

Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Laboratório de Imunopatologia

Lucilene Aparecida Resende Oliveira

**Infectividade e patogenicidade de diferentes isolados de *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* obtidos de cães naturalmente infectados**

Ouro Preto
2016

Lucilene Aparecida Resende Oliveira

**Infectividade e patogenicidade de diferentes isolados de *Leishmania*
(*Leishmania*) *chagasi* obtidos de cães naturalmente infectados**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas na área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti – Laboratório de Biologia das Interações Celulares – ICB/UFMG

Co-Orientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis – Laboratório de Imunopatologia – NUPEB/UFOP

Ouro Preto

2016

O41i Oliveira, Lucilene Aparecida Resende .
Infectividade e patogenicidade de diferentes isolados de Leishmania
(Leishmania) chagasi obtidos de cães naturalmente infectados [manuscrito] /
Lucilene Aparecida Resende Oliveira. - 2016.
102f.: il.: color; graf; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti.
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Leishmania . 2. Infecção. 3. Leishmaniose visceral . 4. Hamster. I.
Giunchetti, Rodolfo Cordeiro . II. Reis, Alexandre Barbosa . III. Universidade
Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.993.161

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

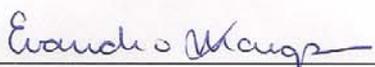


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

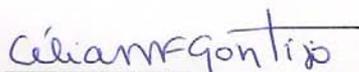
"Infectividade e patogenicidade de diferentes isolados de Leishmania (Leishmania) infantum obtidos de cães naturalmente infectados".

Aos três dias do mês de outubro de 2016, às 14:00h, no Auditório do DECOM da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Lucilene Aparecida Resende Oliveira**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

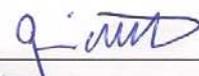
Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado Examinador (UFOP)

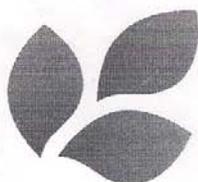

Prof.ª Dr.ª Marta de Lana Examinadora (UFOP)


Prof.ª Dr.ª Célia Maria Ferreira Gontijo
Examinadora (Fundação Oswaldo Cruz)


Prof. Dr. Nelder de Figueiredo Gontijo
Examinador (UFMG)


Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Presidente (UFMG)

DATA DA DEFESA: 03/10/2016



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

Dr. Wendel Coura Vital^I

Dra. Nádia das Dores Moreira^{II}

Dr. Rodrigo Dian de Oliveira Aguiar Soares^{II}

Dr. Sidney de Almeida Ferreira^{II}

Ms. Mariana Ferreira Lanna^{II}

Ms. Jamille Mirelle de Oliveira Cardoso ^{II}

Ms. Fernando Augusto Siqueira Mathias ^{II}

I - Laboratório de Pesquisa em Epidemiologia e Citologia, Escola de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais.

II - Laboratório de Imunopatologia - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais

Agências financiadoras:

CAPES

FAPEMIG

CNPq

Aos meus pais, Maria de Fátima Resende e Francisco José de Resende (*in memoriam*), que me ensinaram a batalhar por uma vida melhor e sempre torceram por minha vitória;

Ao meu esposo Cristiano, que sempre me incentivou e deixa meus dias mais felizes com seu amor e companheirismo;

Ao meu filho Eduardo, razão da minha vida!

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

(Paulo Freire)

A Deus, pela oportunidade da vida e por sempre guiar meus passos; agradeço também à Nossa Senhora Aparecida, por sempre me amparar na dor e estar ao meu lado na alegria. Obrigada por me entender e sempre me ajudar, mesmo diante de minhas falhas... Mãe querida, busco sua proteção para que eu possa seguir minha vida amparada por ti;

Ao meu esposo, Cristiano Ferreira de Oliveira, pelo incentivo e companheirismo. Obrigada pelos cuidados, pelo amor, pela compreensão e por sempre caminhar ao meu lado. Agradeço também por suportar meus defeitos e humores e acima de tudo por tudo que construímos. Sua presença deixa meus dias mais felizes e os momentos difíceis menos árduos;

Ao meu filho, Eduardo Resende Oliveira, por existir e por me ensinar a cada dia o verdadeiro sentido da vida;

Aos meus pais, Maria de Fátima Resende e Francisco José de Resende (*in memoriam*), pelo exemplo de honestidade e retidão... Agradeço pela doação incondicional a fim de fazer de mim e meus irmãos pessoas vitoriosas. Minha mãe, exemplo de determinação e dedicação à família! Meu pai, presença espiritual e inspiração... Como gostaria de tua presença para compartilhar, juntamente com minha mãe, deste momento, que é nosso!

Aos meus irmãos, Rodrigo e Luciana, por fazerem parte da minha vida. É muito bom saber que estamos sempre unidos, torcendo uns pelos outros;

Aos meus avós pelo exemplo de vida;

Aos meus sobrinhos, Francisco e Luanny por alegrarem meus dias;

Aos meus tios Roberto e Solange, por estarem sempre presentes e por cuidarem com tanto carinho do meu filho Eduardo, possibilitando que muitas vezes eu não precisasse deixar meu trabalho;

Aos meus familiares, pela presença marcante, pelos momentos de descontração em nossas reuniões em família, motivo de muita satisfação e orgulho por nossa união;

Ao meu orientador, Rodolfo Cordeiro Giunchetti, pelos ensinamentos, pela oportunidade para a realização deste trabalho e pela confiança depositada em mim;

Ao meu co-orientador, Alexandre Barbosa Reis, pelo apoio, pelos ensinamentos e por me acolher como membro do Laboratório de Imunopatologia;

Ao Rodrigo Dian pelos ensinamentos e inúmeras contribuições ao longo de todo trabalho, sem medir esforços para que tudo desse certo. Sua contribuição foi, com certeza, essencial para que este trabalho pudesse ser realizado;

A Nádia, pelas contribuições e ajuda, principalmente no manejo dos hamsters. É muito bom saber que pude contar com a ajuda de alguém tão competente e experiente com esse modelo experimental;

Ao Sidney, pela ajuda na parte de detecção de carga parasitária dos animais e pela presteza em sempre contribuir;

Ao Wendel, por ceder os isolados obtidos a partir das amostras de medula dos cães de área endêmica naturalmente infectados;

A Jamille por sempre estar disposta a contribuir;

A Mariana Lanna, por compartilhar comigo de experiências e anseios semelhantes;

Aos demais colaboradores deste trabalho, por tornarem possível a conclusão do mesmo;

A todas aquelas pessoas próximas a mim que em algum momento, de forma direta ou indireta, fizeram parte de minha formação;

A todos aqueles que foram solidários a mim por ocasião de minha gravidez e nascimento do meu filho, que aconteceu na metade do período do curso;

A equipe de funcionários do Laboratório de Imunopatologia por tornarem a logística de trabalho mais fácil, zelando pela organização e bom funcionamento, essencial para o sucesso de todo trabalho realizado no laboratório;

Aos demais membros do Laboratório de Imunopatologia por toda ajuda e pela agradável convivência.

Sumário

Lista de Figuras.....	XII
Lista de Tabelas	XIV
Lista de Fluxogramas.....	XV
Lista de Abreviaturas e Siglas	XVI
1. Introdução	1
1.1. Aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da leishmaniose visceral humana e canina.....	3
1.2. Fatores que interferem na patogenia da infecção por <i>Leishmania</i>	5
1.3. Aspectos epidemiológicos e ações de combate à leishmaniose visceral humana e canina	7
1.4. A resistência farmacológica relatada no tratamento da leishmaniose visceral e alternativas ao antimônio pentavalente	10
1.5. Importância da caracterização de isolados de <i>Leishmania</i>	12
2. Justificativa	17
3. Objetivos.....	18
3.1. Objetivo Geral.....	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. Material e métodos.....	19
4.1. Delineamento experimental	19
4.2. Isolamento dos parasitos	20
4.3. Caracterização molecular dos isolados obtidos	22
4.3.1. Preparação das massas de <i>Leishmania</i>	22
4.3.2. Extração de DNA	23

4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	24
4.3.4. Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP).....	24
4.4. Avaliação da infectividade <i>in vitro</i>	25
4.4.1. Infecção de macrófagos (DH82) com <i>Leishmania chagasi</i>	25
4.4.2. Infecção de macrófagos (DH82) com <i>Leishmania chagasi</i> marcada com CFSE	26
4.5. Avaliação da infecção por <i>Leishmania in vivo</i>	27
4.5.1. Grupos experimentais.....	27
4.5.2. Infecção experimental	29
4.5.3. Tratamento com Glucantime®.....	29
4.5.4. Taxa de sobrevivência e sinais clínicos	30
4.5.5. Necropsia e obtenção do material biológico	31
4.5.6. Re-isolamento dos parasitos a partir de amostras de órgãos dos hamsters experimentalmente infectados.....	31
4.5.7. Avaliação dos parâmetros hematológicos	32
4.5.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	32
4.5.9. Processamento e avaliação do infiltrado celular no fígado	32
4.5.10. Avaliação da densidade parasitária por qPCR	33
4.6. Análise estatística	35
5. Resultados.....	36
5.1. Identificação dos parasitos por PCR-RFLP	36
5.2. Análise de infectividade empregando-se ensaios <i>in vitro</i>	37
5.3. Perfil de infecção em hamsters com os diferentes isolados selecionados na etapa anterior	40
5.3.1. Taxa de sobrevivência.....	40

5.3.2. Avaliação clinicopatológica	41
5.3.3. Hemograma	42
5.3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	43
5.3.5. Contagem do infiltrado celular no fígado	44
5.3.6. Avaliação da carga parasitária.....	46
5.4. Perfil de infecção em hamsters, submetidos ao tratamento com Glucantime®, com os diferentes isolados selecionados na etapa inicial do trabalho (614 e 616)	47
5.4.1. Taxa de sobrevivência.....	47
5.4.2. Avaliação clinicopatológica	48
5.4.3. Hemograma	49
5.4.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	50
5.4.5. Análise do infiltrado celular no fígado.....	51
5.4.6. Avaliação da carga parasitária.....	53
6. Discussão	55
7. Conclusão.....	64
8. Perspectivas	65
9. Referências bibliográficas.....	66
10. Anexo.....	84

Lista de Figuras

Figura 1: Cães dos quais foi feito o isolamento das cepas 614 e 616	22
Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de macrófagos DH82 infectados com diferentes cepas de <i>L. chagasi</i> marcadas com CFSE <i>in vitro</i>	27
Figura 3: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do kDNA do mini-círculo de <i>Leishmania</i> antes e após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%.....	37
Figura 4: Percentual de macrófagos caninos infectados por diferentes isolados de <i>L. chagasi</i> e respectivas cargas parasitárias.....	39
Figura 5: Macrófagos imortalizados de cães da linhagem DH82 infectados com os isolados 616 e 614.	40
Figura 6: Taxa de sobrevivência de hamsters dos grupos: controle e infectados experimentalmente com os diferentes isolados.	41
Figura 7: Hamsters experimentalmente infectados com <i>L. chagasi</i> apresentando: (A) emagrecimento e caquexia	42
Figura 8: Avaliação do infiltrado celular no fígado de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados.....	45
Figura 9: Fotomicroscopias de fígado de hamster dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados.	45
Figura 10: Carga parasitária avaliada pela qPCR no fígado (A) e baço (B).....	46
Figura 11: Taxa de sobrevivência de hamsters tratados com Glucantime®.....	48
Figura 12: Avaliação do infiltrado celular no fígado de hamsters tratados com Glucantime®	52

Figura 13: Fotomicroscopias de fígado de hamsters tratados com Glucantime®..... 53

Figura 14: Carga parasitária avaliada pela qPCR no fígado (A) e baço (B) de hamster tratados com Glucantime®..... 54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise clínica e *post-mortem* de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados..... 42

Tabela 2: Perfil hematológico em hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados. 43

Tabela 3: Perfil bioquímico em amostras de soro de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados. 44

Tabela 4: Frequência de positividade pela qPCR em amostras de baço e fígado de hamsters dos grupos: infectados experimentalmente com os diferentes isolados. 47

Tabela 5: Análise clínica e *post-mortem* de hamsters, submetidos ao tratamento com Glucantime® 49

Tabela 6: Perfil hematológico dos hamsters submetidos ao tratamento com Glucantime®. 50

Tabela 7: Perfil bioquímico dos hamsters submetidos ao tratamento com Glucantime®, dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os diferentes isolados. 51

Tabela 8: Frequência de positividade pela qPCR em amostras de baço e fígado de hamsters tratados com Glucantime® dos grupos: infectados experimentalmente com os diferentes isolados. 54

Lista de Fluxogramas

Fluxograma 1: Delineamento experimental esquemático das principais atividades realizadas neste estudo.20

Fluxograma 2: Delineamento experimental esquemático das atividades realizadas na etapa de estudo *in vivo* em hamster.....28

Fluxograma 3: Delineamento experimental esquemático das atividades realizadas na etapa de estudo *in vivo* em hamster, na presença de pressão medicamentosa com Glucantime®.....30

Lista de Abreviaturas e Siglas

BPQ - Buparvaquone

CCA – Centro de Ciência Animal

CD4 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores

CD5 - Marcador de superfície celular de linfócitos T

CD8 - Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxico/supressores

CD21 - Marcador de superfície celular de linfócitos B

CFSE - 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester

EDTA - Anticoagulante quelante de cálcio

IFN- γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulina

IgA - Imunoglobulina da classe A

IgE - Imunoglobulina da classe E

IgG - Imunoglobulina da classe G

IgG1- Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2- Imunoglobulina da subclasse G2

IgM - Imunoglobulina da classe M

IL-4 - Interleucina 4

IL-10 - Interleucina 10

kDA – kilo-Dalton

Kg – kilograma

LC- Leishmaniose cutânea

LM- Leishmaniose mucosa

LIT - *Liver Infusion Tryptose* (Meio de cultivo)

LPG - Lipofosfoglicano

LV - Leishmaniose Visceral

LVC - Leishmaniose Visceral Canina

M – concentração molar (mol/L)

MAPA - Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento-

mg - miligrama

mL – mililitro

MO - medula óssea

ng - nanograma

NNN - Nicole, Novy & Neal (Meio de cultivo bifásico)

OLPC- *oleylphosphocholine*

pb – pares de base

PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells*: células mononucleares so sangue periférico

PBS - *Phosphate buffer saline*

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

qPCR - reação em cadeia da polimerase quantitativa

rpm - rotação por minuto

SGE - *sand fly gland extract (Lutzomyia longipalpis)*: extrato de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis*

SIPEAGRO - Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários –

TA – Temperatura ambiente

TGF- β - fator de transformação do crescimento β

TGO - transaminase glutâmica oxalacética

TGP - transaminase glutâmica pirúvica

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α

TRF - Tribunal Regional Federal

UFOP - Universidade Federal de Ouro Preto

WHO - *World Health Organization*

°C - graus Celsius

μ g – micrograma

μ L - microlitro

μ m – micrometro

% - percentual

No Brasil, a Leishmaniose Visceral (LV), que tem como agente etiológico a *Leishmania chagasi* (sinonímia *Leishmania infantum*), vem sendo amplamente distribuída. O cão se destaca como reservatório doméstico deste parasito, favorecendo sua transmissão no ambiente urbano. Considerando que a transmissão da *L. chagasi* ocorre necessariamente com a participação dos cães no ambiente urbano, e que muitos deles podem ter sido tratados ou estar em tratamento contra esta infecção, sem induzir cura parasitológica, é possível especular que em ambientes domésticos possam estar circulando cepas com características de resistência ao tratamento, bem como alta infectividade e patogenicidade. Neste contexto, torna-se fundamental a caracterização de isolados de *L. chagasi*, oriundos de cães naturalmente infectados, bem como o estudo do comportamento *in vitro* e *in vivo* destes isolados para identificação de padrões de infectividade e patogenicidade. Dentre os resultados obtidos neste estudo, foi possível confirmar, pela PCR-RFLP, que todos os isolados são da espécie *L. chagasi*. De forma interessante, o cultivo dos diferentes isolados em linhagem de macrófago canino (DH82) evidenciou perfis distintos de infectividade e carga parasitária. Esta abordagem permitiu identificar os isolados com comportamentos polares *in vitro*, representados por infectividade e carga parasitária elevada (isolado 616) ou reduzida (isolado 614). Após este estudo inicial *in vitro*, foi realizada uma análise do perfil de infecção em hamsters, utilizando estes isolados, bem como a cepa padrão PP75 e a cepa selvagem OP46. Em um segundo experimento com estes isolados e com as cepas padrão (PP75 e OP46), os animais de cada um dos grupos foram submetidos a uma intervenção com a administração de Glucantime[®] em dose subterapêutica. De forma interessante, a taxa de sobrevivência nos animais infectados com o isolado 616 foi de 100%, enquanto que para os animais infectados com o isolado 614 (com ou sem intervenção medicamentosa), bem como com o isolado 616 (nos animais que receberam Glucantime[®]) foi em torno de 50%. De um modo em geral, o isolado 614 induziu: (i) maiores alterações clinicopatológicas, (ii) indicativo de alteração hepática pelas análises bioquímicas, (iii) intenso infiltrado inflamatório no fígado, (iv) elevação da carga parasitária avaliada por qPCR no baço e no fígado. Estes resultados mostraram que o isolado que foi menos infectivo (614) nos ensaios *in vitro* foi o mais infectivo e patogênico em hamsters. Por outro lado, na presença de infecção com o isolado 616 e com administração de Glucantime[®], o perfil da infecção mostrou maior gravidade, alterando, portanto, a evolução da infecção. Em conjunto, os dados obtidos pela análise *in vitro* em macrófagos caninos da linhagem DH82, a partir de isolados de *L. chagasi* apresentando perfis polares de infectividade, não refletiram o mesmo padrão nos ensaios *in vivo* utilizando hamsters. Além disto, foi observado que o tratamento não efetivo da leishmaniose visceral experimental pode induzir alteração no curso da infecção, tornando-a mais agressiva.

Palavras-Chave: *Leishmania chagasi*, infectividade, leishmaniose visceral canina, hamster

In Brazil, Visceral Leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania chagasi* (synonymy *Leishmania infantum*), has been widely distributed. The dog is considered the domestic reservoir of the parasite, favoring its transmission in the urban environment. Whereas the transmission of *L. chagasi* necessarily occurs with dog's participation in the urban area, and that many of them may be in treatment for this infection without inducing parasitological cure. Considering this scenario, is possible to speculate that parasite transmission would include strains with characteristics as high infectivity, pathogenicity and resistance to treatment. In this context, it is fundamental to identify *L. chagasi* strains, derived from *L. chagasi*-naturally infected dogs including *in vitro* and *in vivo* analysis for identification of infectivity and pathogenicity patterns. The data considering all analyzed strains were confirmed by PCR-RFLP as *L. chagasi* specie. Interestingly, the *in vitro* approach using canine macrophage lineage (DH82) showed distinct infectivity and parasite burden profiles. This analysis allowed us to identify strains with *in vitro* polar patterns, represented by high (strain 616) or low (strain 614) infectivity and parasite load. After this initial *in vitro* study, it was carried out an *in vivo* analysis of the infection profile using hamsters and the strains 614, 616, in addition to PP75 and wild type OP46 (standard strains). In a second experiment with these strains, the hamsters of each group were subjected to an intervention by the administration of Glucantime®. Interestingly, the survival rate of the infected animals using 616 strains was 100%, whereas for strain 614 (with or without Glucantime® treatment), as well as to 616 strains (after Glucantime® treatment) was around 50%. The major results using 614 strain in hamsters demonstrated: (i) higher clinicopathological changes, (ii) indicative of liver disorders according to biochemical analysis, (iii) intense liver inflammation, (iv) increased parasite burden assessed by qPCR in both spleen and liver. These results showed that the less infective strain (614) in the *in vitro* assays was the most pathogenic and infective in hamsters. Moreover, the infection with 616 strain following by Glucantime® treatment, the infection profile showed greater severity by changing the infection outcome. Taken together, the *in vitro* data analysis using canine macrophages (DH82 lineage) from *L. chagasi* strains presenting polar infectivity profiles did not reflect the same outcome by *in vivo* analysis using hamsters. Furthermore, it was observed that the non-effective treatment of experimental visceral leishmaniasis might induce changes in the infection outcome making it more pathogenic.

1. Introdução

As leishmanioses representam um complexo de doenças com uma grande diversidade clínico-epidemiológica, constituindo um sério problema de saúde pública (Desjeux, 2004; WHO, 2015). Entre as diferentes formas clínicas [leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM)], a forma visceral, causada por *Leishmania donovani* ou por ou *Leishmania infantum/Leishmania chagasi*, tem maior impacto, sendo a mais grave e letal (Chappuis *et al.*, 2007). Os primeiros casos de LV foram notificados em 1903, quando William Leishman encontrou o parasito por ocasião da necrópsia de um soldado vindo da estação de Dum-Dum e Charles Donovan confirmou a descrição de Leishman em outro estudo independente, onde amastigotas foram observadas no interior de macrófagos obtidos de pessoas infectadas. Nesta época, o gênero *Leishmania* foi descrito por Ross (Ross, 1903). Em 1908, Charles Nicolle demonstrou o papel do cão como hospedeiro e em 1924 foi confirmada a transmissão ao homem através da picada de *Phlebotomus argentipes*, dados importantes para a compreensão do ciclo biológico (Badaró e Duarte, 1986).

No Velho Mundo, o agente etiológico da LV é *Leishmania donovani* (em regiões da Índia, Paquistão, China e África) e *Leishmania infantum* (na região do Mediterrâneo). No Novo Mundo, a LV é causada por *L. chagasi* (sinonímia *Leishmania infantum*; Maurício *et al.*, 2000; Lukes *et al.*, 2007), que é encontrada principalmente no Brasil (McGwire e Satoskar, 2013). O parasito possui um ciclo de vida heteroxênico, alternando estádios de vida entre hospedeiros mamíferos (edentados, marsupiais, canídeos e primatas) e invertebrados (gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo) (Lainson e Shaw, 1988). Com o processo de urbanização e periurbanização do calazar revelado em vários estudos epidemiológicos, o cão destaca-se como principal reservatório doméstico (Deane, 1956; Deane, 1961; Ashford, 2000; Desjeux, 2004).

Do ponto de vista epidemiológico, cerca de 0,2 a 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LC ocorrem a cada ano. Mais de 90% dos casos de LV globais ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (Alvar *et al.*, 2012). A prevalência abrange cerca de 12 milhões de pessoas e as estimativas demonstram que existem 350 milhões de habitantes com risco de contrair a doença, onde a taxa de mortalidade por LV global aproxima-se de 40 mil (Desjeux, 2004; Alvar

et al., 2012). No Brasil, a incidência anual é de 3.481 casos de LV (Alvar *et al.*, 2012), sendo que o controle da doença tem sido baseado em providências que tem resultado, em médio prazo, na redução dos casos de LV e da leishmaniose visceral canina (LVC) (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Estas ações consistem no tratamento de casos humanos, combate ao vetor e eutanásia de cães infectados (Ministério da Saúde, 2011). Para que o controle seja realmente eficaz, estas medidas devem ser mantidas durante longo período e, mesmo assim, é frequente a reativação dos focos.

As pesquisas sobre infecção por *L. chagasi* em cães sugerem que o controle da LV depende de um controle efetivo da LVC (Alvar *et al.*, 2004). Porém, em função dos laços muitas vezes estabelecidos entre as pessoas e seus cães, a eutanásia de animais soropositivos não é uma alternativa fácil (Palatnik-de-Sousa *et al.*, 2001). Além disso, muitos cães de área endêmica apresentam-se assintomáticos, embora possuam elevado parasitismo cutâneo, o que, somado à elevada prevalência, torna a LVC mais importante que a LV humana do ponto de vista epidemiológico (Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a). Diante dessa situação, a manutenção do tripé de ações para o controle da LV fica bastante comprometida.

Outro grande problema no programa de controle da LV está no uso de fármacos destinados ao tratamento de casos humanos em cães com LV, já que independentemente do protocolo de tratamento, o sucesso terapêutico nestes animais é praticamente nulo, permanecendo o parasito após o tratamento com grandes chances de recidivas (Noli e Auxilia, 2005; MS, 2006; Roatt *et al.*, 2014). Além disso, independentemente do tipo de estratégia terapêutica utilizada no tratamento da LVC, há possibilidade do surgimento de cepas resistentes, especialmente resistência cruzada aos fármacos utilizados no tratamento LV humana. Por isto, o emprego da terapêutica anti-LVC, independentemente da forma de administração e do tipo de fármaco, não tem sido indicado, conforme parecer nº 0299/2004 da Advocacia Geral da União e de acordo com a portaria interministerial do Ministério da Saúde (nº 1.426, de 11 de julho de 2008). Deste modo, este parecer proíbe o tratamento da LVC no Brasil com produtos de uso humanos ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Vale destacar ainda que a quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento da LV humana e LVC (na Europa) é limitada, o que tem contribuído para o surgimento de resistência do parasito ao tratamento (Sundar *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 2006; Sundar

e Chatterjee, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Croft *et al.*, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Griesven *et al.*, 2010; Maltezou, 2010). A resistência aos antimoniais tem sido relatada em muitas áreas endêmicas em todo o mundo, atingindo proporções epidêmicas no estado de Bihar, na Índia onde 70% da população com LV possui algum grau de resistência aos antimoniais pentavalentes (Thakur *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 1998).

Diante do exposto, torna-se clara a necessidade de se realizarem estudos buscando a caracterização de isolados de *L. chagasi* provenientes de cães residentes em área endêmica para a LV. Deste modo, seria possível compreender o perfil diferencial de aspectos relacionados a infectividade e patogenicidade destes diferentes isolados.

1.1. Aspectos clínicos, histopatológicos e imunológicos da leishmaniose visceral humana e canina

A LV (também conhecida como calazar) representa a forma mais grave das leishmanioses e resulta da infecção de fagócitos a partir do local inicial da infecção (Van Griensven e Diro, 2012). Alguns estudos apontam os neutrófilos como veículo de disseminação dos parasitos no organismo hospedeiro (Laskay *et al.*, 2008). Trata-se de uma doença que pode apresentar formas clínicas diversas, variando de uma forma assintomática às formas oligossintomáticas e sintomática (Badaró *et al.*, 1986). Na forma assintomática, o indivíduo não apresenta história clínica aparente, mas apresenta teste sorológico positivo. A forma oligossintomática é caracterizada por alguns sintomas, tais como febre baixa, prostração, tosse seca e diarreia, sendo encontradas formas amastigotas no baço, fígado e órgãos hematopoiéticos. A forma sintomática é uma forma de evolução prolongada da doença, onde o paciente apresenta desnutrição, caquexia, edema generalizado. A multiplicação de parasitos nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea de pacientes com LV dá origem a hepatoesplenomegalia progressiva e supressão da medula óssea com ocorrência de febre irregular de longa duração, perda de peso, linfadenopatia, anemia, leucopenia, edema, epistaxe, hipergamaglobulinemia, hematêmese, e debilidade progressiva. Em consequência do estado clínico do paciente, geralmente evolui ao óbito, quando não tratada a tempo (Alencar e Neves, 1982).

Na LVC, o animal pode apresentar uma série de sinais clínicos como a onicogrifose (crescimento exagerado das unhas), lesões de pele (dermatite e ulcerações), opacificação do pêlo, linfadenopatia local ou generalizada, perda de peso, anemia,

conjuntivites, diarreia, apatia, caquexia, paresia dos membros posteriores e lesão renal, que culminam com a morte do cão (Mancianti *et al.*, 1988; Pumarola *et al.*, 1991; Solano-Gallego *et al.*, 2001; Giunchetti *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006; Baneth *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2009). De forma semelhante ao que ocorre em humanos, os sinais clínicos podem aparecer progressivamente, de maneira que a doença no cão evolui de uma forma clínica assintomática, relacionada ao controle do parasitismo, passando por uma forma intermediária oligossintomática, que evolui até uma forma clínica debilitante, sintomática, relacionada ao comprometimento do controle do parasitismo ocasionado pela imunossupressão (Mancianti *et al.*, 1988; Pinelli *et al.*, 1994b; Pinelli *et al.*, 1995; Reis, 2001; Giunchetti *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2006a; Reis *et al.*, 2006b; Reis *et al.*, 2006c; Giunchetti *et al.*, 2008a; Giunchetti *et al.*, 2008b). As formas clínicas mais graves da LVC estão associadas a um quadro hematológico com marcada leucopenia caracterizada por linfopenia, monocitopenia e eosinopenia. Aumento nos níveis de uréia e creatinina pode estar relacionado a insuficiência renal, com deposição de imunocomplexos em tecidos renais, constituindo uma manifestação patológica da LVC (Zatelli *et al.* 2003), assim também como alterações nas concentrações de enzimas aminotransferases séricas (TGO e TGP) podem indicar lesões de células hepáticas (Kaneko, 1997). Já entre os biomarcadores associados a resistência à infecção na LVC se destacam, principalmente, o aumento nos níveis de células T CD5⁺, T CD4⁺, T CD8⁺ e de células B CD21⁺ circulantes, presentes na forma clínica assintomática ou em cães com baixa carga parasitária na medula óssea (Reis *et al.*, 2006). Em se tratando de resposta imune compartimentalizada, cães naturalmente infectados apresentam, na pele, uma produção balanceada de citocinas do tipo 1 (proteção) e tipo 2 (progressão da doença), tendendo para uma maior produção de citocinas do tipo 2, principalmente IL-4, em cães com sinais clínicos e alto parasitismo (Brachelente *et al.*, 2005). Cães sintomáticos e com elevado parasitismo apresentam, em linfonodos, aumento da expressão de IL-10 e TGF- β , enquanto que cães assintomáticos e com baixa carga parasitária, apresentaram altos níveis de IFN- γ e TNF- α (Alves *et al.*, 2009). Estes resultados sugerem que o aumento da expressão de citocinas do tipo 1 (IFN- γ e TNF- α) ou citocinas do tipo 2 (IL-10 e TGF- β) em linfonodos, determinam a carga parasitária e a forma clínica em que o animal se encontra na LVC (Alves *et al.*, 2009). Lage *et al.* (2007) observaram que no baço existe um equilíbrio na produção de citocinas do tipo 1 e 2 em animais naturalmente infectados, com predomínio na produção de IL-10,

concomitantemente ao aumento do parasitismo e progressão clínica da LVC. Ainda no compartimento esplênico, Strauss-Ayali *et al.* (2007), demonstraram que a infecção por *L. infantum* estimula a expressão de um padrão misto de citocinas do tipo 1 e 2 e que o aumento da expressão de IL-4 está relacionada com a manutenção do parasitismo. De fato, durante a progressão clínica da LVC, o fígado e o baço de cães assintomáticos e sintomáticos apresentaram altos níveis de TGF- β 1, IL-10 e de IFN- γ (Corrêa *et al.*, 2007). Desta maneira, parece haver um consenso na literatura de que a resposta imune na LVC é o resultado de um padrão misto de citocinas tipo 1 e tipo 2, com predomínio de IL-4 ou IL-10 associadas a evolução do quadro clínico e aumento da carga parasitária em diversos órgãos.

Considerando a resposta imune humoral na LVC, diversos trabalhos foram realizados associando a progressão da doença com os níveis de imunoglobulinas. Bourdoiseau *et al.* (1997) e Vercammen *et al.* (2002) relataram que as formas clínicas assintomática e sintomática apresentam um aumento dos níveis de IgG total e de IgG2. Da mesma forma, Reis *et al.* (2006a) e Reis *et al.* (2006b) observaram que cães sintomáticos ou com alto parasitismo apresentaram níveis elevados de IgG total, IgG2, IgM, IgA e IgE, enquanto que cães assintomáticos ou com baixo parasitismo apresentaram níveis de IgG1 aumentados. Leandro *et al.* (2001) e Cordeiro-da-Silva *et al.* (2003) também documentaram que ocorre um aumento de IgG2 em cães sintomáticos. Porém, alguns autores mostraram que cães sintomáticos apresentam altas concentrações de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* em relação a cães assintomáticos (Nieto *et al.*, 1999). Desta forma, atualmente não há um consenso na literatura sobre qual isotipo de IgG estaria relacionado a resistência ou susceptibilidade a LVC (Day, 2007).

Já do ponto de vista parasitológico, é importante ressaltar que os níveis de carga parasitária em diferentes tecidos podem constituir também em um importante biomarcador de resistência e susceptibilidade na LVC. De acordo com Reis *et al.* (2006a) e Reis *et al.* (2006b), a pele, o baço e a medula óssea seriam os tecidos que melhor correlacionam a carga parasitária com o estado clínico da doença, sendo órgãos importantes para o diagnóstico parasitológico no cão.

1.2. Fatores que interferem na patogenia da infecção por *Leishmania*

A patogenia das leishmanioses resulta de fatores inerentes ao hospedeiro, ao vetor e ao parasito. Vários fatores relacionados ao hospedeiro interferem na patogenia

da infecção por *Leishmania*. Dentre eles podemos citar o sistema do complemento, o qual possui capacidade lítica de parasitos extracelulares, entretanto pode favorecer a infecção facilitando a sobrevivência de parasitos intracelulares pelo auxílio da fagocitose por macrófagos, via receptores de complemento (Mosser *et al.*, 1986). Os elementos celulares, tais como leucócitos polimorfonucleares e mononucleares e também células “Natural Killer” (NK) tem papel importante na modulação da infecção por *Leishmania*. Os leucócitos polimorfonucleares são importantes na fagocitose dos parasitos, com o auxílio de imunoglobulinas e sistema do complemento (Pearson, Steigbigel, 1981), embora novos estudos apontem os neutrófilos como importantes para favorecer a infecção, por manter parasitos fagocitados viáveis, permitindo a entrada dos mesmos de forma silenciosa em macrófagos que interagem com neutrófilos apoptóticos (Van Zandbergen *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 2009). A interação da *Leishmania* com o macrófago, sua célula hospedeira, envolve uma interação ligante-receptor que desencadeia uma série de reações bioquímicas, resultando na ativação ou inibição das funções microbidas (Liew *et al.* 1990).

Os vetores hematófagos também tem função importante na infecção. No momento do repasto sanguíneo, a saliva depositada no local contribui para o estabelecimento do patógeno, pela ação de compostos farmacologicamente ativos, tais como, anticoagulantes, fatores antiplaquetários, vasodilatadores, imunomoduladores e moléculas anti-inflamatórias (Charlab *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 1999; Kamhawi *et al.*, 2000; Lerner *et al.*, 1991). Titus & Ribeiro (1988) demonstraram que a saliva de *L. longipalpis* favorece a infecção por *L. major* em camundongos, aumentando tanto a carga parasitária, quanto o tamanho da lesão. Este estudo sustentou a hipótese de que a resposta imune induzida pela saliva de flebotomíneos facilitaria a proteção contra a infecção por *L. major* em camundongos. Theodos *et al.* (1991), também observaram que o extrato de glândula salivar (SGE) de *L. longipalpis* favorece a infecção de *L. mexicana amazonensis* e que o SGE de *P. papatasi* aumenta a infecção por *L. major*. Resultados semelhantes foram obtidos por Samuelson *et al.* (1991), onde houve exacerbação das lesões cutâneas e da carga parasitária em camundongos BALB/c desafiados com *L. braziliensis* associadas ao SGE de *L. longipalpis*. Entre os principais componentes da saliva de *L. longipalpis* se destaca o maxadilan, que foi descrito como responsável pela modulação do sistema imune e tem sido relatado que na presença de antígeno de *Leishmania*, inibe tanto a proliferação de linfócitos T, como o

estabelecimento de reação de hipersensibilidade tardia (Qureshi *et al.*, 1996), além de inibir a expressão de TNF- α em macrófagos e aumentar a produção de IL-6 (Soares *et al.*, 1998).

Em relação ao parasito, a espécie e a cepa, a carga parasitária infectante, a forma biológica e a via de inóculo empregadas (em caso de infecção experimental) tem papel importante no sucesso da infecção (Moreira *et al.*, 2012). Em um estudo de infecção experimental intraperitoneal em hamster com duas espécies de *Leishmania* (*L. chagasi* e *L. major-like*), foi observado maior carga parasitária no fígado e baço dos animais infectados com *L. chagasi*. Por outro lado, os animais infectados com *L. major-like* apresentaram nódulos de macrófagos discretamente parasitados nestes órgãos. Estes resultados mostraram comportamentos biológicos distintos de cepas isoladas da doença visceral (Laurenti *et al.*, 1988). Moreira *et al.* 2012, observaram melhor sucesso da infecção por via intracardíaca em hamsters, quando comparado a infecção por via intraperitoneal e intradérmica.

Além das diferenças de comportamento biológico entre diferentes espécies de *Leishmania*, é importante que sejam também consideradas as diferenças entre isolados distintos, que é o foco do presente estudo.

1.3. Aspectos epidemiológicos e ações de combate à leishmaniose visceral humana e canina

Do ponto de vista epidemiológico, na transmissão da *L. infantum* o homem não representa uma fonte de infecção aos flebotomíneos e a transmissão depende principalmente de cães infectados, que funcionam como reservatório do parasito (Lainson e Shaw, 1987). A importância epidemiológica do cão na transmissão da LV foi documentada inicialmente por Deane (1956) e Deane e Deane (1962), onde foi observada a participação do cão como reservatório doméstico e da raposa como reservatório silvestre (Deane 1956; Deane e Deane 1962). Estes estudos subsidiaram o estabelecimento de parte das medidas preconizadas pelo tripé de ações relacionados ao controle da LV, no que diz respeito sobre a importância do cão como reservatório e mantenedor do parasito no ambiente urbano. Deste modo, este tripé de ações considera como medidas fundamentais ao controle da LV, o tratamento de pacientes humanos, a aspersão de inseticidas piretróides no domicílio e peridomicílio onde houver casos da doença, além da eutanásia de cães sorologicamente reativos. Apesar destas medidas de

controle serem claras, o Ministério da Saúde não tem conseguido reduzir os casos humanos da LV a níveis aceitáveis (Lemos *et al.*, 2008; Harhay *et al.*, 2011), o que aponta para a necessidade de reavaliar a política de controle desta doença no Brasil (Costa e Vieira, 2001). A complexidade e diversidade dos cenários de transmissão do parasito, a falta de intervenções adequadas e devidamente validadas, bem como a falta de apoio político para o controle da doença em muitos países limitam o impacto das medidas de controle e prevenção existentes (Romero e Boelaert, 2010).

Perante as dificuldades na tentativa de combater a LV (Desjeux, 2004), entre as quais a identificação e eliminação de reservatórios (cães) no ambiente urbano, é cada vez mais comum o tratamento da LVC nas diferentes áreas endêmicas do Brasil. Entretanto, a questão envolvendo o tratamento canino é bastante controversa, uma vez que a intervenção terapêutica não elimina completamente os parasitos (Neogy *et al.*, 1994; Moreno *et al.*, 1999; Rhalem *et al.*, 1999; Baneth e Shaw, 2002; Nieto *et al.*, 2003; Noli e Auxilia, 2005; Saridomichelakis *et al.*, 2005; Pasa *et al.*, 2005; Vouldoukis *et al.*, 2006). Sendo assim, estes animais na maioria das vezes continuam a ser fonte de infecção para o vetor, contribuindo para a manutenção da LV (Alvar *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 2012; Laurentti *et al.*, 2013). Vale destacar que a proibição do tratamento da LVC (Portaria Interministerial - Ministérios da Saúde e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) - Nº 1.426, de 11 de julho de 2008) tem sido amplamente contestada. Em janeiro de 2013 o Tribunal Regional Federal da 3ª Região (TRF 3), em São Paulo, declarou ilegal a portaria interministerial que proíbe o tratamento de cães com LVC utilizando medicamentos de uso humano ou produtos não registrados pelo MAPA (Diário da Justiça Federal da 3ª Região, 2013). Porém, a liberação é contrária à posição do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), que manteve a orientação aos veterinários de não tratar animais que forem diagnosticados com a doença, ficando sujeitos a medidas repressivas. Mais recentemente, o MAPA aceitou o registro do medicamento Milteforan® 2% solução oral para cães (Virbac) no Brasil, que já era comercializado na Europa para tratamento da LVC, sendo o primeiro fármaco licenciado para esta finalidade em nosso país (Sistema Integrado de Produtos e Estabelecimentos Agropecuários – SIPEAGRO, <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/segaut> - setembro de 2016). Esta iniciativa permitirá o tratamento em todo o território nacional da LVC, embora não seja capaz de eliminar o parasito do organismo do animal infectado (Woerly *et al.*, 2009; Andrade *et*

al., 2011; Noli & Saridomichelakis *et al.*, 2014). Deste modo, é razoável imaginar que a impossibilidade de cura parasitológica na LVC, associada a pressão farmacológica, possa facilitar o surgimento de cepas de *L. chagasi* que apresentem resistência cruzada aos medicamentos destinados ao tratamento da doença humana.

De forma contrária, o tratamento da LVC é permitido na região do Mediterrâneo, onde a LV também é zoonótica, com os cães desempenhando importante papel como reservatório. Na Europa, medidas para proteger o cão contra a picada do inseto vetor são comuns, porém não há campanhas de controle desta doença, como ocorre no Brasil, visto que a leishmaniose visceral humana não é considerada problema de saúde pública (Dujardin *et al.*, 2008). Vale salientar que dentre alguns aspectos que diferenciam a situação social e epidemiológica de transmissão da LV na Europa em relação ao Brasil, se destacam particularidades encontradas Velho Mundo, como: (i) consciência da posse responsável por proprietários de cães; (ii) características epidemiológicas apresentando interrupção da transmissão da doença no inverno, e; (iii) pequeno número de casos humanos de LV, que estão restritos a paciente imunossuprimidos, como aqueles HIV positivos (Moreno, 2012 - comunicação pessoal).

Uma alternativa na tentativa de controlar a transmissão da doença consiste na vacinação dos cães. Vacinas contra LVC podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a infecção canina e impedir a infecção humana, levando a OMS a estimular o desenvolvimento de pesquisas que busquem vacinas contra LVC (O'Hagan & Valiante, 2003; Reis *et al.*, 2010). Neste sentido nosso grupo de pesquisa vem trabalhando no desenvolvimento de duas vacinas de primeira geração, (LBSap: composta por antígenos de *L. braziliensis* associado ao adjuvante saponina; e LBSapSal: mesma composição da vacina LBSap acrescida de extrato de glândula salivar de flebotomíneos) que revelaram grande potencial imunogênico por induzirem aumento dos níveis de linfócitos T (CD5+, CD4+ e CD8+) e B (CD21+) circulantes, elevada produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*, redução significativa da carga parasitária do baço, altos níveis de IFN- γ e IL-12 e reduzidos níveis de TGF- β (Giunchetti *et al.*, 2007; Giunchetti *et al.*, 2008c; Roatt *et al.*, 2012; Resende *et al.*; 2013; Aguiar-Soares *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2016).

Diante do exposto, considerando que o tratamento da LVC ainda não é capaz de induzir cura parasitológica em cães, e ao considerarmos a ocorrência da transmissão do parasito durante todo o ano em nosso país, é possível especular sobre a possibilidade de

ocorrer seleção de cepas mais resistentes nas áreas endêmicas para LV no Brasil. Considerando os relatos frequentes da resistência ao tratamento da LV humana aos medicamentos de escolha, é necessário o estudo de parasitos isolados em áreas endêmicas do Brasil, de modo que seja possível verificar a validade desta hipótese.

1.4. A resistência farmacológica relatada no tratamento da leishmaniose visceral e alternativas ao antimônio pentavalente

Uma das mais graves questões relacionadas ao tratamento da LV refere-se à aquisição de resistência aos fármacos empregados. Um dos fatores que provavelmente contribuem para esta situação, além do tratamento não esterilizante em cães, é a limitada variedade de medicamentos disponíveis para o tratamento da LV humana (Croft *et al.*, 2006; Sundar *et al.*, 2001; Singh, *et al.*, 2006; Sundar e Chatterjee, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Griesven *et al.*, 2010; Malteizou, 2010; Seblova *et al.*, 2014; Roatt *et al.*, 2014). Neste sentido, o surgimento de cepas resistentes enfatiza a importância da identificação de mecanismos diretamente envolvidos na resistência, assim como as mudanças fisiológicas que podem ocorrer nestes parasitos.

Por mais de seis décadas, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metil glucamina-Glucantime[®] e estibogluconato de sódio-Pentostan[®]) que são os medicamentos de primeira e segunda escolhas para o tratamento da LV (Murray, 2001; Croft *et al.*, 2006; Jha, 2006; Singh *et al.*, 2006; Sundar e Chatterjee, 2006; Ministério da Saúde, 2006; Croft e Olliaro, 2011). Entretanto, estas drogas são tóxicas, nem sempre são efetivas e são usadas em esquemas prolongados. Entre os efeitos colaterais podem ser citados pancreatite, nefrite, distúrbios gastrintestinais, hepáticos, cardiovasculares e respiratórios (Delgado *et al.*, 1999, Rath *et al.*, 2003, Jha, 2006, Ministério da Saúde, 2006).

Já a anfotericina B encapsulada em lipossomas (AmBisome[®]) tem mostrado bons resultados, com alta eficácia e toxicidade mínima para o hospedeiro sendo atualmente usada como droga de primeira linha no tratamento da LV na Europa e nos Estados Unidos, onde o custo das medicações não é fator limitante (Gradoni *et al.*, 2008; Roatt *et al.*, 2014). Mais recentemente, o Ministério da Saúde do Brasil ampliou o uso da Anfotericina B lipossomal (Roatt *et al.*, 2014).

O miltefosine[®], uma droga desenvolvida como um agente antitumoral, mostrou 95% de cura efetiva em estudo no calazar indiano. Esta droga apresenta a vantagem de

ser de uso oral e bem tolerada, embora seja potencialmente teratogênica, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrízes (Sundar *et al.*, 1998; Jha *et al.*, 1999; Sindermann *et al.*, 2004; Sundar *et al.*, 2006; Croft *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007; Sundar *et al.*, 2008).

As novas drogas, principalmente AmBisome® e Miltefosine®, têm mudado o perfil do tratamento da LV, mas o custo das novas terapias leva a diferentes práticas de tratamento, de acordo com a condição socioeconômica e cultural de cada região (WHO, 2010).

A resistência aos antimoniais tem sido relatada em muitas áreas endêmicas em todo o mundo, atingindo proporções epidêmicas no estado de Bihar, na Índia (Thakur *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 1998). Esta situação alarmante intensificou a investigação sobre os mecanismos relacionados à aquisição de resistência a drogas por *Leishmania*, bem como a pesquisa de novos fármacos menos tóxicos e mais eficazes (Thakur *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 1998; Sundar *et al.*, 2001; Murray, 2001; Seifert, 2011; Tempone *et al.*, 2011; Tiuman *et al.*, 2011; Fortin *et al.*, 2012; Seblova *et al.*, 2014). Um dos possíveis mecanismos de aquisição de resistência ao tratamento da doença está associado a um fenótipo multirresistente caracterizado pela superexpressão da P-glicoproteína, Pgp 170 (130 a 200 kDa) (Thakur *et al.*, 1991; Jha *et al.*, 1998; Sundar *et al.*, 2001; Messaritakis *et al.*, 2013). Esta proteína atua como uma bomba de efluxo transmembranar, inclusive para muitos fármacos, facilitando a sobrevivência dos parasitos (Riordan *et al.*, 1985; Coelho *et al.*, 2007; Mookerjee *et al.*, 2008).

Dentre os novos compostos que tem sido testados, pode ser citado o *oleylphosphocholine* (OLPC), um análogo estrutural da miltefosine, que apresentou resultados semelhantes aos encontrados para miltefosina *in vitro* e maior eficácia *in vivo*, em modelo hamster (Fortin *et al.*, 2012). Outro análogo da miltefosina que tem sido testado é o Edelfosine, que apresentou resultados promissores (Varela *et al.*, 2012). Em outro estudo, o composto de telúrio RF07 demonstrou capacidade de destruir a *L. infantum in vitro* e *in vivo*, com concentrações que não são tóxicas para o hospedeiro (Salerno Pimentel *et al.*, 2012). Buparvaquone (BPQ), um medicamento utilizado para o tratamento veterinário de teileriose, mostrou atividades promissoras contra parasitos protozoários, incluindo *Leishmania spp.* (Croft *et al.*, 1992). Entretanto, a baixa biodisponibilidade contribui para a eficácia limitada em modelos *in vivo* de LV (Croft *et al.*, 1992). A imunoterapia (Convit *et al.*, 1987; Badaro *et al.*, 1990; Squires *et*

al., 1993; Sundar *et al.*, 1995; Santos *et al.*, 2003; Jha, 2006; Mayrink *et al.* 2006; El-On, 2009) e o uso de terapias combinadas (Alvar *et al.*, 2006; Sing *et al.*, 2006; Chappuis *et al.*, 2007; Van Griensven e Boelaret, 2011; Roatt *et al.*, 2014) são alternativas que também tem sido testadas.

Apesar da crescente quantidade de estudos que avaliam novas opções de tratamento das leishmanioses, o conhecimento científico na área de imunofarmacologia viabilizando alternativas terapêuticas contra LV e LVC ainda é limitado, tendo em vista a reduzida quantidade de medicamentos disponíveis para o tratamento. De qualquer forma, é preciso que, nos países onde a doença é endêmica, as decisões relacionadas às alternativas terapêuticas levem em consideração a relação risco-benefício ao paciente, bem como a realidade dos serviços de saúde e preocupações relacionadas à aspectos epidemiológicos.

Neste sentido, é de fundamental importância que sejam feitos estudos que contribuam para elucidar mecanismos de resistência dos parasitos às drogas e que possam servir como instrumento na busca de métodos eficientes para o tratamento e prevenção da leishmaniose.

1.5. Importância da caracterização de isolados de *Leishmania*

Os primeiros estudos de caracterização de parasitos do gênero *Leishmania* tinham como objetivo central relacionar a espécie do parasito com a manifestação clínica em seu hospedeiro. Neste contexto, os métodos ainda eram limitados, principalmente no que diz respeito à identificação e caracterização das espécies dentro do gênero, uma vez que podem ocorrer variações de acordo com diversos fatores, assim como espécie ou sistema imune do hospedeiro e comportamento do vetor. Consequentemente, esses critérios não são confiáveis para o estabelecimento de *status* taxonômico (Grimaldi e Tesh, 1993).

Recentemente, vários estudos envolvendo técnicas bioquímicas e de biologia molecular foram introduzidos e ampliaram nosso conhecimento quando passaram a ser empregados novos marcadores que geraram caracterização taxonômicas mais acuradas, por meio de diagnósticos mais sensíveis e específicos (Lachaud *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2007; Locatelli *et al.*, 2014), que permitiram a distinção entre diferentes espécies e cepas do parasito (Martinez *et al.*, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Botilde *et al.*, 2006;

Montalvo *et al.*, 2008; Quaresma *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010; Cercarelli *et al.*, 2014).

Uma importante ferramenta para estudos taxonômicos e evolutivos destes parasitos refere-se à análise de isoenzimas. Os microrganismos que apresentam um mesmo perfil de isoenzimas formam um zimodema (Godfrey *et al.*, 1976). A distinção entre zimodemas é utilizada para classificação do gênero (Lanotte *et al.*; 1981; Rioux *et al.*, 1990). O primeiro estudo em *Leishmania* empregando-se esta técnica foi realizado por Gardener *et al.* (1974), onde foram observados diferentes tipos de perfis enzimáticos da malato desidrogenase. Estes estudos foram estendidos, posteriormente para as enzimas glicose fosfato isomerase, glicose 6-fosfato desidrogenase e 6-fosfoglicodesidrogenase (Chance *et al.*, 1978). Atualmente, este método é amplamente utilizado na identificação e classificação do gênero *Leishmania*, permitindo a discriminação entre espécies, devido ao considerável grau de diversidade enzimática entre espécies distintas (Miles *et al.*, 1981; Momen *et al.*, 1987; Grimaldi *et al.*, 1991). Hatam *et al.* (2012) observaram alta eficiência do sistema de isoenzimas na caracterização de amastigotas e promastigotas de *Leishmania tropica*. A variabilidade enzimática entre membros de um mesmo complexo é menor, ou até mesmo indetectável (Kreutzer e Christensen, 1980; Grimaldi *et al.*, 1991; Tibayrenc, 2009).

Outra importante ferramenta empregada para estudos taxonômicos e filogenéticos consiste no emprego da PCR, onde o grande volume de material genético amplificado, favorece a detecção do parasito, facilitando estudos de caracterização entre diferentes espécies (Degrave *et al.*, 1994). Neste sentido, variações da técnica, tais como PCR com iniciadores aleatórios (AP-PCR – *Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction*), na qual os produtos obtidos são conhecidos como RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) e Polimorfismo dos Fragmentos de Restrição (RFLP) possibilitam a distinção entre diferentes espécies e cepas do parasito (Martinez *et al.*, 2003; Volpini *et al.*, 2004; Andrade *et al.*, 2006; Botilde *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2006; Montalvo *et al.*, 2008; Quaresma *et al.*, 2009; Alimohammadian *et al.*, 2010). Outra variação da técnica de PCR refere-se à Repetições de Sequências Simples (*Simple Sequence Repeats* - SSR-PCR), caracterizada pela amplificação de repetições curtas (microssatélites) distribuídas em tandem no genoma (Estoup *et al.*, 1993; Tautz, 1989), com aplicação em estudos de variabilidade genética intra-específica (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1997; Volpini *et al.*, 2001).

Além disso, estudos genéticos revelaram aspectos interessantes da biologia molecular de parasitos do gênero *Leishmania*, culminando com a identificação e clonagem de genes que podem estar relacionados à capacidade da infecção gerar sintomas e sinais da doença (patogenicidade) bem como efeitos graves no hospedeiro. Tais genes podem ser potenciais alvos na busca do desenvolvimento de vacinas e novas alternativas para o tratamento (Lohman *et al.*, 1990; Murray *et al.*, 1990). Segundo Chang e McGwire (2002), o fenótipo virulento é um espectro de manifestações desde a infecção assintomática até a fatalidade. Neste sentido, estudos relacionados a fatores de virulência e patogenicidade, tais como a habilidade do parasito em sobreviver a mudanças drásticas de ambiente na célula hospedeira, bem como as moléculas envolvidas, são de fundamental importância (Joshi *et al.*, 2005; Zufferey e Bem Mamoun, 2006). Entre os mecanismos utilizados para a sobrevivência de parasitos do gênero *Leishmania* nos hospedeiros, está expressão de gliconjugados regulados, relativos ao seu desenvolvimento biológico (Turco *et al.*, 2001). Em promastigotas, o mais abundante glicoconjugado de superfície celular é o lipofosfoglicano (LPG), que tem sido implicado em importantes passos do ciclo de vida de *Leishmania* (Handman, 1999). Estudos com *Leishmania major* mostraram que a forma mutante LPG⁽⁻⁾ tem virulência atenuada em infecções em flebotomíneos, camundongos e em macrófagos *in vitro* (Sacks *et al.*, 2000; Spath *et al.*, 2000). É importante mencionar que o estudo da expressão gênica permite obter um perfil molecular e fornece oportunidades para identificação de importantes alterações que ocorrem no nível de RNA.

Considerando que a resistência às drogas é um grande problema na quimioterapia da leishmaniose, estudos que empregam técnicas de biologia molecular também podem ser utilizados para este tipo de investigação (Duncan *et al.*, 2011). Em um estudo onde foram selecionadas populações de promastigotas de *L. amazonensis* resistentes ao antimonial, a expressão gênica dos mutantes foi estudada usando microarranjos de DNA. A expressão de RNA dos parasitos resistentes ao antimônio revelou superexpressão de genes envolvidos na resistência à droga (Do Monte-Neto *et al.*, 2011). Entretanto, a falta de concordância entre a concentração dos transcritos e de proteínas, bem como as alterações pós traducionais com consequentes alterações de funções proteicas (Paape e Aebischer, 2011), podem ser fatores limitantes em alguns estudos.

Como a regulação da expressão de proteínas, em tripanossomatídeos, ocorre, principalmente através de modificações pós-transcricionais (Paape e Aebischer, 2011), uma importante ferramenta para complementar os estudos genômicos consiste no emprego da proteômica. O termo proteômica foi inicialmente usado em 1995 e definido como sendo a caracterização em larga escala do conjunto de proteínas (proteoma) em uma célula ou tecido (Wilkins *et al.*, 1997). Esta metodologia possibilita elucidar componentes de proteínas totais de uma determinada população celular através do uso de tecnologias de separação de proteínas, combinadas com espectrometria de massas e sequenciamento do genoma (Serruto e Rappuoli, 2006; Da Fonseca Pires *et al.*, 2014). Neste sentido, a proteômica pode gerar informações tais como: quais e em que níveis determinadas proteínas são expressas, momento de expressão destas proteínas, modificações pós-traducionais, respostas expressas pelas células em diferentes situações ou tratamentos, diferenças moleculares entre linhagens de células e interação gênica (Paape *et al.*, 2010).

Várias pesquisas levaram à gradual melhoria da metodologia para estudar o proteoma de parasitos. Como exemplos, podem ser citados trabalhos que possibilitaram a identificação de proteínas provenientes de parasitos lisados do gênero *Leishmania* (Acestor *et al.*, 2002), bem como a obtenção de mapas detalhados do proteoma com a utilização de géis bidimensionais (2D) (Gongora *et al.*, 2003; Brobey *et al.*, 2006). A separação de proteínas pela eletroforese em gel 2D ocorre pela utilização de dois parâmetros independentes: ponto isoelétrico (PI) na primeira dimensão e massa molecular na segunda dimensão. Sendo assim, os diferentes *spots* de proteínas obtidos podem ser removidos do gel, digeridos a peptídeos e identificados usando espectrometria de massas após análise dos espectros em bancos de dados (Steen e Mann, 2004).

As análises proteômicas em *Leishmania* podem ser utilizadas para estudos de expressão diferencial de proteínas com distintas abordagens e objetivos. Em um estudo do exoproteoma de *L. infantum*, onde soros de cães naturalmente infectados e portadores de diferentes formas clínicas foram utilizados para testes de imunogenicidade, foi observada a possibilidade de discriminar animais sintomáticos daqueles que possuem outras formas clínicas da doença (Braga *et al.*, 2014). Outra aplicação consiste no rastreamento de proteínas para uso em diagnóstico e desenvolvimento de vacinas (Costa *et al.*, 2010; Paape e Aebischer, 2010), bem como

alvo terapêutico (Paape e Aebischer, 2010). Em um estudo de identificação de fatores de virulência em cepas de *L. infantum* através de abordagem proteômica, foi verificado que a virulência pode ser um resultado do aumento da expressão de KMP-11 e metalopeptidase, associadas com uma melhor interação parasito-hospedeiro e com a degradação de proteínas e peptídeos do hospedeiro, respectivamente (Pires da Fonseca *et al.*, 2014). Neste sentido, diversos estudos tem sido utilizados na tentativa de elucidar mecanismos de resistência à drogas, com o uso da proteômica comparativa entre parasitos susceptíveis e resistentes.

Entretanto, embora as técnicas citadas forneçam meios para classificar e caracterizar organismos, é importante uma abordagem mais ampla, agrupando dados bioquímicos e moleculares a outras características das espécies de *Leishmania*, tais como o perfil de infectividade e manifestação clínica. Neste sentido, o presente estudo busca contribuir com informações que poderão ampliar o conhecimento relacionado com diferenças entre isolados distintos, com potencial para aplicação em estratégias profiláticas e terapêuticas. Além disso, este trabalho serve como ponto de partida para futuras investigações, inclusive análises proteômicas, que visem comparar a expressão diferencial de proteínas entre isolados.

2. Justificativa

A leishmaniose visceral é endêmica em muitas regiões do Brasil. A necessidade da erradicação de cães infectados é indicada pelo Ministério da Saúde pelo fato destes animais serem os reservatórios domésticos do parasito, ameaçando as populações humanas. Entretanto, até recentemente, mesmo sendo proibido, o tratamento de cães com LV vinha sendo amplamente praticado em nosso país de forma ilegal. Concomitantemente, tem sido observado um crescente número de casos de pacientes humanos refratários ao tratamento da LV com os antimoniais pentavalentes que consistem no medicamento de escolha. Tendo em vista essa situação, torna-se importante realizar um estudo sobre a caracterização de isolados de *L. chagasi* oriundos de cães, buscando identificar aspectos relacionados à infectividade e patogenicidade, bem como investigar a possível resistência destes parasitos às drogas utilizadas no tratamento humano da LV. Neste contexto, o presente trabalho busca contribuir com a identificação de perfis distintos de infectividade e patogenicidade dos diferentes isolados, possibilitando futuros estudos que possam revelar proteínas importantes associadas à progressão da infecção que, além de revelarem a presença de um perfil diferencial da interação parasito-hospedeiro, poderão compor alvos de testes diagnósticos e vacinais.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar a infectividade e patogenicidade de diferentes isolados de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* obtidos de cães naturalmente infectados.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar a identificação em nível molecular de amostras de *Leishmania* obtidas a partir da medula de cães com leishmaniose visceral provenientes de área endêmica (Belo Horizonte);
- Selecionar isolados de *L. chagasi in vitro* com características de alta e baixa infectividade em macrófagos imortalizados de cães;
- Avaliar em hamsters o perfil da infecção com os diferentes isolados previamente selecionados *in vitro*, considerando as seguintes análises:
 - ✓ Taxa de sobrevivência;
 - ✓ Presença de sinais clínicos;
 - ✓ Hemograma;
 - ✓ Quadro bioquímico;
 - ✓ Infiltrado inflamatório no fígado;
 - ✓ Carga parasitária no fígado e baço;
- Avaliar em hamsters o perfil da infecção com os diferentes isolados previamente selecionados *in vitro*, na presença da intervenção com Glucantime®, considerando as mesmas análises avaliadas no item anterior.

4. Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em Experimentação Animal da UFOP, cujo protocolo refere-se ao número 2012/37, em anexo. Além disto, todos os isolados utilizados neste estudo fazem parte do criobanco do Laboratório de Imunopatologia, da Universidade Federal de Ouro Preto, e foram obtidos por ocasião de um estudo de área endêmica (Belo Horizonte) realizado pela equipe deste laboratório (Coura-Vital *et al.*, 2011; Coura-Vital *et al.*, 2013a; Coura-Vital *et al.*, 2013b).

4.1. Delineamento experimental

As atividades relacionadas aos experimentos deste estudo estão representadas, de forma sucinta, no Fluxograma 1. Desta forma, foram utilizados parasitos isolados a partir da medula óssea de cães residentes em área endêmica. Após caracterização molecular para confirmação da espécie *L. chagasi* como agente etiológico, estes isolados passaram por uma seleção para escolha do mais e menos infectivo *in vitro*. Os isolados selecionados prosseguiram para os estudos das fases seguintes, onde foi feita a avaliação do curso da infecção (inclusive na presença de tratamento com Glucantime®) em hamster. Cada etapa está descrita de forma detalhada nos tópicos seguintes.



Fluxograma 1: Delineamento experimental esquemático das principais atividades realizadas neste estudo.

4.2. Isolamento dos parasitos

O isolamento dos parasitos foi realizado a partir da punção de medula óssea conforme metodologia descrita por Penny *et al.* (1970). Os animais foram sedados com cloridrato de xilazina 2%, (Anasedan®, Vetbrands, Brasil), na dosagem de 0,1 mL/Kg (equivalente a 2mg/Kg) por via intravenosa. Após cerca de 2 minutos, foi administrado o anestésico geral Tiopental Sódico diluído a 2,5% (Thiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Brasil) em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e aplicado na dose de 0,3 mL/Kg (equivalente a 7,5mg/Kg), por via endovenosa, sendo o cão monitorado por médico veterinário até a indução da anestesia geral. Constatado o estado de anestesia geral, o cão foi posicionado em decúbito lateral, para a coleta da medula óssea na crista da tíbia. Imediatamente antes da coleta foi realizada a tricotomia no local da punção, seguido de anti-sepsia com cerca de 5mL de Polivinil Pirrolidona Iodo 10% (PVPI Tópico), seguido de remoção deste degermante com cerca de 10mL de álcool 70%. Posteriormente, com auxílio de agulha 18G (40x12) acoplada

em uma seringa descartável (BD Plastipak®, Becton Dickinson Ltda, Brasil) de 20 mL, foi posicionada verticalmente na crista da tíbia e, por meio de movimentos rotatórios, foi exercida uma pressão até atingir a cavidade medular. Posteriormente, procedeu-se à aspiração do material medular, em um volume máximo de 1 mL de medula óssea por animal. Imediatamente, após a retirada da agulha, uma a duas gotas do aspirado medular foi transferido para tubos de vidro contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT próximo ao bico de Bunsen, para evitar contaminação. Para cada animal foram feitos três tubos previamente identificados. Os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 7 dias. Após este período as culturas foram examinadas, através da confecção de duas lâminas, por microscopia óptica a fim de se identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubo e repassado para um novo tubo contendo 3 mL do meio de cultura NNN/LIT e após 7 dias foi feita uma nova avaliação, através de observação em microscópio. Nos casos em que houve a observação do parasito, estas culturas foram expandidas em meio de cultura NNN/LIT, e posteriormente foram criopreservadas.

Os isolados obtidos a partir dos cães 614 e 616 foram escolhidos a partir dos resultados obtidos nos estudos *in vitro* e utilizados também nos estudos *in vivo*, conforme detalhado adiante. O cão 614 encontrava-se bastante debilitado e apresentava muitos sinais clínicos típicos de LVC. Já o cão 616 apresentava poucos sinais, sendo considerado oligossintomático (Figura 1).



Figura1: Cães dos quais foi feito o isolamento das cepas 614 (painel superior) e 616 (painel inferior). O cão 614 apresentou emagrecimento moderado, lesões dermatológicas generalizadas com hipotricose, e, em muitas regiões a presença de alopecia, como próximo às orelhas e região orbital. O cão 616 apresentou emagrecimento leve e alopecia restrita a região das orelhas.

4.3. Caracterização molecular dos isolados obtidos

4.3.1. Preparação das massas de *Leishmania*

Os isolados obtidos de cães naturalmente infectados, bem como a cepa de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) PP75 (MHOM/BR/1974/PP75) e a cepa OP46 (MCAN/BR/2008/OP46), foram expandidos em meio LIT e cultivados em estufa biológica BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os isolados foram utilizados sem que houvesse passagem por outro animal antes da realização dos experimentos. Os parasitos foram cultivados por 7 dias, sendo homogeneizados diariamente. A quantidade de parasitos foi expandida, na proporção cultura por meio de cultura de 1:3, através de repiques sucessivos, na fase logarítmica de crescimento, em tubos de vidro de 3 mL, e posteriormente em Erlenmeyers de 25

mL, 50 mL e 500 mL, respectivamente, para a obtenção final de 1×10^{10} células/isolado. Após o sétimo dia do último repique, uma alíquota de aproximadamente 20 μ L de cada parasito foi removida em capela de fluxo laminar para realização da contagem em Câmara de Neubauer. Após a contagem e verificação do número de parasitos desejado, as culturas foram transferidas para tubos de 50 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação em 3.800g, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso em solução PBS estéril pH 7,2. As células foram lavadas e centrifugados por 3 vezes (3.800g, durante 10 minutos a 4°C) em solução de PBS. A massa úmida obtida foi estocada em freezer sob temperatura -80°C, até o momento da caracterização molecular.

4.3.2. Extração de DNA

Para obtenção do DNA das amostras, foi utilizado o kit de extração Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Dessa forma, as massas de parasitos armazenadas a -80°C foram descongeladas para a retirada de uma alíquota de 200 μ L. A este volume foi adicionado 700 μ L de solução de lise celular, e, em seguida, a amostra foi homogeneizada por 10 minutos e centrifugada a 15.000g por um minuto em microcentrífuga (Eppendorff- Modelo 5418, NY, USA). Posteriormente foi descartado o sobrenadante e o precipitado agitado com o auxílio de vortex (Vision Scientific®, Korea) por 15 segundos. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de solução de lise nuclear e 75 μ L de solução de precipitação proteica. Novamente, com o auxílio do vortex, a amostra foi homogeneizada por 30 segundos e centrifugada a 15.000g por três minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 200 μ L de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Em seguida, a amostra foi homogeneizada por aproximadamente 30 segundos. Após este procedimento, a amostra foi centrifugada a 15.000g por um minuto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente levado ao vortex por 15 segundos. Posteriormente foi acrescentado 200 μ L de etanol a 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha) sendo a amostra homogeneizada e centrifugada a 15.000g por um minuto. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e a amostra foi deixada por 35 a 45 minutos em temperatura ambiente (TA) até total evaporação do etanol. Finalmente, foram adicionados 100 μ L de solução de hidratação e as amostras foram mantidas por 24 horas a temperatura ambiente, sendo periodicamente

homogeneizadas. Após este período, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e início da reação de PCR.

4.3.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da reação de PCR foi empregado o par de iniciadores (150) 5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA-3' e (152) 5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C-3', direcionados para amplificação da região conservada dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* (Degrave *et al.*, 1994). A mistura da reação constituiu-se de: tampão 1x (Invitrogen®, SP, Brazil), 1,5 mM de MgCl₂, 2,0 μM de dNTPs, 1,0 pmol de cada iniciador (150 e 152), 0,76 U Taq DNA polimerase (Fermentas - Sinapse®), 2,5 μL DNA e H₂O Milli Q totalizando 12,5 μL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). As condições utilizadas na reação de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C por um minuto, seguida por 40 ciclos a 93°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto, 72°C por um minuto e uma extensão final a 72°C por sete minutos. O equipamento utilizado foi o termociclador Verit Thermal Cycler 96well (Applied Biosystems®, Califórnia, USA). Após amplificação, 5μL do produto obtido foram ressuspensos em um volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol) e aplicados em gel de poliacrilamida. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida a 8%, a 40mA em TBE (Tris-base a 89mM pH 8,0; ácido bórico a 89mM, EDTA a 2mM) em um sistema de cubas. Foi utilizado como marcador de tamanho molecular o DNA do bacteriófago fX 174 digerido pela enzima Hae III (Pharmacia, San Francisco, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados por nitrato de prata 0,2% (Santos *et al.*, 1993).

4.3.4. Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)

Após a realização da PCR, foi realizada a RFLP mkDNA conforme (Volpini *et al.*, 2004). Resumidamente, 5μL do produto da PCR foi digerido, após incubação por 3 horas a 37°C, por 1 U da enzima Hae III em seu tampão de uso 1x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e H₂O Milli Q totalizando 15 μL por poço da placa (MicroAmp® Fast Optical 96-Well, Applied Biosystems). Os fragmentos de restrição foram separados em gel de poliacrilamida a 10%, onde foi aplicado 4 μL do produto restringido em um

volume equivalente de tampão da amostra 2X (azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25% e 15% de ficol). A corrida eletroforética foi realizada a 40mA em TBE (Tris-base a 89 mM pH 8,0; ácido bórico a 89 mM, EDTA a 2 mM). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, os géis foram corados por nitrato de prata 0,2% (Santos et al., 1993).

4.4. Avaliação da infectividade *in vitro*

4.4.1. Infecção de macrófagos caninos (DH82) com *Leishmania chagasi*

Com a finalidade de avaliar se há perfil diferencial de infectividade e selecionar o isolado mais e o menos infectivo *in vitro*, macrófagos caninos imortalizados da linhagem DH82 (ATCC® CRL-10389™, USA) foram infectados com cada um dos isolados obtidos. Para isso, macrófagos DH82 foram mantidos em garrafa (Nunc, Roskilde, Denmark) com 60% da capacidade de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), equivalente a 7 mL de meio, sendo a capacidade do frasco de 70 mL, que foram transferidos no momento em que a confluência aproximada era de 90%, para um tubo de 15 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA). Posteriormente, foi realizada a contagem em câmara de Neubauer, e o volume contido no tubo foi ajustado com meio RPMI com SFB 10% (Vitrocel Embriolife, Campinas, SP) para conter 10^5 macrófagos/mL, que foi a concentração utilizada em cada poço da placa de 24 poços (Nunc, Roskilde, Denmark), onde lamínulas foram posicionadas no fundo de cada poço. Após o tempo de 3h, suficiente para a adesão dos macrófagos à placa, o meio RPMI com SFB 10% foi retirado da placa e substituído por 1 mL de RPMI com SFB 10% contendo o parasito na proporção determinada (1 macrófago : 4 promastigotas e 1 macrófago : 10 promastigotas). A contagem do parasito também foi realizada com a utilização de câmara de Neubauer. O volume foi ajustado de forma que a quantidade fosse suficiente para adicionar 1 mL em cada poço da placa de 24 poços contendo 4 e 10 vezes a mais de parasitos em relação à quantidade de macrófagos. Em seguida, foi feita a incubação em estufa de CO₂ para avaliação da fagocitose dos parasitos nos tempos 3h, 24h e 48h após a infecção. Após o tempo de 3h pós-infecção, o sobrenadante de todos os poços foi removido, e foi feita uma lavagem com RPMI. Os poços referentes aos demais tempos de avaliação foram completados com 1 mL de RPMI com SFB 10% e os poços referentes ao tempo de 3h pós-infecção tiveram as lamínulas removidas, com o auxílio

de uma agulha. Esse procedimento foi feito com os demais poços em seus respectivos tempos de avaliação, após remoção do sobrenadante. Após secagem, as lamínulas foram coradas com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e após nova secagem foram aderidas com entelan (Merck, Alemanha) em lâminas. Com o auxílio de um microscópio (Olympus Optical, Japan), na objetiva com aumento de 100x, foi realizada a contagem do número de amastigotas em um total de 100 macrófagos. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.2. Infecção de macrófagos (DH82) com *Leishmania chagasi* marcada com CFSE

A preparação dos macrófagos foi realizada da mesma forma descrita no item anterior. Após a contagem, estas células foram incubadas em estufa de CO₂ juntamente com a *Leishmania* marcada com CFSE nos tempos de 3h e 24h após infecção.

Para a marcação da *Leishmania*, foi adicionado CFSE (Vybrant® CFDA SE Cell tracer kit, Invitrogen), na concentração de 2,8µg/mL, seguido de incubação por 10 minutos, em banho Maria, a 37⁰C, protegido da luz. Em seguida, ao tubo de 15 mL (Falcon®, Becton Dickinson, EUA) contendo *Leishmania* em fase estacionária de cultivo, foi adicionado CFSE, e completado o volume com 15 mL de RPMI 1640 (Gibco) com 10% SFB. Após incubação em gelo por 10 minutos, foi realizada duas etapas de lavagem com 15 mL de RPMI, centrifugando os tubos a 400 x g desprezado o sobrenadante, ressuspensando em seguida o sedimento em 1 mL de RPMI 1640. Em seguida, após contagem do parasito em câmara de Neubauer, o volume foi ajustado de modo a conter 10⁵ promastigotas de *Leishmania*/mL. Deste modo, foram utilizadas as proporções de 1 macrófago : 4 promastigotas e 1 macrófago : 10 promastigotas. Em seguida, foi feita a incubação da *Leishmania* marcada juntamente com o macrófago em estufa de CO₂ a 37⁰C, por 3h e 24h em tubos de poliestireno (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) de 12x75mm, com capacidade para 5mL, para que não ocorresse adesão dos macrófagos. Após o tempo de incubação, foi adicionado 2 mL de PBS 10% (Phosphate-Buffered Saline) para lavar os tubos, centrifugando-os a 400 x g e descartando o sobrenadante. Finalmente, o sedimento foi ressuspensado em 200 µL de solução fixadora Max Facs Fix – MFF (10,0g/L de paraformaldeído; 10,2g/L de cacodilato de sódio; 6,65g/L de cloreto de sódio; pH 7,2) e procedeu-se à leitura em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Mountain View, CA). Os dados obtidos foram analisados através do programa FlowJo 7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland,

OR, USA). Os resultados referentes à infecção de macrófagos DH82 pelas diferentes cepas de *L.chagasi* marcadas com CFSE foram obtidos através da frequência (%) de macrófagos DH82 CFSE⁺. A análise da frequência de macrófagos DH82 CFSE⁺ (infectados) foi realizada utilizando-se a estratégia de análise convencional. Esse tipo de análise consistiu na seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfométricos, através de gráficos de distribuição pontual de FSC versus SSC (Figura 2A). Após a seleção da região de interesse (R1) contendo os macrófagos DH82, o percentual de macrófagos DH82 CFSE⁺(Q3), dentro da população selecionada, foi obtido em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência F L1/CFSE versus FL4 como exemplificado na Figura 2.

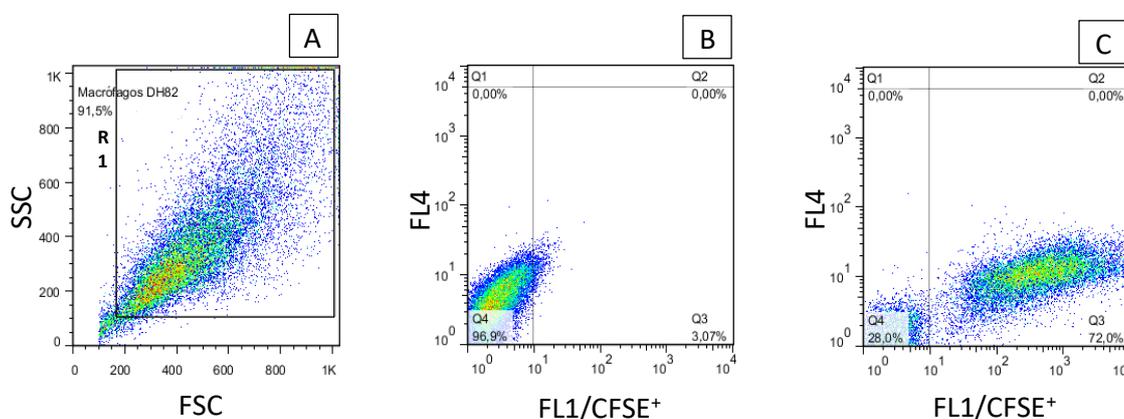


Figura 2: Sequência de procedimentos utilizados para quantificar o percentual de macrófagos DH82 infectados com diferentes cepas de *L. chagasi* marcadas com CFSE *in vitro*. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população celular de interesse - R1 (macrófagos DH82). (B e C) Gráficos de distribuição pontual contendo as células (macrófagos DH82) selecionadas na região R1, empregados para quantificar o percentual das populações de macrófagos DH82 infectados/CFSE⁺ (FL1 versus FL4). Os gráficos de distribuição pontual estão divididos em quatro quadrantes (Q1, Q2, Q3 e Q4), com as respectivas frequências (%) correspondentes a cada quadrante. (B) Controle negativo: apenas macrófagos DH82. (C) Percentagem de macrófagos DH82 infectados por *L.chagasi* marcadas com CFSE

4.5. Avaliação da infecção por *Leishmania in vivo*

4.5.1. Grupos experimentais

Após selecionados os isolados mais e menos infectivos *in vitro*, foi realizada a infecção experimental em hamsters. Os procedimentos foram realizados no CCA

(Centro de Ciência Animal) da UFOP. Sendo assim, 50 hamsters (machos) com idade aproximada de 30 dias foram inoculados, por via intracardíaca, com 200µL de solução salina estéril a 0,85% contendo 10^7 parasitos, ou apenas a solução salina estéril a 0,85%, distribuídos nos seguintes grupos:

Grupo controle (C): 10 hamsters - receberam solução salina estéril a 0,85%;

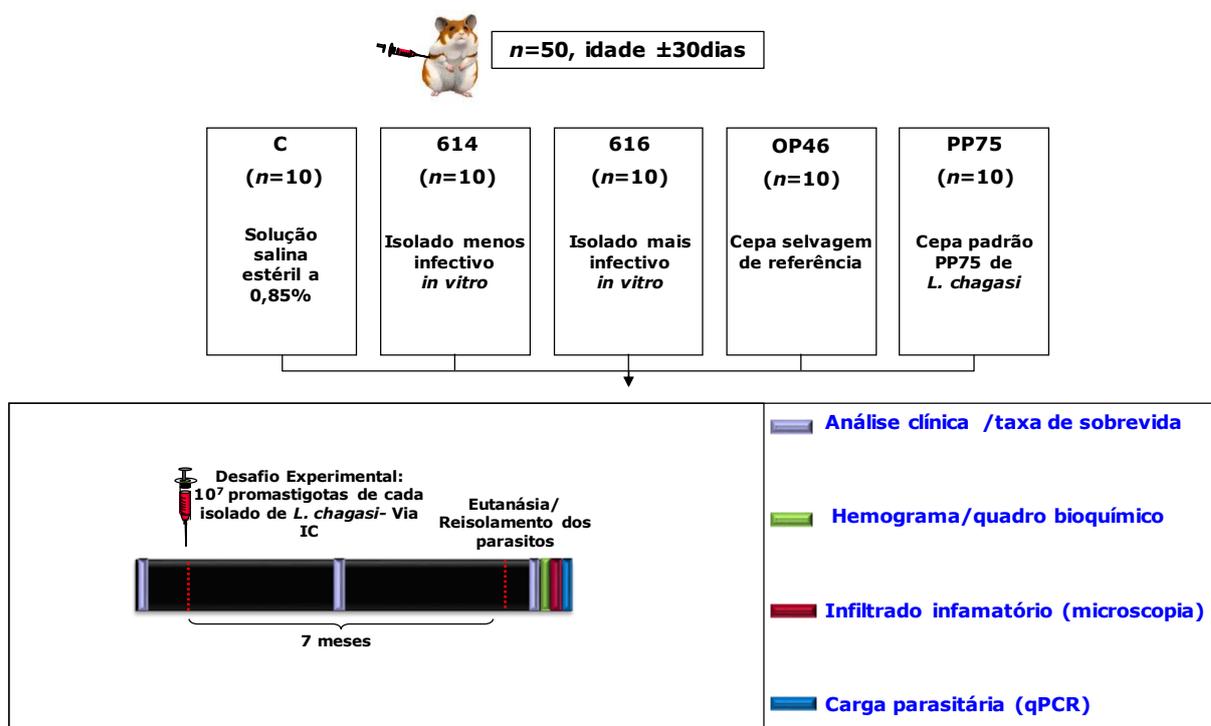
Grupo PP75 (PP75): 10 hamsters - receberam uma aplicação da cepa padrão PP75 (MHOM/BR/74/PP75);

Grupo OP46 (OP46): 10 hamsters - receberam uma aplicação da cepa OP46 (MCAN/BR/2008/OP46);

Grupo 614 - parasito pouco infectivo (614): 10 hamsters - receberam uma aplicação dos parasitos classificados *in vitro* como menos infectivos nos testes *in vitro*;

Grupo 616 - parasito mais infectivo (616) 10 hamsters - receberam uma aplicação dos parasitos classificados *in vitro* como mais infectivos nos testes *in vitro*.

As atividades realizadas estão representadas de forma esquemática no Fluxograma 2.



Fluxograma 2: Delineamento experimental esquemático das atividades realizadas na etapa de estudo *in vivo* em hamster.

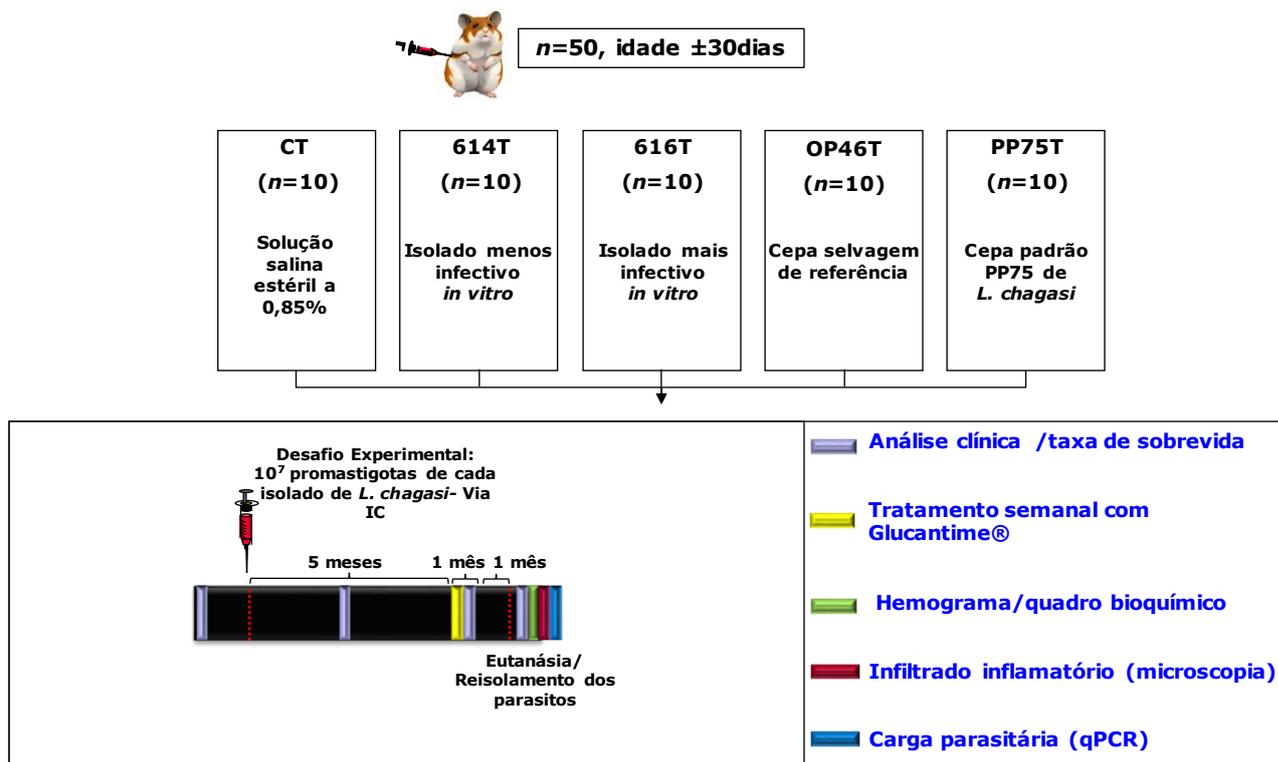
4.5.2. Infecção experimental

Para a realização da infecção experimental, as promastigotas de *L. chagasi* (cepas PP75, OP46, isolados mais e menos infectivos *in vitro*) foram descongeladas e distribuídas, sob condições estéreis, em *Erlenmeyers* contendo meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Para obtenção das formas promastigotas, em fase estacionária de crescimento, a cultura foi expandida a partir de um inóculo de 10 mL de meio LIT contendo entre 10^7 a 10^8 promastigotas/mL de *L. chagasi* em crescimento logarítmico. Aos parasitos foram adicionados 40mL de meio de cultura LIT e distribuídos em condições estéreis em capela de fluxo laminar (Veco, Campinas, São Paulo, Brasil), sendo acondicionados, em seguida, a temperatura de 23°C. Após sete dias do inóculo inicial, foi realizado o primeiro repique, depois de constatadas a viabilidade e ausência de agentes contaminantes com auxílio do microscópio óptico. Os 50mL de cultura foram distribuídos em cinco *Erlenmeyers* nas mesmas condições do inóculo inicial (10mL de cultura em 40mL de meio LIT). Ao término dos sete dias, foram obtidos 250mL da cultura, na concentração de 10^7 a 10^8 promastigotas/mL. A cultura foi removida em capela de fluxo laminar e transferida para tubos estéreis de polipropileno de 50mL (Falcon, Becton Dickinson, EUA), que foram submetidos à centrifugação a 900 x g durante 15 minutos em temperatura ambiente. O sedimento de promastigotas foi homogeneizado em solução salina estéril (NaCl 0,85%), e, em seguida, foi realizada a centrifugação na mesma condição, repetindo o procedimento de lavagem por mais uma vez. Após as etapas de lavagem, realizou-se a contagem do número de promastigotas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e o volume foi ajustado para que cada 200 µL de salina tivesse aproximadamente 10^7 parasitos. O inóculo foi realizado em hamsters (*Mesocricetus auratus*), por via intracardíaca.

4.5.3. Tratamento com Glucantime®

Os grupos de animais que foram submetidos a intervenção com Glucantime® foram infectados da mesma forma que os animais dos grupos descritos anteriormente. Para diferenciar dos grupos anteriores, foi utilizada a letra “T”. Dessa forma, os grupos são os seguintes: CT (n=10), PP75T (n=10), C46T (n=10), 614T (n=10) e 616T (n=10).

Após cinco meses de infecção, foi iniciado o tratamento com Glucantime®, o qual foi feito em doses semanais de 20mg/kg/dia por via intramuscular durante um mês, de acordo com Pal *et al.* (2002). A dose escolhida foi propositalmente baixa, para evitar cura parasitológica, porém permitir que os parasitos fossem submetidos a uma pressão medicamentosa. Os animais foram necropsiados um mês após o término do tratamento. As atividades realizadas estão representadas de forma esquemática no Fluxograma 3.



Fluxograma 3: Delineamento experimental esquemático das atividades realizadas na etapa de estudo *in vivo* em hamster, na presença de pressão medicamentosa com Glucantime®.

4.5.4. Taxa de sobrevivida e sinais clínicos

Para a determinação da taxa de sobrevivida, os animais foram acompanhados do início até o término do período experimental, totalizando um período de sete meses, através de visitas diárias, em que eram realizadas vistorias, contado o número de hamsters, para determinação da taxa de sobrevivida. A presença de eventuais alterações clínicas foi anotada durante todo o período do estudo.

4.5.5. Necropsia e obtenção do material biológico

Para os procedimentos de eutanásia dos hamsters foi realizada a administração de anestésico (tiopental sódico 2,5%) na dose de 30 mg/kg, por via intraperitoneal. Uma vez constatado o plano anestésico, foi feita a coleta de sangue do coração e, em seguida, foi administrada a dose letal de anestésico (80 mg/kg). Imediatamente após a comprovação da morte, os animais foram pesados individualmente, identificados por grupo, fotografados e, em seguida, iniciados os procedimentos de necropsia e obtenção do material biológico. Os hamsters foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio de uma tesoura cirúrgica. O fígado e baço foram removidos de forma asséptica, analisados macroscopicamente e um fragmento com aproximadamente 20mg do baço foi removido para isolamento do parasito em 2 mL de meio LIT, próximo à chama de fogo proveniente do bico de Bunsen. Baço e fígado foram subdivididos em fragmentos de aproximadamente 20mg, sendo estes destinados a: preservação em formol tamponado a 10% pH 7,2 para avaliação histopatológica e armazenameto de fragmentos em freezer -80°C para avaliação por qPCR. Os fragmentos para qPCR foram retirados e envoltos em papel alumínio autoclavado, identificados e imediatamente imersos em nitrogênio líquido onde permaneceram até o fim da necropsia. Após conclusão do procedimento da necropsia os fragmentos foram retirados do nitrogênio e armazenados em freezer a temperatura de -80°C até o momento da extração de DNA total utilizado para avaliação da carga parasitária por qPCR.

4.5.6. Re-isolamento dos parasitos a partir de amostras de órgãos dos hamsters experimentalmente infectados

Para possibilitar a obtenção dos isolados selvagens (um isolado com maior e outro com menor infectividade *in vitro*), bem como as cepas padrões OP46 e PP75 após infecção em hamster, um fragmento de aproximadamente 20mg do baço foi removido assepticamente, próximo à chama de fogo para assegurar a esterilidade, e depositado em um tubo (Falcon, Becton Dickinson, EUA) com capacidade para 15mL, contendo 2mL de meio LIT. Os tubos foram armazenados em estufa biológica refrigerada BOD (FANEM® modelo 347), à temperatura de 23°C ± 1°C por 7 dias. Após este período as culturas foram avaliadas através da confecção de duas lâminas em microscopia óptica a fim de se identificar a presença de formas promastigotas do parasito. Após análise das lâminas, foi retirado 1 mL do meio de cada tubo e repassado para um novo tubo

contendo 3 mL do meio de cultura LIT e após 7 dias foi feita uma nova avaliação, através de observação em microscópio. Nos casos em que houve a observação do parasito, estas culturas foram expandidas em meio de cultura LIT, nas mesmas condições descritas no tópico 4.2, e posteriormente foram criopreservadas.

4.5.7. Avaliação dos parâmetros hematológicos

A avaliação dos parâmetros hematológicos foi feita por ocasião da necropsia. Para isso, o sangue foi coletado do coração dos animais e colocado em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL contendo 20 µL de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Em seguida, as amostras foram analisadas utilizando o aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800 Vet, Hamburgo, Alemanha) para a determinação do hemograma completo (contagem de leucócitos, eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e avaliada por microscopia óptica em objetiva de imersão. Desta forma, foi determinado o número absoluto de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, por meio da contagem de 100 leucócitos/lâmina.

4.5.8. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

As avaliações bioquímicas consistiram das seguintes análises: prova de função renal a partir da dosagem de uréia e creatinina, e provas de função hepática a partir da dosagem das enzimas TGO (transaminase glutâmica oxalacética) e TGP (transaminase glutâmica pirúvica). Para a avaliação dos parâmetros foi utilizado o Sistema Bioquímico Automático (CELM SBA-200, Barueri, SP, Brasil) e empregado Kits comerciais do Labtest (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo o método descrito pelo fabricante.

4.5.9. Processamento e avaliação do infiltrado celular no fígado

Fragmentos de fígado de hamsters fixados em formol 10% tamponado pH 7,2 foram processados e embebidos em parafina, sendo assim preservados até o momento da confecção das lâminas contendo os cortes histológicos.

Sobre lâminas de vidro, previamente desengorduradas com solução álcool-éter, foram colocados cortes histológicos com espessura de quatro μm . As lâminas obtidas foram coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE) para análise do infiltrado celular. As imagens de fígado visualizadas pela objetiva de 40x foram digitalizadas através da microcâmara Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e todas as imagens foram analisadas pelo software de análise e processamento de imagem Leica Qwin no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas/NUPEB da UFOP. O processo inflamatório no fígado foi quantificado em 20 imagens aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$), conforme descrito por Moreira (2012).

4.5.10. Avaliação da densidade parasitária por qPCR

4.5.10.1. Extração de DNA das amostras de fígado e baço

Para obtenção do DNA das amostras de fígado e baço foi utilizado o método com CTAB (brometo de Cetiltrimetilamônio). Foram utilizadas quantidades de tecidos com peso aproximado de 20mg. Aos tubos contendo os fragmentos de fígado foram adicionados 500 μL de tampão de lise (Tris HCl 20mM; EDTA 5mM; NaCl 400mM, SDS 1%, pH = 8,5). A mistura foi homogeneizada e posteriormente incubada em banho seco a 37°C por uma hora, sendo a suspensão homogeneizada em vórtex em intervalos de 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 20 μL de Proteinase K (20mg/mL), e, após homogeneização foi feita a incubação por 18 horas a 55°C. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de NaCl 5M, sendo as amostras mantidas a 65°C por 10 minutos, para então se adicionar 50 μL de solução CTAB 10% (v/v). As amostras foram mantidas por 20 minutos a 65°C e, em seguida, foram adicionados 400 μL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA). As amostras foram centrifugadas a 12000 x g em microcentrífuga (Eppendorf Modelo 5418, NY, USA) por 10 minutos. A fase superior foi transferida para novo tubo ao qual foram adicionados 400 μL de isopropanol (Merck, Darmstad, Alemanha). As amostras foram homogeneizadas por inversão e armazenadas por uma hora a -20oC. Após precipitação do DNA, foi feita a centrifugação por 5 minutos a 12000 x g e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi feita a lavagem do precipitado com 1mL de etanol 70% (Merck, Darmstad, Alemanha) gelado. Subsequentemente, as amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão do

tubo durante um minuto. Em seguida as amostras foram centrifugadas por cinco minutos a 12000 x g e o sobrenadante foi descartado e deixado secar em temperatura ambiente. Posteriormente, o precipitado foi homogeneizado em 50µL de água livre de nucleases. As amostras foram dosadas utilizando-se espectrofotometria sob a razão de absorbância 260nm/280nm. As amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C até o momento de uso na qPCR.

4.5.10.2. Reação de qPCR em tempo real

Foi utilizada a quantificação absoluta para a estimativa de cargas parasitárias. Para a construção da curva padrão foi utilizado DNA extraído de uma cepa padrão (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75). Os parasitos foram crescidos em meio LIT. Uma alíquota do meio foi transferida para câmara de Neubauer para estimar o número de células por mililitro de solução. A quantidade definida de parasitos teve seu DNA extraído utilizando-se o kit *Wizard Genomic DNA Extraction* (Promega) segundo instruções do fabricante. O DNA total purificado foi diluído serialmente na razão 1:10 de modo a se obter de 10⁶ a 1,0 parasito para as curvas padrão. Cada ponto da curva foi utilizado em triplicatas nas reações.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços - *MicroAmp®Optical 96 - Well Reaction Plate with Barcode* (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), cobertas com adesivos ópticos - *Optical Adhesive Covers* (Applied Biosystems, EUA) e processadas em termociclador *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA).

Para verificar a integridade do DNA das amostras, foi feita a amplificação do gene TNF- α , de acordo com Moreira *et al.* (2012), utilizando-se os iniciadores direto: 5' GAG TGG CTG AGC CAT CGT 3' e reverso: 5' TGG TTG TCT TTG AGA GAC ATG 3', que amplificam um fragmento de 86pb (acesso no GenBank: AF046215).

Também foi amplificado o gene de cópia única da DNA polimerase alfa de 90pb (direto:5' TGT CGC TTG CAG ACC AGA TG 3', e reverso: 5'GCA TCG CAG GTG TGA GCA C 3') de *L. chagasi* (acesso no GenBank: AF009147) descrito por Bretagne *et al.* (2001). Como controle negativo foi usado água livre de nucleases, ao invés de DNA. A reação de cada amostra foi realizada em duplicata, com as seguintes condições: uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Finalmente, a temperatura foi elevada gradualmente para

dissociação dos produtos amplificados a fim de analisar a especificidade da amplificação.

As reações foram realizadas utilizando-se SYBR *Green* 2X PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA); 20ng de DNA; iniciadores (1,0 pmol/uL final para DNA polimerase ou 2,5pmol/uL final para TNF- α) e água livre de nucleases em quantidade suficiente para um volume final de 10 μ L por poço. Para a quantificação do número de genes de cópia única de *Leishmania* (número de amastigotas) nas amostras, inicialmente foi determinado para cada poço o número de ciclos (Ct) em que a fluorescência cruzou uma linha limiar arbitrária, denominada *threshold*, calculada pelo programa *7500 Software v.2.0.1 for 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems, EUA).

Para a análise dos resultados foram consideradas as reações com eficiência entre 97-103% e curva padrão com valores de coeficiente de linearidade ($r^2 = 0,99$). O resultado final (RF) foi estimado em número de amastigotas/miligrama de tecido de acordo com a expressão: $RF = (C \times N \times 50)/(20ng \times M)$, em que:

- C = resultado obtido diretamente da qPCR;
- N x 50 = quantidade total, em ng, de DNA em 50uL obtido na espectrofotometria;
- 20ng = quantidade de DNA acrescentado na reação de qPCR (fator de correção);
- M = massa em miligramas do fragmento de tecido submetido à extração de DNA.

4.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o *GraphPad Prism* 5.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Após verificação da normalidade dos dados usando o teste *Kolmogorov-Smirnoff*, foi realizada análise de variância (ANOVA *one-way*) seguida do teste de *Tukey* para determinar as diferenças específicas entre os grupos. Em caso de ausência de distribuição normal dos dados, foi usado o teste de *Kruskal-Wallis*, seguido do teste de *Dunns* para identificação de diferenças entre os grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

5. Resultados

5.1. Identificação dos parasitos por PCR-RFLP

Foram obtidos sete isolados a partir de cães com leishmaniose visceral provenientes de Belo Horizonte - MG. A cada isolado foi dada uma nomenclatura: 610, 571, 592, 593, 591, 614 e 616.

Os sete isolados obtidos foram submetidos à reação de PCR-RFLP com o intuito de confirmar se os mesmos correspondem à espécie *L. chagasi*. Os isolados selvagens obtidos a partir de cães naturalmente infectados apresentaram perfil idêntico ao da cepa referência (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75). Este resultado confirma que todos os isolados são da espécie *L. chagasi*, uma vez que foi observado após aplicação da enzima HAE III um perfil de bandas com pesos moleculares de 120, 80, 60 e 40 pb. O gel representado pela Figura 3 ilustra o perfil eletroforético da cepa padrão (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e dos diferentes isolados (616, 592, 591, 593, 571, 610, 614), sendo os resultados referente à PCR convencional (primeira canaleta da cepa padrão e dos diferentes isolados), seguida pelos resultados referentes à PCR-RFLP (segunda canaleta da cepa padrão e dos diferentes isolados) para os produtos de amplificação de 120pb obtidos na reação de PCR para a região conservada do minicírculo do kDNA, após digestão com a enzima de restrição Hae III.

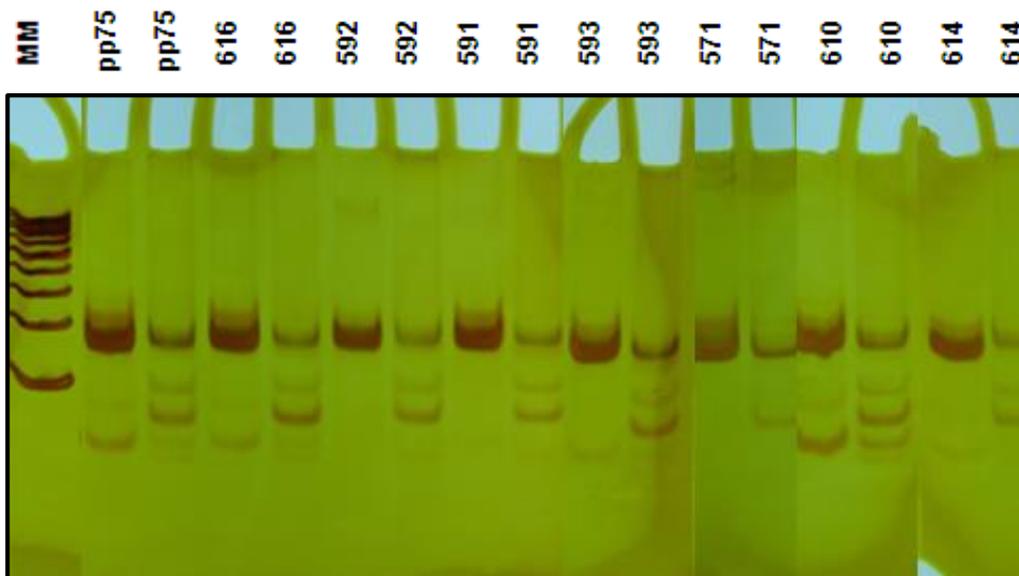


Figura 3: Produtos de amplificação pela PCR para a região conservada do kDNA do mini-círculo de *Leishmania* antes e após a restrição por Hae III em gel de poliacrilamida 10%. MM, Marcador molecular de 25 pb (Invitrogen); cepa de referência PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75); isolados obtidos de cães com leishmaniose visceral (616, 592, 591, 593, 571, 610 e 614).

5.2. Análise de infectividade em ensaios *in vitro*

Com o intuito de selecionar os isolados com características de alta e baixa infectividade, foi realizada, através de contagem em microscópio óptico, uma análise do percentual de infecção e carga parasitária em macrófagos imortalizados de cães (DH82) em cultivo com os diferentes isolados selvagens (610, 571, 592, 593, 591, 614 e 616), com a cepa OP46 (uma vez que trata-se de um isolado já estudado anteriormente e que não sofreu passagens em outros modelos experimentais, além do cão) e com a cepa padrão (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75). Além disso, também foi realizada a marcação dos parasitos com CFSE para verificação da infecção em citômetro de fluxo.

No estudo empregando-se a microscopia óptica, foram analisados os tempos de 3, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Além disso, foram utilizadas duas diferentes proporções de macrófago e promastigotas, sendo elas: 1 : 4 (Figura 4 A, C) e 1 : 10 (Figura 4 B, D). Foi observado que o isolado 616 proporcionou maior percentual de infecção e maior carga parasitária. Por outro lado, o isolado 614 foi o que apresentou menor percentual de infecção e menor carga parasitária. Na Figura 5 estão representadas imagens referentes ao isolado menos infectivo (614), mais infectivo (616) e cepa padrão (PP75), nos tempos de 3 e 24hpi, na proporção de macrófago : parasitos de 1:10.

Com o intuito principal de confirmar os resultados obtidos pela avaliação por microscopia foi feita também a análise empregando-se a marcação com CFSE. Para isso foram escolhidos dois dos pontos avaliados na análise anterior (os tempos de 3 e 24hpi), na proporção macrófago : parasitos de 1 : 4 e 1 : 10. Os resultados obtidos por esta metodologia confirmaram que o isolado 616 foi o mais infectivo e que o isolado 614 foi o menos infectivo (Figura 4, E, F).

O isolado 571 mostrou-se menos infectivo em alguns pontos, como mostrado por ambas as metodologias. Entretanto o mesmo apresentou muitas variações entre os diferentes tempos de infecção, de forma que o 614 foi escolhido para prosseguir para as avaliações *in vivo*.

De acordo com Croft *et al.* (2001), o ensaio de infecção em macrófagos com amastigotas *in vitro* é o único capaz de correlacionar resposta clínica a sensibilidade a drogas do isolado. Entretanto, tendo em vista os diferentes perfis observados neste trabalho, para estudos de diferença de infectividade *in vitro*, a infecção de macrófagos com promastigotas parece ser uma metodologia aplicável para comparações entre diferentes isolados, sem fins diretos de investigação de resistência a drogas.

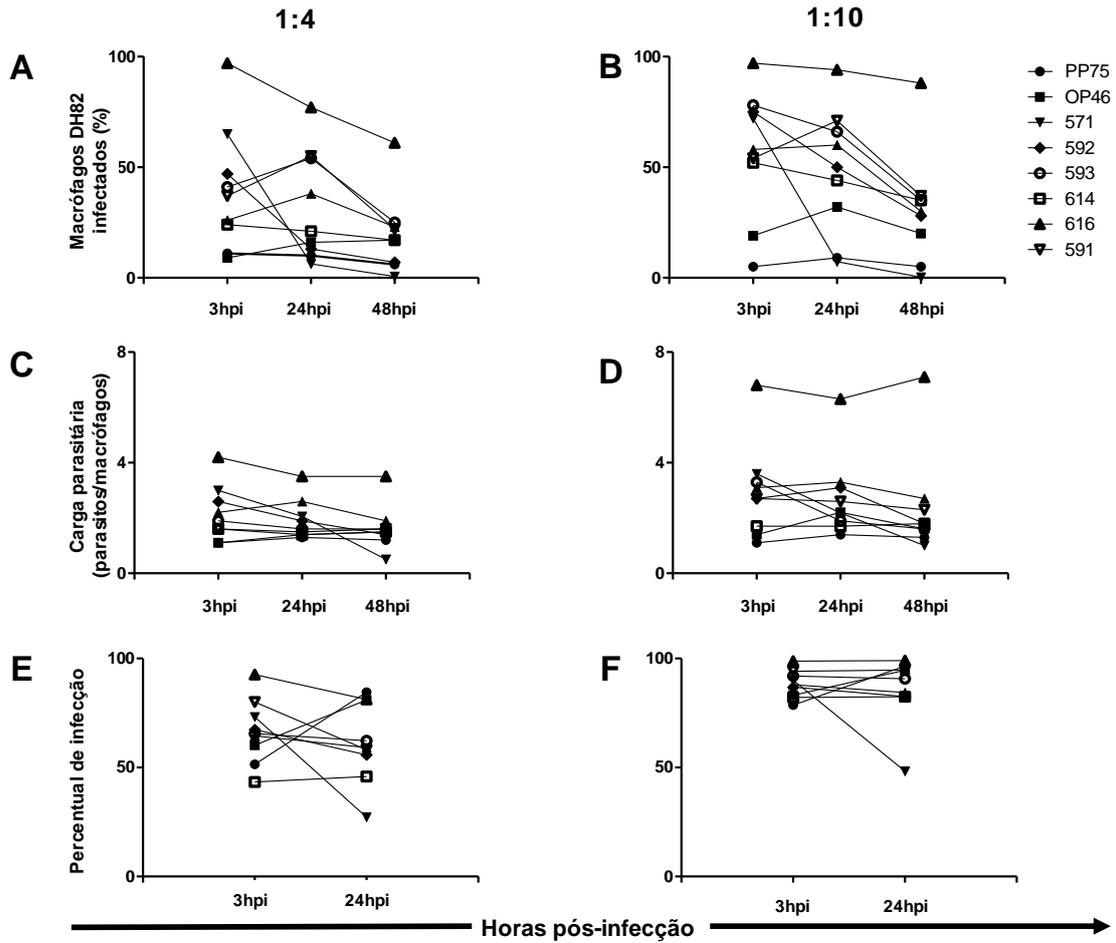


Figura 4: Percentual de macrófagos caninos infectados por diferentes isolados de *L. chagasi* e respectivas cargas parasitárias. Os números 610, 571, 592, 593, 591, 614 e 616 representam cepas selvagens. Cepa de referência de *L. chagasi*: PP75, MHOM/BR/74/PP75); OP46 (MCAN/BR/2008/OP46). 1:4 (A, C, E) e 1:10 (B, D, F) correspondem às proporções entre macrófagos DH82 e parasitos. Os dados foram obtidos por microscopia óptica (A, B, C, D; nos tempos 3hpi, 24hpi e 48hpi) e parasitos marcados com CFSE (E, F; nos tempos 3hpi e 24hpi).

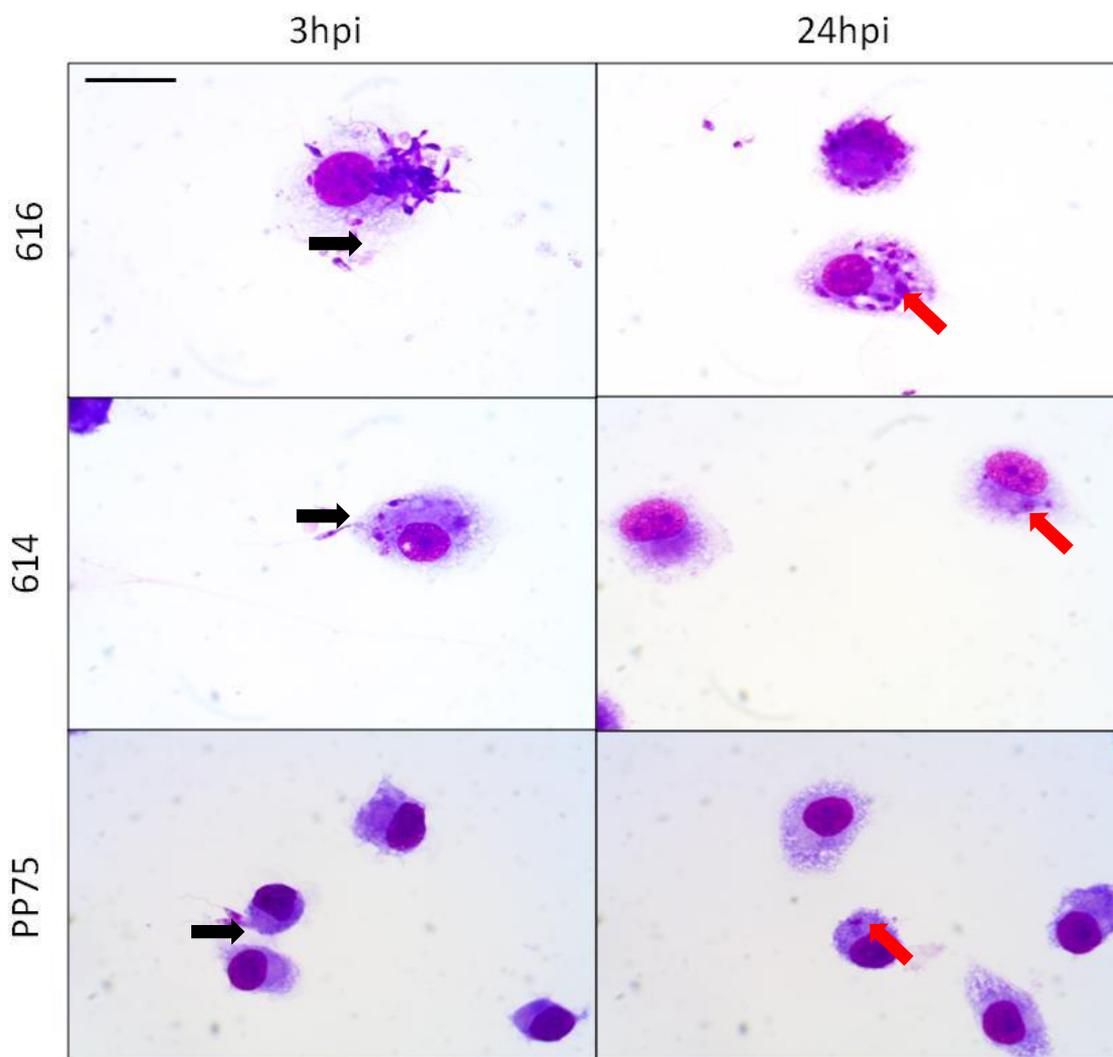


Figura 5: Macrófagos imortalizados de cães da linhagem DH82 infectados com os isolados 616 e 614 obtidos a partir de cães com leishmaniose visceral, e com a cepa PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) 3 e 24 horas pós-infecção. Barra= 25 μ m. Setas pretas indicam promastigotas em 3hpi e setas vermelhas ilustram amastigotas após 24hpi.

5.3. Perfil de infecção em hamsters com os diferentes isolados selecionados na etapa anterior

5.3.1. Taxa de sobrevivida

Os animais não infectados apresentaram taxa de sobrevivida de 100% (Figura 6). O mesmo ocorreu com os animais infectados com a cepa PP75. Os animais infectados com o isolado 616 também apresentaram taxa de sobrevivida de 100% (Figura 6).

Já os animais dos grupos OP46 e 614 apresentaram taxa de sobrevivida de 73% e 50% respectivamente (Figura 6).

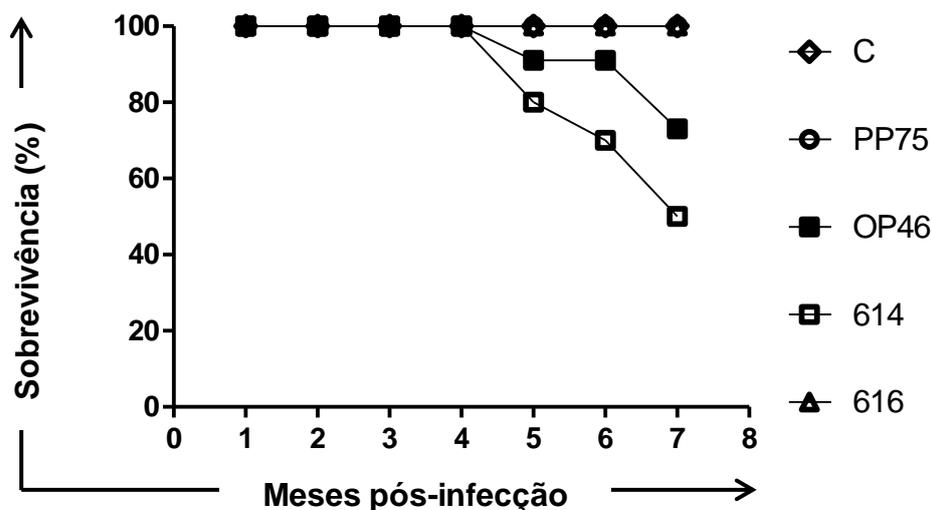


Figura 6: Taxa de sobrevivência de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

5.3.2. Avaliação clinicopatológica

A observação do aparecimento de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral foi feita no decorrer de todo o tempo, desde a infecção experimental até o momento da necropsia. Neste momento também foram registradas as características macroscópicas observadas no fígado e baço dos animais.

Sendo assim, foi observado que os animais que vieram a óbito apresentavam um acentuado emagrecimento e caquexia, comparáveis a situação dos animais representados na Figura 7, que se manteve por um período aproximado de uma semana, até morrerem. No momento da necropsia, 60% dos animais do grupo 614 e 11% do grupo 616 encontravam-se nessa situação de acentuado emagrecimento e caquexia. Além disso, esses animais apresentaram esteatose e esplenomegalia (Tabela 1).

Tabela 1: Aspectos clínicos e *post-mortem* de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

	C	OP46	PP75	614	616
Emagrecimento	-	-	-	60%	11%
Caquexia	-	-	-	60%	11%
Hepatomegalia	-	-	-	-	-
Esplenomegalia	-	100%	60%	100%	22%

- =ausência de alterações

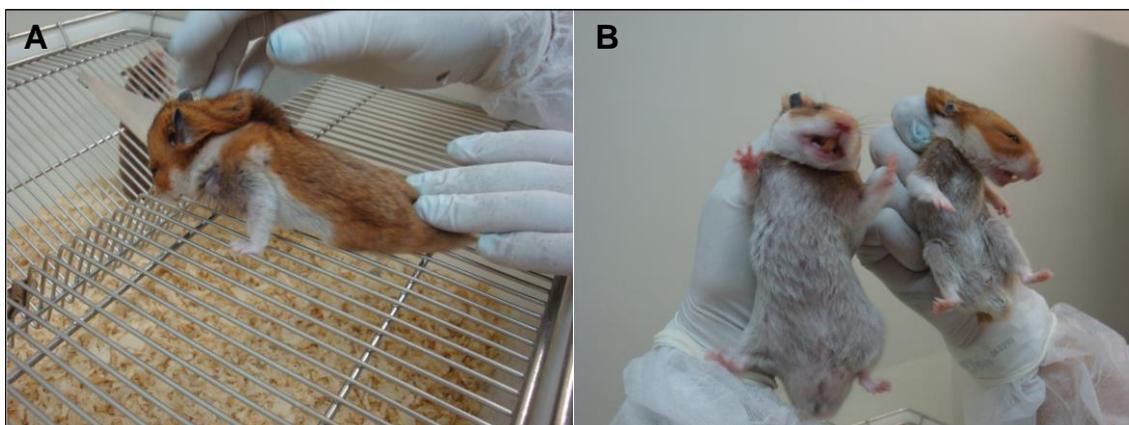


Figura 7: Hamsters experimentalmente infectados com *L. chagasi* apresentando: (A) emagrecimento e caquexia – isolado 614; (B) animal com caquexia e emagrecimento (hamster à direita – isolado 614) comparado a um controle (hamster à esquerda).

5.3.3. Hemograma

A avaliação dos parâmetros hematológicos foi feita através da análise da série branca (valores absolutos das populações de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) e vermelha (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito) dos diferentes grupos experimentais (Tabela 2). A análise dos dados relacionados à série branca revelou redução ($P<0,05$) da população de linfócitos do grupo OP46 e 614 em relação ao grupo PP75. Em relação à série vermelha, foi observado redução ($P<0,05$) dos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, no grupo 614, em relação aos demais grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Perfil hematológico em hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

Parâmetros hematológicos	Grupos				
	C (Valores de referência)	PP75	OP46	614	616
Neutrófilos	680.3±397.1	951.6±582.3	601.0±445.7	256.5±144.4	812.2±585.5
Eosinófilos	39.7±25.4	67.0±46.2	27.8±16.4	31.2±29.0	50.4±38.1
Linfócitos	2012±659.4	2426±540.4	1524±521.5 ^b	1568±1011 ^b	2142±796.3
Monócitos	61.7±43.6	65.4±35.6	58.1±47.3	32.0±29.3	65.6±76.6
Eritrócitos	6.4±1.1	7.2±0.1	6.6±0.6	3.9±2.1 ^{a,b,c,e}	6.6±0.8
Hemoglobina	13.1±1.4	14.0±0.5	13.0±1.4	7.9±4.3 ^{a,b,c,e}	13.1±1.7
Hematócrito	27.7±2.9	29.4±1.5	27.4±3.1	17.1±8.6 ^{a,b,c,e}	27.4±3.6

C: grupo controle; PP75 e OP46: grupos infectados com as respectivas cepas de referência de *L. chagasi*; 614 e 616: grupos infectados com os respectivos isolados de *L. chagasi* de menor e maior infectividade *in vitro*, respectivamente. Os valores obtidos no grupo controle (não infectado) foram adotados como valores de referência. *a*: diferença estatística com o grupo C; *b*: diferença estatística com o grupo PP75; *c*: diferença estatística com o grupo OP46; *d*: diferença estatística com o grupo 614; *e*: diferença estatística com o grupo 616. Todos os dados indicam média ± desvio padrão.

5.3.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para a avaliação da função hepática foram realizadas dosagens em soro das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) nos diferentes grupos experimentais. Os resultados demonstraram aumento ($P < 0,05$) nos níveis de TGO no grupo 614 em relação aos grupos C e PP75 (Tabela 3). Já para a avaliação da função renal, foi realizada a dosagem de uréia e creatinina no soro de hamsters dos diferentes grupos experimentais, não sendo indentificada qualquer diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3: Perfil bioquímico em amostras de soro de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	C	PP75	OP46	614	616
TGO	87.3±73.0	83.8±30.1	127.9±102.9	245.6±112.1 ^{a,b}	163.6±117.6
TGP	97.1±39.1	78.4±19.2	111.7±66.9	170.8±125.9	134.1±50.1
Uréia	47.6±3.8	39.2±2.5	40.4±5.6	94.3±96.8	50.8±10.7
Creatinina	0.4±0.0	0.3±0.05	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.05

5.3.5. Contagem do infiltrado celular no fígado

As células inflamatórias do fígado foram quantificadas através de análise morfométrica por microscopia óptica e os resultados estão representados na Figura 8.

Foi observado que o grupo infectado com o isolado 614 foi o que apresentou um processo inflamatório hepático mais intenso. O grupo 614 apresentou aumento ($P < 0,05$) na quantidade de células inflamatórias em relação a todos os outros grupos experimentais (Figuras 8 e 9).

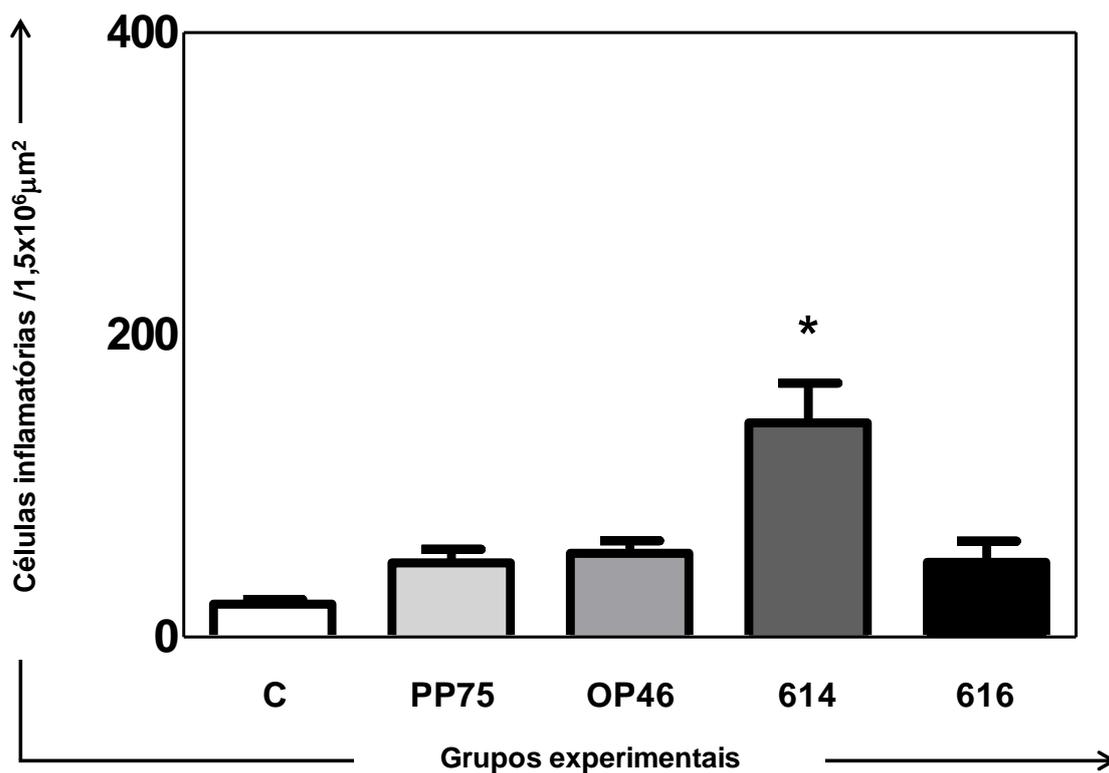


Figura 8: Avaliação do infiltrado celular no fígado de hamsters dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. * representa diferença em relação aos demais grupos (C, PP75, OP46, 614, 616).

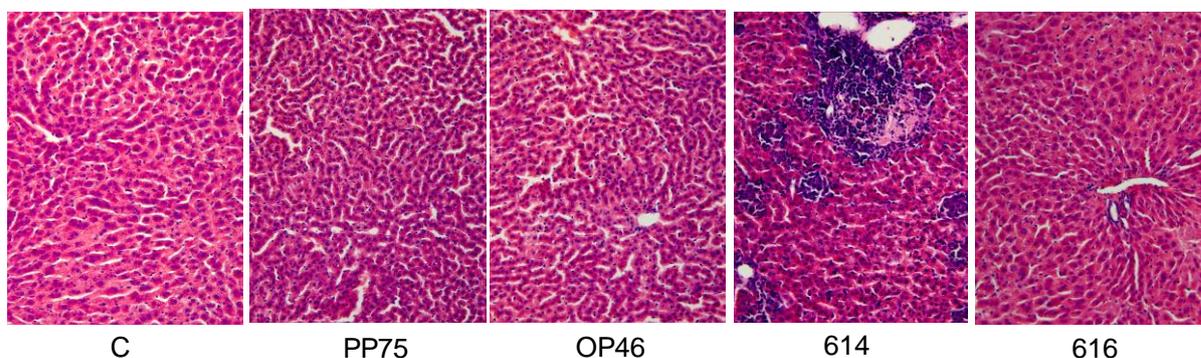


Figura 9: Fotomicroscopias de fígado de hamster dos grupos: controle (C) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

5.3.6. Avaliação da carga parasitária

A carga parasitária no baço e no fígado dos diferentes grupos experimentais foi avaliada através de qPCR em tempo real (Figura 10). Os resultados estão representados como número de amastigotas/mg de de tecido.

No fígado, de forma semelhante ao descrito para o infiltrado inflamatório, o grupo 614 apresentou aumento ($P < 0,05$) da carga parasitária em relação ao grupo 616 (Figura 10).

Todos os animais do grupo 614 apresentaram resultado positivo, tanto no fígado quanto no baço (Tabela 4). No grupo 616 foi observado 55,5% e 66,6% de positividade no baço e fígado, respectivamente. O grupo PP75 apresentou 60% e 30% de positividade no baço e fígado, respectivamente. Já o grupo OP46 apresentou 66,6% de positividade em ambos os órgãos (Tabela 4).

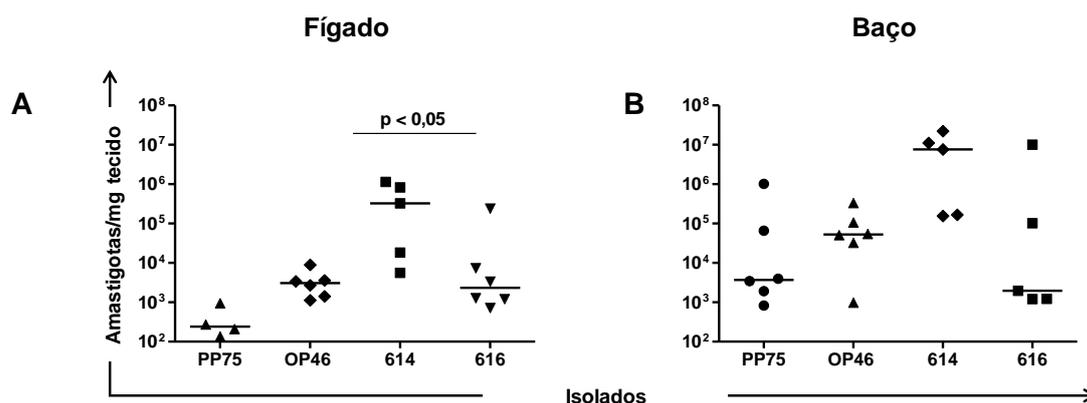


Figura 10: Carga parasitária avaliada pela qPCR no fígado (A) e baço (B). No eixo y está representado o número de amastigotas por miligrama de tecido. No eixo x estão representados os grupos: infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46). As linhas conectoras indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os valores das medianas dos grupos.

Tabela 4: Frequência de positividade pela qPCR em amostras de baço e fígado de hamsters dos grupos: infectados experimentalmente com os dois isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46). ^aNúmero de hamsters positivos/número total de hamsters avaliados no grupo.

Grupos	Positividade n ^a (%)	
	Baço	Fígado
PP75	6/10 (60.0)	3/10 (30.0)
OP46	6/9 (66.6)	6/9 (66.6)
614	5/5 (100.0)	5/5 (100.0)
616	5/9 (55.5)	6/9 (66.6)

5.4. Perfil de infecção em hamsters, submetidos ao tratamento com Glucantime®, com os dois isolados selecionados na etapa inicial do trabalho (614 e 616)

5.4.1. Taxa de sobrevivência

Os animais infectados com PP75 e OP 46, bem como o grupo CT, todos submetidos à pressão medicamentosa com Glucantime®, apresentaram taxa de sobrevivência de 100% (Figura 11).

Já os animais dos grupos 614 (tratado) e 616 (tratado) apresentaram taxa de sobrevivência de 54,5% e 58%, respectivamente (Figura 11).

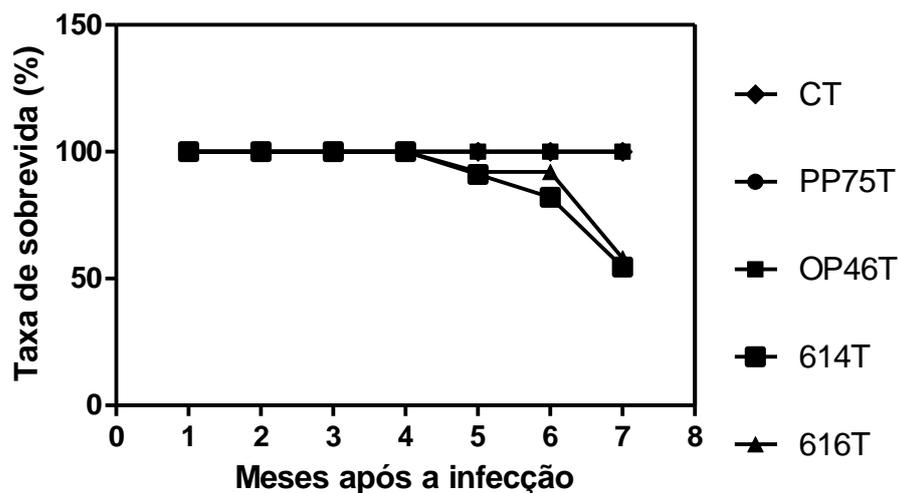


Figura 11: Taxa de sobrevivência de hamsters tratados com Glucantime® pertencentes aos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

5.4.2. Avaliação clinicopatológica

A observação do aparecimento de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral foi feita no decorrer de todo o tempo, da mesma forma que nos grupos de animais sem a pressão medicamentosa, apresentados anteriormente. Neste momento também foram registradas as características macroscópicas observadas no fígado e baço dos animais.

No momento da necropsia, 33% dos animais do grupo 614T e 38% do grupo 616T encontravam-se em situação de acentuado emagrecimento e caquexia. Além disso, todos os grupos infectados e tratados (PP75T, 614T e 616T) apresentaram esplenomegalia (Tabela 5).

Tabela 5: Aspectos clínicos e *post-mortem* de hamsters, submetidos ao tratamento com Glucantime®, dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

	CT	PP75T	OP46T	614T	616T
Emagrecimento	-	-	-	33%	38%
Caquexia	-	-	-	33%	38%
Hepatomegalia	-	-	-	-	-
Esplenomegalia	-	100%	90%	100%	100%

- =ausência de alterações.

5.4.3. Hemograma

A avaliação dos parâmetros hematológicos foi feita através da análise da série branca (valores absolutos das populações de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos) e vermelha (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito) dos diferentes grupos experimentais (Tabela 6).

A análise dos dados relacionados à série branca revelou drástica redução ($P<0,05$) da população de eosinófilos do grupo 614T em relação ao grupo PP75T. O grupo 614T apresentou ainda redução ($P<0,05$) da população de linfócitos em relação ao grupo PP75T e 616T (Tabela 6).

Em relação à série vermelha, foi observada intensa anemia no grupo 614T, que apresentou redução ($P<0,05$) dos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em relação a todos os demais grupos avaliados (Tabela 6).

Tabela 6: Perfil hematológico dos hamsters submetidos ao tratamento com Glucantime®, dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi* MCAN/BR/2008/OP46).

Parâmetros hematológicos	Grupos				
	CT (Valores de referência)	PP75T	OP46T	614T	616T
Neutrófilos	715.4±409.9	812.7±609.8	341.5±426.7	189.4±175.1	458.1±213.9
Eosinófilos	30.8±13.2	42.7±27.9	27.1±28.4	7.6±5.8 ^b	27.6±13.0
Linfócitos	1451±531.5	1604±372.5	1209±725.8	549.0±526.4 ^{b,e}	1494±448.6
Monócitos	40.0±29.6	40.4±21.8	32.7±36.6	11.2±10.5	33.2±14.4
Eritrócitos	6.4±0.8	6.9±0.3	5.6±1.0	3.1±1.3 ^{a,b,c,e}	5.2±2.2
Hemoglobina	12.5±1.9	13,7±0,6	10,9±2,1	5,5±2,1 ^{a,b,c,e}	10.3±4.5
Hematócrito	25.8±3.3	28.8±2.1	22.6±4.2	13.6±6.0 ^{a,b,c,e}	21.8±8.0

CT: controle tratado com Glucantime®; PP75T e OP46T: grupos infectados com as respectivas cepas de referência e tratados com Glucantime®; 614T e 616T: grupos infectados com os respectivos isolados e tratados com Glucantime®. Os valores obtidos no grupo controle tratado com Glucantime® foram adotados como valores de referência. *a*: diferença estatística entre grupo CT e grupo assinalado; *b*: diferença estatística entre grupo PP75T e grupo assinalado; *c*: diferença estatística entre OP46T e grupo assinalado; *d*: diferença estatística entre 614T e grupo assinalado; *e*: diferença estatística entre 616T e grupo assinalado. Todos os dados estão representados por valores de média ± desvio padrão de cada parâmetro avaliado.

5.4.4. Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Para a avaliação da função hepática foram realizadas dosagens em soro das enzimas transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP) nos diferentes grupos experimentais. Já para a avaliação da função renal, foi realizada a dosagem de uréia e creatinina no soro de hamsters dos diferentes grupos experimentais. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil bioquímico dos hamsters submetidos ao tratamento com Glucantime®, dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46).

Parâmetros bioquímicos	Grupos				
	CT	PP75T	OP46T	614T	616T
TGO	171,8±132.2	191,3±82.9	183,0±102.3	155,9±119.0	117,6±32.7
TGP	78.0±28.5	126.2±49.6	104.3±65.2	89.1±33.0	76.6±22.9
Uréia	53.3±10.7	42.6±4.2	41.4±9.0	57.2±24.2	46.8±7.0
Creatinina	0.3±0.1	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0

CT: controle tratado com Glucantime®; PP75T e OP46T: grupos infectados com as respectivas cepas de referência e tratados com Glucantime®; 614T e 616T: grupos infectados com os respectivos isolados e tratados com Glucantime®. Os valores obtidos no grupo controle tratado com Glucantime® foram adotados como valores de referência. Todos os dados estão representados por valores de média \pm desvio padrão de cada parâmetro avaliado.

5.4.5. Análise do infiltrado celular no fígado

As células inflamatórias do fígado de hamsters submetidos à intervenção com Glucantime® foram quantificadas através de análise morfométrica e os resultados estão representados na Figura 12.

Foi observado que o grupo infectado com o isolado 614T apresentou uma quantidade de células inflamatórias significativamente maior em relação aos grupos CT e PP75T. Ainda no grupo 614T e também no grupo 616T, as células inflamatórias estavam organizadas em granulomas, repletos de formas amastigotas do parasito (Figura 13).

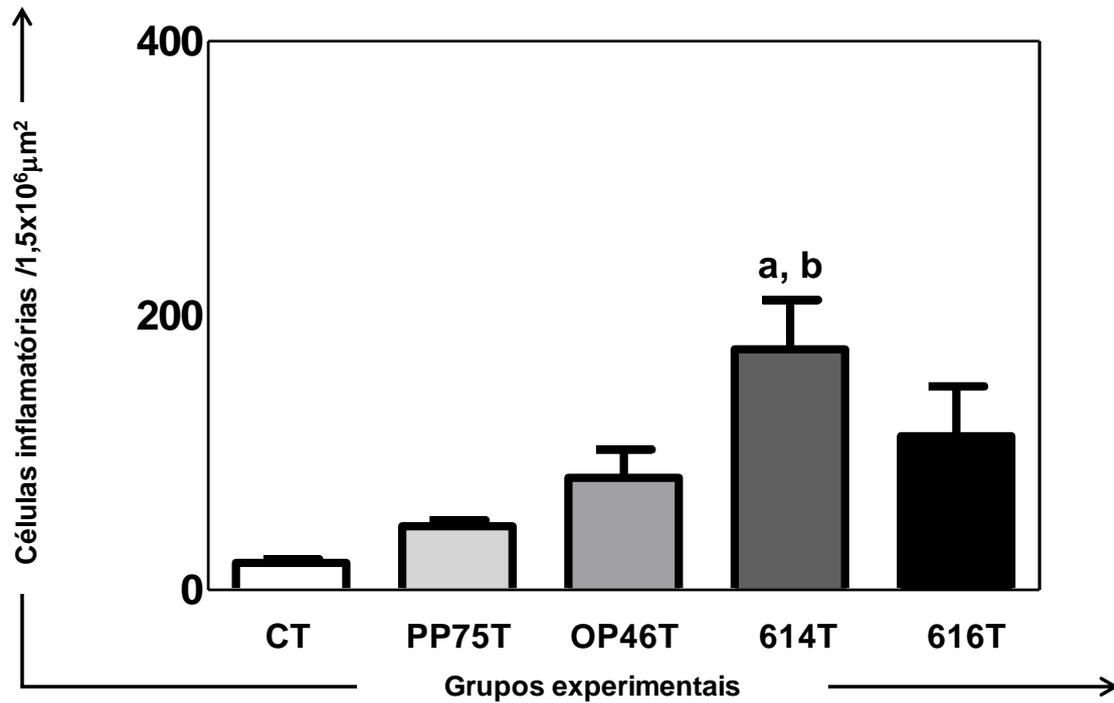


Figura 12: Avaliação do infiltrado celular no fígado de hamsters tratados com Glucantime® dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Letras a, b representam diferenças significativas em relação aos grupos CT e PP75T, respectivamente.

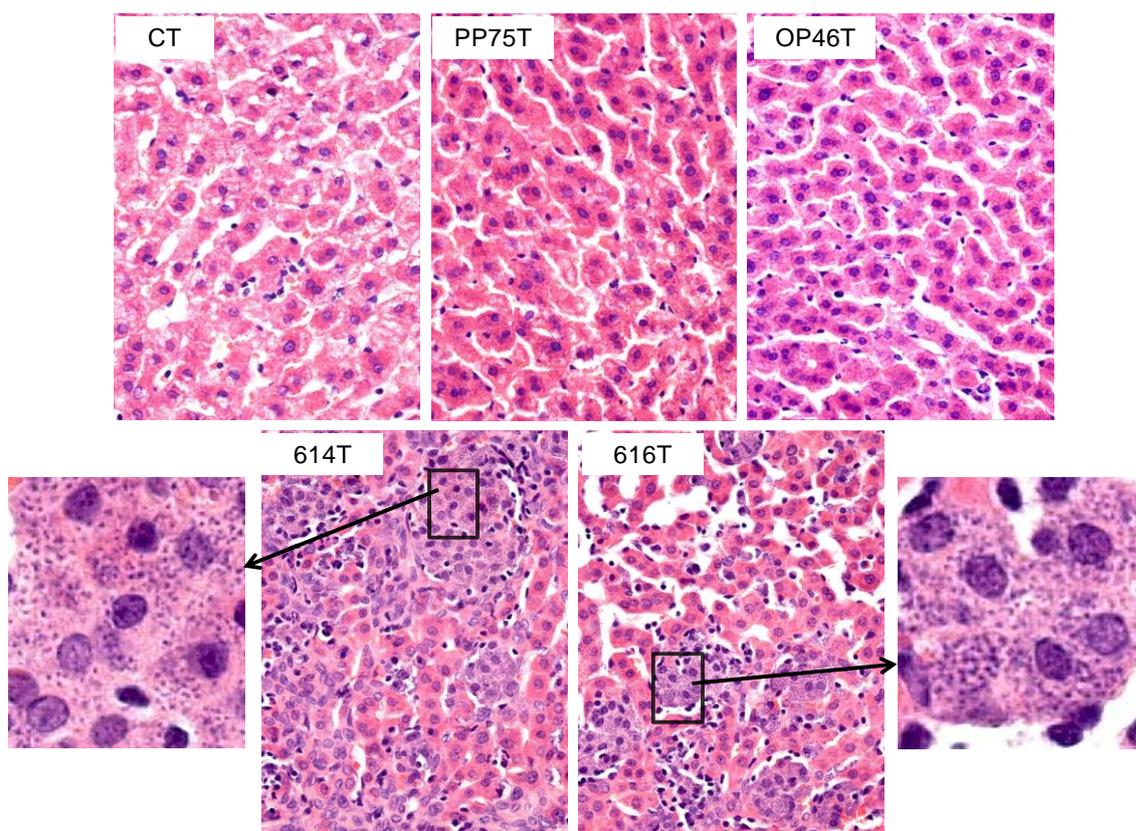


Figura 13: Fotomicroscopias de fígado de hamsters tratados com Glucantime® dos grupos: controle tratado (CT) e infectados experimentalmente com os dois isolados (614T e 616T) e com as cepas PP75T (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46T (*L. chagasi*, MCAN/BR/2008/OP46). No detalhe ampliado das imagens representativas dos isolados 614 e 616 são ilustradas inúmeras formas amastigotas no interior de macrófagos.

5.4.6. Avaliação da carga parasitária

A carga parasitária do fígado (Figura 14 A) e baço (Figura 14 B), nos diferentes grupos experimentais, foi avaliada através de qPCR. Os resultados estão representados como número de amastigotas/mg de de tecido.

Os grupos 614T e 616T apresentaram aumento ($P < 0,05$) da quantidade de parasitos no fígado em relação ao grupo OP46T. No grupo PP75T, apenas um animal apresentou carga parasitária detectável, impossibilitando a comparação estatística com os demais grupos.

No baço foi observado aumento ($P < 0,05$) da carga parasitária no grupo 614T em relação ao grupo PP75T. O percentual de positividade nos grupos está representado na Tabela 8.

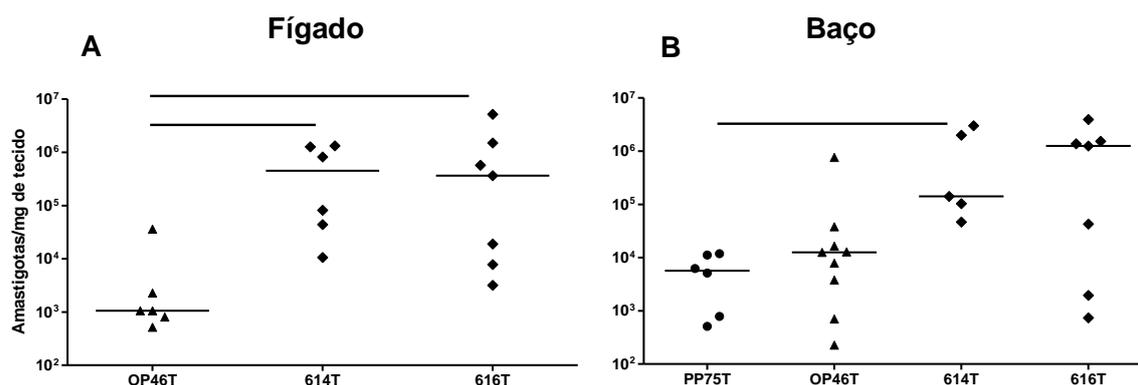


Figura 14: Carga parasitária avaliada pela qPCR no fígado (A) e baço (B) de hamster tratados com Glucantime®. No eixo y está representado o número de amastigotas por miligrama de tecido. No eixo x estão representados os grupos: infectados experimentalmente com os diferentes isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (MCAN/BR/2008/OP46). As linhas conectoras indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre os valores das medianas dos grupos.

Tabela 8: Frequência de positividade pela qPCR em amostras de baço e fígado de hamsters tratados com Glucantime® dos grupos: infectados experimentalmente com os diferentes isolados (614 e 616) e com as cepas PP75 (*L. chagasi*, MHOM/BR/74/PP75) e OP46 (MCAN/BR/2008/OP46). ^aNúmero de hamsters positivos/número total de hamsters avaliados no grupo.

Grupos	Positividade n ^a (%)	
	Baço	Fígado
PP75T	6/9 (66.6)	1/9 (11.1)
OP46T	9/10 (90.0)	6/10 (60.0)
614T	5/6 (83.3)	6/6 (100)
616T	7/8 (87.5)	7/8 (87.5)

6. Discussão

As leishmanioses, em especial a LV, representam um grave problema de saúde pública, que tem passado por uma transição de perfil de distribuição rural para urbano nas últimas décadas (Gontijo & Melo, 2004, WHO, 2008; Harhay *et al.*, 2011; Conti *et al.*, 2016). A crescente expansão da doença reflete a complexidade do controle do parasito, de forma que um dos grandes desafios dos pesquisadores consiste na busca de estratégias imunoproliféricas e terapêuticas capazes de reverter casos graves da doença, promovendo melhora clínica e cura parasitológica. A participação do cão como reservatório do parasito e mantenedor da doença em ambiente urbano tem fundamental importância nesse processo, uma vez que a circulação de parasitos que passaram por animais em tratamento pode representar um grande problema, já que esses animais não alcançam a cura parasitológica e continuam a transmitir o parasito (Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a, Ferreira *et al.*, 2012; Laurenti *et al.*, 2013; Roatt *et al.*, 2014). Ainda assim, apesar de até o momento não existirem evidências científicas de cura parasitológica após o tratamento da LVC (Roatt *et al.*, 2014), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), autorizou o registro do Milteforan[®] pela empresa Virbac Saúde Animal, como sendo o primeiro fármaco a ser utilizado no Brasil (Nota Técnica N° 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, segundo site do CRMV-MG). Esta nota técnica foi divulgada após acordo entre o MAPA e o Ministério da Saúde sobre o registro deste produto (Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, segundo CRMV-MG). Embora este tratamento não seja considerado como medida de saúde pública para controle da doença, é razoável imaginar o grande risco à saúde pública caso o parasito proveniente de cães submetidos ao tratamento seja transmitido aos flebotomíneos, com risco de infecção por cepas mais virulentas e resistentes ao tratamento ao homem e aos cães. Deste modo, seria fundamental desenvolver novas estratégias que bloqueiem a transmissão do parasito na LVC aos flebotomíneos.

Além disto, outros fatores tais como *status* imune do hospedeiro ou falhas no tratamento, por exemplo, podem contribuir para a re-emergência e expansão da doença com a circulação de parasitos mais resistentes (Sulahian *et al.*, 1997; Gangneux *et al.*, 2000; Sacks *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 2005). Neste sentido, a identificação e caracterização dos parasitos circulantes é fundamental para se constituir a base para o entendimento da doença, quimioterapia, profilaxia e controle das leishmanioses.

Considerando que existem diferenças na manifestação clínica na LV humana e canina, bem como na resposta aos agentes quimioterápicos, é importante que sejam investigados os perfis de virulência interespecífica e também entre diferentes cepas de *Leishmania* de uma mesma espécie (intra-específica), de forma que o conhecimento de dados biológicos, bioquímicos e moleculares seja utilizado para o estabelecimento de critérios epidemiológicos e clínicos no combate ao parasito e conseqüentemente à doença. Em outras palavras, é importante agrupar os dados bioquímicos com outras formas de expressão fenotípica das espécies de *Leishmania* nos hospedeiros e comportamento biológico dos parasitos.

Neste contexto, o presente estudo destaca a caracterização biológica de diferentes isolados da mesma espécie (*Leishmania chagasi*), através da avaliação da infectividade *in vitro* e *in vivo*, bem como da patogenicidade. É importante ressaltar que em estudos de caracterização, as metodologias utilizadas apresentam vantagens e desvantagens, de forma que a escolha de uma determinada técnica deve ser cautelosa e levar em consideração os objetivos propostos. Trabalhos anteriores utilizaram a metodologia *in vitro* para caracterizar a virulência (Cunha *et al.*, 2013; Domínguez-Bernal *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2014), resistência a drogas (Maia *et al.*, 2007; Luz *et al.*, 2009; Hendrickx *et al.*, 2012) ou comportamento biológico de isolados de *Leishmania*. As avaliações *in vitro* são essenciais em alguns estudos, porém é preciso cautela porque podem não refletir o comportamento do parasito no sistema *in vivo*.

No presente estudo, foi feita a avaliação, *in vitro*, da infectividade de diferentes isolados obtidos a partir de cães de área endêmica para LV. O isolados menos e o mais infectivos foram escolhidos para a avaliação da patogenicidade em hamster. Este modelo de experimentação animal foi escolhido em virtude de vantagens, tais como características clínico-patológicas da LV que se assemelham a doença humana ativa e tempo de experimentação compatível com as possibilidades deste estudo. Surpreendentemente, foi observado que o isolado menos infectivo *in vitro* foi o mais infectivo e patogênico *in vivo*. Este dado alerta para a necessidade de avaliação com cautela em estudos que extrapolem dados de experimentos *in vitro* para o sistema *in vivo*. Além disso, o cultivo *in vitro* do parasito está sujeito a variações entre laboratórios, que pode dificultar a certeza em relação aos resultados. Essas variações podem ser, por exemplo, diferenças entre meios de culturas, número de passagens em meio de cultura em que o parasito se encontra, quantidade de formas metacíclicas no momento da infecção. Por tudo isso é preciso ponderação quando se pretende extrapolar

resultados *in vitro* para avaliações *in vivo*. Em contrapartida, Cunha *et al.* (2013) compararam a virulência entre diferentes cepas através de comparação de infectividade *in vitro* e também *in vivo* em camundongos, sendo observado que a cepa com mais alta carga parasitária *in vitro* também foi a mais infectiva *in vivo* 6 semanas após a infecção experimental de camundongos. O fato é que o conjunto de resultados corroboram com outros estudos (Sulahian *et al.*, 1997; Baptista-Fernandes *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2011) no sentido de que a leishmaniose é uma doença multifatorial e que o amplo espectro de manifestações clínicas depende de características intrínsecas do parasito coordenadas com a susceptibilidade do hospedeiro, além dos aspectos nutricionais e ambientais.

É importante enfatizar que a infecção experimental por *Leishmania* em hamster reproduz muitos aspectos clínicos e da evolução da infecção na LV humana (Badaró *et al.*, 1986; Pastorino *et al.*, 2002, Pedrosa, 2004; Oliveira *et al.*, 2010) e canina (Santos-Gomes *et al.*, 2002; Paranhos-Silva, *et al.*, 2003; Reis *et al.*, 2006; da Costa-Val *et al.*, 2007; Ikeda-Garcia *et al.*, 2007; Baneth *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.*, 2011), resultando em aumento na carga parasitária tecidual (baço e fígado), caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e consequente morte. Por isso, neste estudo utilizamos o modelo hamster para estudar o comportamento *in vivo* dos isolados selecionados na etapa de avaliações *in vitro* (614, 616), sendo incluídas cepas referência de *L. chagasi* como critério de comparação (OP46 e PP75).

O grupo de animais infectados com o isolado 614, que foi o menos infectivo nas avaliações *in vitro*, apresentou a menor taxa de sobrevivência (50%) em 7 meses de acompanhamento. O grupo infectado com a cepa OP46 apresentou 73% de sobrevivência, e, nos demais grupos, houve 100% de sobrevivência. Um estudo prévio realizado em nosso grupo de pesquisa mostrou que em 9 meses de infecção, utilizando-se a mesma concentração de parasitos e a mesma via de infecção, houve 90% e 60% de sobrevivência nos grupos infectados com as cepas PP75 e OP46, respectivamente (Moreira *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2016). Estes dados estão de acordo com os encontrados no presente estudo (100% e 73% de sobrevivência, respectivamente), uma vez que o tempo de infecção foi menor, em virtude dos outros grupos nos quais a perda precoce de animais em consequência da infecção poderia inviabilizar o trabalho. No presente estudo, a observação do aparecimento de sinais clínicos sugestivos de leishmaniose visceral foi feita no decorrer de todo o tempo, desde a infecção experimental até o momento da necropsia, bem como a observação das características macroscópicas e microscópicas

no fígado e baço desses animais. O grupo infectado com o isolado 614 foi o que apresentou maior gravidade da doença, com sinais clínicos evidentes e acentuados, o que mostra o quão patogênico é este isolado. Vários estudos já demonstraram a presença de sinais clínicos semelhantes aos observados neste estudo, no mesmo modelo experimental (Melby *et al.*, 2001; Requena *et al.*, 2000; Poot *et al.*, 2006; Riça-Capela *et al.*, 2003; Dea-Ayuela *et al.*, 2007, Nieto *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2012). Assim como observado por Moreira *et al.* (2012), onde a hepatomegalia foi pouco frequente, não houve registro de hepatomegalia, enquanto a esplenomegalia foi bastante frequente. Sendo assim, o isolado 614 apresenta-se como potencial referência a ser utilizado em estudos de infecção experimental, terapêuticos e profiláticos contra o agente etiológico da LV.

A avaliação dos parâmetros hematológicos mostrou que o grupo infectado com o isolado 614 apresentou anemia grave, com redução dos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito em relação aos demais grupos experimentais. Foi observado também que este grupo apresentou redução dos níveis de linfócitos em relação ao grupo infectado com a cepa OP46. Os parâmetros hematológicos podem apresentar relevância para o acompanhamento do estado clínico e definição de protocolos terapêuticos (Da Costa-Val *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2009; Solano-Gallego *et al.* 2009; Brasil, 2009; Oliveira *et al.*, 2010). Neste sentido, na LV humana e canina, é estabelecido um quadro hematológico grave, com anemia normocítica, normocrômica, e valores reduzidos de hemoglobina e hematócrito. Com relação à série branca, ocorre imunossupressão com uma forte queda nos valores globais de leucócitos (leucopenia), diminuição de monócitos (monocitopenia), linfócitos (linfopenia) e eosinófilos (eosinopenia) (Pearson, 1996; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Ciaramella *et al.*, 1997; Pastorino *et al.*, 2002; Feitosa *et al.*, 2003; Pedrosa, 2004; Reis *et al.*, 2006a; Costa-Val *et al.*, 2007; Maia *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2010). Sendo assim, o grupo que apresentou pior prognóstico da doença foi o infectado com o isolado 614, com baixos níveis de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e linfócitos, o que associado a outros dados pode estar relacionado ao grande potencial de patogenicidade deste isolado.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, foi observado aumento nos níveis de TGO no grupo de animais infectado com o isolado 614 em relação ao grupo controle e ao grupo infectado com a cepa PP75. Alterações nas concentrações de enzimas aminotransferases séricas (TGO e TGP) podem indicar lesões de células hepáticas (Kaneko, 1997), sinal clínico típico da LV.

As células inflamatórias do fígado foram quantificadas através de análise morfométrica. Corroborando com a hipótese de maior patogenicidade induzida pelo isolado 614, foi observado que este grupo apresentou um processo inflamatório hepático mais intenso. Estes dados, mais uma vez, apontam para um maior comprometimento causado pelo isolado 614. O fígado, juntamente com o baço, constitui o principal órgão atingido na LV experimental, onde a resolução da infecção aguda está associada ao desenvolvimento de granulomas hepáticos intralobulares tipicamente inflamatórios em torno das células de Küpffer (Wilson *et al.*, 1987; Vianna *et al.*, 2002; Stanley e Engweda, 2007). De acordo com Moreira *et al.* (2012), o aumento do processo inflamatório e a presença de maior número de granulomas podem estar relacionados ao intenso parasitismo. Sendo assim, esses dados apontam para um elevado parasitismo tecidual do grupo 614. De fato, o grupo experimental infectado com o isolado 614 apresentou elevado parasitismo hepático.

Este conjunto de dados decorrentes da avaliação da infecção experimental em hamsters comprovam que o isolado 614 é o mais patogênico e infectivo *in vivo*, embora tenha sido o menos infectivo *in vitro*, como já constatado. Em contrapartida o isolado 616, mais infectivo *in vitro*, não teve destaque nas avaliações *in vivo*. É importante ressaltar que nós obtivemos estes isolados a partir de cães naturalmente infectados em área endêmica e que o cão do qual foi obtido o isolado 614 apresentava sinais clínicos graves indicativos de LV. Já o cão do qual foi obtido o isolado 616 apresentava poucos sinais clínicos. Estes dados reforçam nossa hipótese de que o isolado 614 é mais patogênico. Entretanto, embora estes dados corroborem nossos resultados, é importante observar que os mesmos não podem ser considerados como critério na avaliação destes isolados, uma vez que se trata de infecção natural em campo e não há como mensurar o tempo de infecção e a quantidade de parasitos inoculados nestas condições.

Além de comprovar que dados de infectividade *in vitro* nem sempre podem ser extrapolados para o experimentações *in vivo*, nossos dados também mostraram que existe diferença de infectividade, *in vitro* e *in vivo*, e de patogenicidade entre os isolados. Pereira *et al.* (2009) mostraram que diferentes isolados de *L. braziliensis* causaram manifestações patológicas distintas em camundongos. Um outro estudo conduzido por Teixeira *et al.* (2005) também comparou a infecção em modelo murino com seis diferentes isolados de *L. braziliensis* e mostrou que existe diferença de virulência e patogenicidade e que as diferenças no tamanho das lesões estavam relacionadas a cepa do parasito e não a sua quantidade na lesão. Cunha *et al.* (2013)

fizeram a caracterização e avaliação da infectividade de cepas dermatotrópicas e viscerotrópicas de *L. infantum* no modelo murino e também atribuíram as diferenças de infectividade encontradas tanto *in vitro* quanto *in vivo* as características intrínsecas de cada cepa. Dominguéz-Bernal *et al.* (2014) avaliaram a virulência de cepas de *L. infantum* isoladas de *Phlebotomus perniciosus* em uma área de Madri, na França, onde havia um surto de LV, e observaram que os isolados apresentaram alta virulência em termos de índice de infecção, produção de citocinas e atividade enzimática envolvida na patogênese da LV. Todos estes resultados corroboram com nossos dados no sentido de que existe diferença de virulência entre cepas da mesma espécie de *Leishmania*.

É possível supor que as diferenças que existem entre cepas de *Leishmania*, comprovadas por estudos como os citados anteriormente, signifique a ocorrência de diferença na resistência a tratamento entre as mesmas. Neste sentido, um dos graves problemas observado na quimioterapia das leishmanioses está relacionado ao tratamento de cães. Embora essa prática seja permitida em alguns países, trata-se de uma medida ineficaz uma vez que induz a remissão dos sinais clínicos, mas não elimina o parasito, de forma que não impede a infectividade dos flebotomíneos (Giunchetti *et al.*, 2006, Reis *et al.*, 2006a, Ferreira *et al.*, 2012; Laurenti *et al.*, 2013). Sendo assim, é factível considerar a possibilidade de circulação de parasitos que apresentem resistência ao tratamento nas áreas endêmicas para LV. Seblova *et al.* (2014) estudaram o desenvolvimento de *L. infantum* resistentes a antimônio em vetores naturais (*Lutzomyia longipalpis* e *Phlebotomus perniciosus*) para determinar o risco de transmissão dos parasitos e observaram que o fenótipo de resistência foi mantido após passagem pelo vetor. Estes resultados destacam o risco de circulação de cepas de *Leishmania* resistentes e questionam a utilização de medicamentos de uso humano para tratamento de cães com LVC. O nosso trabalho também alerta para esta questão, uma vez que comprova a circulação de cepas com diferentes perfis de infectividade e patogenicidade em área endêmica. Futuros estudos com estes isolados poderão responder se também existe diferença na aquisição de resistência a drogas entre os mesmos, inclusive quando são submetidos a pressão medicamentosa no sistema *in vivo*.

Assim, nós utilizamos os isolados selecionados na primeira etapa deste estudo para infectar experimentalmente hamsters e submeter estes animais infectados a doses de Glucantime®, insuficientes para o sucesso do tratamento, mas que pudesse submeter os parasitos a uma pressão medicamentosa. O re-isolamento destes parasitos foi realizado, possibilitando inúmeros futuros estudos que poderão investigar com maior

profundidade se houve alguma mudança no sentido de aquisição de resistência ao tratamento.

Além disso, esta estratégia possibilitou a avaliação do perfil desta infecção, perante pressão medicamentosa, em hamsters. De maneira geral, foi observado um perfil semelhante ao ocorrido na infecção experimental na ausência de pressão medicamentosa. Algumas particularidades, entretanto, foram observadas no grupo 616T. De forma curiosa, a presença do quimioterápico parece ter facilitado a progressão da infecção. O grupo 616T apresentou uma taxa de sobrevida de 58%, enquanto o grupo 616, sem pressão medicamentosa tinha 100% de sobrevida. Além disso, os animais infectados com o isolado 616 e submetidos a pressão medicamentosa (616T) apresentaram um grau de emagrecimento, caquexia e esplenomegalia comparáveis ao grupo 614T. De forma intrigante, os resultados dos exames hematológicos e bioquímicos do grupo 616T não apresentaram alterações em relação aos demais grupos. Já a infecção com o isolado 614, mesmo com a intervenção com Glucantime®, manteve as mesmas características de gravidade observadas na etapa anterior, com maior taxa de mortalidade, anemia marcante, com baixos níveis de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito e também baixos níveis de linfócitos.

A avaliação do infiltrado celular do fígado também revela a maior gravidade do isolado 614, também na presença de intervenção com Glucantime®. No grupo 616T foi observada uma tendência a aumento da quantidade de células inflamatórias no fígado, entretanto este aumento não foi estatisticamente significativo.

As cargas parasitárias no baço e fígado também foram avaliadas. O grupo 614T apresentou maior parasitismo, assim como ocorreu na etapa anterior com o grupo 614. Já no grupo 616T foi notório o aumento do parasitismo.

De acordo com estes resultados, podemos supor que a presença do quimioterápico, em doses insuficientes indicadas como protocolo de tratamento da LV, parece ter induzido alguma alteração que tornou a infecção com o isolado 616 mais grave. Diante destes resultados, pode-se especular sobre a possibilidade de ter ocorrido uma seleção, na qual sobreviveram a pressão medicamentosa apenas os parasitos mais infectivos. Esta alteração merece atenção com futuros estudos que possam explicar o mecanismo que levou a estes resultados. Pode ser que estes dados sejam mais um alerta do perigo que o tratamento não esterilizante (como o que ocorre no tratamento da LVC) possa representar na seleção de parasitos mais virulentos.

Dessa forma, vários estudos têm sido feitos no sentido de compreender os mecanismos que levam a aquisição de resistência a drogas. Kazeme-Rad *et al.* (2013) fizeram um estudo para identificar genes diferencialmente expressos em isolados de campo de *Leishmania tropica* sensíveis e resistentes ao tratamento com antimonial e observaram o envolvimento de biomoléculas distintas na resistência ao antimônio. Nosso trabalho possibilita investigações neste sentido, uma vez que o contato dos parasitos com Glucantime® no sistema *in vivo* pode ter, de alguma forma, levado a algum mecanismo de aquisição de resistência. Uma das nossas apostas com a qual almejamos responder algumas dessas questões é a proteômica.

As análises proteômicas em *Leishmania* podem ser utilizadas para estudos de expressão diferencial de proteínas com distintas abordagens e objetivos. Sendo assim, diversos estudos têm sido utilizados na tentativa de elucidar mecanismos de resistência à drogas, com o uso da proteômica comparativa entre parasitos susceptíveis e resistentes. Em um trabalho realizado por Drummelsmith e colaboradores, uma comparação entre géis 2D que mapearam proteínas de parasitos *L. major* resistentes e susceptíveis ao metotrexato, mostrou a presença de um *spot* de 30 kDa com um PI aproximado de 6,3 apenas na linhagem resistente. Esta proteína foi identificada como redutase pteridina, sendo que a super-expressão da mesma está relacionada a um mecanismo de resistência (Drummelsmith *et al.*, 2003). Carnielli *et al.* (2014) utilizaram a análise proteômica para elucidar diferenças de expressão entre parasitos *L. infantum* sensíveis e resistentes a miltefosine isolados de pacientes com LV que responderam de forma distinta ao tratamento. Neste estudo, foi observada, em parasitos resistentes a miltefosina, uma maior expressão de proteínas que desempenham um papel em mecanismos de homeostase, resposta ao estresse, proteção à apoptose e translocação da droga, consistente com o fenótipo de resistência (Carnielli *et al.*, 2014). Em um estudo comparativo entre cepas de *L. donovani* resistentes e susceptíveis ao antimonial pentavalente isoladas de pacientes indianos com LV, a análise proteômica revelou uma série de proteínas diferencialmente expressas, as quais sugerem que a morte celular programada é modificada no parasito resistente (Vergnes *et al.*, 2007). Outro estudo também analisou a resistência ao antimonial pentavalente através da proteômica comparativa entre cepas de *L. donovani* susceptíveis e resistentes isoladas a partir de pacientes com LV. Neste trabalho, foi investigada a possibilidade de envolvimento de várias proteínas, de membrana e citossólicas, indicando que vários mecanismos são responsáveis pela resistência às drogas (Kumar *et al.*, 2010). Estes estudos fornecem

valiosas informações na busca de estratégias terapêuticas e profiláticas contra a LV e servem como base para nossos futuros estudos a partir dos dados obtidos nesse trabalho.

7. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os isolados obtidos a partir de cães residentes em área endêmica apresentam distintos perfis de infectividade, *in vitro* e *in vivo*, e patogenicidade em hamster. Além disso, ficou demonstrado que resultados obtidos no sistema *in vitro* podem não corresponder, em intensidade de infecção, ao comportamento *in vivo*. Esta hipótese é sustentada pelos resultados indicando que o isolado menos infectivo *in vitro* foi o mais infectivo e patogênico em hamster. Adicionalmente, o isolado 616, quando submetido a pressão medicamentosa com Glucantime® *in vivo*, apresentou mudanças no perfil da infecção que permitem supor a ocorrência de seleção de parasitos mais virulentos.

8. Perspectivas

Os resultados deste estudo permitiram identificar diferença de infectividade *in vitro* e patogenicidade em hamsters, entre diferentes os isolados avaliados. Buscando identificar a possível existência de outras diferenças para um melhor entendimento do significado das mesmas, este estudo tem como perspectivas:

- Realizar a comparação do padrão de metilação do DNA entre os diferentes isolados, inclusive os que sofreram pressão medicamentosa *in vivo*;
- Realizar a análise proteômica comparativa, entre os diferentes isolados de *L. chagasi* obtidos de hamsters, na presença e ausência de pressão medicamentosa, a partir de proteínas solúveis e do extrato total destes parasitos.

9. Referências bibliográficas

Acestor, N., S. Masina, *et al.* Establishing two-dimensional gels for the analysis of *Leishmania* proteomes. Proteomics, v.2, n.7, Jul, p.877-9. 2002.

Aguiar-Soares, R.D., Roatt B.M., Ker, H.G., Moreira, N.D, Mathias, F.A, Cardoso, J.M, Gontijo, N.F, Bruna-Romero, O., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Correa-Oliveira, R., Giunchetti, R.C., Reis, A.B. LBSapSal-vaccinated dogs exhibit increased circulating T-lymphocyte subsets (CD4+ and CD8+) as well as a reduction of parasitism after challenge with *Leishmania infantum* plus salivary gland of *Lutzomyia longipalpis*. Parasit Vectors. Feb 7;7(1):61. 2014.

Alimohammadian, M. H., H. Darabi, *et al.* Genotypically distinct strains of *Leishmania major* display diverse clinical and immunological patterns in BALB/c mice. Infect Genet Evol, v.10, n.7, Oct, p.969-75. 2010.

Alencar, J. E.; Neves, J. Leishmaniose visceral (calazar). Veronesi R, Doenças Infecciosas e parasitárias. 6th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p 724-738, 1982.

Alvar, J., C. Canavate, *et al.* Canine leishmaniasis. Adv Parasitol, v.57, p.1-88. 2004.

Alvar, J., S. Croft, *et al.* Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. Adv Parasitol, v.61, p.223-74. 2006.

Alvar, J. e M. Jimenez. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? Aids, v.8, n.6, Jun, p.854. 1994.

Alvar, J., I. D. Velez, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One, v.7, n.5, p.e35671. 2012

Alves, C. F., I. F. De Amorim, *et al.* Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.4, Apr 15, p.349-58. 2009.

Andrade H. M.; Toledo V. P.; Pinheiro M. B.; Guimarães T. M.; Oliveira N. C.; Castro J. A.; Silva R. N.; Amorim A. C.; Brandão R. M.; Yoko M.; Silva A. S.; Dumont K.; Ribeiro M. L. Jr; Bartchewsky W.; Monte S. J. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (=L. chagasi) in Brazil. Vet Parasitol. Sep 27;181(2-4):83-90. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.05.009. Epub 2011 May 14. 2011.

Ashford, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. Int J Parasitol, v.30, n.12-13, Nov, p.1269-81. 2000.

Badaró R. e Duarte M.I.S. Leishmaniose Visceral (Calazar). 97: 1234 - 1255. 1986.

Badaro, R., E. Falcoff, *et al.* Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent

- antimony and interferon gamma. N Engl J Med, v.322, n.1, Jan 4, p.16-21. 1990.
- Badaro, R., T. C. Jones, *et al.* New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.154, n.6, Dec, p.1003-11. 1986.
- Baneth, G. e I. Aroch. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. Vet J, v.175, n.1, Jan, p.14-5. 2008.
- Baneth, G. e S. E. Shaw. Chemotherapy of canine leishmaniasis. Vet Parasitol, v.106, n.4, Jul 2, p.315-24. 2002.
- Baptista-Fernandes T, Marques C, Roos Rodrigues O, Santos-Gomes GM: Intra-specific variability of virulence in *Leishmania infantum* zymodeme MON-1 strains Comp Immunol Microbiol Infect Dis. Jan;30(1):41-53. Epub 2006 Nov 15. 2007.
- Bhattacharya, S. K., P. K. Sinha, *et al.* Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.196, n.4, Aug 15, p.591-8. 2007.
- Botilde, Y., T. Laurent, *et al.* Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. Infect Genet Evol, v.6, n.6, Nov, p.440-6. 2006.
- Bourdoiseau, G., C. Bonnefont, *et al.* Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.56, n.3-4, May, p.345-51. 1997.
- Braga, M. S., L. X. Neves, *et al.* Shotgun proteomics to unravel the complexity of the *Leishmania infantum* exoproteome and the relative abundance of its constituents. Mol Biochem Parasitol, v.195, n.1, Jun, p.43-53. 2014
- Brasil. Portaria Interministerial. Diário Oficial da União, v.n.1.426, seção 1, p.133. 2008.
- Brasil. Guia de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, v.Ministério da Saúde. Brasília. 2009.
- Brobey, R. K., F. C. Mei, *et al.* Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. Braz J Infect Dis, v.10, n.1, Feb, p.1-6. 2006.
- Carnielli, J. B. T.; Andrade, H., M.; Pires, S. F.; Chapeaurouge, A. D.; Perales, J.; Monti-Rocha, R.; Carvalho, S. F. G.; Ribeiro, L. P.; Dietze, R.; Figueiredo, S. G.; Lemos, E. M. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum* /*chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. J Proteomics. Aug 28;108:198-208. doi: 10.1016/j.jprot.2014.05.010. Epub 2014 May 27. 2014.
- Ceccarelli M.; Galluzzi L.; Migliazzo A.; Magnani M. Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. PLoS ONE 9(2): e88845. doi:10.1371/journal.pone.0088845. 2014.

- Chance, M. L., L. F. Schnur, *et al.* The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the Aethiopian zoogeographical region of Africa. Ann Trop Med Parasitol, v.72, n.6, Dec, p.533-42. 1978.
- Chang, K. P. e B. S. Mcgwire. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. Kinetoplastid Biol Dis, v.1, n.1, May 20, p.1. 2002.
- Charlab, R., Valenzuela, J.G., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Proc Natl Acad Sci U S A; 96:15155–60. 1999.
- Chappuis, F., S. Sundar, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nat Rev Microbiol, v.5, n.11, Nov, p.873-82. 2007.
- Ciaramella, P., G. Oliva, *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. Vet Rec, v.141, n.21, Nov 22, p.539-43. 1997.
- Coelho, A. C., N. Messier, *et al.* Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, v.51, n.8, Aug, p.3030-2. 2007.
- Conti, R. V.; Moura Lane, V. F.; Montebello, L.; Pinto Junior, V. L. Visceral leishmaniasis epidemiologic evolution in timeframes, based on demographic changes and scientific achievements in Brazil. J Vector Borne Dis. Apr-Jun;53(2):99-104. 2016.
- Convit, J., P. L. Castellanos, *et al.* Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. Lancet, v.1, n.8530, Feb 21, p.401-5. 1987.
- Cordeiro-da-Silva, A., Cardoso, L., Araujo, N., Castro, H., Tomas, A., Rodrigues, M., Cabral, M., Vergnes, B., Sereno, D., Ouaissi, A. Identification of antibodies to *Leishmania* silent information regulatory 2 (SIR2) protein homologue during canine natural infections: pathological implications. Immunol. Lett. 86, 155–162. 2003.
- Corrêa, A.P.F.L., Dossi, A.C.S., Vasconcelos, R.O., Munari, D.P., Lima, V.M.F. Evaluation of transformation growth factor b1, interleukin-10 and interferon-g in males symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. Vet. Parasitol. 143, 267–274. 2007.
- Costa, C. H. e J. B. Vieira. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, v.34, n.2, Mar-Apr, p.223-8. 2001.
- Costa, M. M., H. M. Andrade, *et al.* Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. J Proteome Res, v.10, n.5, May 6, p.2172-84.
- Coura-Vital, W., M. J. Marques, *et al.* Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. Vet J, v.190, n.2, Nov, p.e43-7.

- Coura-Vital, W., M. J. Marques, *et al.* Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. PLoS Negl Trop Dis, v.5, n.8, Aug, p.e1291.
- Coura-Vital, W., A. B. Reis, *et al.* Risk factors for seroconversion by *Leishmania infantum* in a cohort of dogs from an endemic area of Brazil. PLoS One, v.8, n.8, p.e71833.
- Croft, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. Trop Med Int Health, v.6, n.11, Nov, p.899-905. 2001.
- Croft, S. L., J. Hogg, *et al.* The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. J Antimicrob Chemother, v.30, n.6, Dec, p.827-32. 1992.
- Croft, S. L. e P. Olliaro. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. Clin Microbiol Infect, v.17, n.10, Oct, p.1478-83.
- Croft, S. L., S. Sundar, *et al.* Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev, v.19, n.1, Jan, p.111-26. 2006.
- Cunha, J.; Carrillo, E.; Sánchez, C.; Cruz, I.; Moreno, J.;Cordeiro-da-Silva, A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. Parasit Vectors. Apr 26;6:122. doi: 10.1186/1756-3305-6-122. 2013
- Da Costa-Val, A. P., R. R. Cavalcanti, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. Vet J, v.174, n.3, Nov, p.636-43. 2007.
- Da Fonseca Pires S¹, Fialho LC Jr, Silva SO, Melo MN, de Souza CC, Tafuri WL, Bruna Romero O, de Andrade HM. Identification of virulence factors in *Leishmania infantum* strains by a proteomic approach. J Proteome Res. Apr 4;13(4):1860-72. doi: 10.1021/pr400923g. Epub 2014 Mar 24. 2014
- De Andrade, H. M., A. B. Reis, *et al.* Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. Vet Parasitol, v.140, n.3-4, Sep 10, p.231-8. 2006.
- Day, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniasis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. Vet Parasitol.147(1-2):2-8. 2007.
- Dea-Ayuela, M. A., S. Rama-Iniguez, *et al.* Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. Vet Res Commun, v.31, n.6, Aug, p.703-17. 2007.
- Deane, L. M. Reservoirs of *Leishmania donovani* in Brazil.. Rev. Assoc. Med. Bras. 7, 161-169. 1961.
- Deane, L. Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores

realizados no estado do Ceará. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, p.162. 1956.

Deane, L. M. e M. P. Deane. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.4, May-Jun, p.198-212. 1962.

Degrave, W., O. Fernandes, *et al.* Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania--a mini-review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.89, n.3, Jul-Sep, p.463-9. 1994.

Delgado, J., J. Macias, *et al.* High frequency of serious side effects from meglumine antimoniate given without an upper limit dose for the treatment of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus type-1-infected patients. Am J Trop Med Hyg, v.61, n.5, Nov, p.766-9. 1999.

Descoteaux, A., H. A. Avila, *et al.* Leishmania LPG3 encodes a GRP94 homolog required for phosphoglycan synthesis implicated in parasite virulence but not viability. Embo J, v.21, n.17, Sep 2, p.4458-69. 2002.

Desjeux, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, v.27, n.5, Sep, p.305-18. 2004.

Do Monte-Neto RI, C. A., Raymond F, Le´Gare´ D, Corbeil J, Et Al. Gene Expression Profiling and Molecular. Characterization of Antimony Resistance in Leishmania amazonensis. PLoS Negl Trop Dis, v.5, p.(5): e1167. 2011.

Domínguez-Bernal, G; Jiménez, M.; Molina, R; Ordóñez-Gutiérrez, L.; Martínez-Rodrigo, A.; Mas, A.; Cutuli, M. T.; Carrión, J. Characterisation of the ex vivo virulence of *Leishmania infantum* isolates from *Phlebotomus perniciosus* from an outbreak of human leishmaniosis in Madrid, Spain. Parasit Vectors. Nov 7;7:499. doi: 10.1186/s13071-014-0499-1. 2014.

Drummelsmith, J., V. Brochu, *et al.* Proteome mapping of the protozoan parasite Leishmania and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. Mol Cell Proteomics, v.2, n.3, Mar, p.146-55. 2003.

Dujardin, J. C., L. Campino, *et al.* Spread of vector-borne diseases and neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis, v.14, n.7, Jul, p.1013-8. 2008.

Duncan, R.; Gannavaram, S.; Dey, R.; Debrabant, A.; Lakhali-Naouar, I.; Nakhasi, H. L. Identification and Characterization of Genes Involved in Leishmania Pathogenesis: The Potential for Drug Target Selection. Molecular Biology International, v.2011, p.10. 2011.

El-on, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. Isr Med Assoc J, v.11, n.10, Oct, p.623-8. 2009.

Estoup, A., P. Presa, *et al.* (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). Heredity (Edinb), v.71 (Pt 5), Nov, p.488-96. 1993.

Ferreira *et al.*, Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of *Leishmania infantum* DNA in an Endemic Urban Area in Brazil PLoS NTD, 6 (4), e1596. 2012.

Fortin, A., S. Hendrickx, *et al.* Efficacy and tolerability of oleylphosphocholine (OIPC) in a laboratory model of visceral leishmaniasis. J Antimicrob Chemother, v.67, n.11, Nov, p.2707-12.

Gardener, P. J., M. L. Chance, *et al.* Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. Ann Trop Med Parasitol, v.68, n.3, Sep, p.317-25. 1974.

Giunchetti, R. C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R. D. O., Vitoriano-Souza, J., Moreira, N. D., Malaquias, L. C., Castro, L. L. M., Lana, M., Reis, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. Vaccine 25, 7674-7686. 2007.

Giunchetti, R. C., O. A. Martins-Filho, *et al.* Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.121, n.1-2, Jan 15, p.23-33. 2008a.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, *et al.* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci, v.84, n.2, Apr, p.269-77. 2008b.

Giunchetti, R.C., Reis, A.B., Da Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O. A., Correa-Oliveira, R., Bethony, J., Vale, A.M., DA Silva Quetz, J., Bueno, L.L., Franca-Silva; J.C., Nascimento, E., Mayrink, W., Fujiwara, R.T. Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. Res. Vet. Sci., 85, 106–112. 2008c.

Giunchetti, R. C., W. Mayrink, *et al.* Relationship between canine visceral leishmaniasis and the *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* burden in dermal inflammatory foci. J Comp Pathol, v.135, n.2-3, Aug-Oct, p.100-7. 2006.

Godfrey, D. G. e V. Kilgour. Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.70, n.3, p.219-24. 1976.

Gomes, A. H., I. M. Ferreira, *et al.* PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine Leishmaniasis. Vet Parasitol, v.144, n.3-4, Mar 31, p.234-41. 2007.

Gongora, R., N. Acestor, *et al.* Mapping the proteome of *Leishmania Viannia* parasites using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and associated technologies. Biomedica, v.23, n.2, Jun, p.153-60. 2003.

Gontijo, C. M. F., Melo, M. N., Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol., v.7, p.338- 349. 2004.

- Gradoni, L., K. Soteriadou, *et al.* Drug regimens for visceral leishmaniasis in Mediterranean countries. Trop Med Int Health, v.13, n.10, Oct, p.1272-6. 2008.
- Grimaldi, G., Jr., H. Momen, *et al.* Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.44, n.6, Jun, p.645-61. 1991.
- Grimaldi, G., Jr. e R. B. Tesh. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. Clin Microbiol Rev, v.6, n.3, Jul, p.230-50. 1993.
- Handman, E. Cell biology of Leishmania. Adv Parasitol. ;44:1-39. 1999.
- Harhay, M. O.; Olliaro, P. L.; Costa, D. L.; Costa, C.H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. Sep;27(9):403-9. doi: 10.1016/j.pt.2011.04.001. Epub 2011 May 18. 2011.
- Hatam, G. R.; Bahrami, S.; Razavi, S. M.; Oryan, A. Isoenzyme and ultrastructural characterization of Leishmania tropica axenic amastigotes and promastigotes. Parasitol Res. Feb;112(2):643-8. doi: 10.1007/s00436-012-3179-0. Epub 2012 Nov 13. 2013.
- Hendrickx, S., Inocencio da Luz, R. A., Bhandari, V., Kuypers K, Shaw CD, *et al.* Experimental Induction of Paromomycin Resistance in Antimony- Resistant Strains of L. donovani: Outcome Dependent on In Vitro Selection Protocol. PLoS Negl Trop Dis 6(5): e1664. doi:10.1371/journal.pntd.0001664. 2012.
- <http://www.crmvmg.org.br/novoportal/Conteudo/detalheConteudo.aspx?id=2506> acesso dia 12/09/2016.
- <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/segaut>. Acesso em setembro de 2016.
- Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: Third WHO report on neglected diseases. In: Peter H, editor. Geneva: World Health Organization Press 2015; p.1–191.
- Ikeda-Garcia, F. A., R. S. Lopes, *et al.* Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi submitted to treatment with meglumine antimoniate. Vet Parasitol, v.143, n.3-4, Feb 28, p.254-9. 2007.
- Jha, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.389-98. 2006.
- Jha, T. K., P. Olliaro, *et al.* Randomised controlled trial of aminosidine (paromomycin) v sodium stibogluconate for treating visceral leishmaniasis in North Bihar, India. Bmj, v.316, n.7139, Apr 18, p.1200-5. 1998.
- Jha, T. K., S. Sundar, *et al.* Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med, v.341, n.24, Dec 9, p.1795-800. 1999.
- Joshi, M. B., M. E. Rogers, *et al.* Molecular characterization, expression, and in vivo

analysis of LmexCht1: the chitinase of the human pathogen, *Leishmania mexicana*. J Biol Chem, v.280, n.5, Feb 4, p.3847-61. 2005.

Kamhawi, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. Microbes Infect; 2:1765–73. 2000.

Kaneko, J. J. H., J. W. Et Al. . Clinical Biochemistry of domestic animals. Academic Press Inc, San Diego, p.932. 1997.

Kazemi-Rad, E.; Mohebbali, M.; Khadem-Erfan, M. B.; Saffari, M.; Raoofian, R.; Hajjaran, H.; Hadighi, R.; Khamesipour, A.; Rezaie, S.; Abedkhozasteh, H.; Heidari, M. Identification of antimony resistance markers in *Leishmania tropica* field isolates through a cDNA-AFLP approach. Exp Parasitol. Oct;135(2):344-9. doi: 10.1016/j.exppara.2013.07.018. Epub 2013 Aug 6. 2013.

Kreutzer, R. D. e H. A. Christensen. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. Am J Trop Med Hyg, v.29, n.2, Mar, p.199-208. 1980.

Kumar, A., B. Sisodia, *et al.* Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. Br J Clin Pharmacol, v.70, n.4, Oct, p.609-17.

Lachaud, L., S. Marchergui-Hammami, *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol, v.40, n.1, Jan, p.210-5. 2002.

Lainson, R., L. Ryan, *et al.* Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.82, n.3, Jul-Sep, p.421-4. 1987.

Lainson, R. e J. J. Shaw. Observations on the development of *Leishmania* (L.) chagasi Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). Ann Parasitol Hum Comp, v.63, n.2, p.134-45. 1988.

Lanotte, G., J. A. Rioux, *et al.* The application of a numerical method to the taxonomy of the genus *Leishmania* Ross, 1903,--The recognition of 146 original lines in the Old World. Use of allozymic characters. Epidemiological and phyletic significance (author's transl)]. Ann Parasitol Hum Comp, v.56, n.6, p.575-91. 1981.

Laskay, T.; Van Zandbergen, G.; Solback, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. Immunobiology, New York, v. 213, n. 3/4, p. 183-191, 2008.

Laurenti, M. D. ; Corbett, C.E.P. ;Andrade Júnior, H. F.; Duarte, M. I. S. . Comparative study of the biological behaviour in hamsters of two isolates of *Leishmania* characterized as *L.major-like* and *L.donovani*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo - Brasil, v. 30, n. 1, p. 21-27, 1988.

Laurenti, M. D.; Rossi C.N.; da Mata, V. L.; Tomokane, T. Y; Corbett, C. E., Secundino, N. F.; Pimenta, P. F.; Marcondes, M. Asymptomatic dogs are highly

competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. Vet Parasitol, 23;196(3-4):296-300. doi: 10.1016. 2013.

Lemos, E. M., M. D. Laurenti, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: performance of a rapid diagnostic test (Kalazar Detect) in dogs with and without signs of the disease. Acta Trop, v.107, n.2, Aug, p.205-7. 2008.

Lerner, E. A., Ribeiro, J. M., Nelson, R. J., Lerner, M. R. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. J Biol Chem, 266:11234–6. 1991.

Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M., & Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L arginine. J. Immunol. 144, 4794-4797. 1990.

Locatelli, F. M.; Cajalb, S. P.; Barroso, P. A.; Lauthierc, J. J.; Morac, M. C; Juarezb, M; Katod, H.; Nasserb, J. R.; Hashiguchia, Y.; Korenaga, M.; Marco, J. D. The isolation and molecular characterization of *Leishmania* spp. from patients with American tegumentary leishmaniasis in northwest Argentina. Acta trop. 131, 16-21. 2014.

Lohman, K. L., P. J. Langer, *et al.* Molecular cloning and characterization of the immunologically protective surface glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.21, Nov, p.8393-7. 1990.

Lukes, J., I. L. Mauricio, *et al.* Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.22, May 29, p.9375-80. 2007.

Magalhães RDM, Duarte MC, Mattos EC, Martins VT, Lage PS, *et al.* Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. PLoS Negl Trop Dis 8(4): e2764. doi:10.1371/journal.pntd.0002764. 2014.

Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votypka J, Volf P: Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. PLOS Neglect Trop D 2011, 5(6):e1181.

Maia, C., M. Nunes, *et al.* Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. Acta Trop, v.116, n.3, Dec, p.193-9.

Maia, C., M. Nunes, *et al.*, In vitro drug susceptibility of *Leishmania infantum* isolated from humans and dogs. Exp Parasitol, v.135, p.36-41. 2013.

Maltezou, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. J Biomed Biotechnol, v.2010, p.617521.

Mancianti, F., M. Gramiccia, *et al.* Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.82, n.4, p.566-7. 1988.

Martinez, E., V. Alonso, *et al.* RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*. Parasitology, v.127, n.Pt 6, Dec, p.513-7. 2003.

Mauricio, I. L., J. R. Stothard, *et al.* The strange case of *Leishmania chagasi*. Parasitol Today, v.16, n.5, May, p.188-9. 2000.

Mayrink, W., A. C. Botelho, *et al.* Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. Rev Soc Bras Med Trop, v.39, n.1, Jan-Feb, p.14-21. 2006.

McGwire, B. S. e A. R. Satoskar. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. Qjm, v.107, n.1, Jan, p.7-14.

Melby, P. C., B. Chandrasekar, *et al.* The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. J Immunol, v.166, n.3, Feb 1, p.1912-20. 2001.

Messaritakis, I., V. Christodoulou, *et al.* Drug resistance in natural isolates of *Leishmania donovani* s.l. promastigotes is dependent of Pgp170 expression. PLoS One, v.8, n.6, p.e65467.

Miles, M. A., R. Lainson, *et al.* Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis*--aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.75, n.4, p.524-9. 1981.

Momen, H., G. Grimaldi Junior, *et al.* *Leishmania infantum*, the aetiological agent of American visceral leishmaniasis (AVL)? Mem Inst Oswaldo Cruz, v.82, n.3, Jul-Sep, p.447-8. 1987.

Montalvo, A. M., L. Monzote, *et al.* [PCR-RFLP and RAPD for typing neotropical *Leishmania*]. Biomedica, v.28, n.4, Dec, p.597-606. 2008.

Mookerjee Basu, J., A. Mookerjee, *et al.* Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. Antimicrob Agents Chemother, v.52, n.3, Mar, p.1080-93. 2008.

Moreira, N., J. Vitoriano-Souza, *et al.* Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: "Leishman Donovan units" versus real-time PCR. PLoS One, v.7, n.10, p.e47907. 2012

Moreira, N. D. HISTÓRIA NATURAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM HAMSTER "Mesocricetus auratus" EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR DUAS CEPAS DE *Leishmania infantum* COM PERFIS DISTINTOS DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE (Tese de doutorado em Ciências Biológicas. Ouro Preto: Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto). 2012.

- Moreira, N. D.; Vitoriano-Souza, J.; Roatt, B. M.; Vieira, P. M.; Coura-Vital, W.; Cardoso, J. M.; Rezende, M. T.; Ker, H. G.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Reis, A. B. Clinical, hematological and biochemical alterations in hamster (*Mesocricetus auratus*) experimentally infected with *Leishmania infantum* through different routes of inoculation. Parasit Vectors. Mar 31;9:181. doi: 10.1186/s13071-016-1464-y. 2016.
- Moreno, J., J. Nieto, *et al.* The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. Vet Immunol Immunopathol, v.71, n.3-4, Nov 30, p.181-95. 1999.
- Mosser, D. M.; Burke, S. K.; Coutavas, E. E.; Wedgwood, J. F.; Edelson, P. J. *Leishmania species*: mechanisms of complement activation by five strains of promastigotes. Exp Parasitol. Dec;62(3):394-404. 1986
- Murray, H. W. Effect of continuous administration of interferon-gamma in experimental visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.161, n.5, May, p.992-4. 1990.
- Murray, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother, v.45, n.8, Aug, p.2185-97. 2001.
- Neogy, A. B., I. Vouldoukis, *et al.* Exploitation of parasite-derived antigen in therapeutic success against canine visceral leishmaniosis. Veterinary Group of Lupino. Vet Parasitol, v.54, n.4, Sep, p.367-73. 1994.
- Nieto, A., G. Dominguez-Bernal, *et al.* Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus Syrian hamster model. Vet Res, v.42, p.39.
- Nieto, J., J. Alvar, *et al.* Pharmacokinetics, toxicities, and efficacies of sodium stibogluconate formulations after intravenous administration in animals. Antimicrob Agents Chemother, v.47, n.9, Sep, p.2781-7. 2003.
- Noli, C. e S. T. Auxilia. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. Vet Dermatol, v.16, n.4, Aug, p.213-32. 2005.
- Noli C.; Saridomichelakis M. N. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). Vet J. Dec; 202(3):425-35. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.09.002. 2014.
- O'Hagan, D. T., & Valiante, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 727-735. 2003.
- Oliveira, J. M. F., A.N. Et Al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.43, p.188-193. 2010.
- Oliveira, R. P., A. M. Macedo, *et al.* An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. Parasitol Today, v.13, n.5, May, p.196-200. 1997.

Paape, D. e T. Aebischer. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. J Proteomics, v.74, n.9, Aug 24, p.1614-24. 2010.

Pal, C.; Raha, M.; Basu, A.; Roy, K. C.; Gupta, A.; Ghosh, M.; Sahu, P.; Banerjee, S.; Mandal, N. B.; Bandyopadhyay, S. Combination Therapy with Indolylquinoline Derivative and Sodium Antimony Gluconate Cures Established Visceral Leishmaniasis In hamster. Antimicrob. Agents Chemother. 46(1):259. 2002.

Palatnik-De-Sousa, C. B., W. R. Dos Santos, *et al.* Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg, v.65, n.5, Nov, p.510-7. 2001.

Paranhos-Silva, M., G. G. Oliveira, *et al.* A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. Vet Parasitol, v.114, n.2, May 30, p.97-111. 2003.

Pasa, S., S. O. Toz, *et al.* Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. Vet Parasitol, v.128, n.3-4, Mar 31, p.243-9. 2005.

Pastorino, A. C., C. M. Jacob, *et al.* [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. J Pediatr (Rio J), v.78, n.2, Mar-Apr, p.120-7. 2002.

Pastorino, A. C. J., C. M. Et Al. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. J Pediatr (Rio J), v.78, p.120-7. 2002.

Pearson, R. D.; Steigbigel, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. J Immunol. Oct;127(4):1438-43. 1981.

Pearson, R. D. e A. Q. Sousa. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin Infect Dis, v.22, n.1, Jan, p.1-13. 1996.

Pedrosa, C. M. S. Aspectos clínicos e epidemiológicos da leishmaniose visceral em menores de 15 anos procedentes de Alagoas, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop, v.37, p.300-304. 2004.

Penny, R. H. e C. H. Carlisle. The bone marrow of the dog: a comparative study of biopsy material obtained from the iliac crest, rib and sternum. J Small Anim Pract, v.11, n.11, Nov, p.727-34. 1970.

Pereira, C. G.; Silva, A. L.; de Castilhos, P.; Mastrantonio, E. C.; Souza, R. A.; Romão, R. P.; Rezende, R. J.; Pena, J. D.; Beletti, M. E.; Souza, M.A. Different isolates from *Leishmania braziliensis* complex induce distinct histopathological features in a murine model of infection. Vet Parasitol. Nov 12;165(3-4):231-40. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.07.019. Epub 2009 Jul 19. 2009.

Pinelli, E., R. M. Gonzalo, *et al.* *Leishmania* infantum-specific T cell lines derived from

asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. Eur J Immunol, v.25, n.6, Jun, p.1594-600. 1995.

Pinelli, E., R. Killick-Kendrick, *et al.* Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. Infect Immun, v.62, n.1, Jan, p.229-35. 1994.

Pires Da Fonseca S 1 , F. L. J., So Silva , Melo Mn , De Souza Cc , Tafuri Wl , Bruna Romero O , De Andrade Hm . A Identificação De Fatores De Virulência Em *Leishmania Infantum* Estirpes Por Uma Abordagem Proteômica. . J Proteome Res 2014 04 De Abril; 13 (4): 1860-1872. Doi: 10,1021 / Pr400923g. Epub 24 Março De 2014.

Piñero, J., Martínez, S., Castillo, A., Portús, M., Valladares, B. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* strains isolated from Spanish HIVpositive patients to Abelcet and Fungizone. J. Antimicrob. Chemother. 50,304–306. 2002.

Poot, J.; Spreeuwenberg, K. *et al.* Optimization of a *Leishmania infantum* challenge model in hamsters. Intervet International B.V, p.57-70, 2006.

Pumarola, M., L. Brevik, *et al.* Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. J Comp Pathol, v.105, n.3, Oct, p.279-86. 1991.

Quaresma, P. F., S. M. Murta, *et al.* Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR. Acta Trop, v.111, n.3, Sep, p.289-94. 2009.

Qureshi, A. A., Asahina, A., Ohnuma, M., Tajima, M., Granstein, R. D., Lerner, E. A. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54, 665-671. 1996.

Rathi, S. K., R. K. Pandhi, *et al.* Therapeutic trial of sodium antimony gluconate alone and in combination with ketoconazole in post-kala-azar dermal leishmaniasis. Indian J Dermatol Venereol Leprol, v.69, n.6, Nov-Dec, p.392-3. 2003.

Reis, A. B. Avaliação de parâmetros laboratoriais e imunológicos de cão naturalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, portadores de diferentes formas clínicas da infecção (Tese de Doutorado em Ciências). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 180p. 2001.

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. Res Vet Sci, v.81, n.1, Aug, p.68-75. 2006.

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, *et al.* Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. Vet Immunol Immunopathol, v.128, n.1-3, Mar 15, p.87-95. 2009.

Reis, A. B., A. Teixeira-Carvalho, *et al.* Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs

naturally infected by *Leishmania chagasi*. Clin Exp Immunol, v.146, n.2, Nov, p.303-11. 2006.

Reis, A. B., O. A. Martins-Filho, *et al.* Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Vet Immunol Immunopathol, v.112, n.3-4, Aug 15, p.102-16. 2006.

Reis, A. B., Giunchetti, R. C., Carrillo, E., Martins-Filho, O. A., Moreno, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine visceral leishmaniasis. Trends Parasitology, Review. 2010.

Requena, J. M., M. Soto, *et al.* Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. Vet Immunol Immunopathol, v.76, n.3-4, Oct 31, p.269-81. 2000.

Resende L.A, Roatt B.M, Aguiar-Soares R.D, Viana K.F, Mendonça L.Z, Lanna M.F, Silveira-Lemos D, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho O.A, Fujiwara R.T, Carneiro C.M, Reis A.B, Giunchetti R.C. (2013). Cytokine and nitric oxide patterns in dogs immunized with LBSap vaccine, before and after experimental challenge with *Leishmania chagasi* plus saliva of *Lutzomyia longipalpis*. Vet Parasitol. Dec 6;198(3-4):371-81.

Resende LA, Aguiar-Soares RD, Gama-Ker H, Roatt BM, Mendonça LZ, Alves ML, Silveira-Lemos Dd, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Araújo MS, Fujiwara RT, Gontijo NF, Reis AB, Giunchetti RC. Impact of LbSapSal Vaccine in Canine Immunological and Parasitological Features before and after *Leishmania chagasi*-Challenge. PLoS One. 2016 Aug 24;11(8):e0161169. doi: 10.1371.2016.

Rhalem, A., H. Sahibi, *et al.* Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. Vet Immunol Immunopathol, v.71, n.1, Oct 1, p.69-76. 1999.

Ribeiro, J. M., Katz, O., Pannell, L. K., Waitumbi, J., Warburg, A. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5' -AMP. J Exp Biol; 202:1551-9. 1999.

Riça-Capela, M. J., S. Cortes, *et al.* Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. Parasitol Res, v.89, n.3, Feb, p.163-9. 2003.

Riordan, J. R. e V. Ling. Genetic and biochemical characterization of multidrug resistance. Pharmacol Ther, v.28, n.1, p.51-75. 1985.

Rioux, J. A., G. Lanotte, *et al.* Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. Ann Parasitol Hum Comp, v.65, n.3, p.111-25. 1990.

Roatt, B. M., Aguiar-Soares, R.D.O., Vitoriano-Souza, J., Coura-Vital, W., Et Al. (2012). Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. PLOS

ONE, v. 7 (11):e49780

Roatt, B. M. A.-S., R. D. O.; Coura-Vital, W.; Gama-Ker, H.; Moreira, N. D.; Vitoriano-Souza, J.; Giunchetti, R. C.; Carneiro, C. M.; Reis, A. B. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: promising treatments for this neglected disease. Frontiers in immunology, v.5. 2014.

Romero, G. A. e M. Boelaert. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.1, p.e584.

Ross, R. Note on the Bodies Recently Described by Leishman and Donovan. Br Med J, v.2, n.2237, Nov 14, p.1261-2. 1903.

Sacks, D. L., G. Modi, *et al.* The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.1, Jan 4, p.406-11. 2000.

Salerno Pimentel IA¹, Paladi Cde S, Katz S, de Souza Júdice WA, Cunha RL, Barbiéri CL. In vitro and in vivo activity of an organic tellurium compound on Leishmania (Leishmania) chagasi. PLoS One. 7(11): e48780. doi: 10.1371/journal.pone.0048780. Epub 2012 Nov 7. 2012.

Samuelson, J., Lerner, E., Tesh, R., Titus, R. A mouse model of Leishmania braziliensis infection produced by coinjection with sand fly saliva. J Exp Med; 173:49–54. 1991.

Santos, F. R. P., S.D.; Epplen, J.T. Genetic and population study of a Ylinke tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Human Genetics v.90, p.655-656. 1993.

Santos, W. R., I. A. Aguiar, *et al.* Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. Vaccine, v.21, n.32, Dec 1, p.4668-76. 2003.

Santos-Gomes, G. M., R. Rosa, *et al.* Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by Leishmania infantum. Vet Immunol Immunopathol, v.88, n.1-2, Sep 6, p.21-30. 2002.

Saridomichelakis, M. N., M. E. Mylonakis, *et al.* Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniosis (Leishmania infantum) in the endemic areas. Vet Parasitol, v.130, n.3-4, Jun 30, p.199-205. 2005.

Saúde, M. D. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, Brasil. p.122. 2006.

Seblova V.; Oury B.; Eddaikra N.; Aiti Oudhia K., Pratlong F.; Gazanion E.; Maia C.; Volf P.; Sereno, D. Transmission potential of antimony-resistant leishmania field isolates. Antimicrob Agents Chemother. Oct; 58(10):6273-6. doi: 10.1128/AAC.02406-13. Epub 2014 Jul 21. 2014.

Seifert, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. Open Med Chem J, v.5, p.31-9.

- Serruto, D. e R. Rappuoli. Post-genomic vaccine development. FEBS Lett, v.580, n.12, May 22, p.2985-92. 2006.
- Sindermann, H., S. L. Croft, *et al.* Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. Med Microbiol Immunol, v.193, n.4, Nov, p.173-80. 2004.
- Singh, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.411-22. 2006.
- Soares, M. B., Titus, R. G., Shoemaker, C. B., David, J. R., Bozza, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) receptor. J. Immunol. 160, 1811-1816. 1998.
- Solano-Gallego, L., A. Koutinas, *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. Vet Parasitol, v.165, n.1-2, Oct 28, p.1-18. 2009.
- Solano-Gallego, L., J. Lull, *et al.* Evaluation of the efficacy of two leishmanins in asymptomatic dogs. Vet Parasitol, v.102, n.1-2, Dec 3, p.163-6. 2001.
- Solano-Gallego, L., G. Miro, *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. Parasit Vectors, v.4, p.86.
- Spath, G. F., L. Epstein, *et al.* Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.16, Aug 1, p.9258-63. 2000.
- Squires, K. E., F. Rosenkaimer, *et al.* Immunochemotherapy for visceral leishmaniasis: a controlled pilot trial of antimony versus antimony plus interferon-gamma. Am J Trop Med Hyg, v.48, n.5, May, p.666-9. 1993.
- Stanley, A. C. E., C. R. . Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. Immunol Cell Biol, v.85, p.138-47. 2007.
- Steen, H. e M. Mann. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.5, n.9, Sep, p.699-711. 2004.
- Sundar, S. e M. Chatterjee. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. Indian J Med Res, v.123, n.3, Mar, p.345-52. 2006.
- Sundar, S., K. Pai, *et al.* Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. Am J Trop Med Hyg, v.65, n.3, Sep, p.193-6. 2001.
- Sundar, S., M. Rai, *et al.* New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. Clin Infect Dis, v.47, n.8, Oct 15, p.1000-6. 2008.
- Sundar, S., F. Rosenkaimer, *et al.* Immunochemotherapy for a systemic intracellular

infection: accelerated response using interferon-gamma in visceral leishmaniasis. J Infect Dis, v.171, n.4, Apr, p.992-6. 1995.

Sundar, S., F. Rosenkaimer, *et al.*. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. Lancet, v.352, n.9143, Dec 5, p.1821-3. 1998.

Sulahian A, Garin YJ, Pratlong F, Dedet JP, Derouin F: Experimental pathogenicity of viscerotropic and dermatropic isolates of *Leishmania infantum* from immunocompromised and immunocompetent patients in a murine model. FEMS Immunol Med Mic 1997, 17(3):131–138. MON-1 strains. Comp Immunol Microb 2007, 30(1):41–53)

Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res, v.17, n.16, Aug 25, p.6463-71. 1989.

Teixeira, M.J., Fernandes, J.D., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Pompeu, M.L., Silva, J.S., Brodskyn, C.I., Barral-Netto, M., Barral, A., 2005. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates diferent paces of chemokine expression. patterns. Infect. Immun. 73, 1191–1195

Tempone, A. G., C. Martins De Oliveira, *et al.* Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Planta Med, v.77, n.6, Apr, p.572-85.

Thakur, C. P., M. Kumar, *et al.* Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. Am J Trop Med Hyg, v.45, n.4, Oct, p.435-41. 1991.

Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., Titus, R.G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. Infect Immun; 59:1592–8. 1991.

Titus R. G., Ribeiro J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science. 239(4845):1306-8. 1988.

Tibayrenc, M. Microbial molecular epidemiology: an overview. Methods Mol Biol, v.551, p.1-12. 2009.

Tiuman, T. S., A. O. Santos, *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis, v.15, n.8, Aug, p.e525-32.

Turco, S. J., G. F. Spath, *et al.* Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. Trends Parasitol, v.17, n.5, May, p.223-6. 2001.

Van Griensven, J., M. Balasegaram, *et al.* Combination therapy for visceral leishmaniasis. Lancet Infect Dis, v.10, n.3, Mar, p.184-94. 2011.

Van Griensven, J. e E. Diro. Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am, v.26, n.2, Jun, p.309-22.

Vergnes, B., B. Gourbal, *et al.* A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical

field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. Mol Cell Proteomics, v.6, n.1, Jan, p.88-101. 2007.

Vianna, V. L. T., C. M. Et Al. . Histopathologic analysis of hamster hepatocytes submitted to experimental infection with *Leishmania donovani*. Parasitol Res, v.88, p.829-36. 2002.

Volpini, A. C., V. M. De Azeredo Passos, *et al.* Attempt to differentiate *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. Parasitol Res, v.87, n.12, Dec, p.1056-9. 2001.

Volpini, A. C., V. M. Passos, *et al.* PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. Acta Trop, v.90, n.1, Mar, p.31-7. 2004.

Vouldoukis, I., S. Rougier, *et al.* Canine visceral leishmaniasis: comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. Vet Parasitol, v.135, n.2, Jan 30, p.137-46. 2006.

Who. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO reported on neglected tropical diseases. n WHO Geneva, p.184. 2010.

Woerly V.; Maynard L.; Sanquer A.; Eun H. M. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. Parasitol Res. Aug;105(2):463-9. doi: 10.1007/s00436-009-1404-2. 2009.

Wilkins, M. R., C. Pasquali, *et al.* From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Biotechnology (N Y), v.14, n.1, Jan, p.61-5. 1996.

Wilson, M. E. I., D. J. Et Al. . Early histopathology of experimental infection with *Leishmania donovani* in hamsters. J Parasitol, v.73, p.55-63. 1987.

Zatelli, A., M. Borgarelli, *et al.* Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. Am J Vet Res, v.64, n.5, May, p.558-61. 2003.

Zietkiewicz, E., A. Rafalski, *et al.* Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, v.20, n.2, Mar 15, p.176-83. 1994.

Zufferey, R. e C. Ben Mamoun. *Leishmania major* expresses a single dihydroxyacetone phosphate acyltransferase localized in the glycosome, important for rapid growth and survival at high cell density and essential for virulence. J Biol Chem, v.281, n.12, Mar 24, p.7952-9. 2006.

10. Anexo

	<p>MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29 35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370 Email: ceua@propo.ufop.br</p>	
---	--	---

OFÍCIO CEUA Nº. 132/2012, de 13 de dezembro de 2012.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
NUPEB/ICEB/UFOP

Senhor Pesquisador,

Estamos enviando o certificado de aprovação do protocolo "*Caracterização de diferentes cepas de Leishmania chagasi isoladas em área endêmica a partir de cães com leishmaniose visceral*". Informamos também que para atender a resolução normativa nº. 1, artigo 6º, do CONCEA, ao final da execução do mesmo deverá ser encaminhado relatório à CEUA/UFOP, conforme modelo presente na página da CEUA.

Atenciosamente,

Wanderson Geraldo de Lima
Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Coordenador da CEUA/UFOP.