., Teixeira, M. J., Gomes, R., Barral, A., & Brodskyn, C. (2004). Animal models for infectious diseases caused by parasites: Leishmaniasis. In *Drug Discovery Today: Disease Models* (Vol. 1, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2004.07.005>
- de Oliveira Filho, V. A., Garcia, M. S. A., Rosa, L. B., Giorgio, S., & Miguel, D. C. (2024). An Overview of *Leishmania* In Vitro Cultivation and Implications for Antileishmanial Screenings against Promastigotes. In *Parasitologia* (Vol. 4, Issue 4, pp. 305-318). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/parasitologia4040027>
- de Paiva-Cavalcanti, M., de Moraes, R. C. S., Pessoa-e-Silva, R., Trajano-Silva, L. A. M., Gonçalves-de-Albuquerque, S. da C., Tavares, D. de H. C., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Silva, R. de F. e., & Pereira, V. R. A. (2015). Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. In *Cell and Bioscience* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13578-015-0021-2>
- de Paula, N. A., Leite, M. N., de Faria Bertoluci, D. F., Soares, C. T., Rosa, P. S., & Frade, M. A. C. (2024). Human Skin as an Ex Vivo Model for Maintaining *Mycobacterium leprae* and Leprosy Studies. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9060135>
- de Vries, H. J. C., Reedijk, S. H., & Schallig, H. D. F. H. (2015). Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. In *American Journal of Clinical Dermatology* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s40257-015-0114-z>

- Deaver, D. R. (1995). A new non-isotopic detection system for immunoassays. *Nature*, 377(6551). <https://doi.org/10.1038/377758a0>
- Donovan, C. (1903). The etiology of one of the hetero geneous fevers of india. *British Medical Journal*, 2(2239). <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2239.1401-a>
- Dos-Santos, A. L. A., Carvalho-Kelly, L. F., Dick, C. F., & Meyer-Fernandes, J. R. (2016). Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. In *Experimental Parasitology* (Vol. 167). <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.005>
- Dunning, N. (2009). Leishmania vaccines: From leishmanization to the era of DNA technology. In *Bioscience Horizons* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzp004>
- Eberlin, S., Silva, M. S. da, Facchini, G., Silva, G. H. da, Pinheiro, A. L. T. A., Eberlin, S., & Pinheiro, A. da S. (2020). The Ex Vivo Skin Model as an Alternative Tool for the Efficacy and Safety Evaluation of Topical Products. In *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* (Vol. 48, Issue 1). <https://doi.org/10.1177/0261192920914193>
- Elmahallawy, E. K., Alkhaldi, A. A. M., & Saleh, A. A. (2021). Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 139). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>
- Elmahallawy, E. K., Sampedro Martínez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernández, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. In *Journal of Infection in Developing Countries* (Vol. 8, Issue 8, pp. 961-972). *Journal of Infection in Developing Countries*. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310>
- Espitia, C. M., Zhao, W., Saldarriaga, O., Osorio, Y., Harrison, L. M., Cappello, M., Travi, B. L., & Melby, P. C. (2010). Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-31>
- Evans, K. J., & Kedzierski, L. (2012). Development of vaccines against visceral leishmaniasis. In *Journal of Tropical Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2012/892817>
- Ferreira, L. M., Hochman, B., & Barbosa, M. V. J. (2005). Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cirurgica Brasileira*, 20(suppl 2). <https://doi.org/10.1590/s0102-86502005000800008>
- Filemon, P., Pimenta, P., Cabreira De Freitas, V., Francinete, N., & Secundino, C. (2012). *Tópicos Avançados em Entomologia Molecular Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores*.

- Filho, A. A. P., Nascimento, A. A. de S., Saab, N. A. A., Fugiwara, R. T., D'Ávila Pessoa, G. C., Koerich, L. B., Pereira, M. H., Araújo, R. N., Sant'Anna, M. R. V., & Gontijo, N. F. (2021). Evasion of the complement system by *Leishmania* through the uptake of factor H, a complement regulatory protein. *Acta Tropica*, 224. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106152>
- Frade, M. A. C., Aguiar, A. F. C. L., Leite, M. N., Coelho, E. B., De Moretti Andrade, T. A., Guedes, F. A., Passos, W. R., & Das, P. K. (2015). Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(3). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153645>
- Frevert, C. W., Felgenhauer, J., Wygrecka, M., Nastase, M. V., & Schaefer, L. (2018). Danger-Associated Molecular Patterns Derived From the Extracellular Matrix Provide Temporal Control of Innate Immunity. In *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* (Vol. 66, Issue 4). <https://doi.org/10.1369/0022155417740880>
- Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>
- Ghigo, C., Mondor, I., Jorquera, A., Nowak, N. J., Wienert, S., Zahner, S. P., Clausen, B. E., Luche, H., Malissen, B., Klauschen, F., & Bajénoff, M. (2013). Multicolor fate mapping of langerhans cell homeostasis. *Journal of Experimental Medicine*, 210(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20130403>
- Gluenz, E., Ginger, M. L., & McKean, P. G. (2010). Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.008>
- Gomes, A. H. S., Martines, R. B., Kanamura, C. T., Barbo, M. L. P., Iglezias, S. D., Lauletta Lindoso, J. A., & Pereira-Chiocola, V. L. (2017). American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunology*, 39(4). <https://doi.org/10.1111/pim.12423>
- Gontijo, B. (2003). Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Medicina Tropical*, 36(13).
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nri978>
- Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. In *Expert Review of Anti- Infective Therapy* (Vol. 8, Issue 4). <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>
- Gow, I., Smith, N. C., Stark, D., & Ellis, J. (2022). Laboratory diagnostics for human *Leishmania* infections: a polymerase chain reaction-focussed review of detection and identification methods. In *Parasites and Vectors* (Vol. 15, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05524-z>

- Guedes, D. C., Minozzo, J. C., Pasquali, A. K. S., Faulds, C., Soccol, C. R., & Thomaz-Soccol, V. (2017). New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(6). <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0131-2017>
- Gumy, A., Louis, J. A., & Launois, P. (2004). The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 34, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.11.021>
- Gupta, S., & Nishi. (2011). Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. In *Indian Journal of Medical Research* (Vol. 133, Issue 1).
- Guttman-Yassky, E., Zhou, L., & Krueger, J. G. (2019). The skin as an immune organ: Tolerance versus effector responses and applications to food allergy and hypersensitivity reactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 144(2). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.03.021>
- Hain, T., Melchior, F., Kamenjarin, N., Muth, S., Weslati, H., Clausen, B. E., Mahnke, K., Silva-Vilches, C., Schütze, K., Sohl, J., Radsak, M. P., Bündgen, G., Bopp, T., Danckwardt, S., Schild, H., & Probst, H. C. (2019). Dermal CD207-Negative Migratory Dendritic Cells Are Fully Competent to Prime Protective, Skin Homing Cytotoxic T-Lymphocyte Responses. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(2). <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.022>
- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.229-243.2001>
- Hofmann, E., Schwarz, A., Fink, J., Kamolz, L. P., & Kotzbeck, P. (2023). Modelling the Complexity of Human Skin In Vitro. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11030794>
- Hurrell, B. P., Regli, I. B., & Tacchini-Cottier, F. (2016). Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. In *Trends in Parasitology* (Vol. 32, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>
- Italiani, P., & Boraschi, D. (2014). From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 5, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00514>
- Jacobs, J. J. L., Lehé, C. L., Cammans, K. D. A., Das, P. K., & Elliott, G. R. (2004). Assessment of contact allergens by dissociation of irritant and sensitizing properties. *Toxicology in Vitro*, 18(5). <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2004.03.007>
- Jacobs, J. J. L., Lehé, C. L., Hasegawa, H., Elliott, G. R., & Das, P. K. (2006). Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and

- maturation at irritant concentration. *Experimental Dermatology*, 15(6).
<https://doi.org/10.1111/j.0906-6705.2006.00420.x>
- Jain, K., & Jain, N. K. (2013). Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. In *Drug Discovery Today* (Vol. 18, Issues 23-24).
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.08.005>
- Jardet, C., David, A., Braun, E., Descargues, P., Grolleau, J. L., Hebsgaard, J., Norsgaard, H., & Lovato, P. (2020). Development and characterization of a human Th17-driven ex vivo skin inflammation model. *Experimental Dermatology*, 29(10). <https://doi.org/10.1111/exd.14160>
- Jiménez-Antón, M. D., Grau, M., Olías-Molero, A. I., & Alunda, J. M. (2019). Syrian Hamster as an Advanced Experimental Model for Visceral Leishmaniasis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1971).
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9210-2_17
- JUNQUEIRA. (2017). Histologia Básica - Texto e Atlas. In *Nucl. Phys.* (Vol. 13, Issue 1).
- Kabashima, K., Honda, T., Ginhoux, F., & Egawa, G. (2019). The immunological anatomy of the skin. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 19, Issue 1).
<https://doi.org/10.1038/s41577-018-0084-5>
- Kassebaum, N. J., Arora, M., Barber, R. M., Brown, J., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Coates, M. M., Coggeshall, M., Cornaby, L., Dandona, L., Dicker, D. J., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M. H., Fullman, N., Goldberg, E. M., ... Zuhlke, L. J. (2016). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053). [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31460-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31460-X)
- Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. In *Parasites and Vectors* (Vol. 10, Issue 1).
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>
- Khalil, C. (2018). Human skin explants an in vitro approach for assessing UVB induced damage. *Toxicology in Vitro*, 53.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.08.013>
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M. P., Kamhawi, S., & Sacks, D. (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.0802331105>
- Knight, C. A., Harris, D. R., Alshammari, S. O., Gugssa, A., Young, T., & Lee, C. M. (2023). Leishmaniasis: Recent epidemiological studies in the Middle East. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 13).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1052478>

- Kropf, P., Kadolsky, U. D., Rogers, M., Cloke, T. E., & Müller, I. (2010). The leishmaniasis model. In *Methods in Microbiology* (Vol. 37, Issue C). [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(10\)37013-9](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(10)37013-9)
- Kupani, M., Pandey, R. K., & Mehrotra, S. (2021). Neutrophils and Visceral Leishmaniasis: Impact on innate immune response and cross-talks with macrophages and dendritic cells. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 236, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/jcp.30029>
- Lai-Cheong, J. E., & McGrath, J. A. (2021). Structure and function of skin, hair and nails. In *Medicine (United Kingdom)* (Vol. 49, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2021.03.001>
- Lainson, R., & Rangel, B. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>
- Lainson, R., Shaw, J. J., Silveira, F. T., Braga, R. R., & Ishikawa, E. A. (1990). Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania* (Viannia) *naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65(5-6).
- Laskay, T., Van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? In *Trends in Microbiology* (Vol. 11, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)
- Lebonvallet, N., Jeanmaire, C., Danoux, L., Sibille, P., Pauly, G., & Misery, L. (2010). The evolution and use of skin explants: Potential and limitations for dermatological research. In *European Journal of Dermatology* (Vol. 20, Issue 6). <https://doi.org/10.1684/ejd.2010.1054>
- Leishman, W. B. (1903). On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in india. In *British Medical Journal* (Vol. 2, Issue 2238). <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2238.1376-a>
- Leite, M. N., Viegas, J. S. R., Praça, F. S. G., de Paula, N. A., Ramalho, L. N. Z., Bentley, M. V. L. B., & Frade, M. A. C. (2021). Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 160. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105769>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014a). Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 56, Issue 1). <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014b). Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 56, Issue 1, pp. 1-11). Instituto de

- Mann, S., Frasca, K., Scherrer, S., Henao-Martínez, A. F., Newman, S., Ramanan, P., & Suarez, J. A. (2021). A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. In *Current Tropical Medicine Reports* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s40475-021-00232-7>
- Martinez, J. E., Travi, B. L., Valencia, A. Z., & Saravia, N. G. (1991). Metastatic capability of *Leishmani (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in golden hamsters. *Journal of Parasitology*, 77(5). <https://doi.org/10.2307/3282713>
- Masson-Meyers, D. S., Andrade, T. A. M., Caetano, G. F., Guimaraes, F. R., Leite, M. N., Leite, S. N., & Frade, M. A. C. (2020). Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. In *International Journal of Experimental Pathology* (Vol. 101, Issues 1-2). <https://doi.org/10.1111/iep.12346>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 172(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: M1 and M2 macrophages. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 6, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00212>
- Murray, P. J., Allen, J. E., Biswas, S. K., Fisher, E. A., Gilroy, D. W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J. A., Ivashkiv, L. B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F. O., Mege, J. L., Mosser, D. M., Natoli, G., Saeij, J. P., Schultze, J. L., Shirey, K. A., ... Wynn, T. A. (2014). Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. In *Immunity* (Vol. 41, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008>
- N., R., & I.J., K. (2012). A review on alternatives to animal testing methods in drug development. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(SUPPL. 5).
- Nateghi-Rostami, M., & Sohrabi, Y. (2024). Memory T cells: promising biomarkers for evaluating protection and vaccine efficacy against leishmaniasis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 15). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1304696>
- Neil, J. E., Brown, M. B., & Williams, A. C. (2020). Human skin explant model for the investigation of topical therapeutics. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78292-4>
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nri2622>

- Nguyen, A. V., & Soulika, A. M. (2019). The dynamics of the skin's immune system. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081811>
- Okwor, I., Liu, D., & Uzonna, J. (2009). Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine*, 27(19). <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.133>
- Okwor, I., Mou, Z., Liu, D., & Uzonna, J. (2012). Protective immunity and vaccination against cutaneous leishmaniasis. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 3, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00128>
- Oliveira, L. C. de, & Moreira, N. M. (2021). Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Brazil and in international border regions. *Research, Society and Development*, 10(12). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20684>
- OMS, O. (2019). Leishmanioses -Informe Epidemiológico das Américas. *Informe de Leishmanioses No 7, 1*.
- Ono, S., & Kabashima, K. (2016). The role of dendritic cells and macrophages in the skin immunity. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 39(5). <https://doi.org/10.2177/jsci.39.448>
- Osorio, Y., Melby, P. C., Pirmez, C., Chandrasekar, B., Guarín, N., & Travi, B. L. (2003). The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunology*, 25(3). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00615.x>
- Pacheco-Fernandez, T., Volpedo, G., Verma, C., & Satoskar, A. R. (2021). Understanding the immune responses involved in mediating protection or immunopathology during leishmaniasis. *Biochemical Society Transactions*, 49(1). <https://doi.org/10.1042/BST20200606>
- PAHO. (2020). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. *PAHO/WHO Institutional Repository. Leishmaniasis: Epidemial Report in the Americas*, 9.
- Paiva, V. C. F., & Careta, F. P. (2019). Comparison of the growth of promastigotes cellular lineages of *Leishmania amazonensis* by the sequential adaptation of Schneider's insect for RPMI 1640 medium culture. *Scientific Electronic Archives*, 12(6). <https://doi.org/10.36560/1262019986>
- Pasparakis, M., Haase, I., & Nestle, F. O. (2014). Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nri3646>
- Passelli, K., Billion, O., & Tacchini-Cottier, F. (2021). The Impact of Neutrophil Recruitment to the Skin on the Pathology Induced by *Leishmania* Infection. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.649348>

- Pérez-Salas, J. L., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., & Gallegos-Infante, J. A. (2023). In Vitro and Ex Vivo Models for Screening Topical Anti-Inflammatory Drugs. In *Scientia Pharmaceutica* (Vol. 91, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/scipharm91020020>
- Pessoa, F. A. C., Medeiros, J. F., & Barrett, T. V. (2007). Effects of timber harvest on phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a production forest: Abundance of species on tree trunks and prevalence of trypanosomatids. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(5). <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000075>
- Probst, R. J., Welde, B. T., Lawyer, P. G., Stiteler, J. S., & Rowton, E. D. (2001). Rhesus monkey model for *Leishmania major* transmitted by *Phlebotomus papatasi* sandfly bites. *Medical and Veterinary Entomology*, 15(1). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2915.2001.00283.x>
- Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00034-18>
- Råberg, L., Sim, D., & Read, A. F. (2007). Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science*, 318(5851). <https://doi.org/10.1126/science.1148526>
- Reis, L. L. dos, Balieiro, A. A. da S., Fonseca, F. R., & Gonçalves, M. J. F. (2019). Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. *Cadernos de Saúde Pública*, 35(1). <https://doi.org/10.1590/0102-311x00047018>
- Reithinger, R., & Dujardin, J. C. (2007). Molecular diagnosis of leishmaniasis: Current status and future applications. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 45, Issue 1). <https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>
- Reuter, C., Hauf, L., Imdahl, F., Sen, R., Vafadarnejad, E., Fey, P., Finger, T., Jones, N. G., Walles, H., Barquist, L., Saliba, A. E., Groeber-Becker, F., & Engstler, M. (2023). Vector-borne *Trypanosoma brucei* parasites develop in artificial human skin and persist as skin tissue forms. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43437-2>
- Rey, J. A., Travi, B. L., Valencia, A. Z., & Saravia, N. G. (1990). Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43(6). <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.43.623>
- Ritter, U., & Körner, H. (2002). Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 24(6). <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2002.00467.x>

- Ross, R. (1903). Note on the bodies recently described by leishman and donovan. *British Medical Journal*, 2(2237). <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 2, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/nri933>
- Saha, S., Shalova, I. N., & Biswas, S. K. (2017). Metabolic regulation of macrophage phenotype and function. In *Immunological Reviews* (Vol. 280, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/imr.12603>
- Saini, S., & Rai, A. K. (2020). Hamster, a close model for visceral leishmaniasis: Opportunities and challenges. In *Parasite Immunology* (Vol. 42, Issue 10). <https://doi.org/10.1111/pim.12768>
- Santiago, A. S., Pita, S. S. da R., & Guimarães, E. T. (2021). Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. *Research, Society and Development*, 10(7). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16543>
- Schiffner, R., Bischoff, S. J., Matziolis, G., & Schmidt, M. (2017). Evaluation of a vital staining protocol with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for cancellous bone in a sheep model. *Research in Veterinary Science*, 114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.03.013>
- Scott, P. (2005). Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. In *Cellular Microbiology* (Vol. 7, Issue 12). <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00626.x>
- Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>
- Seneschal, J., Clark, R. A., Gehad, A., Baecher-Allan, C. M., & Kupper, T. S. (2012). Human Epidermal Langerhans Cells Maintain Immune Homeostasis in Skin by Activating Skin Resident Regulatory T Cells. *Immunity*, 36(5). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.018>
- Singh, N., Kumar, M., & Singh, R. K. (2012). Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(6). [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)
- Singh, S., Dey, A., & Sivakumar, R. (2005). Applications of molecular methods for *Leishmania* control. In *Expert Review of Molecular Diagnostics* (Vol. 5, Issue 2). <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.251>
- Solbach, W., & Laskay, T. (2000). The host response to leishmania infection. *Advances in Immunology*, 74. [https://doi.org/10.1016/s0065-2776\(08\)60912-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2776(08)60912-8)

- Soong, L. (2009). *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases Leishmaniasis*. www.genedb.org/genedb/linfantum
- Sousa, A. Q., & Pearson, R. (2009). Drought, smallpox, and emergence of *Leishmania braziliensis* in northeastern Brazil. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 15, Issue 6). <https://doi.org/10.3201/eid1506.071331>
- Souto-Silva, M. V., Bispo, E. C. I., Albuquerque, L. F. F., Barcelos, S., Garcez, E. M., Quilici, L. S., Neto, F. F. C., Duarte, E. C. B., Boeloni, J. N., Saldanha-Araujo, F., Gelfuso, G. M., & Carvalho, J. L. (2024). Toxicity and Dermatokinetic Analysis of Ibrutinib in Human Skin Models. *Pharmaceutics*, 16(11), 1377. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111377>
- Souza-Lemos, C., De-Campos, S. N., Teva, A., Côte-Real, S., Fonseca, E. C., Porrozzi, R., & Grimaldi, G. (2008). Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *Journal of Pathology*, 216(3). <https://doi.org/10.1002/path.2403>
- Steverding, D. (2017). The history of leishmaniasis. In *Parasites and Vectors* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1-10). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>
- Suman, S. S., Amit, A., Singh, K. P., Gupta, P., Equbal, A., Kumari, A., Topno, R. K., Ravidas, V., Pandey, K., Bimal, S., Das, P., & Ali, V. (2018). Cytosolic trypanothione of *Leishmania donovani* modulates host immune response in visceral leishmaniasis. *Cytokine*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.03.010>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: From textbook descriptions to biological understanding. In *Open Biology* (Vol. 7, Issue 9). <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Thakur, C. P., Mitra, D. K., & Narayan, S. (2003). Skewing of cytokine profiles towards T helper cell type 2 response in visceral leishmaniasis patients unresponsive to sodium antimony gluconate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(4). [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)90071-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)90071-X)
- Thakur, S., Joshi, J., & Kaur, S. (2020). Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of parasitological, immunological and molecular methods. In *Journal of Parasitic Diseases* (Vol. 44, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s12639-020-01212-w>
- Tice, R. R., Austin, C. P., Kavlock, R. J., & Bucher, J. R. (2013). Improving the human hazard characterization of chemicals: A Tox21 update. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 121, Issue 7). <https://doi.org/10.1289/ehp.1205784>
- Tobin, D. J. (2017). Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, 26(1). <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2016.03.002>

- Toebak, M. J., Gibbs, S., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J., & Rustemeyer, T. (2009). Dendritic cells: Biology of the skin. In *Contact Dermatitis* (Vol. 60, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2008.01443.x>
- Travi, B. L., Osorio, Y., Melby, P. C., Chandrasekar, B., Arteaga, L., & Saravia, N. G. (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infection and Immunity*, 70(5). <https://doi.org/10.1128/IAI.70.5.2288-2296.2002>
- Ty, M. C., Loke, P., Alberola, J., Rodriguez-Cortes, A., & Rodriguez-Cortes, A. (2019). Immuno-metabolic profile of human macrophages after *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS ONE*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225588>
- Vannier-Santos, M., Martiny, A., & Souza, W. (2005). Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4). <https://doi.org/10.2174/1381612023396230>
- Visvesvara, G. S., & Garcia, L. S. (2002). Culture of protozoan parasites. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 15, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.327-328.2002>
- Von Stebut, E. (2007). Cutaneous *Leishmania* infection: Progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental Dermatology*, 16(4). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00554.x>
- Vostálová, J., Cukr, M., Zálešák, B., Lichnovská, R., Ulrichová, J., & Rajnochová Svobodová, A. (2018). Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.011>
- Wang, E. H. C., Barresi-Thornton, R., Chen, L. C., Senna, M. M., Liao, I. C., Chen, Y., Zheng, Q., & Bouez, C. (2023). The Development of Human Ex Vivo Models of Inflammatory Skin Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24). <https://doi.org/10.3390/ijms242417255>
- WELLER, R. et al. (2008). *Chapter 2: Function and structure of the skin*.
- WHO. (2010). Control of the leishmaniases: WHO TRS N°949. In *Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the* (Issue March 22-26).
- Wickett, R. R., & Visscher, M. O. (2006). Structure and function of the epidermal barrier. *American Journal of Infection Control*, 34(10 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.295>
- Wilkinson, H. N., Kidd, A. S., Roberts, E. R., & Hardman, M. J. (2021). Human ex vivo wound model and whole-mount staining approach to accurately evaluate skin repair. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(168). <https://doi.org/10.3791/62326>

- Wurbs, A., Karner, C., Vejzovic, D., Singer, G., Pichler, M., Liegl-Atzwanger, B., & Rinner, B. (2024). A human ex vivo skin model breaking boundaries. *Scientific Reports*, 14(1), 24054. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-75291-7>
- Xu, W., Jong Hong, S., Jia, S., Zhao, Y., Galiano, R. D., & Mustoe, T. A. (2012). Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. *Laboratory Investigation*, 92(4). <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.184>
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. In *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 16, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Yousef, H., Alhaji, M., & Sharma, S. (2020). Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls Publishing*.
- Zschaler, J., Schlorke, D., & Arnhold, J. (2014). Differences in innate immune response between man and mouse. *Critical Reviews in Immunology*, 34(5). <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2014011600>

STUDY OF THE INITIAL EVENTS OF HUMAN INFECTION BY *Leishmania braziliensis* IN HUMAN SKIN EXPLANTS

Abstract

Background: Leishmaniasis is a vector-borne disease of major public health significance, caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted through the bite of Phlebotomine sandflies. Despite advances in studies on the immunobiology of infection, the initial mechanisms of parasite-host interaction remain incompletely understood. Although *in vitro* and *in vivo* models have been fundamental in generating new knowledge, none fully replicate human infection. *Ex vivo* models, such as human skin explants, preserve the structural and cellular complexity of the skin, including immune cells, and represent a promising alternative for these studies.

Methods: This study aimed to standardize the use of human organotypic skin explant cultures (hOSEC) as an experimental model for studying *Leishmania braziliensis* infection. Skin explants obtained from abdominoplasty donors were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Viability was assessed using TTC metabolism assay and histological analysis. Infection was standardized at 3×10^5 parasites per fragment, inoculated through three 5 μ L injections. Parasite presence was confirmed by histological examination, scanning electron microscopy, and qPCR. Cytokine production (IL-10, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-2) was quantified using flow cytometry.

Results: hOSEC viability was maintained for seven days. Immune cells were present in cultured skin samples. The presence of *L. braziliensis* was confirmed, showing progressive promastigote-to-amastigote conversion and a gradual decrease in parasite load over time. Histological analysis showed tissue alterations in infected samples, including inflammatory infiltration and epithelial disorganization. Cytokine profiling revealed detectable levels of IL-10, IL-4, TNF- α , IFN- γ , IL-6, and IL-2, with IL-2 downregulation in infected samples by day seven, suggesting an immunomodulatory effect of *L. braziliensis*.

Conclusion: The hOSEC model was successfully optimized for *L. braziliensis* infection, demonstrating immune competence and potential for studying early host-parasite interactions in leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, *ex vivo* model, hOSEC, immune response, cytokines

Background

Leishmaniasis is a neglected tropical disease with high epidemiological relevance. It is endemic in 92 countries, with *Leishmania braziliensis* being the most widely distributed species in the Americas. Mucocutaneous leishmaniasis,

caused by *L. braziliensis*, results in severe tissue destruction and long-term morbidity. Over one billion people are at risk of contracting the disease, with approximately 1.6 million new cases reported annually (WHO, 2020). The increasing urbanization of vector habitats and environmental changes contribute to the spread of the disease, complicating efforts for control and treatment (PAHO, 2020).

The transmission cycle involves phlebotomine sandflies that act as vectors, transferring *Leishmania* species to mammalian hosts, including humans. Once in the host, the parasites invade macrophages, transforming from promastigote to amastigote form, where they persist intracellularly (Lainson & Rangel, 2005). Different species of *Leishmania* lead to distinct clinical manifestations, ranging from cutaneous ulcers to visceral involvement, depending on host immune responses and parasite virulence factors (Burza et al., 2018).

Despite advances in research, current *in vivo* and *in vitro* models fail to accurately replicate human infection. Mouse models provide insights into immune responses but differ significantly from human pathophysiology, particularly regarding immune system interactions (Mestas & Hughes, 2004). While *in vitro* cell culture systems offer controlled environments for studying *Leishmania* behavior, they lack the complexity of full tissue architecture (Costa-Da-silva et al., 2022). Given these limitations, *ex vivo* human skin explants emerge as a promising alternative for studying early host-pathogen interactions.

hOSEC maintains the structural integrity of the skin, including immune cells, allowing the evaluation of parasite-host interactions in a more physiologically relevant context. This study aims to optimize hOSEC as an experimental model for *L. braziliensis* infection, focusing on tissue viability, immune cell composition, infection dynamics, and cytokine responses.

Methods

Human skin explant culture (hOSEC)

Skin explants were obtained from patients undergoing abdominoplasty who signed the informed consent form. After skin disinfection, cylindrical fragments of 8 mm in diameter and approximately 5 mm in depth were cut using a dermatological punch. The fragments were placed on a sterile metal grid in six-well plates, with the dermis in contact with the culture medium and the epidermis exposed to air. The fragments were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco®) supplemented with 10% v/v fetal bovine serum (FBS) (Nova Biotecnologia) and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco®) and incubated at 37°C, 95% humidity, and 5% CO₂ (Leite et al., 2021). Culture medium changes were performed every 2 days by removing 50% of the old medium volume and adding the same volume of fresh medium. The fragments

were cultured for experimental periods of 0, 1, 3, 5, and 7 days, except for tissue viability assays, in which the fragments were cultured for 0, 7, 14, and 21 days.

2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) metabolization assay

To assess the viability of the hOSEC models, a colorimetric method based on the metabolism of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) was used. This assay serves as an indicator of the metabolic state of the tissue, distinguishing metabolically active and inactive regions (Vostálová et al., 2018).

The fragments were cultured for experimental periods of 0, 7, 14, 21, and 28 days. After the designated cultivation periods, the fragments were processed as described by Vostálová et al. (2018). Extraction was performed overnight at room temperature on a plate shaker protected from light. Subsequently, 200 µL samples were taken from each well and transferred to a 96-well plate, where absorbance was measured at 485 nm using a spectrophotometer (Synergy™ HTX).

Histological evaluation of tissue viability of the hOSEC model

Structural evaluations of hOSEC were carried out by a pathologist who was blinded to the experimental groups, ensuring impartiality in the analyses, as described by Matarrese et al. (2021). The following criteria were assessed and semi-quantitatively quantified: spongiosis (intercellular edema), acantholysis, vesicles, edema, epidermal cell necrosis (intense cellular eosinophilia), perinuclear edema (epidermis), intranuclear edema, nuclear pyknosis, dermo-epidermal junction separation/basal cells not connected, exocytosis, and inflammatory cells in the dermis.

Assessment of the immune cell population by immunohistochemistry

The immunodetection step was carried out at LIB, a partner laboratory of the research group. For immunohistochemistry (IHC), the tissues were initially sectioned into thin slices and dehydrated in alcohol solutions of increasing concentration. The samples were then incubated in a blocking solution (1% bovine serum albumin) for 10–30 minutes. Next, cytokeratin, S-100 protein, CD56, CD138, CD8, and CD68 antibodies were diluted in the blocking solution, and the samples were incubated for 1–2 hours at room temperature. Subsequently, the samples were washed with PBS to remove excess primary antibody and incubated with the secondary antibody (peroxidase-conjugated) for 30–60 minutes at room temperature. After incubation with the chromogenic substrate solution for a few minutes, the samples were washed with water to stop the reaction. Finally, the slides were mounted and examined by a pathologist who was blinded to the experimental groups (Deaver, 1995).

Infection of the hOSEC model with *L. braziliensis*

First, the viability of promastigotes of *L. braziliensis* was verified by observing their mobility after being stained with 0.4% trypan blue in phosphate-buffered saline (PBS). Then, the parasites were concentrated by centrifugation at 2200 G for 15 min and the pellet was resuspended in 1 mL of Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) medium (Sigma - Aldrich) supplemented with 10% FBS and counted in a Neubauer chamber. After counting viable parasites, the skin explants were divided into an uninfected control group and an infected group. Intradermal inoculation of fragments from the infected group was performed using an insulin syringe (BD Ultra-Fine II 0.3 ml 8 x 0.3 mm) with the aid of a needle measuring 8 mm in length and 0.30 mm in gauge (30G). In order for the parasites to be distributed throughout the skin fragment, 3 injections were performed per fragment containing 5ul of 1×10^5 *Leishmania braziliensis*.

Evaluation of parasite presence by qPCR and Scanning Electron Microscopy (SEM)

To verify and monitor the infection, genomic DNA was isolated from the samples using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™) and following the manufacturer's recommendations. The absolute parasite load was determined by qPCR using primers targeting the Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) region with the primers: LITSR-5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' and L5.8S-5' TGATACCACTTATCGCACTT 3 (Davila & Momen, 2000). In each reaction, 50 ng of DNA, 0.2 µM of each primer, 10 µL of LuminoCt® SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich) in a final volume of 20 µL were used. qPCRs were performed in 96-well plates (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®), in triplicate, in the 7500 Real-time PCR System thermocycler (Applied Biosystems), under the following amplification conditions: 2 min at 50 oC, 10 min at 94 oC, followed by 40 cycles under the conditions of 15 sec at 94 oC, 40 sec at 53 oC and 10 sec at 72 oC. In all reactions, 2 negative controls (samples without DNA) and 2 positive controls (DNA extracted from *L. braziliensis* cultures) were included.

The samples were initially pre-fixed in Karnovsky's solution for 24 hours and stored in CaCo buffer at 4°C. Cryofracture was then performed by infiltrating the samples with glycerol solutions in 0.1 M sodium cacodylate buffer, followed by freezing in liquid nitrogen and fracturing with blades to separate membrane leaflets. Post-fixation was carried out in 2% osmium tetroxide, and the samples were dehydrated in increasing acetone concentrations before undergoing critical point drying with CO₂. They were then mounted on metal stubs using carbon tape and coated with a 10 nm layer of gold or platinum to ensure conductivity. Finally, the samples were analyzed using a scanning electron microscope to obtain detailed structural images.

Evaluation of histological changes and presence of parasites after infection with *L. braziliensis*.

After the different culture periods, the skin fragments were fixed in 10% formalin until they were sent to the Pathology laboratory for paraffin embedding and production of histological sections. The histological examination was performed by an experienced pathologist, who classified the inflammatory infiltrate according to its intensity and cellular composition. The analysis included the identification of mononuclear cells, such as lymphocytes and macrophages, as well as the assessment of the presence of both extracellular and intracellular parasites. In addition, the viability of the parasites was estimated based on morphological criteria, such as cell membrane integrity and preservation of the cytoplasm.

Cytokine quantification

Cytokines belonging to the Th1 (INF- γ , IL-2, TNF- α) and Th2 (IL-6, IL-4, IL-10) profiles were measured by flow cytometry in samples of conditioned culture medium from hOSECs in the control and infected groups collected on the defined experimental days. For this, the commercial Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 kit (BD Bioscience) was used, according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

The data from the histological analysis were analyzed qualitatively. The other results were analyzed quantitatively. The collected data were subjected to normality analysis using the Shapiro-Wilk test and presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or standard error. The variables viability, parasite load and tissue viability were analyzed by ONE-WAY ANOVA, while the cytokine analysis was performed by TWO-WAY ANOVA, and Tukey's post hoc tests were subsequently performed. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Optimization of hOSEC culture

Skin explant culture was previously described by the research group for the study of Ibrutinib permeation and action (Alencar-Silva et al., 2019; Souto-Silva et al., 2024) as well as in studies of the regenerative potential of peptides (Alencar-Silva et al., 2023). In this study, adjustments were made to standardize the use of hOSEC for infection with *Leishmania braziliensis*. The samples were mostly derived from female individuals aged 35 to 48 years. The fragments were cultured for 21 days, and their viability was analyzed weekly. During the first 7 days of culture, the skin did not lose metabolic viability, with no statistical difference

between days 0 and 7. However, analysis of the viability of the hOSEC model throughout the remaining culture periods revealed a reduction of 46.47% after 14 days, when compared to day 0 ($p < 0.05$). This decline was also observed after 21 days of culture, when compared to days 0 and 7, with an average reduction of 54.45% ($p < 0.05$) (Figure 1). The results indicate that, although the model maintains metabolic characteristics in the first days of culture, its viability begins to be compromised over time, especially after two weeks. Therefore, the assessment of tissue viability through histological evaluation was performed only up to the seventh day of culture.

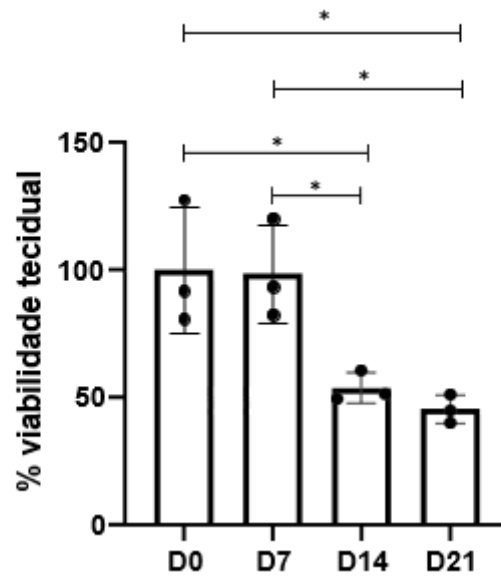


Figure 1. Assessment of hOSEC viability in culture. Human skin explant cultures were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS for 21 days. Viability was assessed by the TTC test at 7-day intervals. Data was analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. Results refer to three biological replicates performed in technical triplicates. * $p < 0.05$.

Histological analyses of the hOSEC model throughout the different culture periods also revealed progressive cellular damage. In all periods evaluated, mononuclear inflammatory cells were discretely detected. Furthermore, no changes such as intercellular edema or cellular lesions were identified, indicating the absence of these specific lesions throughout the entire culture period. On the other hand, perinuclear edema in the epidermis was discretely identified on days 0, 1, 3 and 5 (Figure 2), intensifying to a moderate degree on day 7 (Figure 2E). Important changes, such as separation at the dermoepidermal junction and disconnection of basal cells, were also observed on day 7 of culture (Figure 2F).

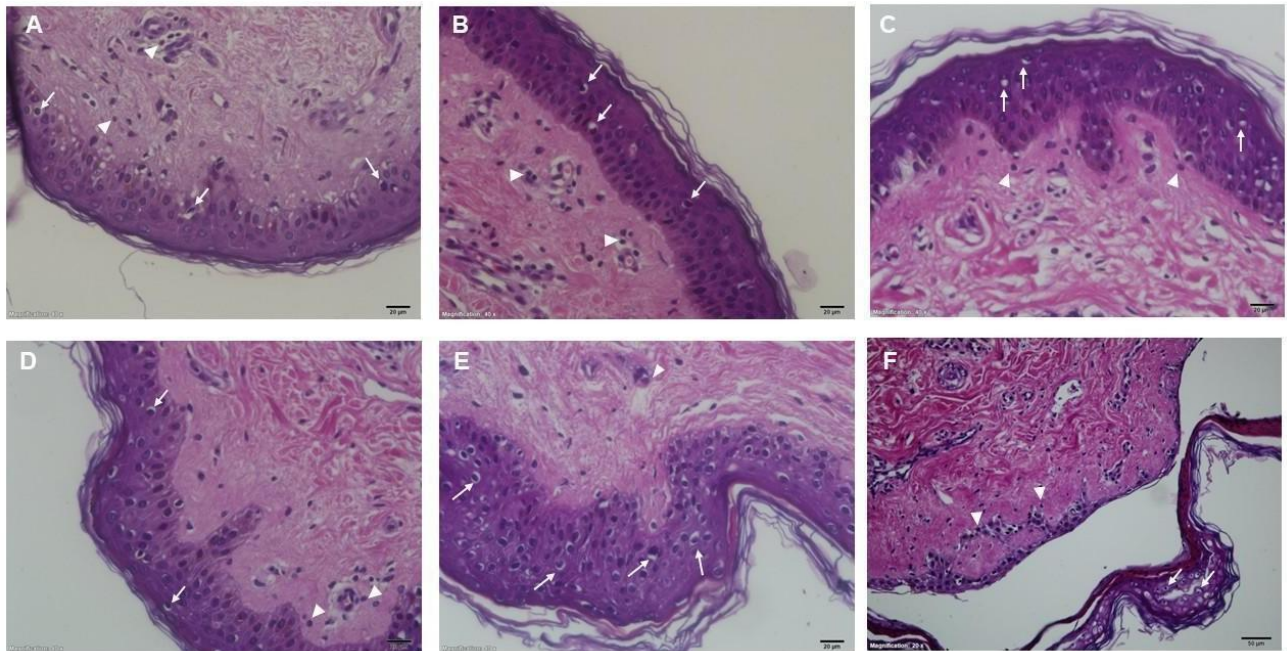


Figure 2. Histological evaluation of hOSEC over 7 days of culture. Human skin explant cultures were grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS for 7 days. Histological sections were stained with H/E and recorded using a microscope. Perinuclear edema changes are indicated by white arrows. Mononuclear inflammatory cells in the dermis are pointed out with white arrowheads. Day 0 (A), day 1 (B), day 3 (C), day 5 (D), day 7 (E and F).

Characterization of the immune cell population in skin explants

The analysis of skin explants cultured in the hOSEC model revealed the presence of several immunologically active cell populations throughout the different experimental days. Cells positive for specific markers for Langerhans cells (S100+) (Figure 3 A and B), macrophages (CD68+) (Figure 3 C and D), and different subtypes of T lymphocytes (CD4+, CD8+) (Figure 3 E and F) were identified. In addition, plasma cells (CD138+) (Figure 3 G and H), effector cells of the humoral response, were observed, reinforcing the immunological diversity present in the explants. The detection of these cell populations at all culture times indicates that the hOSEC model maintains the integrity of the skin's resident immune cells, preserving their distribution over time. The presence of antigen-presenting cells, such as Langerhans cells and macrophages, suggests that the model may provide a reliable platform for investigating cutaneous immune

activation. Similarly, the identification of T lymphocytes aids in understanding adaptive immune responses in this system.

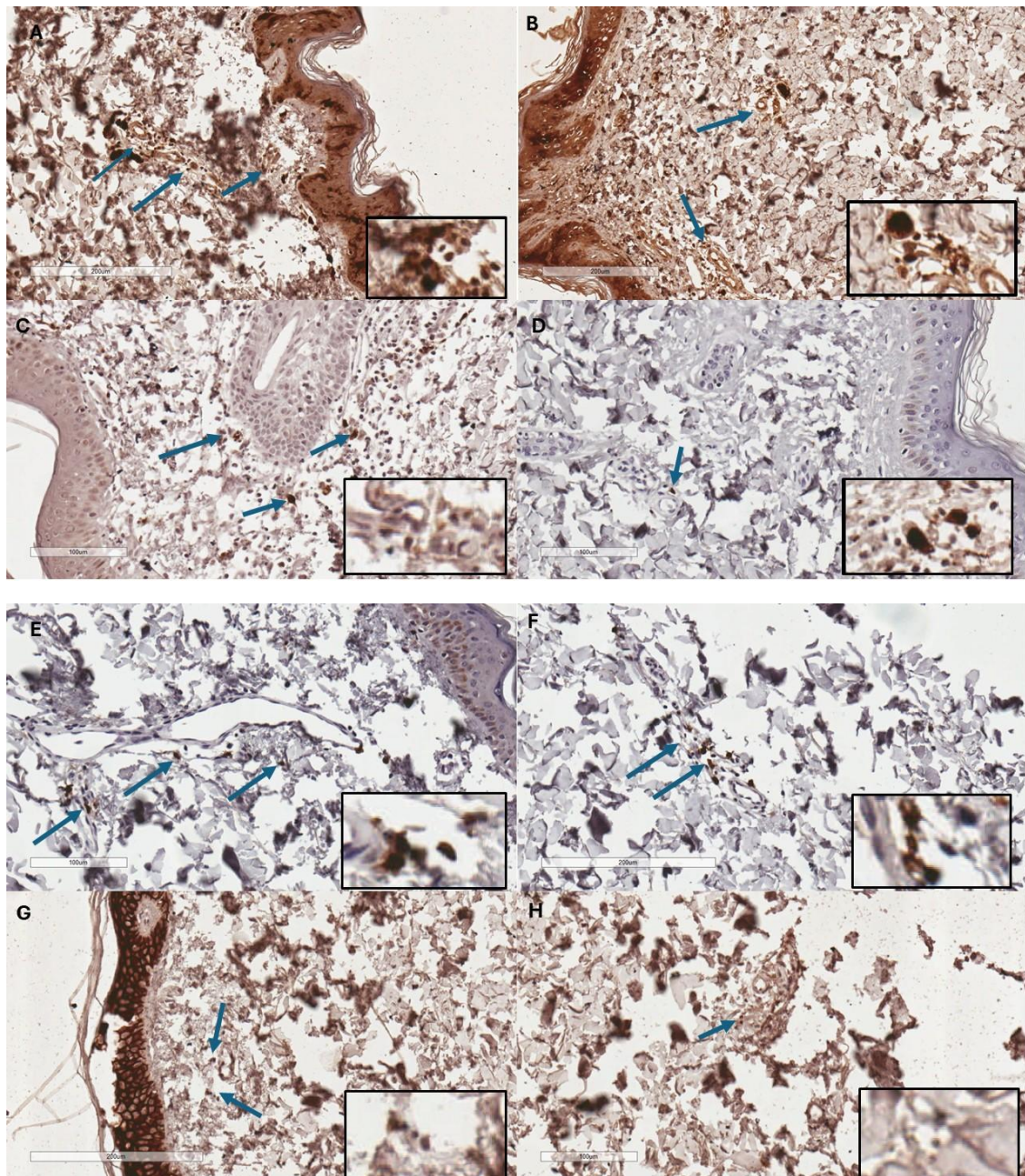


Figure 3. Histological sections of hOSEC for immunohistochemistry. Histological slides of hOSEC stained with S100 (A and B), CD68 (C and D), CD4 and CD8 (E and F) and CD138 (G and H). Blue arrows indicate the presence of immune cells. Images are representative of samples derived from 3 different patients.

Assessment of the presence of *L. braziliensis* in hOSEC using scanning electron microscopy

The presence of the parasites in hOSEC was also confirmed using scanning electron microscopy of ex vivo skin samples infected with *L. braziliensis*. This analysis revealed important aspects of the parasite's behavior and interaction with the host tissue throughout the different culture periods. On days 0 and 1 of

culture, it was possible to observe predominantly promastigote forms of the parasite attached to the surface of skin cells (Figure 4). However, on day 3 of culture, the presence of amastigote forms was observed, characterizing the morphological transformation of the parasite in the ex vivo environment (Figure 5). These findings suggest both the phagocytic potential of cells present in the skin, such as macrophages and other resident immune cells, and the adaptive capacity of the parasite to switch between promastigote and amastigote forms, which is essential for the survival and progression of the infection.

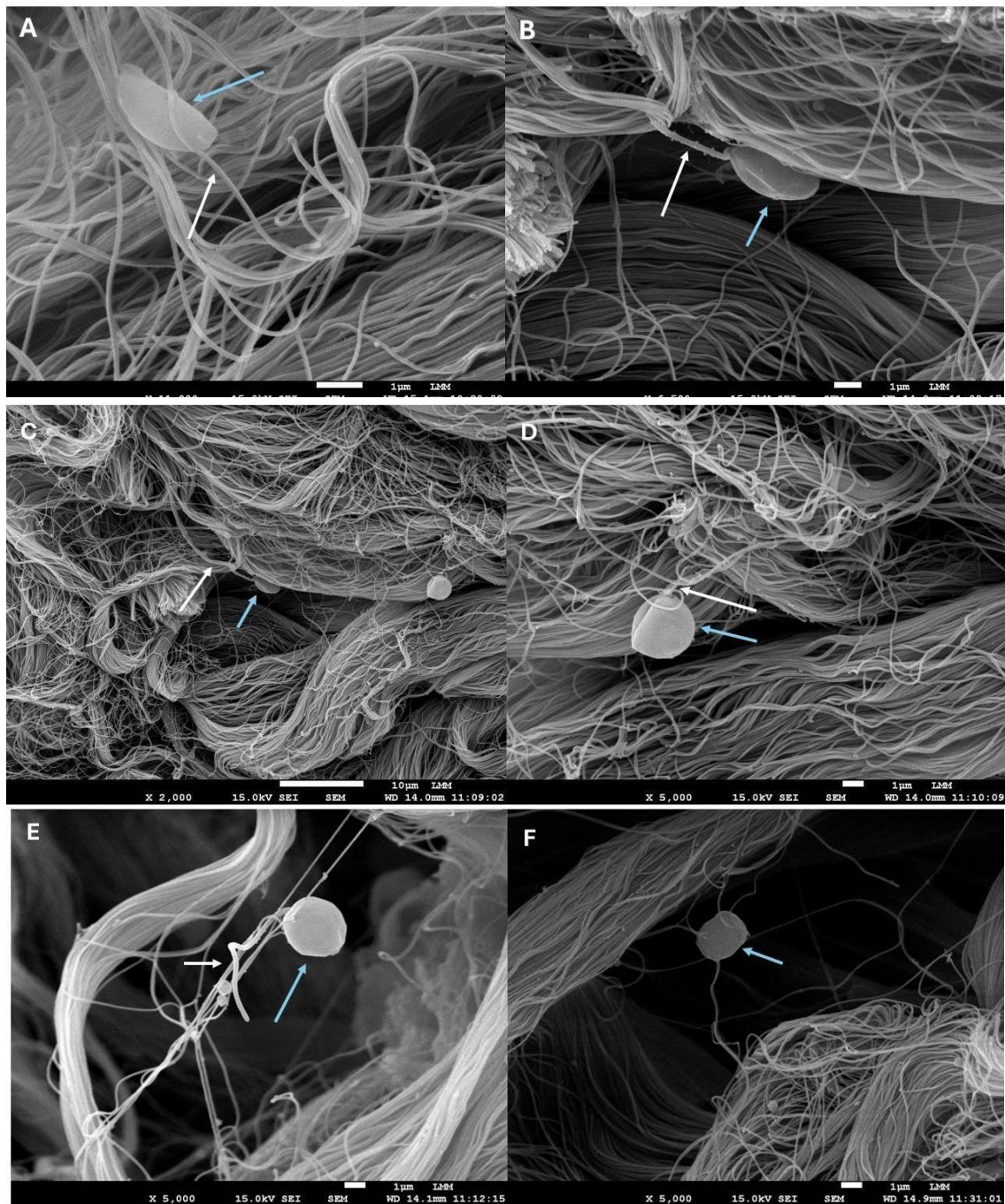


Figure 4. Scanning electron microscopy showing *Leishmania braziliensis* present in infected hOSEC at day 0 of culture. hOSEC were infected with 3×10^5 parasites and cultured for 2 h until processing for scanning electron microscopy. Electron micrographs showing the elongated forms of promastigotes (blue arrow) with a small free flagellum (white arrow) at day 0 of culture. Images are representative of samples derived from 3 different patients.

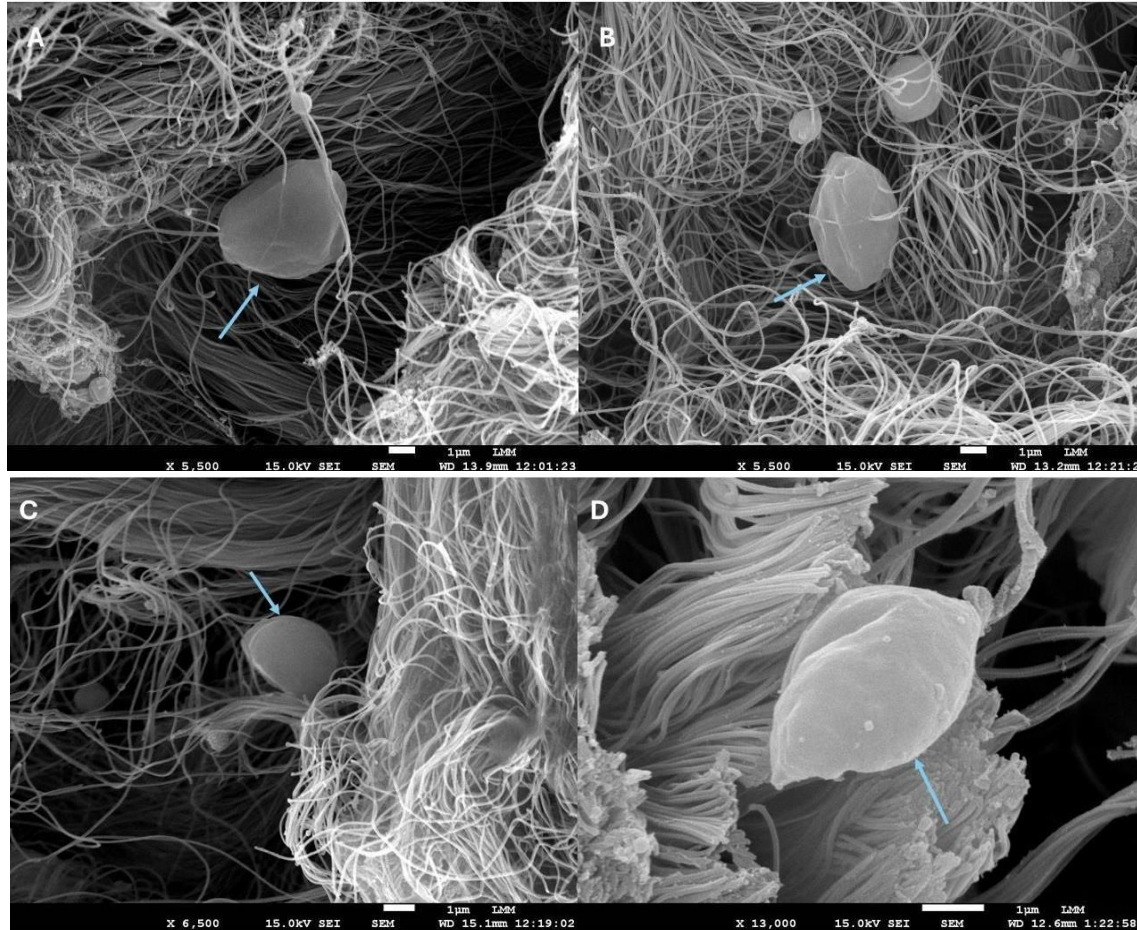
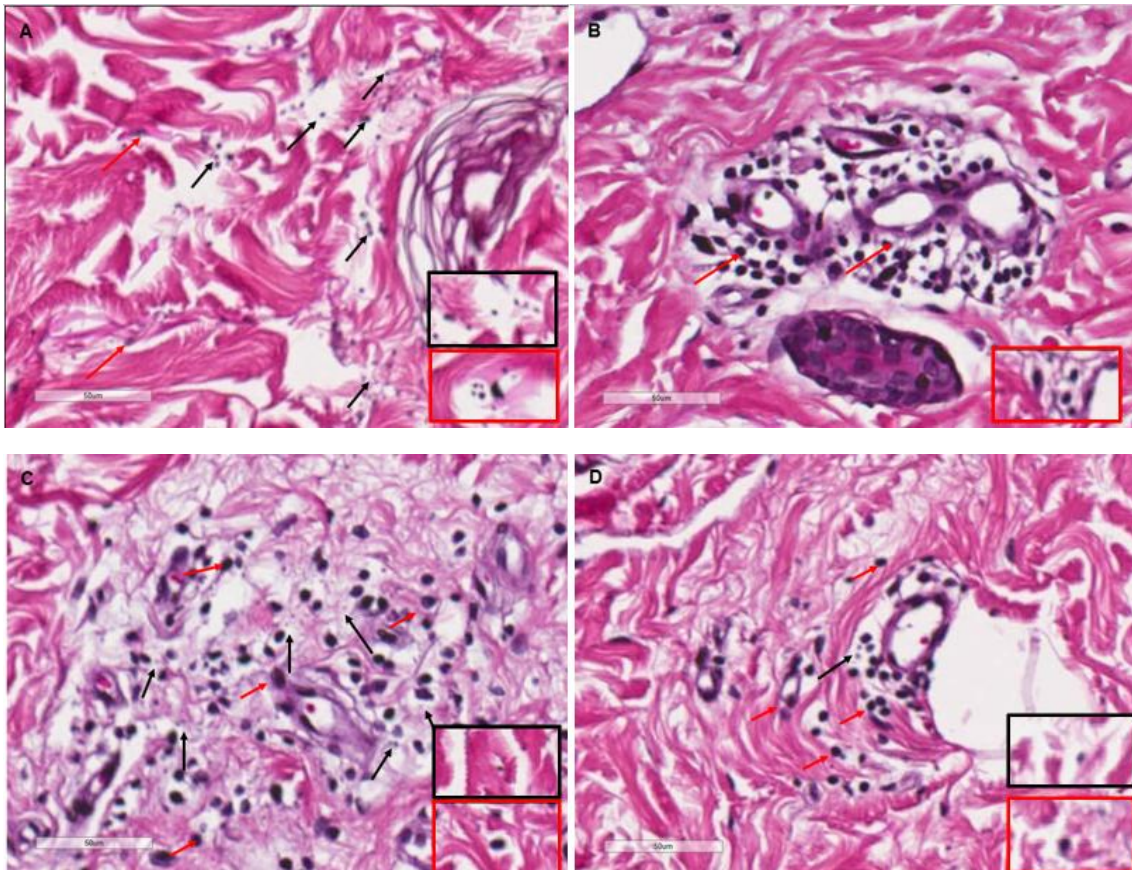


Figure 5. Scanning electron microscopy showing *Leishmania braziliensis* present in infected hOSEC on day 3 of culture. hOSEC were infected with 3×10^5 parasites and cultured for 3 days until processing for scanning electron microscopy. Electron micrographs showing the rounded amastigotes on day 3 of culture (blue arrow). Images are representative of samples derived from 3 different patients.

Histological evaluation of the presence of *L. braziliensis* in hOSEC and post-infection tissue changes

On day 0 (Figure 6 A and B), the epidermis of the fragments was covered by a layer of keratin with thickness and stratification of keratinocytes within the expected pattern. The basal layer contained melanocytes and cells with broad cytoplasm that extended to the middle layer of the epidermis, possibly Langerhans cells. In the papillary layer, small-caliber capillaries surrounded by loose stroma and mononuclear cells were observed. Furthermore, in the dermis, there was edematous dissociation of the collagen bundles and rounded structures suggestive of *Leishmania braziliensis* (black arrows), as well as dilated capillaries and a slight infiltration of mononuclear cells organized in perivascular leukocyte cuffs (red arrows). Some of these cells showed a lack of cytoplasm,

while others exhibited more abundant cytoplasm, compatible with lymphocytes and monocytes. On day 3 (Figure 6 C), a significant increase in the number of rounded amastigotes was observed, associated with intense dilation of capillaries and a significant infiltrate of mononuclear cells, with morphological characteristics predominantly of lymphocytes. In addition, edematous dissociation of the stroma around the vessels was observed, suggesting that this period corresponds to the peak of the immune response to the infection. On day 5 (Figure 6 D), persistent edema was observed, accompanied by a reduction in the number of parasites and an increase in the presence of inflammatory cells migrating to the site of infection. On day 7 (Figure 6 E), the dermis demonstrated a decrease in the affected area compared to the previous days, with a reduction in the caliber of capillaries and a mild inflammatory infiltrate composed of mononuclear cells. Furthermore, only occasional amastigote forms of *Leishmania braziliensis* were observed, indicating a reduction in the parasite load throughout the experiment.



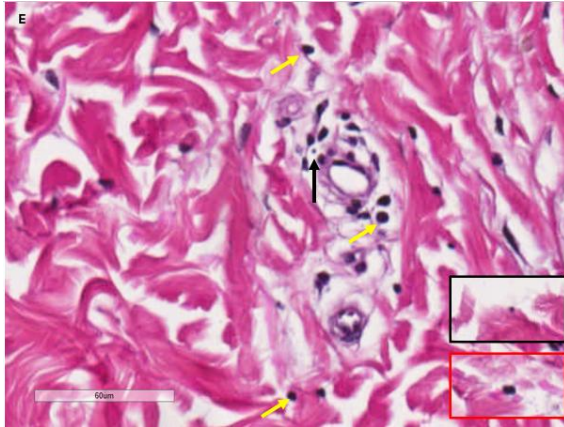


Figure 6. Histological section of hOSEC infected with *L. braziliensis* stained with hematoxylin and eosin (HE). The hOSEC samples were infected and processed on days 0 (A) (B), 3 (C), 5 (D) and 7 (E) of culture. Black arrows indicate the presence of the parasite in the tissue and red arrows indicate mononuclear immune cells that migrated to the site of infection. The images are representative of samples derived from 3 different patients.

Evaluation of parasite load over 7 days of culture

In parallel with the qualitative verification of the presence of parasites in hOSEC, parasite quantification was performed by determining the parasite load using qPCR. The results obtained indicated a progressive reduction in the number of parasites over time. From the fifth day of infection, a statistically significant difference was observed in relation to day 0 ($p < 0.05$), with a consistent decrease in the parasite load (3.2 ± 0.89). On day 7, there was also a decrease in the total number of parasites present in the explants in comparison to day 0 (2.77 ± 0.04) ($p < 0.05$) (Figure 7).

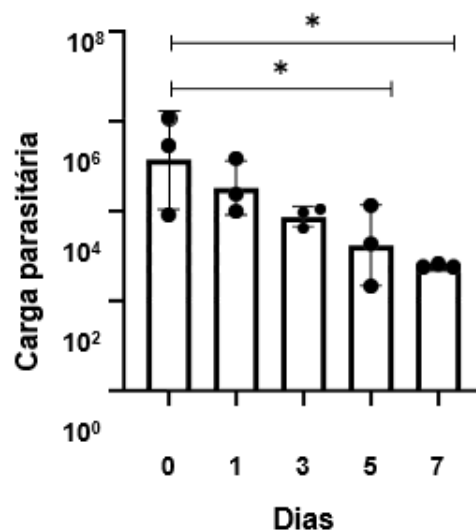
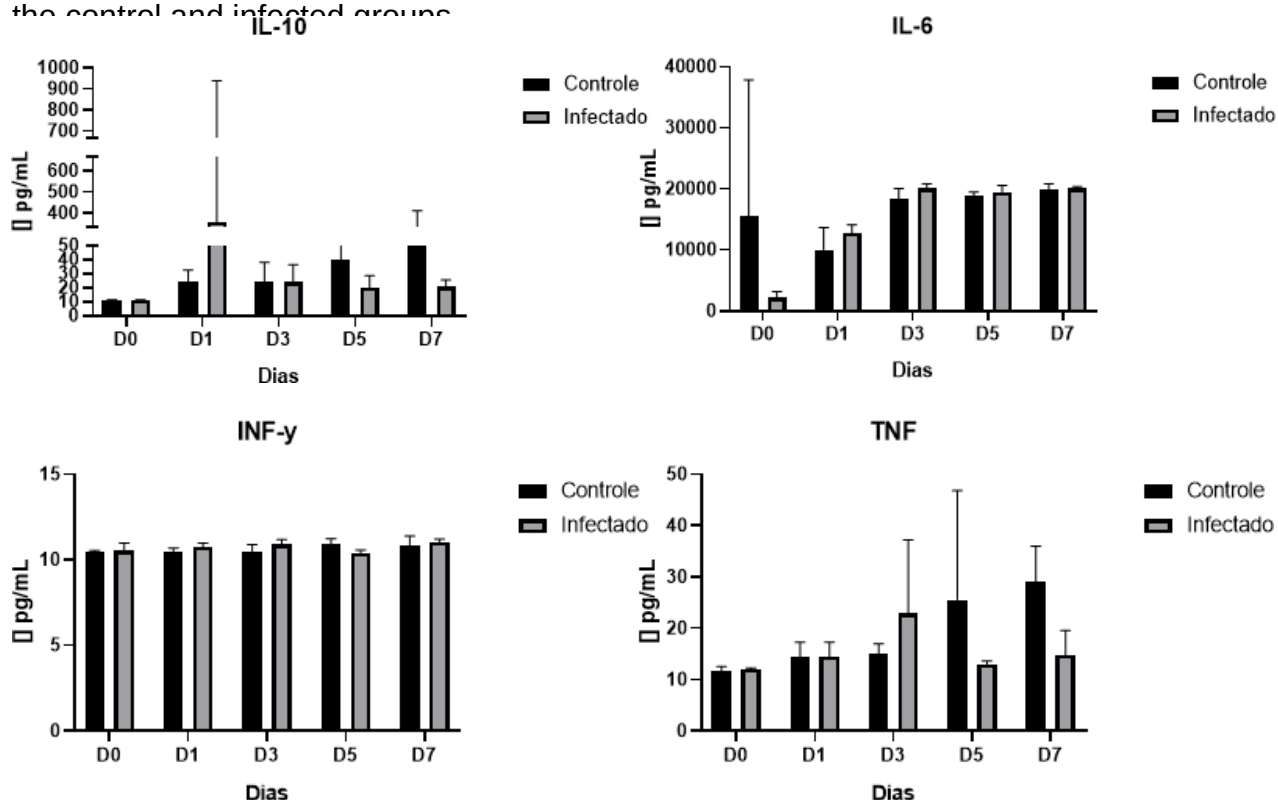


Figure 7. Parasite load of *L. braziliensis*. hOSEC were infected with 3×10^5 parasites per fragment and cultured. On days 0 (+2 hours), 1, 3, 5 and 7, samples were collected for DNA extraction and PCR to determine the parasite load using the ITS gene. Data were analyzed using

ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. Results refer to three biological replicates. * $p < 0.05$.

Evaluation of cytokine production by hOSEC infected with *L. braziliensis*

Cytokine production in the conditioned medium of the cultured skins was monitored throughout the culture period (Fig. 8). The cytokines evaluated were IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-10 and IL-4 and represent the Th1 and Th2 profiles. The results demonstrated that there was a statistically significant increase in IL-2 production in the samples over time, indicating a temporal variation in its production. A tendency for progressive increase in the production of IL-10, IL-4 and TNF- α was also observed over the 7 days of culture, however, without statistical significance. On the other hand, the production of IFN- γ remained constant throughout the observation period. Comparing cytokine production between infected and uninfected samples, no statistically significant differences were observed between the experimental groups in relation to the production of IFN- γ , TNF- α , IL-6 and IL-4 at any of the analyzed time points. For the cytokine IL-2, a statistically significant difference was observed between the groups on the seventh day of culture, with a higher concentration in the control group compared to the infected group ($p < 0.05$). Within the control group, there was an increase in IL-2 levels with a statistically significant difference between days 0 and 3, 0 and 7, 1 and 7 and days 5 and 7 ($p < 0.05$). In the infected group, there was an increase between days 0 and 3, and a decrease between days 3 and 5 ($p < 0.05$). Quantification of cytokines over time allowed a detailed evaluation of the behavior of these inflammatory molecules in the conditioned media. The data demonstrates the viability of hOSEC and the dynamicity of their metabolism when in culture and suggests that IL-2 production was modulated by *L. braziliensis* infection, while the other cytokines analyzed maintained similar levels between the control and infected groups.



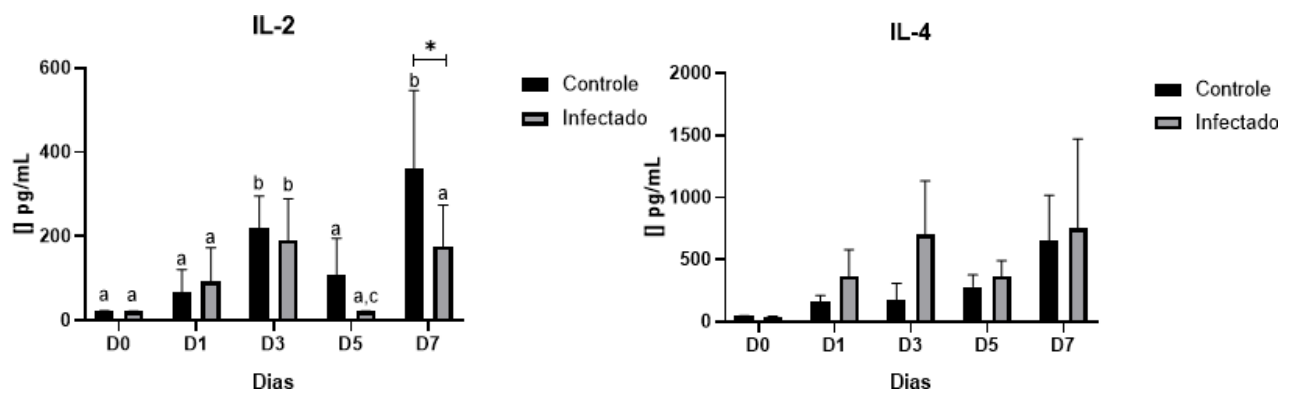


Figure 8. Quantification of cytokines in samples of control or *L. braziliensis*-infected hOSEC. hOSEC were infected with 3×10^5 parasites per fragment and cultured. On days 0 (+2 hours), 1, 3, 5, and 7, the conditioned medium from the cultures was collected and processed to determine the concentration of IL-10, IL-4, IFN- γ , TNF- α , IL-2, and IL-6 (Unit: picogram/mL). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation. Data was analyzed by ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. Results refer to three biological replicates. * $p < 0.05$.

Discussion

Leishmaniasis is a neglected disease that affects populations worldwide and presents gaps in knowledge about its immunobiology. The variation in clinical manifestations occurs due to multiple factors, including the parasite species and the host's immune response, influenced by genetic and environmental aspects. The genetic and ecological diversity of human populations exposed to the parasite makes it difficult to understand the parameters that determine resistance and control of the infection. Furthermore, the initial events of infection in humans remain largely unknown, and the available immunological data are limited (Costa-Da-silva et al., 2022; Elmahallawy et al., 2021; Okwor et al., 2009).

Experimental animal models, such as mice, hamsters, domestic dogs, and non-human primates, are widely used to study the immunology of leishmaniasis. However, no animal model can fully reproduce the human immune response to infection by *Leishmania spp.* Mice, for example, have low infectivity for *Leishmania* of the Viannia subgenus, which makes it difficult to reproduce sustainable skin lesions. Furthermore, immunological differences between mice and humans impact cellular activation and the immune response (Handman, 2001; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014a).

The Syrian hamster is a model that presents greater similarity to the human immune response, as it demonstrates prolonged persistence of the parasite and a mixed Th1/Th2 immunological profile. However, its limitation lies in the lack of homogeneous inbred lines and the scarcity of specific immunological and molecular tools. Non-human primates are more closely related to humans in terms of phylogenetics and are useful for assessing pathogenicity and vaccine development, although their use is restricted due to ethical issues and high costs (André et al., 2020; Jiménez-Antón et al., 2019; Loría-Cervera & Andrade-Narváez, 2014b).

Given these limitations, this study proposed the use of the hOSEC ex vivo model to investigate the early stages of *L. braziliensis* infection. hOSEC is composed of human skin cells, such as keratinocytes, melanocytes, and Langerhans cells, preserving the original structure of the skin. This model has been used for dermatological and inflammatory studies due to its ease of obtaining and ethical simplicity. In addition, it allows investigations on the application of topical products and transdermal permeation (Frade et al., 2015; Wilkinson et al., 2021).

The study evaluated the maximum time of hOSEC cultivation and observed the preservation of metabolic viability for up to seven days. The skin maintained its morphology close to the original in the first days, although it presented progressive changes, such as a decrease in keratinocyte layers and thickening of the stratum corneum. The presence of immune cells, such as macrophages, Langerhans cells and T lymphocytes, reinforced the relevance of this model for investigations on the cutaneous immune response (Nestle et al., 2009; Quaresma, 2019).

Finally, standardization of the inoculum was essential for tissue infection, with different parasite concentrations being tested. A reduction in the parasite load was observed throughout cultivation, possibly due to the skin's immune response, which, even without systemic circulation, demonstrated recruitment of immune cells and activation of inflammatory mechanisms. These findings indicate that hOSEC is a promising model for studies on local immunological interactions in *L. braziliensis* infections, requiring optimization of the infection for its validation (de Oliveira Filho et al., 2024; Kimblin et al., 2008).

Conclusion

In this study, the culture of the hOSEC model was standardized for seven days, demonstrating the metabolic viability and preservation of the histological structure of the skin explants. The analysis revealed the presence of resident immune cells, such as macrophages, Langerhans cells and lymphocytes, in addition to a dynamic production of cytokines influenced by parasitic infection. One of the main advances was the standardization of the hOSEC infection with *Leishmania braziliensis*, observing the differentiation of promastigote forms into amastigotes and the recruitment of immune cells to the site of infection, reinforcing the ability of the model to reproduce aspects of the infection in vivo.

Although additional studies are needed to deepen the understanding of the immune response and optimize the culture of hOSEC, the findings provide relevant information on the cellular dynamics in the early stages of infection by *L. braziliensis*. Thus, the experimental hOSEC model appears to be a promising tool for the study of cutaneous leishmaniasis, contributing to future investigations on the interaction between the parasite and the skin's immune system.

References

- Alencar-Silva, T., Díaz-Martín, R. D., Zonari, A., Foyt, D., Guiang, M., Pogue, R., Saldanha-Araujo, F., Dias, S. C., Franco, O. L., & Carvalho, J. L. (2023). The Combination of Synoeca-MP Antimicrobial Peptide with IDR-1018 Stimulates Proliferation, Migration, and the Expression of Pro-Regenerative Genes in Both Human Skin Cell Cultures and 3D Skin Equivalents. *Biomolecules*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/biom13050804>
- Alencar-Silva, T., Zonari, A., Foyt, D., Gang, M., Pogue, R., Saldanha-Araujo, F., Dias, S. C., Franco, O. L., & Carvalho, J. L. (2019). IDR-1018 induces cell proliferation, migration, and reparative gene expression in 2D culture and 3D human skin equivalents. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(11). <https://doi.org/10.1002/term.2953>
- André, S., Rodrigues, V., Picard, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2020). Non-human primates and Leishmania immunity. *Cytokine: X*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.cyttox.2020.100038>
- Burza, S., Croft, S. L., & Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. In *The Lancet* (Vol. 392, Issue 10151, pp. 951–970). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Costa-Da-silva, A. C., Nascimento, D. de O., Ferreira, J. R. M., Guimarães-Pinto, K., Freire-De-lima, L., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Filardy, A. A., & Freire-De-lima, C. G. (2022). Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. In *Tropical Medicine and Infectious Disease* (Vol. 7, Issue 4). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7040054>
- de Oliveira Filho, V. A., Garcia, M. S. A., Rosa, L. B., Giorgio, S., & Miguel, D. C. (2024). An Overview of Leishmania In Vitro Cultivation and Implications for Antileishmanial Screenings against Promastigotes. In *Parasitologia* (Vol. 4, Issue 4, pp. 305–318). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/parasitologia4040027>
- Deaver, D. R. (1995). A new non-isotopic detection system for immunoassays. *Nature*, 377(6551). <https://doi.org/10.1038/377758a0>
- Elmahallawy, E. K., Alkhaldi, A. A. M., & Saleh, A. A. (2021). Host immune response against leishmaniasis and parasite persistence strategies: A review and assessment of recent research. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 139). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111671>
- Frade, M. A. C., Aguiar, A. F. C. L., Leite, M. N., Coelho, E. B., De Moretti Andrade, T. A., Guedes, F. A., Passos, W. R., & Das, P. K. (2015). Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(3). <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153645>

- Handman, E. (2001). Leishmaniasis: Current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2).
<https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.229-243.2001>
- Jiménez-Antón, M. D., Grau, M., Olías-Molero, A. I., & Alunda, J. M. (2019). Syrian Hamster as an Advanced Experimental Model for Visceral Leishmaniasis. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1971).
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9210-2_17
- Kimblin, N., Peters, N., Debrabant, A., Secundino, N., Egen, J., Lawyer, P., Fay, M. P., Kamhawi, S., & Sacks, D. (2008). Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29). <https://doi.org/10.1073/pnas.0802331105>
- Lainson, R., & Rangel, B. F. (2005). *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A review. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8).
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000800001>
- Leite, M. N., Viegas, J. S. R., Praça, F. S. G., de Paula, N. A., Ramalho, L. N. Z., Bentley, M. V. L. B., & Frade, M. A. C. (2021). Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 160.
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105769>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014a). Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 56, Issue 1).
<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Loría-Cervera, E. N., & Andrade-Narváez, F. J. (2014b). Review: Animal models for the study of leishmaniasis immunology. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* (Vol. 56, Issue 1, pp. 1–11). Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>
- Mestas, J., & Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *The Journal of Immunology*, 172(5). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., & Nickoloff, B. J. (2009). Skin immune sentinels in health and disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nri2622>
- Okwor, I., Liu, D., & Uzonna, J. (2009). Qualitative differences in the early immune response to live and killed *Leishmania major*: Implications for

vaccination strategies against Leishmaniasis. *Vaccine*, 27(19).
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.01.133>

PAHO. (2020). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas.
PAHO/WHO Institutional Repository. Leishmaniasis: Epidemial Report in the Americas, 9.

Quaresma, J. A. S. (2019). Organization of the skin immune system and compartmentalized immune responses in infectious diseases. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 32, Issue 4).
<https://doi.org/10.1128/CMR.00034-18>

Souto-Silva, M. V., Bispo, E. C. I., Albuquerque, L. F. F., Barcelos, S., Garcez, E. M., Quilici, L. S., Neto, F. F. C., Duarte, E. C. B., Boeloni, J. N., Saldanha-Araujo, F., Gelfuso, G. M., & Carvalho, J. L. (2024). Toxicity and Dermatokinetic Analysis of Ibrutinib in Human Skin Models. *Pharmaceutics*, 16(11), 1377. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16111377>

Vostálová, J., Cukr, M., Zálešák, B., Lichnovská, R., Ulrichová, J., & Rajnochová Svobodová, A. (2018). Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.12.011>

Wilkinson, H. N., Kidd, A. S., Roberts, E. R., & Hardman, M. J. (2021). Human ex vivo wound model and whole-mount staining approach to accurately evaluate skin repair. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(168).
<https://doi.org/10.3791/62326>