

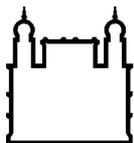
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE HAMSTERS DOURADOS (*Mesocricetus auratus*) POR *Leishmania* spp.: VIAS ORAL E INTRAGÁSTRICA

MAYRA MANSUR REIMANN

Rio de Janeiro  
Março de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***MAYRA MANSUR REIMANN***

Infecção experimental de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por *Leishmania* spp.: Vias oral e intragástrica

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Orientador:** Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque

**RIO DE JANEIRO**

Março de 2018

Mansur Reimann, Mayra.

Infecção experimental de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por *Leishmania* spp.: Vias oral e intragástrica / Mayra Mansur Reimann. - Rio de Janeiro, 2018.

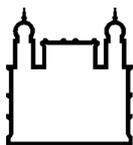
xvi, 84f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientador: André Luiz Rodrigues Roque.

Bibliografia: f. 73-84

1. *Leishmania* spp.. 2. Transmissão oral. 3. Infecção experimental. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**AUTOR: MAYRA MANSUR REIMANN**

**Infecção experimental de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por  
*Leishmania* spp.: Vias oral e intragástrica**

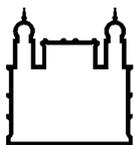
**ORIENTADOR: Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque**

**Aprovada em: 26/03/2018**

### **EXAMINADORES:**

**Profa. Dra. Kátia da Silva Calabrese - Presidente e Revisora** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos** (IOC/FIOCRUZ)  
**Profa. Dra. Veronica Figueiredo do Amaral** (UFF)  
**Profa. Dra. Fernanda Nazaré Morgado** (IOC/FIOCRUZ)  
**Prof. Dr. Mauricio Vericimo** (UFF)

Rio de Janeiro, 26 de março de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada. (Opcional)**

*Ao meu querido avô João Mansur, que partiu durante a realização deste trabalho, mas que nunca deixou de ser grande exemplo de dedicação e integridade. Estará sempre em nossos corações!*

## AGRADECIMENTOS

*“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” (Charles Chaplin)*

À **Deus**, por todas as bênçãos que me proporcionou até aqui, por sempre guiar meus passos e iluminar meu coração nos momentos difíceis;

À **minha família**, apenas posso agradecer por todo apoio que vocês têm me dado, pois nunca conseguirei compensar devidamente a dedicação, orgulho e incentivo que sempre manifestaram;

Ao meu amor, **Philipe**, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado;

Ao meu querido orientador, **Dr. André Roque**, que acreditou em meu potencial de desde o início, e mesmo sem referências minhas me acolheu como orientanda. Sempre disponível e disposto a ajudar com paciência e firmeza, me fazendo enxergar que existem mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação. Tornou-se referência profissional e pessoal para meu crescimento. Obrigada por toda ajuda e amizade;

Ao **Dr. Reginaldo Brazil**, que com sua doçura, experiência e paciência foi grande conselheiro e colaborador. Muito obrigada pela orientação extraoficial, e pelas conversas agradáveis e cheias de conteúdo;

À Dra. **Ana Jansen**, pelo acolhimento no LabTrip. Sendo, com toda sua sabedoria e experiência, um grande exemplo de vida profissional, que nunca deixou de me cumprimentar com um sorriso;

À minha professora do ensino médio, **Lúcia Helena R. de Almeida**, que incentivou minha paixão pela Biologia, sempre foi exemplo de dedicação e teve grande peso em minha escolha por essa linda profissão;

À querida **Celeste Souza**, que muito além da colaboração foi amiga e conselheira. Muito obrigada por todo apoio, incentivo e paciência;

Ao amigo **Bruno Alves**, que me ajudou tantas vezes nessa jornada, sempre com muito bom humor e paciência. Obrigada por tudo, foi uma parte insubstituível desse trabalho;

À **Dra. Samantha Xavier**, que me acolheu tão carinhosamente no LabTrip e sempre esteve disponível para me ajudar;

Aos amigos do **LABTRIP**, que foram muito solícitos sempre que precisei. Em especial **Marina, Elida e Lucélia** que me acolheram no laboratório e sempre tiraram minhas dúvidas mais banais. Obrigada pelas risadas e conselhos;

Aos **amigos do mestrado**, pelos momentos divididos juntos, especialmente aos **Furões**, que se tornaram verdadeiros amigos e tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias, e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês;

À toda equipe do LabTrip, que foi de grande ajuda na bancada, em especial **Carlos, Marcos e Marlon**, sem vocês não seria possível concluir esse projeto;

À **Andressa Rodrigues**, que sempre esteve pronta a atender minhas solicitações;

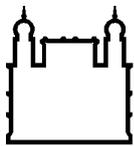
À **Rita**, por estar sempre atenta e disponível a ajudar, mesmo nas mais simples situações;

Aos colaboradores do **LPL**, em especial às **Dras. Patrícia Cuervo e Elisa Cupolillo** e a mestranda **Camila Filgueira** por toda disponibilidade e ajuda quando precisamos;

À todos os **professores e coordenadores da BP**, que tornaram essa jornada possível;

À **CAPES** pelo financiamento.

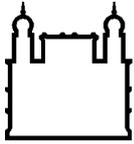
*"A ciência pode purificar a religião, livrando-a do erro e da superstição; a religião pode purificar a ciência, livrando-a da idolatria e dos falsos absolutos. Cada uma pode introduzir a outra num mundo mais amplo, em que ambos consigam florescer." (São João Paulo II).*

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**Infecção experimental de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) por *Leishmania spp.*:

Vias oral e intragástrica

**RESUMO****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA****Mayra Mansur Reimann**

O gênero *Leishmania* compreende mais de 20 espécies de protozoários transmitidas entre mamíferos por insetos flebotomíneos. No entanto, sabe-se que a transmissão também ocorre de forma direta (vias transplacentária, sexual e transfusional), e que outras formas de transmissão também podem estar envolvidas, como a transmissão por outros vetores, como o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, por exemplo, além da via oral. O presente estudo objetivou avaliar a possibilidade da infecção experimental de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* por via intragástrica e oral em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*). O primeiro conjunto de grupos experimentais foi infectado experimentalmente com  $10^6$  formas promastigotas derivadas de cultura axênica de *L. braziliensis*: grupo A (GA) – animais inoculados por via intradérmica (ID) - grupo controle; GB- inoculados por via intragástrica (IG); GC- inoculados por via oral (VO) com cultura. No GD os animais foram inoculados por VO com cultura de macrófagos, que tinham sido infectados com  $10^5$  formas promastigotas de *L. braziliensis*. Ao final de 120 dias, todos os animais foram eutanasiados para realização de diagnóstico parasitológico, sorológico, histopatológico e molecular. A infecção nos animais dos grupos A e B foi confirmada por sorologia, *imprint*, cultura e PCR. Após 120 dias foram feitos 3 novos grupos: GE - animais infectados pela ingestão de *Lutzomyia longipalpis*, que foram alimentadas na lesão dérmica de animal do grupo A; GF - animais infectados por VO com um fragmento de lesão dérmica oriunda do grupo A; GG- infectados por VO com fragmento de baço oriundo de um animal do grupo B. Após a necropsia, os animais dos grupos C a G não mostraram positividade em nenhuma das análises realizadas. O segundo conjunto de grupos experimentais foi submetido à infecção com  $10^6$  formas promastigotas derivadas de cultura axênica de *L. infantum*: GA- animais inoculados por via intraperitoneal (IP), grupo controle; GB- inoculados por via IG; GC- inoculados por VO com cultura. Os animais do GD- inoculados por VO com cultura de macrófagos infectados com  $2,5 \times 10^7$  formas promastigotas de *L. infantum* por mL. Transcorridos os 120 dias de infecção, os animais foram eutanasiados para análise. Apenas a infecção dos animais do grupo A (controle) foi confirmada até o momento, por sorologia, cultura e PCR de baço. A partir dos Grupos A e B foram criados os grupos: E- animais infectados pela ingestão de *L. longipalpis*, que foram alimentados em animal do grupo A; GF- infectados VO com fragmento de baço do grupo B. Os grupos E e F também foram negativos em todas as análises realizadas até o momento. O sucesso obtido na infecção experimental de hamsters com *L. braziliensis* por via intragástrica comprova que essa via de infecção é possível em mamíferos. Esses resultados encorajam a realização de novas tentativas que comprovem a possibilidade de infecção intragástrica ou oral, utilizando diferentes fontes de inóculo e com espécies diferentes de *Leishmania*. Definir a viabilidade de novas vias de transmissão de um parasito é fundamental para entender sua dinâmica de manutenção e transmissão na natureza, propondo estratégias diferenciadas e eficazes de prevenção e controle da parasitose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Experimental infection of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) by *Leishmania* spp.: Oral and intragastric routes

### ABSTRACT

### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Mayra Mansur Reimann

The genus *Leishmania* comprises more than 20 species of protozoa transmitted between mammals by phlebotomine insects. Transmission is also known to occur directly by transplacental, sexual, and transfusional route. Nevertheless, other forms of transmission may also be involved, including the transmission by other vectors such as the *Rhipicephalus sanguineus* tick, as well as the oral route. The present study aimed to evaluate the possibility of experimental infection of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* by intragastric and oral route in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). The first set of experimental groups was experimentally infected with  $10^6$  promastigote forms derived from axenic culture of *L. braziliensis*: group A (GA) - animals inoculated by intradermal (ID) route - control group; GB- inoculated intragastric (IG); GC-inoculated orally (VO) with promastigote culture; and GD - inoculated by VO with a macrophage culture, which had been infected with  $10^5$  promastigotes of *L. braziliensis*. At the end of 120 days, all animals were euthanized for parasitological, serological, histopathological and molecular diagnosis. Infection in the animals of groups A and B was confirmed by serology, imprint, culture and PCR. After 120 days, three new groups of *L. braziliensis* were included, GE - animals were infected by the ingestion of *Lutzomyia longipalpis*, which were fed on the dermal lesion of GA; GF - infected by VO with a fragment of dermal lesion from GA; GG - infected by VO with spleen fragment from a GB animal. Animals from groups C to G were negative to all analyzes performed. The second set of experimental groups was submitted to infection with  $10^6$  promastigote forms derived from axenic culture of *L. infantum*: GA - animals inoculated intraperitoneally (IP), control group; GB- inoculated via the IG route; GC- inoculated by VO with culture. GD- inoculated orally with *L. infantum* infected macrophages. After 120 days of infection, the animals were euthanized for analysis. Only the infection of GA (control) was confirmed until now, by serology, culture and spleen PCR. From Groups A and B the following groups were created: E - animals infected by *L. longipalpis* ingestion, which were fed in a group A animal; GF- animals infected VO with a fragment of spleen of group B. The groups E and F were also negative in all the analysis carried out so far. The success obtained in the experimental infection of hamsters with *L. braziliensis* by intragastric route proves that this route of infection is possible in mammals. These results encourage further attempts to prove the possibility of intragastric or oral infection using different sources of inoculum and with different species of *Leishmania*. Defining the viability of new transmission routes of a parasite is fundamental to understand its dynamics of maintenance and transmission in nature, proposing differentiated and effective strategies for prevention and control of parasitosis.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMO .....   | ix        |
| ABSTRACT .....   | x         |
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>17</b> |
| 1.1 Flebótomos.....  | 18        |
| 1.2 Hospedeiros .....  | 21        |
| 1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana .....  | 23        |
| 1.4 Leishmaniose Visceral .....  | 24        |
| 1.5 Transmissão.....   | 26        |
| 1.6 Justificativa .....  | 31        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>  | <b>32</b> |
| 2.1 Objetivo Geral .....   | 32        |
| 2.2 Objetivos Específicos.....   | 32        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>33</b> |
| 3.1 Aspectos éticos .....  | 33        |
| 3.2 Parasitos.....   | 33        |
| 3.3 Animais.....   | 33        |
| 3.4 Caracterização taxonômica.....   | 34        |
| 3.5 Obtenção e infecção de macrófagos .....  | 35        |
| 3.5.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais .....   | 35        |
| 3.5.2 Infecção de macrófagos peritoneais.....  | 36        |
| 3.5.3. Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por<br>célula.....  | 36        |
| 3.5.4 Obtenção de macrófagos infectados .....  | 37        |
| 3.6 Procedimentos de infecção experimental com formas<br>promastigotas de cultura pelas vias intradérmica, intraperitoneal<br>e Oral ..... | 37        |
| 3.6.1 <i>Leishmania braziliensis</i> .....   | 38        |
| 3.6.2 <i>Leishmania infantum</i> .....   | 41        |
| 3.7 Procedimentos de eutanásia e coleta de amostras dos hamsters.....  | 43        |
| 3.8 Infecção em <i>L. longipalpis</i> .....  | 44        |
| 3.9 Imprints teciduais .....   | 44        |
| 3.10 Culturas .....  | 45        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.11 PCR Multiplex para detecção de kDNA de <i>Leishmania</i> spp</b> ..... | <b>45</b> |
| 3.11.1 Extração de DNA.....  | 45        |
| 3.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Multiplex).....                   | 46        |
| 3.11.3 Eletroforese .....  | 47        |
| <b>3.12 Diagnóstico Sorológico</b> .....                                       | <b>48</b> |
| <b>3.13 Diagnóstico histopatológico</b> .....                                  | <b>49</b> |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | <b>51</b> |
| <b>4.1 Caracterização taxonômica</b> .....                                     | <b>51</b> |
| <b>4.2 <i>Leishmania braziliensis</i></b> .....                                | <b>51</b> |
| 4.2.1 Grupo A .....  | 51        |
| 4.2.2 Grupo B .....  | 53        |
| 4.2.3 Grupo C.....   | 55        |
| 4.2.4 Grupos D, E, F e G.....  | 56        |
| <b>4.3 <i>Leishmania infantum</i></b> .....                                    | <b>56</b> |
| 4.3.1 Grupo A .....  | 56        |
| 4.3.2 Grupo B .....  | 57        |
| 4.3.3 Grupo C.....   | 57        |
| 4.3.4 Grupo D.....   | 58        |
| 4.3.5 Grupos E a H.....  | 58        |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....   | <b>61</b> |
| <b>6 PERSPECTIVAS</b> .....  | <b>71</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                      | <b>73</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>FIGURA 1</b> - Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> e seus complexos.....   | <b>19</b> |
| <b>FIGURA 2</b> - Espécime da subfamília Phlebotominae .....  | <b>20</b> |
| <b>FIGURA 3</b> - Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....   | <b>21</b> |
| <b>FIGURA 4</b> - Lesões teciduais causadas pela LTA.....   | <b>24</b> |
| <b>FIGURA 5</b> - Esplenomegalia causada pela LV.....   | <b>26</b> |
| <b>FIGURA 6</b> - Desenho experimental dos grupos inoculados experimentalmente com <i>L. braziliensis</i> (A), e <i>L. infantum</i> (B) .....           | <b>39</b> |
| <b>FIGURA 7</b> - Ensaio de Multilocus Enzyme Electrophoresis em gel TrisMaleico pH7.4 para sistema enzimático 6PGDH .....                              | <b>51</b> |
| <b>FIGURA 8</b> - Amastigotas presentes em <i>imprint</i> de lesão de pata (A) e baço (B), dos animais do Grupo A inoculados por via intradérmica ..... | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 9</b> – Promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. marcadas com fluorescência.....  | <b>52</b> |
| <b>FIGURA 10</b> - Eletroforese em gel de poliacrilamida com PCR multiplex mostrando o DNA de <i>Leishmania</i> spp. ....                               | <b>53</b> |
| <b>FIGURA 11</b> - Nodulações sugestivas de infecção por <i>Leishmania</i> sp.....  | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 12</b> - Amastigotas presentes em <i>imprint</i> de baço, dos animais do Grupo B inoculados por via intragástrica .....                       | <b>54</b> |
| <b>FIGURA 13</b> - Lesões de pele dos animais do Grupo C .....  | <b>55</b> |

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Divisão dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania braziliensis* .....**38**

**Tabela 2** - Divisão dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania infantum*. .....**38**

**Tabela 3** – Resumo de resultado dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania braziliensis* .....**59**

**Tabela 4** – Resumo de resultado dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania infantum* .....**60**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6PGDH - *6-phosphogluconate dehydrogenase*

BOD - *Biochemical Oxygen Demand* (Demanda Bioquímica de Oxigênio)

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CLIOC – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

dpi - *dot per inch* (pontos por polegada)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EUA – Estados Unidos da América

F – *foward*

G6PDH - *Glucose-6-phosphate dehydrogenase*

GAPDH - *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase)

H<sub>2</sub>O – Água

HCl - Ácido clorídrico

ICTB – Instituto de ciência e tecnologia em biomodelos

ID – Intradérmico

IgG – Imunoglobulina da Classe G

IP - Intraperitoneal

KCl – Cloreto de Potássio

kDNA – DNA do cinetoplasto

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monopotássico

LABTRIP - Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos

LPL – Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

NaCl - Cloreto de sódio

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Fosfato monossódico

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - Fosfato dissódico

NNN – meio Nicolle, Novy, Mc Neal

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão solução fosfato salina)  
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Polimerase em Cadeia)  
PFA - Paraformaldeído  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
pmol – picomol  
R - *reverse*  
RIFI - Reação de Imunofluorescência Indireta  
rpm – Rotação por minuto  
RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*  
SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecilsulfato sódico)  
TAE – Tris-Acetato-EDTA  
TBE – Tris-Ácido Bórico-EDTA  
UI – Unidades Internacionais  
UV – Luz Ultravioleta  
VO – Via oral  
WHO – World Health Organization

# 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas com importante diversidade clínica e epidemiológica, cuja transmissão envolve diversas espécies de hospedeiros mamíferos, além de seus vetores, e diferentes espécies de parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, todos eles inseridos em ciclos complexos de transmissão. Embora seja muito disseminada, o controle desta doença ainda caracteriza um desafio mundial, principalmente dentro de áreas endêmicas onde muitas vezes as condições precárias e o quadro de desigualdade social aumenta o risco das pessoas contraírem a infecção (Alvar et al. 2006, 2012).

O gênero *Leishmania* é composto por protozoários flagelados pertencentes à classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida e família Trypanosomatidae. Essa classe caracteriza-se pela presença do cinetoplasto, uma organela exclusiva que representa uma porção especializada dentro de uma única mitocôndria ramificada da célula, contendo DNA mitocondrial (kDNA). Esse DNA representa cerca de 20% do DNA total desses parasitos, organizados de forma circular entrelaçados entre si, formando uma rede altamente compactada localizada próxima ao corpúsculo basal. O kDNA é composto por dois tipos de DNAs, os maxicírculos e os minicírculos. Os maxicírculos estão presentes em poucas dúzias de cópias do total da rede e os minicírculos compõem aproximadamente 95% dessa estrutura, estando presentes em milhares de cópias (Shapiro & Englund 1995). O kDNA é o principal alvo no diagnóstico de infecção por *Leishmania* sp. em diferentes técnicas moleculares (Simpson et al. 2002, Stevens 2008).

O gênero *Leishmania* compreende espécies de parasitos obrigatórios heteroxenos, que apresentam duas formas principais: uma flagelada denominada promastigota, encontrada no tubo digestivo dos insetos vetores (e em meios de cultura) e outra forma que não possui flagelo exteriorizado, denominada amastigota, que é intracelular obrigatória e é encontrada no hospedeiro mamífero (Stevens 2008, Deschamps et al. 2011).

Dentre todos os protozoários que apresentam a capacidade de parasitar o homem, os do gênero *Leishmania*, provavelmente, são os que possuem uma maior quantidade de espécies patogênicas. Inicialmente, essas espécies foram identificadas baseando-se nas alterações clínicas distintas manifestadas pelos pacientes, podendo ser: visceral, cutânea (única ou disseminada), cutânea difusa ou mucocutânea. As espécies do gênero *Leishmania* são agrupadas em dois

subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com o desenvolvimento dos parasitos no tubo digestivo dos insetos vetores. As espécies do subgênero *Viannia* são restritas ao Novo Mundo (Américas), enquanto as espécies do subgênero *Leishmania* circulam tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) (Ross 1903, Lainson & Shaw 1987). Conforme mostra a figura 1, os parasitos do gênero *Leishmania* podem ser classificados em complexos dentro de seus subgêneros (Kerr 2000, Schönian et al. 2011).

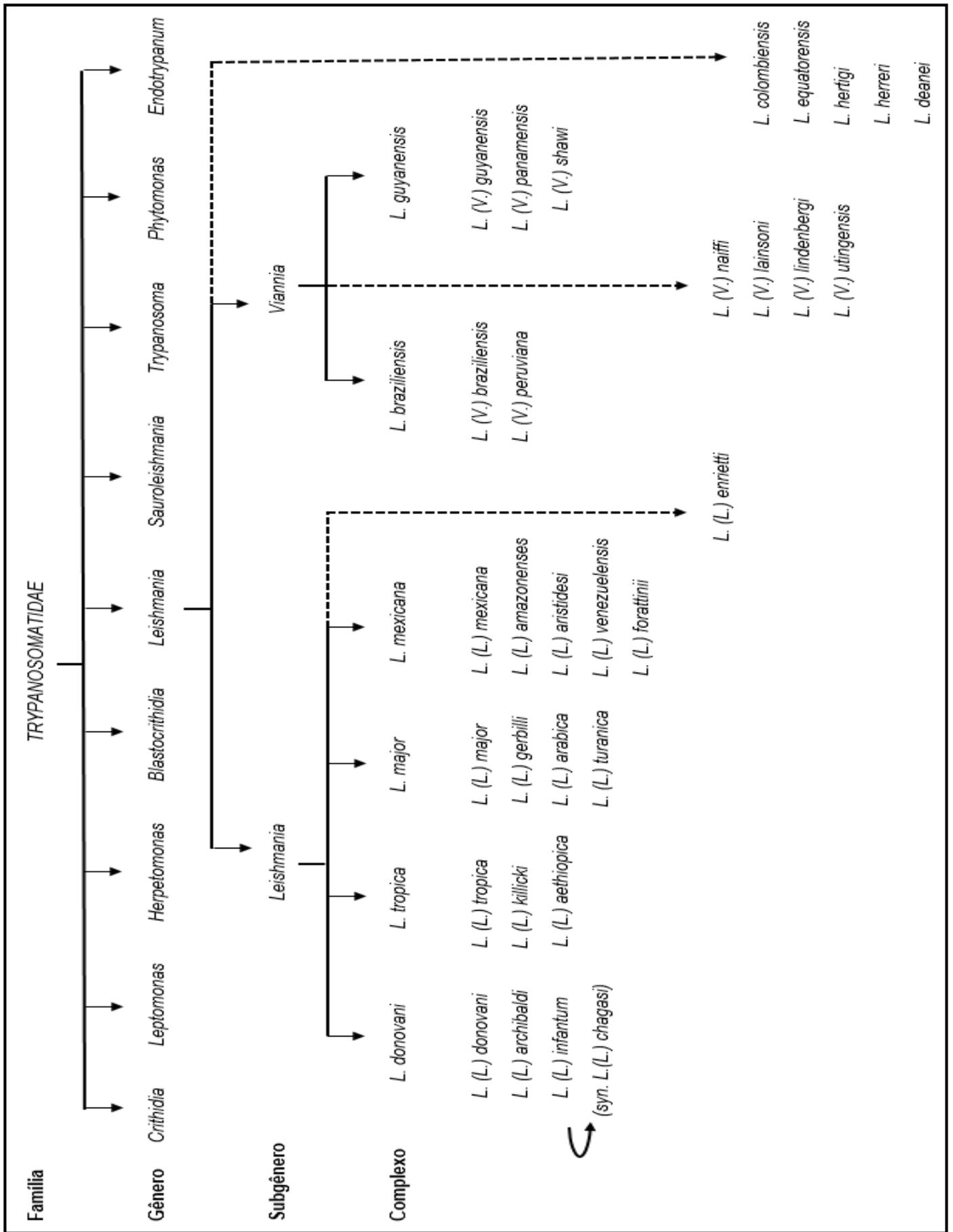
Sabe-se que o gênero *Leishmania* compreende mais de 20 espécies transmitidas circulando entre diferentes espécies de vetores e hospedeiros mamíferos. Esses tripanosomatídeos possuem grande heterogeneidade genética e biológica, como evidenciado pela grande variedade de ordens de mamíferos que são capazes de infectar (Brandão-Filho et al. 2003, Santiago et al. 2007, Roque & Jansen 2014).

## 1.1 Flebótomos

Os vetores flebotomíneos são da ordem Diptera: Psychodidae, da Subfamília Phlebotominae, se apresentam como insetos pequenos, de 2 a 4mm de comprimento, de cor palha ou marrom claro (figura 2) e são conhecidos por diversos nomes populares, principalmente no Brasil: mosquito palha, anjinho, cangalhinha, birigui, flebóti, entre outros (Soares & Turco 2003, Dias et al. 2011).

*Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis*, no continente americano é o principal vetor envolvido na transmissão de *Leishmania infantum*. *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é vetor comprovadamente competente desta espécie de *Leishmania* e está fortemente ligada à expansão da parasitose, além disso, apresenta ampla distribuição geográfica nas Américas, sendo considerada a espécie com melhor adaptação aos diversos ambientes modificados pela ação humana (Soares & Turco 2003, Lainson & Rangel 2005, Pires 2014).

Os parasitos envolvidos na leishmaniose tegumentar, devido a ampla distribuição geográfica e grande quantidade de espécies envolvidas, podem ser transmitidos por um número variável de espécies de flebótomos sendo que, nas Américas, as mais comumente incriminadas pela transmissão de *Leishmania braziliensis* (espécie mais difundida) são: *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia whitmani*, *Migonemyia (Migonemyia) migonei*; *Psychodopygus wellcomei*; *Psychodopygus complexus*, entre outros (de Pita-Pereira et al. 2005, Rangel & Lainson 2009).



**Figura 1** - Classificação das espécies de *Leishmania* e seus complexos. Adaptado de Schönian et al. 2011.

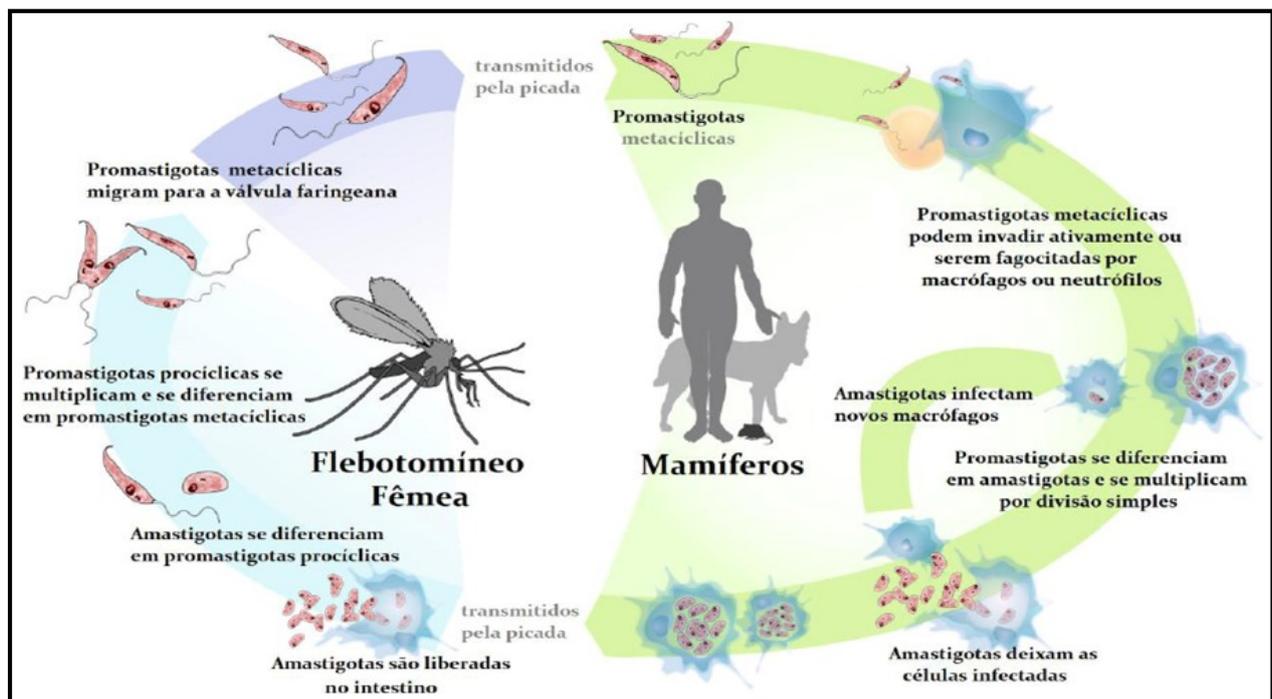


**Figura 2** - Espécime da Subfamília Phlebotominae (Fonte: *InsectBase*).

Os insetos adultos de ambos os sexos precisam de carboidratos (açúcares) como fonte de energia, e esses carboidratos vão influenciar no desenvolvimento e infectividade das espécies de *Leishmania* nos flebotomíneos. As fêmeas, além dos açúcares, necessitam ainda realizar a alimentação com sangue de vertebrados para que aconteça a maturação de seus ovos (Young & Duncan 1994, Soares & Turco 2003). Assim, essas fêmeas podem se infectar com *Leishmania* spp. ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado (WHO 1990, Ashford 1996).

A infecção do inseto se dá quando formas amastigotas encontradas em fagolisossomos de macrófagos e outros fagócitos do hospedeiro vertebrado infectado (Handman & Bullen 2002) são ingeridas. No intestino do inseto vetor os parasitos se diferenciam em promastigotas procíclicas replicativas que multiplicam-se por divisão binária, e posteriormente se fixam em porções específicas do tubo digestivo de acordo com o subgênero a que pertençam (Pimenta et al. 1997, Soares et al. 2005). No subgênero *Viannia* essa adesão ocorre na região peripilárica e no *Leishmania* na região suprapilárica (Nieves & Pimenta 2000). Em uma etapa seguinte, alguns parasitos diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, forma infectante para mamíferos, num processo conhecido como metaciclogênese. Estas migram para o intestino anterior do inseto onde secretam quitinases, que destroem a válvula estomodeal do inseto, e PSG (*promastigote secreted gel*), ambos dificultam o processo de sucção sanguínea e, em um próximo repasto, o flebotomíneo acaba por regurgitar o sangue recém-ingerido, acrescido de formas promastigotas metacíclicas, na pele de um novo hospedeiro vertebrado levando à transmissão do parasito (Rogers et al. 2002, Bates 2007, 2008). Uma vez na derme, as promastigotas

fagocitadas diferenciam-se em amastigotas que se replicam, também por divisão binária, dentro do fagolisossomo de fagócitos mononucleares. A dispersão da infecção ocorre quando a célula, densamente parasitada, se rompe e as amastigotas são novamente fagocitadas por novas células (Lodge & Descoteaux 2005) (Figura 3). As formas amastigotas são responsáveis pelas infecções e podem resistir no organismo do hospedeiro durante toda sua vida, podendo causar formas cutâneas, mucosas ou viscerais dependendo, dentre vários outros fatores, da espécie de *Leishmania* envolvida (Ashford 2000, Brazil et al. 2014, Roque & Jansen 2014).



**Figura 3** - Ciclo biológico de *Leishmania* spp., estágios de desenvolvimento no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado [adaptado de (Harhay et al. 2011)].

Durante seu ciclo biológico, esses protozoários são expostos a diversas condições ambientais, tanto através de seu contato com vetores ou hospedeiros, como também dentro dos hospedeiros vertebrados onde entrarão em contato com diferentes temperaturas, pH, e condições adversas do vacúolo parasitóforo (Courret et al. 2002, Mitra et al. 2013).

## 1.2 Hospedeiros

Uma vez que um mamífero infectado é considerado um hospedeiro, sua importância no ciclo de transmissão e manutenção do parasito dependerá das estratégias de dispersão do mesmo e das particularidades de sua interação com o

hospedeiro. Essas variáveis vão determinar o contato do parasito com o ambiente externo, e/ou com um hospedeiro intermediário envolvido em sua transmissão e manutenção. São esses fatores que determinam a competência de transmissão de determinado hospedeiro e, assim, seu papel como reservatório (Roque & Jansen 2014).

É necessário reconhecer a diferença entre hospedeiros que são essenciais para a manutenção do ciclo de vida dos parasitos (reservatórios) e aqueles que são acidentais, ou seja, que se infectam porém apresentam baixa capacidade de transmissão (Lainson & Shaw 1987). Um hospedeiro, para ser incriminado como reservatório, deve incluir uma ou mais espécies de mamíferos que são responsáveis pela manutenção de determinado parasito na natureza e são considerados únicos, desempenhando um papel distinto na transmissão, dentro de um determinado espaço/tempo. Então, a competência de transmissão é uma característica que se altera ao longo da infecção, inclusive individualmente, em determinado hospedeiro. Assim, uma espécie, ou mesmo um indivíduo, pode desempenhar diferentes papéis ao longo de sua vida na epidemiologia de um parasito (Ashford 1997, Haydon et al. 2002, Jansen & Roque 2010).

Existe uma grande variedade de espécies de mamíferos apontadas como hospedeiras para *Leishmania* spp. dentro, por exemplo no Brasil, das ordens de roedores, marsupiais, canídeos e primatas, alguns deles atuam como reservatórios participando da manutenção do ciclo do parasito não apenas nos ambientes silvestre, mas também no doméstico (Roque & Jansen 2014).

As mudanças ambientais que vêm ocorrendo nos habitats dos flebotomíneos, seja naturalmente ou por intervenção humana, como, por exemplo, a destruição de matas nativas, tem modificado a situação ecológica entre vetores, parasitos e hospedeiros (Pessoa et al. 2007). A invasão humana em áreas florestais e ocupação desordenada tem permitido cada vez mais que os vetores se aproximem do peridomicílio e domicílio, facilitando que o ciclo de transmissão destes parasitos ocorra também fora do ambiente silvestre (Madeira et al. 2003, Queiroz et al. 2012).

O homem tem aumentado cada vez mais seu contato com o ambiente silvestre, sua flora e fauna, e dessa forma seu contato com diversos parasitos que circulam neste ambiente. Embora o homem sempre tenha convivido com parasitos de origem no ambiente silvestre, este contato vem aumentando consideravelmente, seja através do aumento das atividades agrícolas que acabam invadindo e destruindo os habitats naturais; seja pelo aquecimento global e expansão da

urbanização; ou mesmo com a prática cada vez mais frequente de atividades de ecoturismo, entre outros fatores. Esse maior contato com os ciclos de parasitos silvestres tem aumentado a transmissão destes para o homem e animais domésticos (Daszak et al. 2007, Jones et al. 2008). Estas alterações ambientais aceleram a dispersão desses parasitos e acarretam contato com novos hospedeiros, que podem atuar como reservatórios, expandindo as áreas de ocorrência de uma parasitose (Aguirre & Tabor 2008, Rhyan & Spraker 2010).

Os fatores que envolvem essas alterações ambientais são ainda mais importantes quando acontecem, por exemplo, com algumas espécies de *Leishmania*, as de maior importância médica: *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, que se caracterizam como parasitos multi-hospedeiros, ou seja, com capacidade de infectar uma grande variedade de espécies. Esses parasitos possuem uma grande heterogeneidade genética o que permite que infectem uma maior quantidade de espécies de mamíferos, resultando em epidemiologias complexas em cada região afetada, dificultando o estabelecimento de estratégias de controle (Rotureau 2006, Shaw 2007).

### **1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana**

Os parasitos responsáveis pela leishmaniose tegumentar (LT) apresentam uma distribuição mundial, com milhões de pessoas em regiões endêmicas correndo risco de se infectar, em aproximadamente 98 países segundo a OMS (WHO 2010). Do total de casos já registrados, 90% ocorreram em apenas 6 países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Brasil e Peru (Gontijo & Carvalho 2003). No continente americano sua presença já foi relatada desde o Texas (EUA) até a Argentina. No Brasil, ocorrem cerca de 35 mil novos casos por ano. Assim como boa parte das zoonoses, a intensidade com que a LT afeta o homem depende, entre outros fatores, das alterações no meio ambiente (Negrão & Ferreira 2009, Brasil 2010).

A LT pode causar lesões teciduais em pele e/ou mucosa em humanos (Figura 4) e está associada a pelo menos 16 espécies de *Leishmania*. No Brasil, as espécies *Leishmania amazonensis* e *L. braziliensis* são as mais prevalentes, sendo essa última a de maior distribuição geográfica, ocorrendo em todas as regiões do país (Baptista et al. 2009, Brasil 2010). Como na LT podem estar envolvidas mais de uma espécie de *Leishmania*, sua importância não está somente na distribuição geográfica, mas também na possibilidade de causar lesões destrutivas,

desfigurantes e até incapacitantes dependendo do caso, impactando psicológica e socialmente o indivíduo afetado. As variações de suas manifestações clínicas podem variar em função da resposta imunológica do hospedeiro e da espécie (ou espécies) envolvida na infecção, podendo ocorrer desde uma infecção subclínica até formas mucosas graves e mutilantes com evolução crônica. Assim, as LT podem ser classificadas em formas cutânea localizada, cutânea disseminada ou mucosa. (Gontijo & Carvalho 2003, Bentes et al. 2015).



**Figura 4** - Lesões teciduais na LT. (A) LT cutânea e disseminada - lesão inicial; (B) LT cutânea e disseminada, no mesmo paciente, 8 dias após a foto A) (Bentes et al. 2015).

O diagnóstico da LT é laboratorial, clínico e epidemiológico. A descoberta da doença e seu tratamento precoce melhoram o prognóstico e reduzem as chances de ocorrer mutilação. Com relação a evolução da doença, geralmente observa-se após um período de duas semanas a três meses de incubação, com o aparecimento de um nódulo eritematoso ou pápula acompanhado de linfadenopatia. Estas lesões podem se resolver espontaneamente ou evoluir para as formas clínicas mucosa ou cutânea, em alguns casos mais graves é possível observar manifestações sistêmicas como febre, mialgia, emagrecimento, entre outros (Bentes et al. 2015).

#### 1.4 Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica em 5 continentes com casos relatados em pelo menos 54 países de regiões tropicais e subtropicais, sendo

a forma mais severa de leishmaniose que pode ser fatal se não tratada e acomete os órgãos viscerais (em especial medula óssea, fígado e baço). A LV pode se apresentar de duas formas, zoonótica e antroponótica, e estão associadas a *L.(L) infantum* (syn. *L. chagasi*) e *Leishmania(L) donovani*, respectivamente. A forma zoonótica dessa doença existe principalmente na região mediterrânea e no continente americano e se caracteriza pela transmissão entre homem x animais onde estes últimos atuam como reservatórios. Já na forma antroponótica, prevalente nos continentes asiático e africano incluindo Índia, Nepal, Bangladesh e África oriental, não há a participação de animais no ciclo, os vetores transmitem o parasito de humanos infectados para os saudáveis (van Griensven & Diro 2012, Jain & Jain 2015).

Cerca de 400.000 novos casos são registrados por ano e a LV é fatal em aproximadamente 90% dos casos não tratados. Infelizmente, esses dados acabam sendo subestimados uma vez que a notificação dos casos não é feita de forma regular em todos os países, muitos sequer possuem um sistema de vigilância e armazenamento de dados. Uma vez que a leishmaniose está associada à pobreza, muitos pacientes acabam não tendo acesso a unidades de saúde, não recebendo assim os cuidados médicos necessários. Além disso, os casos assintomáticos muitas vezes acabam sendo maiores que os relatados (Alvar et al. 2012, WHO 2012, Stockdale & Newton 2013). Mesmo com grande parte dos casos de LV subnotificados, o Brasil é hoje responsável por aproximadamente 90% dos casos da América Latina, sendo crianças com até nove anos de idade as mais afetadas, responsáveis por até 41% dos casos humanos do país. Além das altas taxas de mortalidade, a LV tem apresentado grande expansão no território brasileiro, com 22 dos 27 estados notificando casos autóctones da doença em humanos, principalmente nas regiões norte, nordeste e sudeste (Brasil 2016).

Embora animais domésticos como cão, e talvez também o gato, em menor grau, tenham participação na disseminação da leishmaniose visceral, a aproximação dos domicílios com áreas silvestres, permitem que mamíferos selvagens também tornem-se fonte de infecção para os vetores, adquirindo importância para a transmissão do parasito (Roque & Jansen 2014).

O período de incubação para LV geralmente vai de 2 a 6 meses, porém pode variar de algumas semanas a muitos anos. Inicialmente os pacientes geralmente apresentam febre, anemia, perda de peso, esplenomegalia (Figura 5) entre outros, os sintomas podem persistir por muitos meses, além da possibilidade de

aparecimento de alguns sintomas específicos reportados em algumas localidades (Murray et al. 2005).



**Figura 5** - Esplenomegalia causada pela LV. Paciente em fase aguda (Brasil 2014).

As leishmanioses, principalmente a forma visceral, estão se expandindo em regiões antes consideradas livres do parasito, e casos tanto de visceral quanto de tegumentar estão sendo diagnosticados em pessoas que visitam regiões endêmicas e depois retornam a seus locais de origem (Alvar et al. 2006, 2012). A transmissão, que antes era restrita a habitats silvestres e pequenas regiões rurais, agora vêm se difundindo em grandes centros urbanos, sendo considerada uma endemia em expansão (Werneck et al. 2002, Maia-Elkhoury et al. 2008).

### 1.5 Transmissão

O conhecimento a respeito dos parasitos do gênero *Leishmania* avançou nas últimas décadas, mas ainda há muitos aspectos desconhecidos sobre seus mecanismos de transmissão, em especial entre seus hospedeiros e vetores silvestres, principalmente em áreas onde a taxa de infecção em flebótomos é baixa, porém as taxas de infecção entre os mamíferos são altas e a transmissão se mantém com sucesso ao longo do tempo (Silva et al. 2007, Silva-Nunes et al. 2008, Quinnell & Courtenay 2009).

Apesar de alguns estudos sugerirem que, na ausência dos vetores flebotomíneos suscetíveis em determinadas regiões, maruins (Ceratopogonidae) possam atuar como possíveis transmissores das espécies de *Leishmania* spp. os flebotomíneos são os únicos vetores biológicos comprovados de *Leishmania* spp.

(Dougall et al. 2011). Entretanto, a ocorrência de outras formas de transmissão tem sido muito discutida, principalmente em áreas onde foram confirmados casos de leishmaniose sem a presença confirmada de *Lutzomyia longipalpis* (Souza et al. 2003, Pinto et al. 2010) ou ainda em áreas onde não foram encontrados nenhum indício da presença de qualquer espécie de flebotomíneo (Gaskin et al. 2002). Apesar desses casos ainda não terem sido amplamente estudados, eles sugerem a existência de vias alternativas de transmissão.

Em um canil nos Estados Unidos, 4 cães da raça Foxhound foram diagnosticados com leishmaniose visceral numa localidade onde não há presença de flebotomíneos. Esses cães também nunca tinham viajado para uma região endêmica, porém foram expostos a outros cães da mesma raça que também foram diagnosticados com leishmaniose visceral. A transmissão entre cães, principalmente dessa raça, vem sendo descrita há mais de 20 anos nos Estados Unidos com seus mecanismos de transmissão mal definidos e sem a presença registrada do vetor (Gaskin et al. 2002, Schantz et al. 2005).

No Brasil, em Recife no ano de 2002, foi relatado um caso autóctone de leishmaniose visceral canina e estudos realizados para avaliar a presença de flebotomíneos foi negativo, sendo encontrados somente insetos pertencentes aos gêneros *Culex* e *Aedes* (Dantas-Torres et al. 2005).

Sabe-se que dentre as formas de transmissão secundárias conhecidas (que não incluem os vetores flebotomíneos) estão a transfusão sanguínea com casos relatados em áreas não endêmicas. A transmissão por transfusão sanguínea foi comprovada utilizando hamsters em 1996, e desde então casos de infecção por essa via vem sendo relatados, como o caso de uma criança de 7 meses que foi hospitalizada com sintomas de leishmaniose visceral. Os médicos constataram que a criança teve complicações no momento do parto e precisou de transfusão sanguínea, fornecida por um tio até o momento saudável. Esse tio infelizmente veio a falecer 3 meses após a transfusão. O diagnóstico de leishmaniose visceral só ocorreu após a morte, porém a mãe, os irmãos e outros parentes apresentaram resultado negativo para leishmaniose nos testes realizados (Palatnik-De-Sousa et al. 1996, Dey & Singh 2006).

A via transplacentária ou congênita é outra via possível de transmissão uma vez que já foi comprovada a capacidade do parasito de invadir a placenta, resultando na provável contaminação do feto. Essa via para LV foi descrita pela primeira vez por Low e Cooke em 1926. Mais recentemente foi testada

experimentalmente com sucesso em cães da raça Beagle, onde uma ninhada fruto de progenitores comprovadamente infectados, apresentou resultados positivos para *Leishmania* spp. em PCR (Low & Cooke 1926, Rosypal et al. 2005). Um caso da Ucrânia (área não endêmica) é um exemplo que ajuda a corroborar essa hipótese, onde uma mulher grávida de aproximadamente 31 semanas foi diagnosticada com LV após voltar de sua temporada de trabalho na Espanha, região endêmica. O bebê nasceu aparentemente saudável, porém após 8 meses apresentou sintomas preocupantes e ao ser encaminhado ao hospital local foi diagnosticado com LV. No Brasil já foram relatados 2 casos em Tocantins, onde duas mulheres grávidas foram hospitalizadas com febre e outros sintomas compatíveis com LV e o diagnóstico se confirmou posteriormente. As crianças nasceram prematuras e permaneceram em incubadora e após poucos dias apresentaram sintomas de LV que foi confirmado por PCR (Figueiró-Filho et al. 2004, Zinchuk & Nadraga 2010, Mescouto-Borges et al. 2013).

A transmissão da LV também pode ocorrer através do compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas injetáveis, principalmente os imunodeprimidos, uma vez que já foi demonstrado que a quantidade de sangue residual numa agulha é suficiente para infectar um hospedeiro susceptível. A co-infecção da LV com o HIV, por exemplo, é alta principalmente na região do Mediterrâneo. A prevalência da LV nesses indivíduos co-infectados é até 500 vezes maior do que nos indivíduos soronegativos. Nesses indivíduos co-infectados é possível observar o comprometimento de órgãos que geralmente não são acometidos pela LV (Amela et al. 1996, Okwor & Uzonna 2013, Monge-Maillo et al. 2014).

A transmissão também pode ocorrer, embora seja raro, através do transplante de órgãos, sendo a maioria desses casos descrita na região do Mediterrâneo e Oriente Médio (Hernández-Pérez et al. 1999, Carrasco-Antón et al. 2017, Gajurel et al. 2017).

Alguns trabalhos sugerem que estes parasitos podem ser transmitidos por via sexual, em áreas onde o vetor flebotômíneo é aparentemente ausente, uma vez que podem causar feridas que contêm parasitos infectivos no aparelho reprodutor dos machos, e são capazes também de infectar o sêmen, como já foi sugerido em cães (Diniz et al. 2005, Quintal 2015).

Outra possibilidade já sugerida seria a transmissão por outros artrópodes, que não os flebotômíneos, tais como pulgas e carrapatos. Existem, por exemplo, evidências experimentais indicando que carrapatos também poderiam atuar como

vetores (talvez mecânicos) de *Leishmania* spp., através da ingestão de sangue de hospedeiros infectados. Podendo logo em seguida, serem ingeridos acidentalmente por cães ou outros mamíferos. Porém, até o presente momento, essa possibilidade ainda não foi comprovada (Zanatta Coutinho et al. 2005). Um trabalho envolvendo 60 cães infectados com *L. infantum*, constatou que 40 possuíam pulgas e quase todos estavam infestados com carrapatos. De acordo com as análises de DNA realizadas, 28% das pulgas e 50% dos carrapatos possuíam o protozoário *Leishmania*. Testes de RNA indicaram que haviam parasitos vivos no interior das ninfas de carrapatos, retiradas desses cães infectados (Colombo et al. 2011). Em outro estudo foram analisados ectoparasitos de 213 animais infectados por *L. infantum* através da análise molecular (PCR), e foi constatado que 43,6% desses ectoparasitos também estavam infectados com *L. infantum* (de Moraes et al. 2013).

A hipótese da transmissão oral tem sido levantada por alguns grupos, uma vez que as formas infectantes amastigotas estão presentes nos tecidos do hospedeiro e podem acabar infectando outros mamíferos em caso de predação (Oliveira et al. 2015, Naucke et al. 2016). Os parasitos estão presentes em todos os elos da cadeia trófica e uma vez instalados em um hospedeiro silvestre podem facilitar sua predação, já que animais doentes geralmente ficam mais suscetíveis a predadores, o que contribui para a difusão dos parasitos (Lafferty et al. 2015).

Existem alguns tripanosomatídeos que podem comprovadamente ser transmitidos por via oral. *T. cruzi*, por exemplo, tem como sua via de transmissão mais antiga, importante e eficiente no ambiente silvestre a via oral, através da predação de mamíferos e vetores infectados (Herrera et al. 2005, Rocha et al. 2013, Rueda et al. 2014). Outros tripanosomatídeos característicos de morcegos como *Trypanosoma dionisii*, transmitido por membros da família Cimicidae e *Trypanosoma cruzi marinkellei* transmitido por triatomíneos do gênero *Cavernicola* também podem ser transmitidos por via oral, principalmente através da ingestão de insetos que se infectam em morcegos (Baker 1985, Roellig et al. 2009, Franzén et al. 2012).

*Trypanosoma lewisi*, que já foi incriminado como causador de tripanossomíase em humanos além de seus hospedeiros roedores naturais, é outro exemplo de tripanosomatídeo que pode ser transmitido oralmente, seja pela ingestão de sangue infectado, através da predação de espécies menores ou das pulgas vetores desse parasito (Maraghi et al. 1995, Howie et al. 2006, Pumhom et al. 2015).

Embora a via oral de transmissão para *Leishmania* spp. ainda não tenha sido comprovada natural ou experimentalmente em nenhum mamífero, já foi sugerida em alguns trabalhos envolvendo principalmente cães que vieram a desenvolver a infecção em regiões não endêmicas, onde não foram encontrados vetores suscetíveis, sem a ligação parental entre os animais ou realização de transfusões e transplantes ou relato de viagens para regiões endêmicas. Sendo assim, a via oral, através de mordidas por eventuais brigas ou pela ingestão de carrapatos infectados, seria a mais provável via de infecção (Zanatta Coutinho et al. 2005, Quinnell & Courtenay 2009, Karkamo et al. 2014, Daval et al. 2016, Naucke et al. 2016).

O presente trabalho avaliou o mecanismo oral e intragástrico de infecção por *L. braziliensis* e *L. infantum* no modelo experimental hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), em ambiente controlado. Nossa hipótese é que as formas promastigotas oriundas de vetores infectados e formas amastigotas presentes nos tecidos de hospedeiros infectados sejam capazes de induzir a infecção quando ingeridas por via oral e/ou intragástrica.

## 1.6 Justificativa

Muitos estudos demonstram que as infecções por *Leishmania* spp. na natureza são mantidas mesmo com baixíssimas taxas de infecção em flebotomíneos (em torno de 1-2%), embora as taxas de infecção nos mamíferos da mesma área possam ser muito maiores. Assim, há algum tempo tem sido especulado que outras formas de transmissão possam estar envolvidas, já que essas baixas taxas por si só não seriam suficientes para manter a transmissão dessa parasitose, principalmente em áreas onde não há vetores conhecidos.

Nossa hipótese é que ao menos algumas das espécies de *Leishmania* possam ser transmitidas por via oral através da predação de um mamífero infectado por outro suscetível, já que se sabe que formas amastigotas são capazes de infectar, uma vez que se alojam nos tecidos do hospedeiro e podem ser ingeridas pelo predador juntamente a esses tecidos da presa infectada. Outra possibilidade é que a infecção possa ocorrer pela ingestão de flebotomíneos infectados com formas promastigotas, seja pelo hábito insetívoro de alguns mamíferos, seja acidentalmente.

Apesar dessa via de infecção ainda não ter sido comprovada, definir a viabilidade de transmissão destes parasitos por via oral é de fundamental importância para se entender a dinâmica de manutenção e transmissão destes parasitos na natureza.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a viabilidade da via oral de infecção por *Leishmania infantum* e *L. braziliensis* utilizando hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) como modelo experimental.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Testar a infectividade de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* provenientes de culturas através da via oral em hamsters;
2. Testar a infecção de hamsters por via oral através de ingestão de *L. longipalpis* infectados com *L. braziliensis* ou *L. infantum*;
3. Testar a infecção experimental de hamsters por via oral através da ingestão de amastigotas de *L. braziliensis* ou *L. infantum* presentes em tecidos de animais infectados ou em culturas de macrófagos infectados por estes parasitos;
4. Diagnosticar a infecção em hamsters submetidos a infecção experimental por *L. braziliensis* ou *L. infantum*, por diferentes vias de infecção, através de abordagens parasitológicas, sorológicas e moleculares.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Aspectos éticos

A manipulação dos animais foi realizada atendendo as normas de biossegurança estabelecidas pela Comissão de Biossegurança do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. O estudo foi realizado de acordo com o protocolo aprovado pelo Comitê Institucional de Experimentação e Cuidado de Animais de Investigação (CEUA - Fiocruz: L018/2015, no caso dos hamsters e CEUA - Fiocruz: L030/2016 no caso dos camundongos).

### 3.2 Parasitos

As amostras de *L. braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) CEPA THOR foram doadas pelo Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia do IOC – FIOCRUZ; e as amostras de *L. infantum* (MHOM/BR/2001/HP-EMO=IOC-L2504) foram obtidas a partir da Coleção do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC).

Inicialmente essas amostras, que estavam criopreservadas, foram retiradas do nitrogênio líquido e mantidas em temperatura ambiente em cabine de biossegurança até seu total descongelamento. A viabilidade da amostra foi aferida através do exame de uma gota do material entre lâmina e lamínula e observada microscopicamente na ampliação de 400x. Confirmada a viabilidade, as amostras foram adicionadas em tubos de cultura contendo meio NNN (Nicolle, Novy, Mc Neal) e meio líquido Schneider e observadas a cada 3 dias até atingirem seu pico de crescimento, quando então foi realizado o repique para novos tubos com adição de meio de cultura. Após atingirem o crescimento ideal com o mínimo de passagens possível, no máximo duas. Consideramos como passagem, cada repique para outros tubos, assim como a adição de meio líquido Schneider, numa quantidade entre 0,5mL até 2 mL, nos tubos que deram início ao cultivo. O meio líquido contendo os parasitos foi colocado em um tubo Falcon com PBS estéril e centrifugado à 4 °C em 4000 rotações por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido e ao final o *pellet* foi ressuspenso em 1mL de solução salina estéril. Após, foram realizadas diluições de 1:10 e 1:100 em microtubos do tipo eppendorf (utilizando 10µL da amostra diluída em 90µL de salina

estéril, no caso da diluição 1:10) para quantificação em câmara de Neubauer. Para a contagem foram retirados 10 µL da diluição contida no tubo e contado em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada nos 4 quadrantes laterais, e após essa contagem foi realizado o seguinte cálculo para obtenção da concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de parasitos (total)} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{4}$$

### 3.3 Animais

Foram utilizados 30 hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) derivados do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB) da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais utilizados tinham de 3 a 4 semanas de vida, machos, com aproximadamente 30 gramas. Os mesmos foram mantidos durante todo o experimento em biotério experimental, sob temperatura controlada, alimentação por ração apropriada e água filtrada *ad libitum*.

### 3.4 Caracterização taxonômica

A caracterização taxonômica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses. Para a confirmação taxonômica das amostras de *Leishmania* sp. foi utilizado o Ensaio de Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) (Cupolillo et al. 1994, Bañuls et al. 1997). Os sistemas enzimáticos padrões a para a identificação de isolados de *Leishmania* que circulam nas Américas são G6PDH e 6PGDH. Utilizou-se as amostras de referência IOC/L 566 (*L. braziliensis*) e IOC/L 579 (*L. infantum*), que são as mais comumente utilizadas como padrão de comparação para identificação dos isolados. Foram preparadas inicialmente duas soluções tampão de corrida distintas: solução tampão Tris Maleico pH 7.4 e solução tampão Tris Fosfato pH 8.0. Para preparo do gel de corrida foi adicionado 50mL do tampão de corrida (Tris Maleico ou Tris Fosfato utilizados separadamente), com 50mL de H<sub>2</sub>O tipo II e 1,0g de agarose, a mistura foi levada ao forno microondas até que estivesse transparente e sem grumos. Para a base de corrida, foi utilizada uma folha de GelBond®, onde foi despejada 60 mL do gel. O gel já solidificado foi

colocado em câmara úmida e mantida em geladeira até sua utilização (Cupolillo et al. 1994).

Em seguida preparou-se a agarose 1%, e a solução de ácido acético. O corante utilizado foi azul de bromofenol, e xilenocianol. Foi utilizado um Circulador Termostático para estabilizar a temperatura da cuba de eletroforese horizontal Multiphor II® a  $5 \pm 2^\circ\text{C}$ . Em seguida foi colocado sobre o gel a fita de aplicação EPH – Sample Application F01®, de 24 poços, com aplicação de 2  $\mu\text{L}$  do corante marcador no primeiro poço, no meio e no último poço onde as amostras seriam aplicadas. Depois foram aplicadas as amostras, em um volume de  $3 \pm 3 \mu\text{L/poço}$ . O gel foi posicionado na placa refrigerada, com a solução tampão apropriada para o gel e sistema enzimático a ser utilizado (Momen & Grimaldi 1984, Cupolillo et al. 1994).

Para revelação ao final da corrida, em dois recipientes diferentes, foram preparadas as soluções de revelação específicas para o tampão Tris Maleico (6PGDH) e para o tampão Tris Fosfato (G6PDH), o gel foi retirado da cuba, e levado a um ambiente escuro por pelo menos 3 minutos. Após a visualização de todas as bandas a reação foi parada adicionando ácido acético a 5% sobre o gel, em quantidade suficiente para submergi-lo. A identificação de cada espécie foi realizada comparando as bandas das amostras de referência com as bandas das amostras testadas (Momen & Grimaldi 1984).

### **3.5 Obtenção e infecção de macrófagos**

#### **3.5.1 Obtenção de Macrófagos Peritoneais**

Para a obtenção de macrófagos peritoneais foram utilizados camundongos das linhagens BALB/c obtidos do ICTB, os quais foram inoculados com 3mL de tioglicolato a 3% (Lam et al. 2013) por via intraperitoneal. Após três dias, estes animais foram eutanasiados e submetidos a lavado peritoneal com PBS pH 7.0 (NaCl 137mM; KCl 2,7mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,88 mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,4mM;  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p 1L). O lavado peritoneal foi centrifugado a 1500rpm por 5 minutos (centrifuga Jouan BR4i; rotor S40). O sobrenadante foi descartado e ressuspenso em meio RPMI - 1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich). Os macrófagos foram quantificados em câmara de Neubauer utilizando-se o corante vital azul de trypan 0,4% (Sigma-Aldrich). Após contagem, os macrófagos foram diluídos em meio RPMI sem

vermelho de fenol suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 200mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 10µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich) de acordo com a concentração necessária ao experimento, semeados em placas de 6 poços na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células por poço e mantidos à 34 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, até o dia seguinte.

### **3.5.2 Infecção de macrófagos peritoneais**

Para a infecção da cultura de macrófagos, culturas axênicas de promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. infantum* em fase estacionária foram centrifugadas a 4000rpm (centrifuga Jouan BR4i, rotor S40) e ressuspensas em meio Schneider. Posteriormente, foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas para uma concentração de  $2,5 \times 10^7$  parasitos por poço (10 parasitos por células). Antes da infecção, as culturas de macrófagos foram lavadas 3x com PBS pH 7.0 (temperatura ambiente) e as formas promastigotas colocadas em contato com as células por 6 horas em 1mL de RPMI. Após esse período, as culturas foram novamente lavadas para retirada das promastigotas não interiorizadas, acrescida de 2mL de meio RPMI e mantidas à 34 °C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, até completar 96 horas de infecção.

Para estimar a porcentagem de células infectadas e a média de amastigotas por células foram mantidos, paralelamente, poços com lamínulas, que no mesmo tempo de infecção, foram recolhidas, lavadas duas vezes com PBS pH7.0, fixadas com Bouin por 5 minutos e lavadas em álcool 70% duas vezes por 30 minutos cada lavagem. Posteriormente, foram coradas por Giemsa (diluição 1:10) por 60 min e depois realizado procedimento de desidratação, que consiste em lavar as lamínulas em soluções de acetona pura (2x), 70% acetona + 30% xilol, 50% acetona+ 50% xilol, 30% acetona+70% xilol, xilol puro (2x), nesta mesma sequência aqui descrita. Após desidratação são coladas em laminas com entellan® (Merck).

### **3.5.3. Porcentagem de células infectadas e número de amastigotas por célula**

A carga parasitária intracelular foi determinada por observação através de microscopia ótica (100x, Axioskop, Carl Zeiss International) em três poços. Em cada lamínula foram contadas 100 células, registrando-se o número de parasitos em cada em células. A taxa de infecção foi determinado pelo número de células infectadas e

a média do número de parasitos por célula pela soma das amastigotas encontradas dividido pelo número de células infectadas.

#### **3.5.4 Obtenção de macrófagos infectados**

Após 96 horas de infecção, o sobrenadante das culturas foi retirado, as culturas lavadas 3X com PBS pH7.0, adicionado 1mL de meio RPMI e as células recolhidas com a utilização de um “*cell scraper*”. A cultura final de macrófagos infectados com *Leishmania spp.* foi inoculada oralmente em hamsters (grupos G de *L. braziliensis* e F de *L. infantum*) na concentração de  $10^5$  parasitos em um volume de 0,1mL.

#### **3.6 Procedimentos de infecção experimental com formas promastigotas de cultura pelas vias intradérmica, intraperitoneal e Oral**

Aos 30 dias de idade, em média, os animais foram infectados com formas promastigotas de *Leishmania* derivadas de cultura em fase estacionária e acompanhados por no máximo 180 dias, quando então foram eutanasiados para coleta de sangue e fragmentos de tecidos (pele lesionada e do abdômen, baço e fígado). Esse prazo foi menor nos grupos onde os animais apresentaram alterações clínicas que podiam afetar a qualidade e/ou que representassem risco de vida para o animal, fazendo-se necessário assim antecipar a data da necropsia.

Os hamsters foram quimicamente contidos com Cloridrato de ketamina (100mg/ml) associado a Acepromazina (10mg/ml), por via intramuscular e divididos em grupos (2 animais por grupo) de acordo com a espécie de *Leishmania* utilizada e com o tipo de inóculo (Tabelas 1 e 2):

**Tabela 1** - Divisão dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania braziliensis*

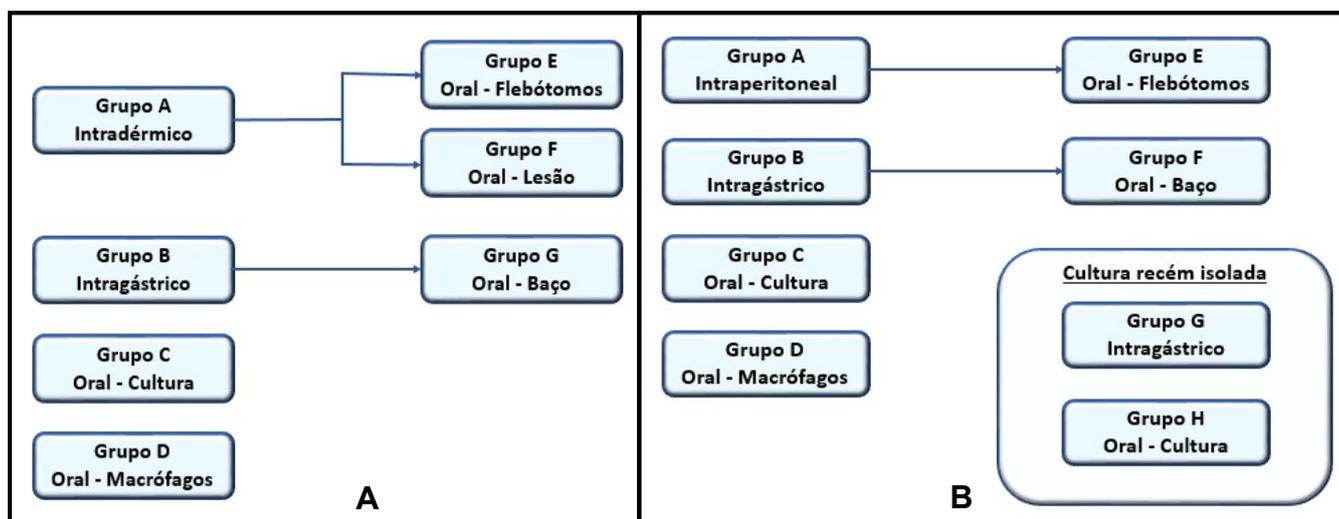
| <b>Grupo</b> | <b>Parasito</b>        | <b>Via de infecção/Fonte do inóculo</b>   |
|--------------|------------------------|---|
| A            | <i>L. braziliensis</i> | Intradérmica - cultura  |
| B            | <i>L. braziliensis</i> | Via intragástrica - cultura   |
| C            | <i>L. braziliensis</i> | Via Oral - cultura  |
| D            | <i>L. braziliensis</i> | Via Oral – Cultura de macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i>                |
| E            | <i>L. braziliensis</i> | Via Oral – Flebótomos alimentados diretamente em lesão dérmica dos animais do grupo A |
| F            | <i>L. braziliensis</i> | Via Oral – Fragmento de lesão dérmica de animais do grupo A                           |
| G            | <i>L. braziliensis</i> | Via Oral – Fragmento de baço com lesão macroscópica oriundos de um animal do grupo B  |

**Tabela 2** - Divisão dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania infantum*.

| <b>Grupo</b> | <b>Parasito</b>    | <b>Tipo de Inóculo/Fonte do inóculo</b>                            |
|--------------|--------------------|--|
| A            | <i>L. infantum</i> | Intraperitoneal  |
| B            | <i>L. infantum</i> | Via intragástrica – cultura  |
| C            | <i>L. infantum</i> | Via Oral - cultura   |
| D            | <i>L. infantum</i> | Via Oral – Cultura de macrófagos infectados com <i>L. infantum</i> |
| E            | <i>L. infantum</i> | Via Oral – Flebótomos alimentados em animal do grupo A             |
| F            | <i>L. infantum</i> | Via Oral – Fragmento de baço de animais do grupo B                 |
| G            | <i>L. infantum</i> | Via intragástrica – cultura (Amostra recém isolada)                |
| H            | <i>L. infantum</i> | Via Oral (Direta) – cultura (Amostra recém isolada)                |

### 3.6.1 *Leishmania braziliensis*

A figura 6 mostra o desenho experimental dos nossos grupos de *L. braziliensis* e *L. infantum*.



**Figura 6** – Desenho experimental dos grupos inoculados experimentalmente com *L. braziliensis* (A), e *L. infantum* (B), apresentando a divisão por tipo de inóculo e espécie de *Leishmania* utilizados.

### 3.6.1.1 Grupo A

O grupo A foi composto por dois hamsters, os quais foram sedados, como descrito no item 3.6, e infectados por via intradérmica, na pata dianteira esquerda, com cultura axênica de *L. braziliensis* (0,1mL na concentração de  $10^6$  formas promastigotas do parasito), utilizando-se uma seringa de 1mL.

### 3.6.1.2 Grupo B

A mesma cultura axênica foi utilizada para inocular dois hamsters que compuseram o Grupo B, infectados por via intragástrica com 0,1mL de cultura de *L. braziliensis*, na concentração de  $10^6$  parasitos. Utilizou-se uma seringa de 1mL, com agulha de gavagem, que possui a ponta romba, não perfurante, a qual foi inserida pela boca do animal permitindo assim a inoculação da cultura diretamente no estômago do mesmo. Antes da necropsia, realizou-se o xenodiagnóstico com aproximadamente 10 flebótomos, dos quais 5 fêmeas sobreviveram após a incubação e foram congeladas para PCR. Após o xenodiagnóstico, deu-se prosseguimento à etapa de eutanásia e coleta de material (sangue, pele do abdômen, baço e fígado).

### **3.6.1.3 Grupo C**

Para o grupo C, utilizou-se uma cultura axênica obtida através do reisolamento dos parasitos de lesão dérmica do grupo A. Foi utilizado 0,1mL do preparado da cultura, contendo  $10^6$  parasitos para inóculo por via oral, oferecendo-se o material em seringa de 1mL sem agulha, diretamente na boca do animal, para que o mesmo bebesse espontaneamente.

### **3.6.1.4 Grupo D**

A mesma cultura axênica utilizada para infectar os animais dos grupos A e B foi utilizada para infectar macrófagos peritoneais de camundongo, como descrito no item 3.5.2. Esses macrófagos infectados foram oferecidos a um novo grupo de hamsters por via oral, com o auxílio de uma seringa de 1mL sem agulha. Cada hamster recebeu aproximadamente  $1 \times 10^5$  parasitos.

### **3.6.1.5 Grupo E**

Após o aparecimento de lesão dérmica na pata dos animais do Grupo A, esses foram sedados conforme descrito anteriormente e foram enrolados em dois pedaços de pano com um pequeno orifício, para a exposição da pata lesionada. Esse procedimento não interferiu na respiração do hamster, e permitiu que somente a pata infectada ficasse exposta, facilitando a alimentação dos flebótomos diretamente na lesão. Dessa forma, esses hamsters foram inseridos dentro de uma gaiola com aproximadamente 20 flebótomos e deixados por aproximadamente uma hora para alimentação dos insetos. Após este período, obtivemos um total de 9 fêmeas alimentadas, as quais foram separadas das demais e armazenadas em estufa BOD conforme o item 3.8.

Após 4 dias, as 6 fêmeas que sobreviveram foram oferecidas a um novo grupo de hamsters por via oral diretamente na boca do animal, com o auxílio de uma pinça. Foram oferecidos 3 flebótomos para cada hamster, os quais foram ingeridos, formando assim o Grupo E.

### **3.6.1.6 Grupo F**

Dois dias após serem utilizados para alimentação dos flebótomos, os animais do Grupo A que apresentaram lesão na pata foram novamente sedados, para que fossem realizadas as etapas de coleta de material (sangue, pele do abdômen, baço

e fígado), 2 meses após o inóculo. Após a eutanásia desses animais, dois fragmentos da lesão dérmica foram coletados e oferecidos a um novo grupo de hamsters, com o auxílio de uma pinça. Utilizou-se um fragmento por animal, que foi introduzido por via oral, diretamente na boca dos animais dando origem ao Grupo F.

### **3.6.1.7 Grupo G**

No momento da necropsia do Grupo B (animais infectados por via intragástrica) foram observadas lesões macroscópicas características de infecção por *Leishmania spp.* no baço e no fígado de um dos animais do grupo; assim foi realizada a coleta de dois fragmentos desse baço lesionado, que foram oferecidos, a um novo grupo de hamsters, com o auxílio de uma pinça. Utilizou-se um fragmento por animal, que foi introduzido por via oral, em hamsters normais, formando assim o Grupo G.

## **3.6.2 *Leishmania infantum***

### **3.6.2.1 Grupo A**

A infecção por *L. infantum* seguiu o mesmo modelo da realizada com *L. braziliensis*. Inicialmente inoculou-se dois hamsters de aproximadamente 4 semanas, previamente sedados como descritos no item 3.6, utilizando cultura axênica de *L. infantum* (0,2mL na concentração de  $10^6$  parasitos) por via intraperitoneal, com o auxílio de uma seringa de 1mL.

No momento da necrópsia destes primeiros dois animais sem sintomas, sugerindo uma baixa carga parasitária ou ausência de parasitos, decidiu-se a realização de inoculação de um novo grupo de 2 hamsters para substituir esses primeiros, e assim ser possível dar continuidade aos experimentos e tentativas de infecção dos demais grupos. Na segunda tentativa, outros dois hamsters foram inoculados e acompanhados semanalmente por 6 meses.

### **3.6.2.2 Grupo B**

Utilizando a mesma amostra de *L. infantum* do Grupo A, foi realizado um inóculo por via intragástrica em um novo grupo de hamsters, que formaram o Grupo B. Utilizou-se agulha de gavagem que permitiu o inóculo da cultura diretamente no estômago do animal.

### **3.6.2.3 Grupo C**

Utilizando a mesma cultura axênica dos Grupos A e B, foram inoculados dois hamsters por via oral, utilizando uma seringa de 1mL sem agulha e oferecendo 0,1mL do preparado de cultura de *L. infantum*, contendo  $10^6$  parasitos, para que os hamsters bebessem espontaneamente.

### **3.6.2.4 Grupo D**

Uma vez que os resultados encontrados nos animais do Grupo A apresentaram uma carga parasitária baixa, resolvemos utilizar uma nova amostra recém isolada da mesma CEPA de *L. infantum*. Essa cultura foi utilizada para infectar macrófagos, utilizando-se em média, 10 parasitos por célula, e essa cultura de macrófagos infectados foi utilizada para inocular por via oral novos hamsters com o auxílio de uma seringa de 1mL sem agulha, cada hamster recebeu aproximadamente  $1 \times 10^5$  parasitos, que estavam no interior de macrófagos, dando origem assim ao Grupo D.

### **3.6.2.5 Grupo E**

Após transcorridos 6 meses da infecção e antes da necropsia do Grupo A (animais inoculados por via intraperitoneal) os animais foram sedados e inseridos em uma gaiola contendo 30 flebotomíneos, por aproximadamente uma hora. Após esse tempo os hamsters foram recolocados em suas gaiolas e as 13 fêmeas de flebotomos que se alimentaram foram separadas das demais e mantidas por 4 dias em estufa BOD conforme o item 3.8.

Transcorridos esses 4 dias, as 10 fêmeas sobreviventes foram utilizadas para alimentar um novo grupo de hamsters, que compuseram o grupo E. De um total de 10 fêmeas alimentadas, foram oferecidas 4 para cada hamster, com o auxílio de uma pinça, para que fossem ingeridas por via oral e 2 foram separadas e congeladas afim de confirmarmos a infecção através do diagnóstico molecular diretamente nos insetos.

### **3.6.2.6 Grupo F**

Após os 4 meses de incubação do Grupo B (hamsters inoculados por via intragástrica) os animais foram sedados e necropsiados. No momento da necropsia foram separados dois pedaços de baço de um dos animais para alimentar um novo

grupo de hamster, o Grupo F. Esse baço, que não apresentava nenhuma alteração macroscópica, foi oferecido aos animais diretamente na boca, com o auxílio de uma pinça, para que o engolissem.

### **3.6.2.7 Grupo G**

Utilizando-se a amostra recém isolada de *L. infantum*, foi realizado um novo inóculo por via intragástrica em um novo grupo de hamsters, que formaram o Grupo G. Para esse inóculo foi utilizada uma seringa de 1mL e agulha de gavagem.

### **3.6.2.8 Grupo H**

A amostra recém isolada de *L. infantum*, foi inoculada em um grupo de hamster por via oral, com seringa de 1mL, sem agulha, contendo 0,2mL do material, mantendo-se a concentração de  $10^6$  parasitos, originando assim o Grupo H.

## **3.7 Procedimentos de eutanásia e coleta de amostras dos hamsters**

No momento da necropsia, os hamsters foram anestesiados com Cloridrato de ketamina (100mg/mL) associado a Acepromazina (10mg/mL). Com o animal anestesiado, foi realizada a coleta de sangue através de punção cardíaca. Após a coleta de sangue, os hamsters foram eutanasiados com Cloreto de potássio por via intracardíaca e transferidos para uma cabine de segurança biológica classe II onde foram realizados os seguintes procedimentos: (i) *imprints* teciduais de baço, fígado, pele do abdômen, e sítio de inoculação (apenas para os inoculados por via intradérmica, Grupo A); (ii) Coleta de fragmentos destes mesmos tecidos, os quais foram lavados em solução salina com antibióticos (350 UI de penicilina e 150 mg / mL de estreptomicina) e inoculados em meio de cultura bifásico (NNN/Schneider) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) e 2% de urina; (iii) coleta e armazenamento de fragmentos desses mesmos tecidos em tubos de 1,5 mL contendo etanol e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para realização de diagnóstico molecular; (iv) coleta e armazenamento de fragmentos desses mesmos tecidos em PFA (paraformaldeído) a 4% em PBS 0,01M, pH 7,45 para diagnóstico histopatológico.

Após a eutanásia dos animais e armazenamento dos tecidos e lâminas, o sangue coletado por punção cardíaca foi centrifugado a 10.000rpm por 8 minutos, o

sobrenadante foi pipetado para um microtubo e armazenado em freezer -20° C até a realização da sorologia.

### **3.8 Infecção em *L. longipalpis***

Os hamsters infectados foram anestesiados e o local do inóculo (no caso do grupo D de *L. braziliensis*) ou o animal inteiro (demais grupos) foi exposto a fêmeas de *L. longipalpis* com aproximadamente 7 a 10 dias de idade para realizarem sua alimentação por um período de 1 hora. Após esse período, os flebotomíneos foram soltos em gaiola de náilon e permaneceram na estufa BOD por 4 dias onde receberam solução de açúcar contendo antibiótico (5mL de glicose, 30mL de água destilada e 2mL de garamicina 40mg diluído em água (0,001%).

Depois de transcorrido o período de incubação, os flebotomíneos foram: (i) oferecidos, por via oral, aos hamsters que compuseram os grupos de animais infectados com esses insetos; ou (ii) congelados para a realização do diagnóstico molecular por PCR.

### **3.9 Imprints teciduais**

Os *imprints* teciduais realizados durante a necropsia foram fixados com metanol por 10 min, em seguida foi preparada em tubo Falcon uma solução de 50mL de água destilada, com 25mL de álcool 92,8% e 3,5 mL de corante Giemsa filtrado em papel filtro. As lâminas foram deixadas para secar apoiadas em uma base reta em um recipiente com água no fundo, tomando cuidado para que a água no fundo não molhasse as lâminas. A solução corante foi despejada em cima das lâminas com o auxílio de uma pipeta de plástico de modo que toda extensão do *imprint* ficasse coberta. O recipiente foi coberto com uma tampa por 30 min, as lâminas foram lavadas cuidadosamente em água corrente para retirada do excesso de corante e colocadas em uma estante para secagem. Após a coloração, os *imprints* foram observados em Microscópio de Luz Olympus Carl Zeiss Axiostar Plus® na ampliação de 1000x, utilizando-se óleo de imersão.

### **3.10 Culturas**

Os tecidos epidérmicos coletados foram primeiramente semeados em microtubos do tipo eppendorf contendo solução salina estéril (Cloreto de sódio - NaCL a 58,44g/mol) acrescida de antibiótico e antifúngico (10mg de estreptomicina, 25µl anfotericina B e 10.000UI de penicilina por mL, solução comercial Sigma®), estocados a 4° C por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram transferidos para tubos de cultura contendo meio NNN e meio líquido Schneider. Os demais tecidos coletados foram lavados com solução salina estéril (Cloreto de sódio - NaCL a 58,44g/mol) acrescida de antibiótico e antifúngico (10mg de estreptomicina, 25µl anfotericina B e 10.000UI de penicilina por mL, solução comercial Sigma®) no momento da coleta e transferidos imediatamente para tubos de cultura contendo meio NNN e meio líquido Schneider.

A identificação dos tubos foi realizada com etiquetas contendo o número da amostra, a data, o local e o(s) responsável(is) pela coleta. Foram mantidos à temperatura ambiente desde o momento da coleta no biotério até o transporte ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos - LABTRIP, onde foram estocadas em estufa entre 26 a 28 °C.

O exame microscópico das culturas foi realizado a partir de uma pequena gota do sobrenadante dos tubos disposta entre lâmina e lamínula. A montagem dessas lâminas foi realizada em cabine de fluxo, seguindo identificação do tubo, as lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e observadas no microscópio em aumento de 400X. Quando positivas, as culturas eram acompanhadas até o crescimento ideal para criopreservação dos parasitos ou para realização de nova inoculação. Todas as culturas foram acompanhadas a cada 3 ou 4 dias. Amostras negativas eram acompanhadas por até 1 mês e então descartadas.

### **3.11 PCR Multiplex para detecção de kDNA de *Leishmania* spp**

#### **3.11.1 Extração de DNA**

A extração de DNA de cada tecido coletado (item 3.6) foi realizada em uma cabine de biossegurança com luz UV (DNA Workstation), em ambiente isolado, e separado do local onde foram manipulados os produtos amplificados, dentro da qual foram realizados todos os procedimentos de extração de DNA.

Inicialmente os fragmentos dos tecidos coletados em etanol absoluto foram reidratados (lavados duas vezes com Água Mili-Q) e submetidos à extração através do kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, EUA), seguindo instruções do fabricante. Por último, o DNA foi ressuspensionado em 100 µL de solução de hidratação de DNA (DNA Rehydration Solution) e armazenado à -20°C até sua utilização.

Como controle positivo da extração foram utilizados fragmentos de baço e fígado de hamsters (mesma CEUA item 3.1) provenientes do Biotério Carlos Chagas do Instituto Oswaldo Cruz previamente infectados com uma cepa de *Leishmania braziliensis* de perfil disseminado (MHOM/BR/2000/LTCP13396 = IOC-L2483) obtida junto à Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC. Antes de sua utilização como controle, foi realizada a PCR direcionada ao kDNA de *Leishmania spp.* em diferentes amostras destes tecidos para confirmar sua positividade. Como controle negativo da extração foram utilizados fragmentos de baço e fígado de hamsters sadios também obtidos do Biotério Carlos Chagas do Instituto Oswaldo Cruz. Os fragmentos de baço e fígado desses animais utilizados como controles positivos e negativos foram previamente coletados e armazenados no LabTrip e são rotineiramente utilizados como controles nas pesquisas de referência. Um controle positivo e um negativo, com aproximadamente 0,5 cm, foi utilizado em cada reação, desde a extração de DNA até a eletroforese.

### 3.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – Multiplex)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex para o diagnóstico da infecção por *Leishmania spp* teve como alvo a região conservada do kDNA de *Leishmania spp*. A amplificação do kDNA dos parasitos foi realizada utilizando o kit comercial PCR pureTaq Beads (ilustra PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads®, GE Healthcare, EUA), os iniciadores direcionados à região conservada do minicírculo de kDNA de *Leishmania spp* com 120 pares de bases: 150F (5'GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA-3') e 152R (5'(C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC3'); e os iniciadores direcionados ao DNA de hospedeiros mamíferos (GAPDH) com 212 pares de bases: 212F (5'ACCACAGTCCATGCCATCAC3') e 212R (5'GTCAGGTCCACCACTGACAC3') (Degraive et al. 1994, De Cássia-Pires et al. 2017).

O kit comercial utilizado nas reações de PCR consiste em grânulos liofilizados contendo os reagentes necessários para a MIX da PCR, necessitando apenas do acréscimo de água Milli-Q e dos respectivos iniciadores. Cada grânulo do kit contém 0,2 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTPs); 50mM de Cloreto de Potássio; 1,5mM de Cloreto de Magnésio; tampão de enzima 1X; 2,5 unidades de pureTaq DNA Polimerase®.

Cada reação foi preparada com um grânulo ressuspendido em 0,5 µL de cada primer para GAPDH, 1,5 µL de cada primer para kDNA e 19 µL água Milli-Q. Em cada reação foram adicionados 2µL de DNA da amostra a ser testada (foram testados todos os tecidos citados no item 3.6, individualmente), resultando em um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas em Termociclador Eppendorf Mastercycler® (Eppendorf, Stevenage, Inglaterra), através das seguintes condições: desnaturação inicial à 95° C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação a 95° por 30 segundos, pareamento dos iniciadores à 61° por 30 segundos, seguido de extensão inicial à 72° por 30 segundos e uma extensão final de 72° por 1 minuto.

Como controle da reação foi utilizado o DNA obtido dos controles positivo e negativo da extração, além do controle da MIX da PCR que não continham amostras biológicas e foram ressuspendidas em 25 µL da mistura contendo os primers e água Milli-Q.

### **3.11.3 Eletroforese**

Os produtos da reação foram diluídos em tampão de amostra (125 mM TrisHCl, pH 6,8; 4% SDS; 20% glicerol e 0,002% azul de bromofenol) e submetidos a eletroforese à 110V constantes, em mini géis de poliacrilamida a 8% em tampão TBE 1X (Tris 0,04 M, Ácido Bórico 0,04 M e EDTA 0,02 M) por aproximadamente 50 minutos. Foram aplicados em cada poço de gel 7 µL de cada produto da PCR.

A cada corrida eletroforética foram adicionadas, além das amostras a serem testadas, os controles positivos e negativos utilizados na extração, o controle da MIX da PCR e um padrão de peso molecular de 50 pb (Promega, Madison, EUA). Após a eletroforese, os géis foram revelados por nitrato de prata utilizando o kit Silver Stain Plus® (Bio Rad, Hercules, EUA). As imagens dos géis foram documentadas com o densitômetro GS-800® (Bio-Rad, Hercules, EUA), sendo salvas no formato Tiff, com resolução da imagem de 300 dpi (pontos por polegada - *dot per inch*) para uma melhor qualidade das mesmas.

### 3.12 Diagnóstico Sorológico

O soro coletado das amostras de sangue dos animais de todos os grupos, foi analisado para a busca por anticorpos da classe IgG anti-*Leishmania* sp. O diagnóstico sorológico foi realizado através da pesquisa do nível de anticorpos séricos através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Camargo 1964).

A reação entre o antígeno fixado e o anticorpo presente no soro das amostras positivas foi visualizada através da adição de anti-imunoglobulina, a anti-IgG de hamster comercial conjugada com isotiocianato de fluoresceína da Sigma® (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA).

Para a reação sorológica, 10 µL das amostras de soro foram aplicadas em placa de 12 poços contendo 90 µL de PBS 0,15 M nos poços da primeira linha e 50 µL nos demais. Para a realização de diluições seriadas, 50 µL da solução foram transferidos para os demais poços da placa em sentido horizontal até atingir a diluição de 1:320.

Em seguida, 10 µL de cada diluição foram aplicados em cada poço nas lâminas já impregnadas com os antígenos (mistura igualitária de parasitos inteiros das cepas 566 e 579 de *L. braziliensis* ou *L. infantum*, respectivamente). As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida e incubadas na estufa a 37 °C por 40 minutos e, depois lavadas com PBS 0,15M por três vezes em movimento rotacional. Após, foi realizada a diluição do Azul de Evans 1X (Sigma®) e do conjugado comercial.

Em seguida, foram aplicados 10 µL desta solução em cada poço da lâmina e as mesmas foram incubadas na estufa a 37 °C por 40 minutos e lavadas com PBS 0,075 M. Finalmente, após a adição de glicerina tamponada e lamínulas, as lâminas foram submetidas à leitura em microscópio de luz (marca e modelo) com sistema de imunofluorescência equipado com lâmpada de mercúrio 12V50W (Osram, Munique, Alemanha) e visualizadas no aumento de 400X.

Todas as reações tiveram controle positivo e negativo e foram realizadas em duplicata. Como controle positivo foi usado soro de animal experimentalmente infectado com sorologia e cultura comprovadamente positivas. Para o controle negativo foi usado soro de animal nascido e criado em cativeiro comprovadamente, nos testes sorológicos e parasitológicos, livre de infecção por *Leishmania* spp.

O resultado foi considerado sorologicamente positivo frente a infecção por *Leishmania* sp. quando as amostras tiveram titulação igual ou maior que o ponto de

cutis adotado, de 1:10 (Herrera et al. 2005). Todas as reações foram previamente padronizadas e são utilizadas rotineiramente no LABTRIP.

### **3.13 Diagnóstico histopatológico**

Para realização da análise histopatológica os fragmentos de fígado, baço e pele lesionada e/ou do abdômen coletados de todos os grupos, foram fixados em PFA (paraformaldeído) a 4% em PBS 0,01M, pH 7,45, a 4 °C por um período de 72 horas. Após esse período, os fragmentos foram clivados e, em processador automático de tecidos (Leica® – TP 1020) foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 90, 100, 100, 100 °GL), diafanizados em Xilol e embebidos em parafina (56 a 60 °C). A seguir, foram incluídos em parafina em estação de inclusão (Microm® – AP 280).

Cortes de 5 µm foram obtidos em micrótomo rotativo (Microm® – HM 360), desparafinizados com três trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100, 95, 80, 70 °GL) até a água destilada e processados para coloração pela técnica de Hematoxilina-Eosina. Análise em microscopia de luz foi realizada em microscópio Zeiss e fotografada com Axioplan 2®.

Para a técnica de Hematoxilina-Eosina foi realizado o preparo da solução: 2,5g de hematoxilina (Sigma) foi dissolvida em 25mL de álcool absoluto, paralelamente, 50g de alúmen de amônio foram dissolvidos em 500mL de água destilada pré-aquecida. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até breve fervura, retirada do fogo e acrescida de 1,25g de óxido vermelho de mercúrio. A solução foi imediatamente resfriada, através da imersão do frasco em água fria, acrescido 20mL de ácido acético glacial e reservada para amadurecimento por 2 meses.

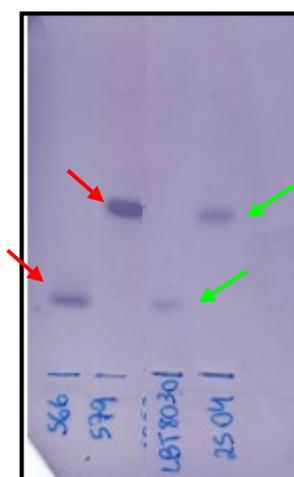
A coloração das lâminas foi feita após desparafinização e hidratação por imersão das lâminas por 7min na hematoxilina de Harris pré-filtrada. A seguir, os cortes foram lavados e mantidos em água corrente até atingirem uma coloração azulada, diferenciados em álcool-ácido (5 gotas de ácido clorídrico em 100mL de álcool etílico a 95GL), novamente lavados em água corrente e corados por 2min em solução alcoólica de eosina (5g de eosina Y “yellowish” - Merck dissolvidas em 200mL de água destilada acrescida de 800mL de álcool etílico absoluto). Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol (70, 80, 95, 100 °GL),

diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com “Entellan” (Merck). Foram montadas duas lâminas por tecido, no momento do corte no micrótomo os primeiros cortes são desprezados até que fique bem plano, e a lâmina foi observada em sua totalidade no microscópio.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Caracterização taxonômica

A caracterização taxonômica confirmou o status taxonômico dos isolados de *Leishmania* que utilizamos no trabalho como sendo: *L. braziliensis* e *L. infantum*. Esses resultados foram confirmados com os dois sistemas enzimáticos utilizados: G6PDH e 6PGDH (Figura 7).



**Figura 7** – Ensaio de Multilocus Enzyme Electrophoresis em gel Tris Maleico pH 7.4 para sistema enzimático 6PGDH mostrando o perfil para diferentes isolados utilizados neste estudo, comparados com cepas de referência para diferentes espécies de *Leishmania*. As setas verdes indicam: LBT8030 - *L. braziliensis* e 2504 - *L. infantum*. Os controles (setas vermelhas) são 566 - *L. braziliensis* e 579 - *L. infantum*.

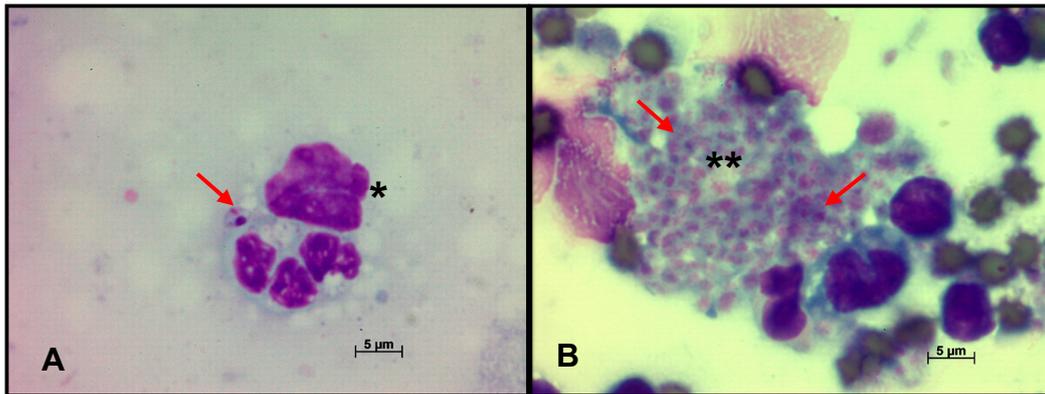
### 4.2 *Leishmania braziliensis*

#### 4.2.1 Grupo A

Os animais inoculados por via intradérmica na pata dianteira esquerda, apresentaram uma lesão característica de infecção por *Leishmania* spp., dois meses após a inoculação. Após este período, deu-se prosseguimento às etapas de alimentação de flebotomos nessa lesão, e após dois dias, eutanásia dos hamsters e coleta de sangue e fragmentos de pele da pata lesionada, pele íntegra do abdômen, baço e fígado.

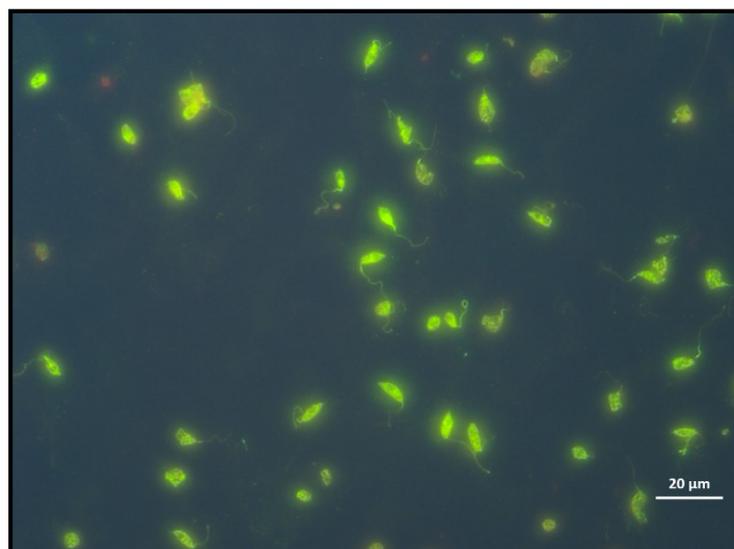
Após 7 dias da coleta, foram observadas formas promastigotas nas culturas realizadas dos fragmentos de pele da lesão da pata, baço e fígado, dos dois animais

desse grupo. Os parasitos isolados foram criopreservados após 2 passagens *in vitro*. Os *imprints* teciduais da lesão, do baço e do fígado, de ambos os animais também foram positivos. A figura 8 mostra agrupamentos de amastigotas de *L. braziliensis* em lesão e baço desses animais. Os resultados de histologia destes tecidos foram negativos, porém foi possível observar uma grande quantidade de infiltrado inflamatório nas amostras de fígado de ambos os animais.



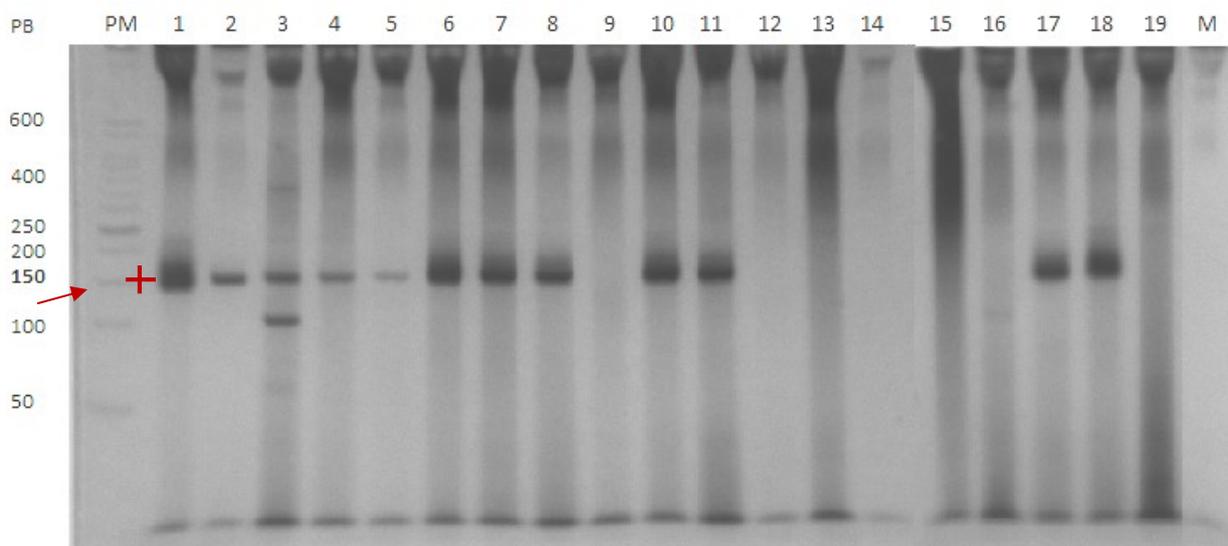
**Figura 8** – *Imprint* de lesão da pata (A) e do baço (B) dos animais do grupo A com 2 meses após serem inoculados por via intradérmica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis* onde observa-se formas amastigotas (setas), corada com Giemsa, no interior de macrófagos (\*) (A) ou dispersos no baço (\*\*) (B).

Ambos os animais foram positivos na sorologia, apresentando uma titulação de 1:320 na RIFI (Figura 9).



**Figura 9** – Formas promastigotas de *Leishmania* sp. marcadas com isotiocianato de fluoresceína mostrando a positividade na reação de imunofluorescência indireta de um dos hamsters do Grupo A. Diluição 1:40 com aumento de 400x.

A positividade desse grupo também foi confirmada através da PCR multiplex nos tecidos da lesão da pata, pele do abdômen, fígado e baço, conforme mostram os números de 1 a 8 na figura 10.

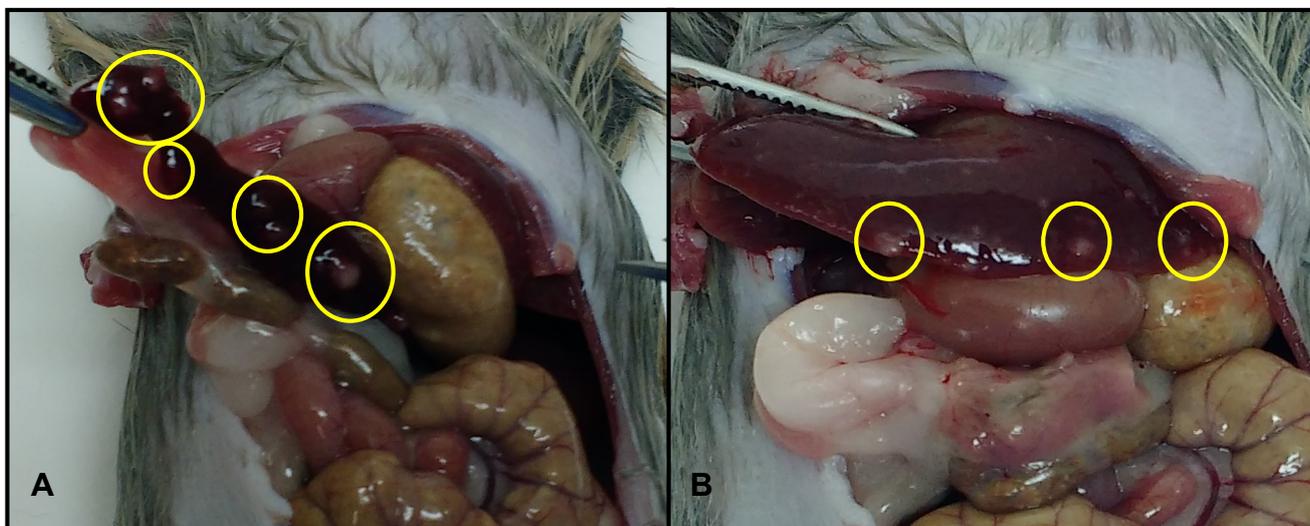


**Figura 10** - Eletroforese em gel de poliacrilamida com PCR multiplex mostrando o DNA de *Leishmania* spp., utilizando-se um marcador de 50 pares de bases. Os poços de 1 a 8 representam as amostras positivas nos 2 animais do grupo A inoculados com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*, sendo 1 e 6 lesão dérmica, 2 e 5 pele íntegra do abdômen, 3 e 8 fígado, 4 e 7 baço. Os poços de 9 a 13 representam as amostras do Grupo B, inoculado por via intragástrica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*, sendo 9 pele íntegra do abdômen do animal 1; 10 e 11 representam as amostras positivas de baço e fígado respectivamente também do animal 1; 12 pele íntegra do abdômen e 13 baço do animal 2 do mesmo grupo. Os poços de 14 a 16 representam as amostras de um dos animais do Grupo B infectados por via intragástrica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. infantum*, sendo pele íntegra do abdômen, baço e fígado respectivamente. Os poços 17 e 18 são controles positivos, 19 controle negativo; M = controle da Mix de PCR. A seta e o sinal de positivo indicam o tamanho esperado de pares de bases (entre 120-145pb).

#### 4.2.2 Grupo B

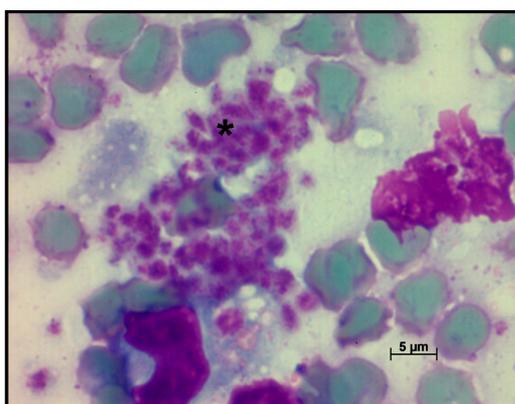
Os dois hamsters que compuseram o grupo B foram infectados por via intragástrica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis* e acompanhados semanalmente até 4 meses, quando então foram eutanasiados e necropsiados sem que tivesse sido observada nenhuma alteração clínica nestes animais. Dois dias antes da necropsia foi realizado o xenodiagnóstico com 15 flebótomos, dos quais 5 fêmeas sobreviveram ao período de incubação e foram congeladas para o diagnóstico por PCR.

No momento da necropsia de um dos animais desse grupo foi possível observar lesões nodulares, pálidas e de aspecto crostoso sugestivas da infecção por *Leishmania* sp. no fígado e baço do animal, (Figura 11).



**Figura 11** - Nodulações sugestivas de infecção por *Leishmania* sp., no baço (A) e fígado (B), observadas em um dos animais do Grupo B, inoculados por via intragástrica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*.

Foi possível isolar novamente os parasitos nas culturas feitas a partir dos fragmentos de baço e fígado desse animal, os quais foram criopreservados no LabTrip. O teste sorológico desses hamsters mostrou uma titulação de 1:160 e foi possível observar os grupamentos de amastigotas nas lâminas de imprint de baço, como mostrado na figura 12. O exame histológico do baço e fígado de ambos os animais desse grupo foram negativos, porém foi possível observar a presença de infiltrados inflamatórios nas lâminas de fígado.



**Figura 12** - Amastigotas (\*) presentes em *imprint* de baço, de um dos animais do grupo B inoculado por via intragástrica com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*.

Além disso, a infecção por *L. braziliensis* foi confirmada através da PCR multiplex no baço e fígado do animal (Figura 10, números 10 e 11).

#### 4.2.3 Grupo C

Seguindo os mesmos procedimentos de acompanhamento semanal dos grupos anteriores, nos dois animais do grupo C, infectados por via oral com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis* (Grupo C), um mês após a inoculação, foram observadas lesões na pele que se estendiam por todo o abdome do animal na altura do estômago, além de seus membros inferiores, superiores e focinho, o que inicialmente acreditamos ser consequência de infecção por *L. braziliensis* (Figura 13).



**Figura 13** - Lesões na pele dos animais do grupo C, infectados por via oral, com  $10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*.

Após a observação dessas lesões, os animais foram eutanasiados para coleta de amostras de sangue, pele com lesão, pele íntegra, baço e fígado. No momento da necropsia desse grupo não encontramos alterações macroscópicas em nenhum órgão além da pele, e a coleta de material (sangue, pele com lesão do abdômen, pele íntegra, baço e fígado) prosseguiu conforme descrito anteriormente. Não foi possível re-isolar parasitos em nenhuma das culturas realizadas com os tecidos coletados. Os resultados dos testes sorológico e molecular, bem como a

observação das lâminas de *imprints* e histologia dessas amostras foram igualmente negativos.

Diante da negatividade observada nesse grupo, e pelo pouco tempo que os animais permaneceram entre o momento de sua inoculação até a necropsia, outros dois hamsters foram inoculados e mantidos no biotério por 4 meses. Transcorridos os primeiros 2 meses, também foi constatado o aparecimento de lesões dérmicas por todo o corpo do animal, principalmente no abdômen na altura do estômago, como as observadas no primeiro grupo de animais. Um dos animais com essas lesões foi sedado e foi realizada uma biópsia da lesão maior no abdômen. O fragmento de pele obtido na biópsia foi dividido em dois, sendo uma parte cultivada em meio de cultura NNN/Schneider e a outra foi utilizada para a realização dos procedimentos de histologia.

A avaliação da cultura, por até 30 dias após o isolamento mostrou resultado negativo, assim como a análise histopatológica das lâminas.

Após 4 meses do inóculo, os animais foram sedados e foram realizados os procedimentos de eutanásia e coleta do material (sangue, pele com lesão, pele íntegra, baço e fígado). Igualmente não obtivemos resultados positivos em nenhum dos testes realizados (culturas, *imprints*, histologia, PCR e sorologia).

#### **4.2.4 Grupos D, E, F e G**

Depois de transcorridos os 4 meses de incubação sem que fosse observado nenhum tipo de alteração clínica visível nos Grupos de D a G (hamsters que receberam oralmente os flebótomos ou fragmento de lesão dérmica ou, fragmento de baço ou macrófagos respectivamente), foi realizada a eutanásia e não foram observados resultados positivos na cultura, *imprint*, histologia, sorologia ou PCR.

### **4.3 *Leishmania infantum***

#### **4.3.1 Grupo A**

Foram realizadas duas tentativas de inoculação nos animais desse grupo por via intraperitoneal. Numa primeira tentativa, os animais foram inoculados e acompanhados semanalmente por 6 meses sem apresentar nenhuma alteração

clínica como o esperado. Realizada a necropsia, não haviam sinais de aumento no tamanho do baço, lesões visíveis ou qualquer outro indicativo visível de que os animais tivessem se infectado com *L. infantum*. Essa primeira tentativa de infecção não foi confirmada pela avaliação das culturas, do *imprints*, da análise histopatológica ou da sorologia, entretanto a PCR multiplex mostrou resultado positivo no baço de um dos animais.

Na segunda tentativa de inoculação obtivemos resultados positivos em sorologia (titulação de 1/320) e cultura de baço de um dos animais desse grupo, assim como na PCR do mesmo tecido e do mesmo animal. Não encontramos amastigotas em *imprint* ou histologia, porém foi possível observar a presença de infiltrado inflamatório nas amostras histológicas de fígado. O outro hamster infectado foi negativo em todos os testes realizados.

#### **4.3.2 Grupo B**

O Grupo B, composto por animais inoculados oralmente com *L. infantum*, ficou incubado por 4 meses e foram acompanhados semanalmente em busca de qualquer tipo de alteração clínica, o que não ocorreu. Após esse tempo foi realizado o xenodiagnóstico com 20 flebótomos dos quais 8 fêmeas sobreviveram ao período de incubação e foram congeladas para o diagnóstico com PCR. Após a eutanásia e processamento do material coletado (sangue, pele íntegra, baço e fígado), os resultados foram negativos em todos os testes realizados: culturas, *imprints*, histologia, PCR e sorologia. O diagnóstico com PCR dos flebótomos também foi negativo.

#### **4.3.3 Grupo C**

Os hamsters inoculados oralmente com cultura axênica de *L. infantum*, foram acompanhados semanalmente durante 4 meses e não apresentaram qualquer alteração clínica. Decorrido este tempo, os animais foram necropsiados, tiveram material coletado (sangue, pele íntegra, baço e fígado), mas também não foram obtidos resultados positivos em nenhum dos testes empregados: cultura, *imprint*, histologia, sorologia e PCR.

#### 4.3.4 Grupo D

A infecção dos macrófagos com *L. infantum* utilizados no Grupo D, resultou em uma taxa de infecção de 40%, em média 2 parasitos por célula.

Esse Grupo D, composto por animais inoculados oralmente com cultura de macrófagos infectados com *L. infantum*, não apresentou resultados positivos em nenhum dos testes empregados: cultura, *imprint*, histologia, sorologia e PCR.

#### 4.3.5 Grupos E a H

Os hamsters inoculados com flebótomos, fragmento de baço, por via intragástrica (amostra recém isolada) e com cultura axênica recém isolada de *L. infantum* (grupos E, F, G e H, respectivamente), também foram acompanhados semanalmente durante 4 meses durante os quais não apresentaram qualquer alteração clínica. Após esse tempo, os animais foram necropsiados, tiveram material coletado (sangue, pele íntegra, baço e fígado), mas também não foram encontrados resultados positivos em nenhum dos testes utilizados: cultura, *imprint*, histologia, sorologia e PCR.

As tabelas 3 e 4 mostram um resumo de todos os resultados obtidos com cada espécie de *Leishmania* em cada grupo.

**Tabela 3** – Resumo de resultado dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania braziliensis*.

| <i>Leishmania braziliensis</i> |                                       |                      |                             |                      |                           |  |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|--|
| Grupo                          | Via de Infecção                       | Resultado da cultura | Resultado do <i>imprint</i> | Resultado sorológico | Resultado histopatológico | Resultado molecular                                  |
| Grupo A                        | Intradérmica na pata                  | Positivo             | Positivo Lesão/Baço         | Positivo (1/320)     | Negativo                  | Positivo pele com lesão, pele íntegra, baço e fígado |
| Grupo B                        | Via intragástrica                     | Positivo             | Positivo Baço               | Positivo (1/160)     | Negativo                  | Positivo baço e fígado                               |
| Grupo C                        | Via Oral – Cultura                    | Negativo             | Negativo                    | Negativo             | Negativo                  | Negativo   |
| Grupo D                        | Via Oral – Cultura de macrófagos      | Negativo             | Negativo                    | Negativo             | Negativo                  | Negativo   |
| Grupo E                        | Via Oral – Flebótomos                 | Negativo             | Negativo                    | Negativo             | Negativo                  | Negativo   |
| Grupo F                        | Via Oral – Fragmento de lesão dérmica | Negativo             | Negativo                    | Negativo             | Negativo                  | Negativo   |
| Grupo G                        | Via Oral – Fragmento de baço          | Negativo             | Negativo                    | Negativo             | Negativo                  | Negativo   |

**Tabela 4** – Resumo de resultado dos grupos experimentais de hamsters inoculados experimentalmente com *Leishmania infantum*.

| <i>Leishmania infantum</i> |  |                      |                      |                      |                           |                     |
|----------------------------|--|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|---------------------|
| Grupo                      | Via de Infecção                            | Resultado da cultura | Resultado do imprint | Resultado sorológico | Resultado histopatológico | Resultado molecular |
| Grupo A                    | Intraperitoneal                            | Positivo             | Negativo             | Positivo (1/320)     | Negativo                  | Positivo baço       |
| Grupo B                    | Via intragástrica                          | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo C                    | Via Oral – Cultura                         | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo D                    | Via Oral – Cultura de macrófagos           | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo E                    | Via Oral – Flebótomos                      | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo F                    | Via Oral – Fragmento de baço               | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo G                    | Via intragástrica (amostra recém isolada)  | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |
| Grupo H                    | Via Oral – cultura (amostra recém isolada) | Negativo             | Negativo             | Negativo             | Negativo                  | Negativo            |

## 5 DISCUSSÃO

Diferentes espécies de mamíferos já foram experimentalmente testadas frente a infecção por *Leishmania* spp., como ratos e hamsters, utilizando-se os mais variados protocolos experimentais. Os ratos (*Rattus* sp.) se apresentaram como uma espécie que pode ser geneticamente resistente ou suscetível à infecção, dependendo da espécie do parasito e de sua subpopulação (cepa ou isolado). Porém, mesmo aqueles que se mostram suscetíveis são capazes de controlar a infecção sem a manifestação clínica da doença. Desta forma, não são considerados os melhores modelos de estudo (Barbosa Junior et al. 1987, Smelt et al. 1997, Moreira et al. 2012).

Muitos outros modelos experimentais para o estudo das leishmanioses foram testados ao longo dos anos, como o camundongo, que demonstrou ser sensível ao aparecimento de nódulo no local do inóculo e de lesões primárias frente a infecção por *L. braziliensis*. Por outro lado, não desenvolveram infecção visceral como os hamsters, que apresentaram os sintomas esperados na leishmaniose experimental como esplenomegalia, hepatomegalia e, muitas vezes, evoluindo até a morte (Coelho & Coutinho-Abath 1965, Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014).

Outro modelo testado em infecções experimentais de *Leishmania* spp. é o modelo canino, já que os cães tem um importante papel na epidemiologia da leishmaniose visceral, podendo desenvolver uma infecção sintomática (que geralmente evolui até a morte), assintomática, ou mesmo desenvolver apenas sintomas leves. Entretanto, existem poucos estudos sobre a infecção experimental por espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea em cães, sendo esta pouco estudada e em alguns casos mal descrita. Tentativas de se reproduzir experimentalmente essa forma da doença em cães relataram a necessidade de um tempo maior de incubação para o aparecimento das lesões cutâneas, quando comparado com os demais modelos, dificultando assim sua utilização em pesquisas de curto prazo (Cruz-Chan et al. 2014, Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014).

A possibilidade de desenvolvimento de um modelo primata não humano para o estudo de leishmaniose é sugerido para exploração de diferentes aspectos da doença que não são possíveis em humanos, já que assim é possível reproduzir grande parte dos sintomas da doença como ocorre no ser humano (Porrozzzi et al. 2006). Porém, a utilização desse modelo é limitado dentro da pesquisa devido ao alto custo de obtenção e manutenção dos primatas e das questões éticas

envolvidas. Dessa forma sua utilização fica restrita a situações extremas onde a questão envolvida não pode ser respondida utilizando outros modelos, como por exemplo, em estudos que atestam a segurança de vacinas e drogas (Loría-Cervera & Andrade-Narváez 2014).

Dentre todos os modelos utilizados nas pesquisas experimentais, o que até hoje é considerado o melhor e mais suscetível modelo a uma variedade de agentes patogênicos intracelulares, é o hamster (*Mesocricetus auratus*) (Tavares et al. 2009).

O modelo hamster vem sendo utilizado nas pesquisas em leishmanioses desde o início do século XX e tem sido responsável por grandes achados nessa área, começando pela descoberta da suscetibilidade do hamster chinês (*Cricetus auratus*) à *L. donovani* por Young e colaboradores na China (Young et al. 1926). Devido à dificuldade de obtenção do hamster chinês, o Dr. Saul Adler em Jerusalém identificou a necessidade de um modelo experimental mais acessível e iniciou uma colônia de hamster Sírio (*Cricetus phaeus*). Depois de estabelecer uma colônia em laboratório, o Dr. Adler enviou alguns exemplares da linhagem, que era de fácil adaptação, para diversos países a fim de evitar a perda da mesma. Após um ano da criação da colônia, os doutores Adler e Theodor introduziram o hamster *M. auratus*, e todos os exemplares existentes são descendentes da linhagem criada em Jerusalém (Adler 1948, 1989). Estes animais desenvolvem a maioria das alterações imunopatológicas características da doença em humanos, caracterizando-se como o modelo com melhor custo-benefício (Niето et al. 2011, Moreira et al. 2012). Com o passar do tempo, o *M. auratus* foi sendo reconhecido como um modelo excelente para o estudo das leishmanioses, sendo o modelo escolhido em diversos estudos, em especial naqueles sobre os aspectos da relação parasito-hospedeiro utilizando cepas do complexo *donovani*. Sua contribuição se deu nos mais diversos campos de conhecimento, tais como clínica, biologia, fisiologia, imunologia, patologia, diagnóstico e terapêutica (Moreira 2012).

Atualmente sabe-se, por exemplo, que há uma relação proporcional entre a quantidade de parasitos inoculados e o tempo de apresentação dos sintomas clínicos. Assim, altas doses de inóculo com formas promastigotas metacíclicas induzem a infecção sintomática, permitindo a formação de grupos experimentais com gradiente de manifestações clínicas (Requena et al. 2000, Dea-Ayuela et al. 2007). Posteriormente, estudos apontaram uma maior suscetibilidade de hamsters machos à infecção por *L. (V.) panamensis*, com lesões maiores, mais graves e maior carga parasitária nos linfonodos, quando comparados às fêmeas (Travi et al. 2002).

Desde então, a grande maioria dos estudos, incluindo o nosso, tem utilizado hamsters machos como modelo experimental.

Nesse estudo utilizamos o modelo hamster (*M. auratus*), para testar a capacidade de duas espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis* e *L. infantum*), de infectar um hospedeiro suscetível através da via de transmissão oral. A escolha das espécies se deu pela grande dispersão das mesmas no país e pelo fato de serem os principais agentes etiológicos envolvidos nas infecções humanas no Brasil (Tonelli et al. 2017, Brito et al. 2018, da Costa Lima et al. 2018). Inicialmente atestamos a viabilidade de nossa cepa (THOR) com promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* através da inoculação de parasitos derivados de cultura axênica dessa cepa por via intradérmica, o que resultou nos sintomas clínicos esperados, como a lesão cutânea no local do inóculo seguida da positividade nos testes de isolamento em cultura, *imprint*, PCR e sorologia. Contudo, nos exames histológicos não foi possível o encontro de formas amastigotas do parasito. No entanto, observamos a presença de infiltrado inflamatório intenso nas amostras de fígado, indicativo de um processo inflamatório comumente descrito nas infecções por *Leishmania* spp. Esses resultados confirmaram a infectividade da cepa e sua capacidade de infectar um hospedeiro susceptível (Gamboa et al. 2008, Teixeira et al. 2014).

Os principais órgãos de escolha tanto em estudos experimentais com *Leishmania* sp., quanto no próprio diagnóstico da infecção em humanos, são o baço, o fígado, a pele e medula óssea (quando possível), dependendo da suspeita clínica e da espécie do parasito envolvido. Estes também foram nossos tecidos de escolha para o diagnóstico (com exceção da medula óssea), que foi realizado tanto em ensaios de biologia molecular, quanto na tentativa de isolamento em culturas, uma vez que ambas as técnicas são bastante utilizadas nos estudos experimentais para diagnóstico das infecções (Gomes-Silva et al. 2013).

A nossa hipótese de trabalho, sobre formas alternativas para infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos, pôde ser respondida logo no segundo grupo experimental, através da inoculação de material de cultura axênica de *L. braziliensis* por via intragástrica. Os resultados que obtivemos deste grupo experimental demonstram que um isolado de cultura, contendo formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* é capaz de infectar um hospedeiro mamífero quando administrada através da via intragástrica. Esta é a primeira vez que a via de transmissão intragástrica para uma espécie de *Leishmania* é comprovada. Antes disso, alguns trabalhos já haviam sugerido a potencialidade desta via de infecção, em especial em

estudos envolvendo cães. Nestes trabalhos, a hipótese dos autores foi que a transmissão havia ocorrido por conta de brigas, dada a presença de lesões de pele e contato com mucosa oral de outro cão, ou através da ingestão de carrapatos que haviam acabado de se alimentar de sangue contaminado com o parasito. Em todos estes casos, a infecção canina ocorreu sem a presença de vetores comprovados do parasito na área e após todas as demais vias de transmissão já comprovadas (transplacentária, transfusão e sexual) terem sido descartadas (Zanatta Coutinho et al. 2005, Karkamo et al. 2014, Daval et al. 2016, Naucke et al. 2016).

Diferentemente do observado na infecção por via intragástrica, os animais infectados experimentalmente por via oral, com a mesma cultura axênica, aparentemente não se infectaram, como observado pelos resultados negativos em todas as análises realizadas. No entanto, nos dois animais do grupo, ocorreram lesões de pele na altura do estômago cerca de um mês após a infecção experimental, sugerindo uma relação entre a infecção experimental e as lesões, visto que os animais estavam saudáveis antes da infecção e nenhuma lesão foi observada nos hamsters de mesma idade do grupo controle e dos demais grupos experimentais. Diante da hipótese de serem estas lesões decorrentes de infecção por *Leishmania* spp., os animais foram eutanasiados para o diagnóstico da infecção, mas, surpreendentemente, foram negativos em todos os testes realizados. Diante disso, e pelo pouco tempo de acompanhamento deste grupo, outros dois hamsters foram experimentalmente inoculados da mesma forma, numa repetição deste grupo experimental. Mais uma vez, cerca de um mês após o inóculo, os dois animais apresentaram as mesmas lesões de pele descritas nos outros dois hamsters. Desta vez, realizamos uma biópsia apenas no local da lesão (por histologia e PCR), mas os resultados foram negativos e nenhuma alteração tissular foi observada. Mantivemos os dois hamsters nas mesmas condições por mais 3 meses, sendo que as lesões não progrediram, mas tampouco se resolveram ou cicatrizaram, mantendo a mesma aparência até o final do acompanhamento do experimento.

Estas lesões não são exatamente patognomônicas da infecção por *L. braziliensis*, mas descamação de pele e processo inflamatório como observado nos 4 hamsters são alguns dos sintomas descritos em lesões cutâneas humanas e caninas. Estas lesões iniciavam-se sempre no ventre, na altura do estômago, reforçando nossa hipótese de relação causal entre a infecção oral e as lesões observadas, o que acabou não se confirmando na necropsia e nos testes diagnósticos. Na forma mais comum de leishmaniose tegumentar, através da

inoculação dos parasitos e da saliva do flebótomo após a picada do vetor, os parasitos permanecem na pele e formam lesões nodulares ou papulares que podem progredir para úlceras bem delimitadas com bordas levantadas, geralmente no local da picada do flebótomo ou do inóculo experimental. Estas lesões cicatrizam lentamente, são indolores e podem se auto-curar sem tratamento, entretanto pode levar vários meses e deixar cicatrizes desfigurantes (Pearson & De Queiroz Sousa 1996). Na infecção por via oral, não esperávamos encontrar lesões como essas e nem nenhum tipo de alteração cutânea. Apesar da negatividade nos testes diagnósticos, não podemos deixar de ressaltar o fato do mesmo tipo de lesão ter ocorrido nos 4 animais, no ventre na altura do estômago, e apenas nos animais infectados experimentalmente por via oral com *L. braziliensis*. Porque estas lesões apareceram apenas nestes 4 animais, e em mais nenhum dos outros 32 hamsters acompanhados, não infectados ou infectados por outra espécie de *Leishmania* e/ou outra vias de infecção é uma pergunta que não sabemos responder.

Dois fatores podem ter influenciado no insucesso da infecção experimental por via oral utilizando material de cultura axênica, ou ao menos na baixa carga parasitária final que resultou na negatividade dos testes diagnósticos realizados (pelo menos quando comparados aos animais que se infectaram por via intragástrica). Primeiro, a saliva do hospedeiro pode apresentar um papel fundamental no combate a determinados antígenos como já foi demonstrado para outros parasitos (Slomiany et al. 1996, Asoh et al. 2014). Há a possibilidade de que os mecanismos de defesa presentes na saliva do hamster tenham conseguido eliminar a infecção. Apesar do pouco contato entre saliva e cultura de parasitos na boca dos animais, visto que o mesmo rapidamente engoliu o inóculo, a ação protetora da saliva já foi demonstrada em *Leptospira* sp. após a infecção experimental realizada da mesma forma que no presente estudo. Além disso, a presença (e, portanto, ação) da saliva não se restringe apenas a cavidade oral e está presente também em outras partes do trato gástrico até o estômago. Ainda que a saliva do hamster tenha tido uma ação protetora contra o estabelecimento da infecção ou pelo menos na redução da carga parasitária a níveis não detectáveis nos exames diagnósticos realizados, isso não exclui totalmente a possibilidade de que essa forma de transmissão seja viável em outros mamíferos, uma vez que esses mecanismos de defesa presentes na saliva podem variar de acordo com a espécie de mamífero envolvida, como já observado na comparação entre as propriedades da saliva de hamsters e humanos, por exemplo (Asoh et al. 2014). Um segundo fator

possivelmente envolvido no processo da infecção que nunca pode ser descartado em modelos experimentais *outbred* e não *germ free* é a presença de outro parasito já instalado no organismo dos hamsters utilizados em nosso estudo, antes da inoculação, sendo esta prévia infecção a responsável pelas lesões descritas no abdomen dos animais. A competição por nutrientes ou mesmo um desequilíbrio imunológico causado por este possível parasito pré-existente poderia inibir a multiplicação de *Leishmania* sp. e impedir o estabelecimento da infecção por *L. braziliensis*. A infecção por *L. braziliensis* pode também ter influenciado na infecção prévia dos animais, resultando na sintomatologia observada, o que não ocorreu em outros grupos experimentais e nos grupos controle. São vários os trabalhos comprovando que co-infecções resultam em respostas diferenciadas no organismo do hospedeiro envolvido, em comparação àquelas infecções pelos mesmos organismos ocorrendo isoladamente (Van den Bogaart et al. 2014).

Alguns animais foram alimentados com flebótomos que haviam se alimentado diretamente da lesão cutânea de onde isolamos *L. braziliensis*. Estes animais aparentemente não se infectaram, ou seja, não apresentaram nenhuma alteração clínica visível e apresentaram resultados negativos em todas as análises realizadas. A escolha da espécie *Lutzomyia longipalpis*, não associada a transmissão de *L. braziliensis* na natureza, se deve ao fato dessa ser uma espécie disseminada de vetor, com alta capacidade de adaptação a diversos ambientes e hospedeiros, além da elevada suscetibilidade a diferentes espécies de *Leishmania* (Da Silva et al. 1990, Salomón et al. 2015). De fato, *L. longipalpis* é considerada um vetor permissivo para *Leishmania* spp. O número de flebótomos utilizado neste trabalho, aparentemente baixo em comparação com outros estudos de infecção em flebótomos (Fonteles et al. 2016, Falcão de Oliveira et al. 2017), não foi tão pequeno considerando que apenas a pata lesionada estava exposta aos vetores, diminuindo muito a área de pele do animal em que os flebótomos tinham acesso. Ainda assim, apenas 6 fêmeas se alimentaram e sobreviveram ao período de incubação. Diante deste baixo número, optamos por oferecer todos eles para alimentar os hamsters (3 vetores para cada hospedeiro), não sendo possível a realização de exame direto ou PCR de uma amostragem dos flebótomos que se alimentaram para confirmação do estabelecimento da infecção.

Diante desta impossibilidade de avaliar se os parasitos haviam infectado os flebótomos, antes de utilizar os insetos para a alimentação dos hamsters, não podemos deixar de considerar a possibilidade de que esses flebótomos não

estivessem infectados ou ao menos, não com uma quantidade de parasitos suficiente, para transmitir os mesmos de forma eficaz através de sua ingestão pelos hamsters. Assim, apesar de não termos obtido sucesso no presente estudo utilizando esta via, também não podemos descartá-la como uma possível via de infecção na natureza.

Outros grupos experimentais de *L. braziliensis* foram inoculados com fragmento de lesão dérmica e fragmento de baço contendo lesões macroscópicas da infecção, com posterior confirmação nos testes diagnósticos, inclusive isolamento dos parasitos. Estas vias de infecção foram concebidas na tentativa de reproduzir o que pode acontecer na natureza, em um momento de predação de um animal infectado por outro suscetível, onde um predador mamífero de grande/médio porte se alimenta de outro mamífero menor infectado com *Leishmania* sp. As análises realizadas para esse grupo foram negativas, sem que observássemos nenhum sinal de infecção por *Leishmania* sp. Sabe-se que as formas amastigotas de *Leishmania* sp. formam ninhos nos tecidos do hospedeiro, os quais não são homoganeamente distribuídos entre os tecidos e nem mesmo dentro de um mesmo tecido. Assim, é comum e esperado que dentro de um mesmo tecido, tenham fragmentos que contenham muitos parasitos e outros com pouca quantidade ou até sem nenhum ninho de amastigota (Doehl et al. 2017). Nestes casos, é possível que dois fragmentos de um mesmo tecido tenham resultados diferentes, positivo e negativo, como já foi observado em 30% dos tecidos avaliados durante a infecção experimental de duas espécies de roedores silvestres do gênero *Thrichomys* (Roque et al. 2010). Apesar da negatividade observada em todos os exames realizados, não podemos descartar a hipótese de apenas uma infecção com baixa carga parasitária tenha se estabelecido e assim, não tenhamos tido acesso àqueles fragmentos que continham os parasitos. Ou mesmo que o número de amastigotas presentes nesses fragmentos não tenha sido o suficiente para o estabelecimento e desenvolvimento dos parasitos no hamster (Alexander & Russell 1992).

Essa possibilidade de transmissão, através da ingestão de tecido infectado com formas amastigotas, ainda não pode ser descartada, uma vez que na natureza o predador certamente ingere uma grande quantidade de tecido durante sua alimentação, e não apenas pequenos fragmentos. Estudos apontam que as infecções por *Leishmania* spp. na natureza abrangem desde espécies descritas como pequenos mamíferos (potenciais presas) como espécies de carnívoros (ou mesmo espécies onívoras) que se alimentam dessas presas (Roque & Jansen

2014). Dessa forma as chances do hamster se infectar seriam maiores se todo o órgão infectado (baço com lesão, por exemplo) tivesse sido ingerido.

Na tentativa de garantir a inoculação de formas amastigotas dentro de macrófagos, um grupo experimental foi inoculado com uma suspensão de macrófagos murinos infectados *in vitro* com *L. braziliensis*. Estes animais, no entanto, também não apresentaram resultados positivos após o tempo de incubação em nenhuma das análises realizadas. A porcentagem de macrófagos infectados (32%) e a carga parasitária intracelular obtida (1,75) foram menores do que o esperado de acordo com trabalhos já realizados na área, sendo em média 60% de macrófagos infectados e 3 a 5 amastigotas por célula (Machado 2014). Em todo caso, aumentamos o volume do inóculo, e o número de células, de modo que cerca de  $10^5$  parasitos foram oferecidos dentro de macrófagos para cada um dos dois hamsters, o que representa uma carga muito maior do que a inoculada por um flebótomo durante um repasto sanguíneo, que é cerca de  $10^2$  parasitos. A menor carga parasitária nesta infecção experimental, comparada à carga de  $10^6$  dos demais grupos experimentais, pode ter influenciado numa menor probabilidade de infecção, principalmente por se tratar de uma via de transmissão oral que naquele momento estava sendo testada de forma inédita.

Para os hamsters infectados com *L. infantum* por via intraperitoneal, os quais serviriam de grupo controle para as tentativas de infecção oral, foram necessárias duas tentativas de infecção, em momentos diferentes. Uma vez que os sintomas clínicos da leishmaniose visceral se manifestam geralmente no período de 2 a 6 meses (Murray et al. 2005), estipulamos o prazo máximo de 6 meses de incubação para esses animais, maximizando assim nossa chance de sucesso no desenvolvimento da infecção e, conseqüentemente, em sua detecção.

Sabe-se que entre os principais sintomas clínicos da LV estão a esplenomegalia, anemia, perda de peso, alopecia, ceratoconjutivite e paresia dos membros posteriores (Requena et al. 2000, Brasil 2014). Nenhum destes sintomas foi observado nos hamsters durante a primeira tentativa de infecção experimental. Desta forma, ainda antes de obtermos os resultados dos testes diagnósticos deste primeiro grupo, que posteriormente confirmaria que os dois hamsters se infectaram, optamos por repetir esse grupo experimental. De fato, a infecção resultante nos 2 hamsters do primeiro grupo experimental foi bastante amena de modo que não foi confirmada através dos testes de cultura, *imprint*, sorologia e histologia. A infecção em ambos os hamsters apenas pôde ser confirmada através do teste diagnóstico

com maior sensibilidade (PCR), que conseguiu detectar a presença do parasito em fragmentos de pele íntegra, baço e fígado. Os animais utilizados na segunda tentativa foram inoculados seguindo o mesmo padrão do primeiro grupo e também ficaram incubados por 6 meses, durante os quais também não apresentaram os sintomas clínicos esperados em um modelo experimental tão susceptível. A infecção nos dois hamsters deste grupo foi confirmada através dos resultados positivos na sorologia, PCR e isolamento de parasitos em cultura de baço, atestando a capacidade infectiva (porém baixa) do isolado de *L. infantum* utilizado nas infecções experimentais dos demais grupos. A presença de infiltrado inflamatório nas amostras de fígado, mesmo sem a observação de formas amastigotas, também é um indicador da presença de infecção, provavelmente causada por *Leishmania* spp.

Diferentemente do observado na infecção experimental por *L. braziliensis*, os animais inoculados com *L. infantum* por via oral ou por via intragástrica não apresentaram nenhum sintoma clínico e foram negativos em todas as análises realizadas, sugerindo que os mesmos não se infectaram. Estes resultados demonstram que os mecanismos de transmissão/infecção de *L. infantum* e *L. braziliensis* por via oral e via intragástrica podem ser diferentes. Diferentes espécies de *Leishmania* podem apresentar respostas diferentes ao sistema imune de cada hospedeiro, se adaptando de maneiras diferentes. Essas formas de adaptação do parasito podem influenciar diretamente no estabelecimento ou não da infecção e na eficácia de cada via de transmissão (Falcão et al. 2016).

Certamente, o isolado que tínhamos para utilizar nas infecções experimentais, apesar de ter sido isolado de outro hamster e congelado com poucas passagens, não se mostrou muito infectivo, visto que resultou apenas em uma branda infecção nos hamsters inoculados pela via clássica experimental (intraperitoneal) (Moreira et al. 2016), não resultando em doença clínica nos mesmos. Lembrando que o modelo hamster é aquele mais susceptível à infecção experimental por *L. infantum*, e as infecções neste modelo quase sempre resultam em uma doença fatal e com elevada carga parasitária. Diante desta situação, uma terceira tentativa de se infectar oralmente hamsters com *L. infantum* foi realizada com um novo isolado da mesma cepa, recém isolados e gentilmente doados pela Dra. Patricia Cuervo Escobar, do Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses do IOC. Dois grupos experimentais foram criados para isso, mas todas as análises foram negativas.

Os grupos experimentais inoculados com flebótomos que se alimentaram em hamsters supostamente infectados e os alimentados com fragmentos de baço

também de hamsters supostamente infectados apresentaram resultados negativos nas análises realizadas (cultura, *imprint*, PCR, histologia e sorologia). A chance de se observar sucesso nestes dois grupos experimentais, era maior nos animais que se alimentaram com flebótomos, uma vez que os animais que serviram de fonte de infecção dos flebótomos estavam comprovadamente infectados. Os fragmentos de baço utilizados para alimentar o outro grupo de hamsters foram derivados de hamsters nos quais não foi possível confirmar a infecção através dos testes diagnósticos realizados.

O sucesso na infecção experimental intragástrica por *L. braziliensis* em hamsters observada no presente estudo, mostra que a infecção por esta via é possível em mamíferos e estimula a realização de novos experimentos na tentativa de comprovar que esta infecção também pode ocorrer utilizando-se outras fontes de infecção, seja por via intragástrica ou oral e com outras espécies de *Leishmania*, principalmente se utilizarmos um tempo de incubação maior, um maior número de animais e isolados com alto percentual de formas promastigotas metacíclicas infectivas.

Conhecer todas as possíveis vias de transmissão de um parasito é de fundamental importância para compreender sua relação com o meio ambiente, vetores e hospedeiros e, dessa forma, propor efetivas estratégias de prevenção e controle. Nosso trabalho aponta uma nova forma possível de infecção por *L. braziliensis* e ressalta a importância de estudos mais aprofundados e detalhados sobre a transmissão oral das espécies de leishmania como uma fonte importante de propagação desse parasito.

## **6 PERSPECTIVAS**

Nossos resultados nos estimulam a manter a mesma linha de pesquisa, dando continuidade às tentativas de comprovar novas formas de infecção em hamsters, através das vias intragástrica e oral com promastigotas metacíclicas. Pretendemos, repetir as inoculações com culturas mais ricas dessas promastigotas, com maior capacidade infectiva, repetindo alguns dos grupos experimentais testados e aumentando a quantidade de hamsters utilizados.

Pretendemos ainda, uma colaboração com outro grupo de pesquisa, para que possamos utilizar parasitos infectivos marcados com fluoresceína, na tentativa de acompanhar a cinética da infecção experimental, tanto nas vias tradicionais (intraperitoneal e intradérmica), quanto na via oral.

## 7 CONCLUSÕES

1. Formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* são capazes de infectar hamsters *M. auratus* quando administradas por via intragástrica;
2. Os testes diagnósticos de PCR multiplex e sorologia demonstraram ter igual sensibilidade no diagnóstico de infecção por *Leishmania* sp. nos grupos experimentais analisados;
3. A inoculação por via oral com cultura axênica de *L. braziliensis* resultou em alterações dérmicas que precisam ser melhor exploradas;
4. A via de transmissão intragástrica descrita de forma inédita nesse trabalho deve ser considerada como uma das possíveis formas alternativas de transmissão de *Leishmania* sp.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler S 1948. Origin of the golden hamster *Cricetus auratus* as a laboratory animal. *Nature* 162: 256.
- Adler S 1989. The origin of the golden hamster as a laboratory animal. *Isr J Med Sci* 25: 206–209.
- Aguirre a A, Tabor GM 2008. Global factors driving emerging infectious diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149: 1–3.
- Alexander J, Russell DG 1992. The Interaction of *Leishmania* Species with Macrophages. *Adv. Parasitol.* 31: 175–254.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M de 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7.
- Alvar J, Yactayo S, Bern C 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22: 552–557.
- Amela C, López-Gay D, Alberdi JC, Castilla J 1996. Injecting drug use as risk factor for visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Eur. J. Epidemiol.* 12: 91–92.
- Ashford RW 1996. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin. Dermatol.* 14: 523–532.
- Ashford RW 1997. What it takes to be a reservoir host. *Belgian J. Zool.* 127 Suppl: 85–90.
- Ashford RW 2000. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30: 1269–1281.
- Asoh T, Saito M, Villanueva SYAM, Kanemaru T, Gloriani N, Yoshida S 2014. Natural defense by saliva and mucosa against oral infection by *Leptospira*. *Can. J. Microbiol.* 60: 383–389.
- Baker JR 1985. Bat trypanosome models for *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* 1: 111–113.
- Bañuls AL, Guerrini F, Pont F Le, Barrera C, Espinel I, Guderian R, Echeverria R, Tibayrenc M 1997. Evidence for hybridization by multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA between *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis/guyanensis* in Ecuador. *J. Eukaryot. Microbiol.* 44: 408–411.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM V, Salgueiro MM, Pacheco RS 2009. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical

- manifestations of tegumentary leishmaniasis: Evaluation by two molecular markers. *Exp. Parasitol.* 121: 317–322.
- Barbosa Junior AA, Andrade ZA, Reed SG 1987. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. *Braz J Med Biol Res* 20: 63–72.
- Bates PA 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37: 1097–1106.
- Bates PA 2008. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 340–344.
- Bentes AA, Rodrigues DE, Carvalho E, Carvalho AL, Campos FA, Romanelli RM de C 2015. Leishmaniose americana cutânea: diagnóstico desafiador na prática pediátrica. *Rev. Médica Minas Gerais* 25: 83–87.
- Bogaart E Van den, Talha ABA, Straetemans M, Mens PF, Adams ER, Grobusch MP, Nour BYM, Schallig HDFH 2014. Cytokine profiles amongst Sudanese patients with visceral leishmaniasis and malaria co-infections. *BMC Immunol.* 15.
- Brandão-Filho SP, Brito ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter L, Shaw JJ 2003. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97: 291–296.
- Brasil M da S 2010. *Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Brasil 2014. *Leishmaniose Visceral*.
- Brasil M da saúde 2016. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. 2016.
- Brazil RP., Rodrigues AAF., Andrade-filho JD 2014. Sand Fly Vectors of *Leishmania* in the Americas - A Mini Review. *Entomol. Ornithol. Herpetol. Curr. Res.* 04.
- Brito MEF de, Almeida EL, Medeiros ACR, Werkhäuser RP, Alexandre JL de A, Sá BSLF, Rodrigues EHG, Brandão-Filho SP 2018. *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from the saliva of patients in a cutaneous leishmaniasis-endemic area of northeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 113: 1–4.
- Camargo ME 1964. Improved technique of indirect immunofluorescence for serological diagnosis for toxoplasmosis. : 117–118.
- Carrasco-Antón N, López-Medrano F, Fernández-Ruiz M, Carrillo E, Moreno J, García-Reyne A, Pérez-Ayala A, Rodríguez-Ferrero ML, Lumbreras C, San-Juan R, Alvar J, Aguado JM 2017. Environmental factors as key determinants for

- visceral leishmaniasis in solid organ transplant recipients, Madrid, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 23: 1155–1159.
- Cássia-Pires R De, Melo MDFAD De, Hora Barbosa R Da, Roque ALR 2017. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of *Leishmania* spp. KDNA and the *gapdh* housekeeping gene of mammal hosts. *PLoS One*.
- Coelho M V., Coutinho-Abath E 1965. Experimental cutaneous leishmaniasis. I. Infection of albino mice and Syrian hamsters by *Leishmania mexicana*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 7: 136–144.
- Colombo FA, Odorizzi RMFN, Laurenti MD, Galati EAB, Canavez F, Pereira-Chiocola VL 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol. Res.* 109: 267–274.
- Costa Lima MS da, Hartkopf ACL, Souza Tsujisaki RA de, Oshiro ET, Shapiro JT, Fatima Cepa Matos M de, Cavalheiros Dorval ME 2018. Isolation and molecular characterization of *Leishmania infantum* in urine from patients with visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 178: 248–251.
- Courret N, Fréhel C, Gouhier N, Pouchelet M, Prina E, Roux P, Antoine J-C 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell Sci.* 115: 2303–2316.
- Cruz-Chan JV, Aguilar-Cetina ADC, Villanueva-Lizama LE, Martínez-Vega PP, Ramírez-Sierra MJ, Rosado-Vallado ME, Guillermo-Cordero JL, Dumonteil E 2014. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. *Parasit. Vectors* 7: 361.
- Cupolillo E, Grimaldi G, Momen H 1994. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50: 296–311.
- Dantas-Torres F, Gloria Faustino MA Da, Costa Lima OC Da, Veiga Acioli R 2005. Epidemiologic surveillance of canine visceral leishmaniasis in the municipality of Recife, Pernambuco. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38: 444–445.
- Daszak P, Epstein JH, Kilpatrick AM, Aguirre AA, Karesh WB, Cunningham AA 2007. Collaborative research approaches to the role of wildlife in zoonotic disease emergence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 315: 463–475.
- Daval N, Marchal C, Guillaumot L, Hüe T, Ravel C, Keck N, Kasbari M 2016. First report of autochthonous non-vectorial canine leishmaniasis in New Caledonia, south-western Pacific: Implications for new control measures and

- recommendations on importation of dogs. *Parasites and Vectors* 9.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Alunda JM, Bolás-Fernández F 2007. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for In Vivo testing of antileishmanial compounds. *Vet. Res. Commun.* 31: 703–717.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*--a mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89: 463–469.
- Deschamps P, Lara E, Marande W, López-García P, Ekelund F, Moreira D 2011. Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids. *Mol. Biol. Evol.* 28: 53–58.
- Dey A, Singh S 2006. Transfusion transmitted leishmaniasis: a case report and review of literature. *Indian J. Med. Microbiol.* 24: 165–170.
- Dias ES, Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA 2011. Psychodidae. In: *Parasitol. Humana*, Atheneu, pp. 377–385.
- Diniz S a, Melo MS, Borges a M, Bueno R, Reis BP, Tafuri WL, Nascimento EF, Santos RL 2005. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Vet. Pathol.* 42: 650–658.
- Doehl JSP, Bright Z, Dey S, Davies H, Magson J, Brown N, Romano A, Dalton JE, Pinto AI, Pitchford JW, Kaye PM 2017. Skin parasite landscape determines host infectiousness in visceral leishmaniasis. *Nat. Commun.*
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int. J. Parasitol.* 41: 571–579.
- Falcão de Oliveira E, Oshiro ET, Fernandes WS, Murat PG, Medeiros MJ de, Souza AI, Oliveira AG de, Galati EAB 2017. Experimental infection and transmission of *Leishmania* by *Lutzomyia cruzi* (Diptera: Psychodidae): Aspects of the ecology of parasite-vector interactions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11.
- Falcão S de AC, Jaramillo TMG, Ferreira LG, Bernardes DM, Santana JM, Favali CBF 2016. *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*: Differences and similarities to evade the innate immune system. *Front. Immunol.* 7.
- Figueiró-Filho EA, Duarte G, El-Beitune P, Quintana SM, Maia TL 2004. Visceral leishmaniasis (kala-azar) and pregnancy. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 12: 31–40.
- Fonteles RS, Filho AAP, Moraes JLP, Kuppinger O, Rebêlo JMM 2016. Experimental

- infection of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, etiological agents of American tegumentary leishmaniasis. *J. Med. Entomol.* 53: 206–209.
- Franzén O, Talavera-López C, Ochaya S, Butler CE, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Marinkelle CJ, Tyler KM, Miles MA, Andersson B 2012. Comparative genomic analysis of human infective *Trypanosoma cruzi* lineages with the bat-restricted subspecies *T. cruzi marinkellei*. *BMC Genomics* 13.
- Gajurel K, Dhakal R, Deresinski S 2017. Leishmaniasis in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Transplant.* 31.
- Gamboa D, Torres K, Doncker SD, Zimic M, Arevalo J, Dujardin J-C 2008. Evaluation of an in vitro and in vivo model for experimental infection with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology* 135.
- Gaskin A a, Schantz P, Jackson J, Birkenheuer A, Tomlinson L, Gramiccia M, Levy M, Steurer F, Kollmar E, Hegarty BC, Ahn A, Breitschwerdt EB 2002. Visceral leishmaniasis in a New York foxhound kennel. *J. Vet. Intern. Med.* 16: 34–44.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
- Gontijo B, Carvalho M de LR 2003. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. *Med. Trop.* 36: 71–80.
- Griensven J van, Diro E 2012. Visceral Leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26: 309–322.
- Handman E, Bullen DVR 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18: 332–334.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN 2011. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 27: 403–409.
- Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK 2002. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1468–1473.
- Hernández-Pérez J, Yebra-Bango M, Jiménez-Martínez E, Sanz-Moreno C, Cuervas-Mons V, Alonso Pulpón L, Ramos-Martínez A, Fernández-Fernández J 1999. Visceral leishmaniasis (kala-azar) in solid organ transplantation: report of five cases and review. *Clin Infect Dis* 29: 918–921.
- Herrera L, D'Andrea PS, Xavier SCC, Mangia RH, Fernandes O, Jansen AM 2005.

- Trypanosoma cruzi infection in wild mammals of the National Park “Serra da Capivara” and its surroundings (Piauí, Brazil), an area endemic for Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 99: 379–388.
- Howie S, Guy M, Fleming L, Bailey W, Noyes H, Faye JA, Pepin J, Greenwood B, Whittle H, Molyneux D, Corrah T 2006. A Gambian infant with fever and an unexpected blood film. *PLoS Med.* 3: 1508–1512.
- Jain K, Jain NK 2015. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J. Immunol. Methods* 422: 1–12.
- Jansen AM, Roque ALR 2010. Domestic and Wild Mammalian Reservoirs. In: *Am. Trypanos.*, pp. 249–276.
- Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990–993.
- Karkamo V, Kaistinen A, Näreaho A, Dillard K, Vainio-Siukola K, Vidgrén G, Tuoresmäki N, Anttila M 2014. The first report of autochthonous non-vector-borne transmission of canine leishmaniosis in the Nordic countries. *Acta Vet. Scand.* 56: 84.
- Kerr SF 2000. Palaearctic Origin of Leishmania. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95: 75–80.
- Lafferty KD, DeLeo G, Briggs CJ, Dobson AP, Gross T, Kuris AM 2015. A general consumer-resource population model. *Science (80-. )*. 349: 854–857.
- Lainson R, Rangel EF 2005. Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100: 881–827.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: *leishmaniases Biol. Med. Vol. I. Biol. Epidemiol.*, p. 120.
- Lam D, Harris D, Qin Z 2013. Inflammatory mediator profiling reveals immune properties of chemotactic gradients and macrophage mediator production inhibition during thioglycollate elicited peritoneal inflammation. *Mediators Inflamm.* 2013.
- Lodge R, Descoteaux A 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin. Immunol.* 114: 256–265.
- Loría-Cervera EN, Andrade-Narváez FJ 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 56: 1–11.
- Low GC, Cooke WE 1926. A congenital case of kala-azar. *Lancet* 208: 1209–1211.
- Machado MM 2014. Análise de diferentes cepas de Leishmania (Leishmania) amazonensis e Leishmania (Viannia) braziliensis quanto a

- infectividade virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados.
- Madeira MDF, Antunes Uchôa CM, Antunes Leal C, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, Barrientos Serra CM 2003. *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36: 551–555.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML de, Sena JM de, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saude Publica* 24: 2941–2947.
- Maraghi S, Wallbanks KR, Molyneux DH 1995. Oral transmission of trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma* from small mammals. *Parasitol. Res.* 81: 693–695.
- Mescouto-Borges MRM, Maués É, Costa DL, Silva Pranchevicius MC da, Romero GAS 2013. Congenitally transmitted visceral leishmaniasis: Report of two Brazilian human cases. *Brazilian J. Infect. Dis.* 17: 263–266.
- Mitra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW 2013. Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *J. Exp. Med.* 210: 401–416.
- Momen H, Grimaldi G 1984. On the identity of *Leishmania mexicana pifanoi* and *L. mexicana garnhami*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 701–702.
- Monge-Maillo B, Norman FF, Cruz I, Alvar J, López-Vélez R 2014. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
- Morais RCS de, Gonçalves S da C, Costa PL, Silva KG da, Silva FJ da, Silva RPE, Brito MEF de, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, Paiva-Cavalcanti M de 2013. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp. Appl. Acarol.* 59: 473–481.
- Moreira N das D 2012. História natural da Leishmaniose visceral em hamster “*Mesocricetus auratus*” experimentalmente infectados por duas cepas de “*Leishmania infantum*” com perfis distintos de virulência e patogenicidade.
- Moreira N das D, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM de A, Coura-Vital W, Cardoso JM de O, Rezende MT, Ker HG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Reis AB 2016. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. *Parasit. Vectors* 9: 181.
- Moreira N das D, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PM de A, Ker HG, Oliveira Cardoso JM de, Giunchetti RC, Carneiro CM, Lana M de, Reis AB 2012.

- Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania* (*Leishmania*) infantum: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS One* 7.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. In: *Lancet*, pp. 1561–1577.
- Naucke TJ, Amelung S, Lorentz S 2016. First report of transmission of canine leishmaniosis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasites and Vectors* 9.
- Negrão GN, Ferreira MEMC 2009. Considerações sobre a dispersão da leishmaniose tegumentar americana nas américas. *Revista Percurso* 1 (1): 85–103.
- Nieto A, Dominguez-Bernal G, Orden JA, La Fuente R De, Madrid-Elena N, Carrion J 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res* 42: 39.
- Nieves E, Pimenta PF 2000. Development of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 37: 134–140.
- Okwor I, Uzonna JE 2013. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Immunol. Res.* 56: 163–171.
- Oliveira VVG de, Alves LC, Silva Junior VA da 2015. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. *Ciência Rural* 45: 1622–1628.
- Palatnik-De-Sousa CB, Paraguai-De-Souza E, Gomes EM, Soares-Machado FC, Luz KG, Borojevic R 1996. Transmission of visceral leishmaniasis by blood transfusion in hamsters. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 29: 1311–1315.
- Pearson RD, Queiroz Sousa A De 1996. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 22: 1–13.
- Pessoa FAC, Medeiros JF, Barrett TV 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 593–599.
- Pimenta PFP, Modi GB, Pereira ST, Shahabuddin M, Sacks DL 1997. A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology* 115: 359–369.
- Pinto IDS, Santos CB Dos, Grimaldi Jr G, Ferreira AL, Falqueto A 2010. American visceral leishmaniasis dissociated from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera,

- Psychodidae) in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad. saude publica / Minist. da Saude, Fund. Oswaldo Cruz, Esc. Nac. Saude Publica* 26: 365–372.
- Pires ACAM 2014. Estudo da susceptibilidade de *Lutzomyia* (L.) longipalpis com diferentes espécies de *Leishmania*.
- Pita-Pereira D de, Alves CR, Souza MB, Brazil RP, Bertho ÁL, Figueiredo Barbosa A de, Britto CC 2005. Identification of naturally infected *Lutzomyia intermedia* and *Lutzomyia migonei* with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by a PCR multiplex non-isotopic hybridisation assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*
- Porrozzi R, Pereira MS, Teva A, Volpini AC, Pinto MA, Marchevsky RS, Barbosa AA, Grimaldi G 2006. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100: 926–937.
- Pumhom P, Morand S, Tran A, Jittapalapong S, Desquesnes M 2015. *Trypanosoma* from rodents as potential source of infection in human-shaped landscapes of South-East Asia. *Vet. Parasitol.* 208: 174–180.
- Queiroz MFM, Varjão JR, Moraes SC de, Salcedo GE 2012. Analysis of sandflies (Diptera: Psychodidae) in Barra do Garças, State of Mato Grosso, Brazil, and the influence of environmental variables on the vector density of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 45: 313–317.
- Quinnell RJ, Courtenay O 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136: 1915–1934.
- Quintal APN 2015. Leishmaniose visceral em hamsters experimentalmente infectados: doença venérea em machos com transmissão sexual.
- Rangel EF, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*
- Requena JM, Soto M, Doria MD, Alonso C 2000. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 76: 269–281.
- Rhyan JC, Spraker TR 2010. Emergence of Diseases From Wildlife Reservoirs. *Vet. Pathol.* 47: 34–39.
- Rocha FL, Roque ALR, Lima JS de, Cheida CC, Lemos FG, Azevedo FC de, Arrais RC, Bilac D, Herrera HM, Mourão G, Jansen AM 2013. *Trypanosoma cruzi* Infection in Neotropical Wild Carnivores (Mammalia: Carnivora): At the Top of

- the *T. cruzi* Transmission Chain. *PLoS One* 8.
- Roellig DM, Ellis AE, Yabsley MJ 2009. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi* with Opposing Evidence for the Theory of Carnivory. *J. Parasitol.* 95: 360–364.
- Rogers ME, Chance ML, Bates PA 2002. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124: 495–507.
- Roque ALR, Cupolillo E, Marchevsky RS, Jansen AM 2010. *Thrichomys laurentius* (rodentia; echimyidae) as a putative reservoir of *Leishmania infantum* and *L. braziliensis*: Patterns of experimental infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4.
- Roque ALR, Jansen AM 2014. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 3: 251–262.
- Ross R 1903. Note on the Bodies Recently Described By Leishman and Donovan. *Bmj* 2: 1261–1262.
- Rosypal AC, Troy GC, Zajac AM, Frank G, Lindsay DS 2005. Transplacental transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in an experimentally infected beagle. *J. Parasitol.* 91: 970–972.
- Rotureau B 2006. Ecology of the *Leishmania* species in the Guianan ecoregion complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74: 81–96.
- Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA 2014. Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica* 3434: 631–41631.
- Salomón OD, Feliciangeli MD, Quintana MG, Afonso MMDS, Rangel EF 2015. *Lutzomyia longipalpis* urbanisation and control. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110: 831–846.
- Santiago MEB, Vasconcelos RO, Fattori KR, Munari DP, Michelin A de F, Lima VMF 2007. An investigation of *Leishmania* spp. in *Didelphis* spp. from urban and peri-urban areas in Bauru (São Paulo, Brazil). *Vet. Parasitol.* 150: 283–290.
- Schantz PM, Steurer FJ, Duprey ZH, Kurpel KP, Barr SC, Jackson JE, Breitschwerdt EB, Levy MG, Fox JC 2005. Autochthonous visceral leishmaniasis in dogs in North America. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 226: 1316–1322.
- Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL 2011. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Parasitology* 138: 405–425.
- Shapiro TA, Englund PT 1995. The Structure and Replication of Kinetoplast DNA.

- Annu. Rev. Microbiol.* 49: 117–143.
- Shaw J 2007. The leishmaniasis - Survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 541–546.
- Silva-Nunes M Da, Cavasini CE, Silva NS Da, Galati EAB 2008. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia, Acre, Brasil. *Rev. Bras. Epidemiol.* 11: 241–251.
- Silva AL Da, Williams P, Melo MN, Mayrink W 1990. Susceptibility of laboratory-reared female *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) to infection by different species and strains of *Leishmania* Ross, 1903. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85: 453–458.
- Silva JGDE, Werneck GL, Cruz M do SPE, Costa CHN, Mendonça IL de 2007. [Natural infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania* sp. in Teresina, Piauí State, Brazil]. *Cad. Saude Publica* 23: 1715–1720.
- Simpson AGB, Lukes J, Roger AJ 2002. The Evolutionary History of Kinetoplastids and Their Kinetoplasts. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2071–2083.
- Slomiany BL, Murty VLN, Piotrowski J, Slomiany A 1996. Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen. Pharmacol.* 27: 761–771.
- Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM 1997. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 158: 3813–3821.
- Soares RPP, Cardoso TL, Barron T, Araújo MSS, Pimenta PFP, Turco SJ 2005. *Leishmania braziliensis*: A novel mechanism in the lipophosphoglycan regulation during metacyclogenesis. *Int. J. Parasitol.* 35: 245–253.
- Soares RPP, Turco SJ 2003. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): a review. *An. Acad. Bras. Cienc.* 75: 301–330.
- Souza MB de, Marzochi MC de A, Carvalho RW de, Ribeiro PC, Pontes C dos S, Caetano JM, Meira A de M 2003. Absence of *Lutzomyia longipalpis* in some endemic visceral leishmaniasis areas in Rio de Janeiro municipality. *Cad. Saúde Publica* 19: 1881–1885.
- Stevens JR 2008. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 15: 226–232.
- Stockdale L, Newton R 2013. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7.
- Tavares NM, Santos DM, Oliveira CI de, Brodskyn CI 2009. ESTRATÉGIAS DE VACINAÇÃO CONTRA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA: LIÇÕES

- DOS MODELOS EXPERIMENTAIS. *Gaz. Médica da Bahia*.
- Teixeira C, Gomes R, Oliveira F, Meneses C, Gilmore DC, Elnaiem DEA, Valenzuela JG, Kamhawi S 2014. Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8.
- Tonelli GB, Tanure A, Rego FD, Carvalho GM de L, Stumpp R, Ássimos GR, Campos AM, Lima ACVM da R, Gontijo CMF, Paz GF, Filho JDA 2017. *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in wild small mammals in ecotourism area of Brazil. *PLoS One* 12.
- Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG 2002. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect. Immun.* 70: 2288–2296.
- Werneck GL, Rodrigues L, Santos M V., Araújo IB, Moura LS, Lima SS, Gomes RBB, Maguire JH, Costa CHN 2002. The burden of *Leishmania chagasi* infection during an urban outbreak of visceral leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 83: 13–18.
- WHO 1990. Control of the leishmaniasis: Report of a WHO expert committee. *World Heal. Organ. - Tech. Rep. Ser.:* 9–131.
- WHO 2010. Control of the Leishmaniasis. World Health Organization, Geneva. *Tech Rep Ser* 949: 22–26.
- WHO 2012. *World Health Statistics*. <[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en)>.
- Young DG, Duncan MA 1994. *Guide to the identification and geographic distribution of Lutzomyia sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae)*.
- Young CW, Smyly HJ, Brown C 1926. Experimental kala azar in a hamster, *Cricetulus griseus* M. EDW. *Am. J. Epidemiol.* 6: 254–275.
- Zanatta Coutinho MT, Bueno LL, Sterzik A, Fujiwara RT, Botelho JR, Maria M De, Genaro O, Linardi PM 2005. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Parasitol.* 128: 149–155.
- Zinchuk a, Nadraga a 2010. Congenital visceral leishmaniasis in Ukraine: case report. *Ann. Trop. Paediatr.* 30: 161–164.