

DIRCEU COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO PRIMATA *CEBUS APELLA* (PRIMATES: CEBIDAE) À
INFEÇÃO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES INÓCULOS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*
*CHAGASI***

BELÉM- PARÁ
2005

DIRCEU COSTA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO PRIMATA *CEBUS APELLA* (PIMATES CEBIDAE) À
INFEÇÃO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES INÓCULOS DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA)*
*CHAGASI***

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Fernando Tobias Silveira

BELÉM -PARÁ
2005

DIRCEU COSTA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO PRIMATA *CEBUS APELLA* (PRIMATES: CEBIDAE) À INFECCÃO EXPERIMENTAL COM DIFERENTES INÓCULOS DE *LEISHMANIA* (*LEISHMANIA*) *CHAGASI*

Dissertação apresentada ao curso de Pós graduação em Doenças Tropicais, área de concentração Patologia das Doenças Tropicais, do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Dr. Fernando Tobias Silveira

BANCA EXAMINADORA

1- _____
Prof. Dra. Edilene Oliveira da silva
(Universidade Federal do Pará-CCB)

2- _____
Prof. Dr. José Luiz Vieira
(Universidade Federal do Pará-NMT)

3- _____
Prof. Dr. Reinaldo Amorim
(Centro Nacional de Primatas -CENP)

4- _____
Prof. Dr. Luiz Carlos Silveira (suplente)
(Universidade Federal do Pará-NMT)

BELÉM -PARÁ
2005

Ter amigos verdadeiros é para mim mais
honroso que descansar sobre os títulos
ilusórios, conquistados num mundo onde
a maioria dos homens ignora
o bem e a verdade.

Paulo de Tarso

A minha família por viver tão
intensamente minhas vitórias e sofrer
minhas dores com amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Sobretudo a Deus por ter me concedido tantos milagres.

Ao meu orientador, Prof. Fernando Silveira pela dedicação e estímulo e por ter sido diversas vezes meu segundo pai.

Ao Centro Nacional de Primatas na figura do Dr. Reinaldo Amorim, Dra. Klena, Dr. Paulo, Sr. Alfredo e Sr. Max pelo apoio necessário ao andamento do projeto.

Ao diretor do NMT, Prof. Luiz Carlos Silveira e a Dra Tereza Cristina Corvelo, Coordenadora do curso de Mestrado em Doenças Tropicais pelo apoio e incentivo à pós graduação.

A minha professora querida, Marliane Campos pela paciência e amizade.

Aos professores da pós-graduação, pela transmissão do conhecimento e da experiência

Aos companheiros de jornada; Roberta, Rejane, Liliane e Khrisna pela convivência e pelo aprendizado que me proporcionaram.

Aos colegas de Laboratório de leishmaniose pelo respeito, carinho e pelo trabalho compartilhado.

Ao Dr. Habib Fraiha Neto, por ter participado de momentos decisivos de minha vida acadêmica.

Aos primatas utilizados no experimento.

A todos não citados nominalmente, mas que estão marcados em meu coração.

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1 Fêmea de flebotomíneo adulto – (foto ampliada)

Fig. 2 Ciclo evolutivo e epidemiológico da LVA

Fig. 3 Formas evolutivas de Leishmania

Fig. 4 Procedimento de punção de medula óssea

Fig. 5 Resultado de intradermorreação de Montenegro negativa após 48 horas em animal do experimento I , segundo grupo.

Fig. 6 Resultado de intradermorreação de Montenegro negativa após 48 horas em animal do experimento II , segundo grupo.

Fig. 7 Resultado de intradermorreação de Montenegro positiva após 48 horas em animal controle.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus celsius ou graus centígrados
CENP	Centro Nacional de Primatas
EV	Endovenoso
IEC	Instituto Evandro Chagas
IP	Intraperitoneal
Kg	Kilograma
LVA	Leishmaniose visceral americana
p.i.	Pós-inoculação
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta

RESUMO

No Brasil, o primata *Cebus apella* tem sido utilizado com sucesso em modelos de estudos experimentais para leishmaniose cutânea. Em função disso, decidiu-se investigar a susceptibilidade desse primata como modelo experimental frente à leishmaniose visceral. Foram utilizados 10 espécimes do primata *Cebus apella*: 7 machos e 3 fêmeas, todos jovens, nascidos e criados em cativeiro. No primeiro experimento foram utilizados 6 primatas divididos em 2 grupos, sendo que o primeiro grupo (com 3 primatas) inoculado com 30×10^6 promastigotas de *L.(L.) chagasi* (MCAO/BR/1998?M18011, estado do Maranhão) na fase estacionária de cultura, enquanto o segundo grupo foi inoculado com 5 doses sucessivas do mesmo inóculo totalizando 150×10^6 promastigotas. No segundo experimento o inoculado foi associado à 5 pares de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalps*. O experimento foi feito com 4 primatas, divididos em 2 grupos. No primeiro grupo (2 primatas) foi inoculado 30×10^6 promastigotas de *L.(L.) chagasi* (MCAO/BR/1998M18011, estado do Maranhão) na fase estacionária de cultura, enquanto o segundo grupo (2 primatas) foi inoculado com 5 doses sucessivas do mesmo inóculo totalizando 150×10^6 promastigotas. As inoculações foram intradérmicas na base da cauda dos animais. A evolução da infecção foi avaliada incluindo exames clínico, anticorpos IgG e resposta imune medida através do teste de Imunodeficiência Indireta. Os macacos inoculados com formas promastigotas, associadas ou não à glândulas salivares de flebotomíneos não apresentaram manifestação clínica ao longo do experimento e não demonstraram parasitas na medula óssea ou resposta imune específica. Os resultados sugerem que o *Cebus apella* apresenta resistência natural à infecção por *L. (L.) chagasi*.

ABSTRACT

In Brazil, the monkey *Cebus apella* has been successfully used as a model for studying cutaneous leishmaniasis. Thus, we decided to investigate its usefulness as a model for visceral leishmaniasis. For this purpose, we used 10 specimens of *C. apella*: 7 males and 3 females, juveniles. All were born and raised in captivity. In the first experiment was realized with 6 monkeys divided in 2 groups, in the first group with 3 monkeys was inoculated with 30×10^6 promastigotes of *L. (L.) chagasi* (MCAO/BR/1998/M18011, Maranhão State) from stationary phase of cultures, while in the second group with 3 monkeys was inoculated 5 doses successive with 30×10^6 promastigotes (150×10^6) of *L. (L.) chagasi* (MCAO/BR/1998/M18011, Maranhão State) from stationary phase of cultures. In the second experiment were used 4 monkeys, divided in 2 groups was also inoculated with five pairs of salivary glands of *Lutzomyia longipalps* together with parasites. In the first group with 2 monkeys was inoculated with 30×10^6 promastigotes of *L. (L.) chagasi*, second group with 2 monkeys was inoculated 5 doses successive with 30×10^6 promastigotes (150×10^6). The inoculations were, intradermally, into the base of the tail of the animals. The evaluation of infections was monthly and included clinical examination, IgG antibody response (IFAT). In monkeys inoculated with promastigotes only or in those inoculated with promastigotes plus the salivary glands of the flebotominae sand fly we have till now found no clinical manifestations of infection all the experiment, neither have demonstrated parasites in the bone-marrow or specific antibody response. These results suggest that *C. apella* monkey is able to resist against to infection by *L. (L.) chagasi*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONCEITO

A leishmaniose visceral americana (LVA) ou “calazar americano” é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica e prolongada por vários meses, podendo ultrapassar até um ano. O agente infeccioso é um protozoário do gênero *Leishmania* da família Trypanosomatidae, nas Américas, *Leishmania (Leishmania) chagasi*. A denominação “leishmaniose visceral” diz respeito ao viscerotropismo da *L. (L.) chagasi*, ao contrário das outras espécies, especialmente pelo fígado e baço, durante a evolução da infecção nos seus hospedeiros vertebrados susceptíveis, inclusive no homem (Badaro & Duarte, 1997).

1.2 DISTRIBUIÇÃO

Tem ampla distribuição, ocorrendo do extremo sul dos Estados Unidos na América do Norte até o norte da Argentina na América do Sul. Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, aonde a doença vem sendo descrita em vários estados das diferentes regiões, exceto na Região Sul. É na Região Nordeste do Brasil que se concentra a maior área endêmica da LVA em nosso continente (Brasil, 2003).

1.3 TRANSMISSÃO

Nessa região, a transmissão da doença é feita através da picada da fêmea de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) (Fig 1) infectada com formas promastigotas que, no momento do hematofagismo, são inoculadas na derme do hospedeiro mamífero para em seguida serem fagocitadas por macrófagos. No interior destas células, transformam-se em amastigotas localizadas no interior de vacúolo fagocítico (Petters & Killick-Kendrick, 1987).

Esta espécie se adapta facilmente em várias temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios e em abrigos de animais domésticos, possuindo uma atividade crepuscular e noturna, fato que propicia o envolvimento de animais domésticos na epidemiologia da doença, destacando-se o papel do cão doméstico como a principal fonte de infecção para o vetor no ciclo domiciliar (Figura 2). Entretanto, na região Amazônica do Brasil, fortes evidências vêm demonstrando que a doença tem sua origem no ciclo enzoótico do parasito no canídeo silvestre, a raposa *Cerdocyon thous* (Lainson et. al., 1969; Silveira et. al., 1982).

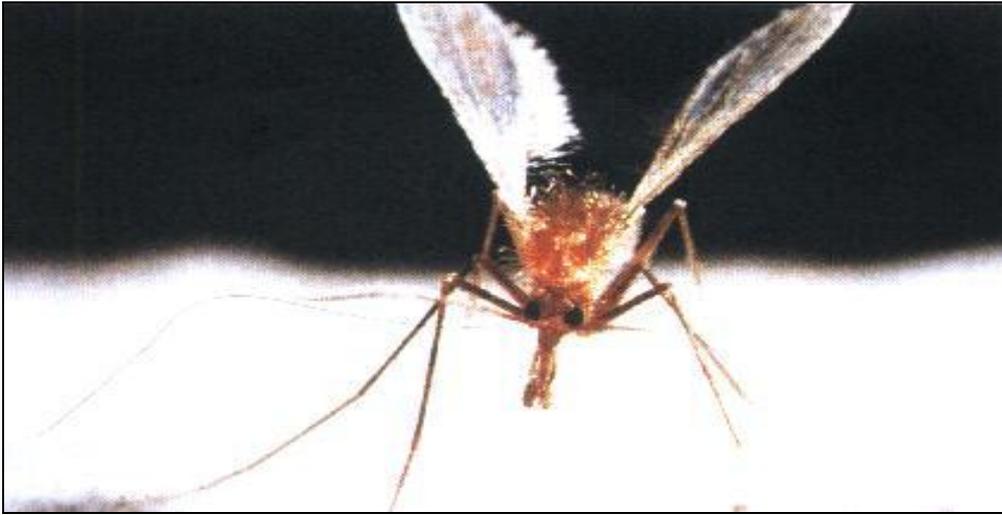


Figura 1: Fêmea de flebotômico adulto
Fonte: Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral, 2003

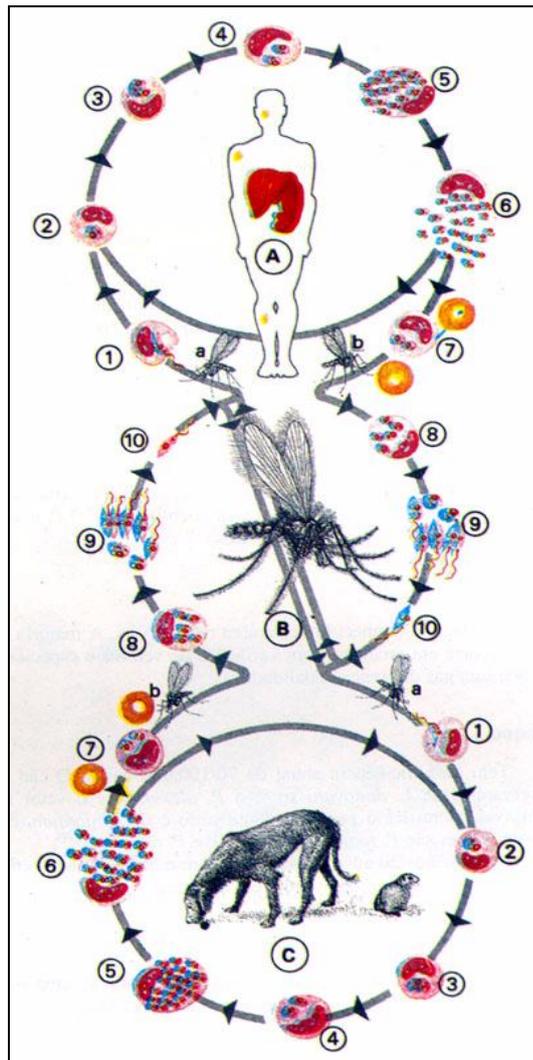


Figura 2 – ciclo evolutivo e epidemiológico da LVA. ^a hospedeiro humano B. Vetor (Flebótomos)
 C. Reservatório, 1-5, leishmania intracelular; 6-8, Ruptura das células e invasão de novos macrófagos;
 9-10, nectonadideos (promastigotas desenvolvidas nos flebótomos). (Adaptação de G. Pierkarki, 1961)

1.4 TAXONOMIA

Quanto à taxonomia, o protozoário é classificado na família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, subgênero *Leishmania*, complexo *donovani*, *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi*. (WHO, 1990).

1.4.1 Posição taxonômica do parasito

Reino PROTISTA Haeckel 1886

Sub-Reino PROTOZOA Goldfunss 1817

Filum SARCOMASTIGOPHORA Honig e Balamuth 1963

Sub-Filme MASTIGOPHORA Deising 1866

Classe ZOOMASTIGOPHOREA Calkins 1909

Ordem KINETOPLASTIDA Hooningberg 1963, emend Vickerman 1976

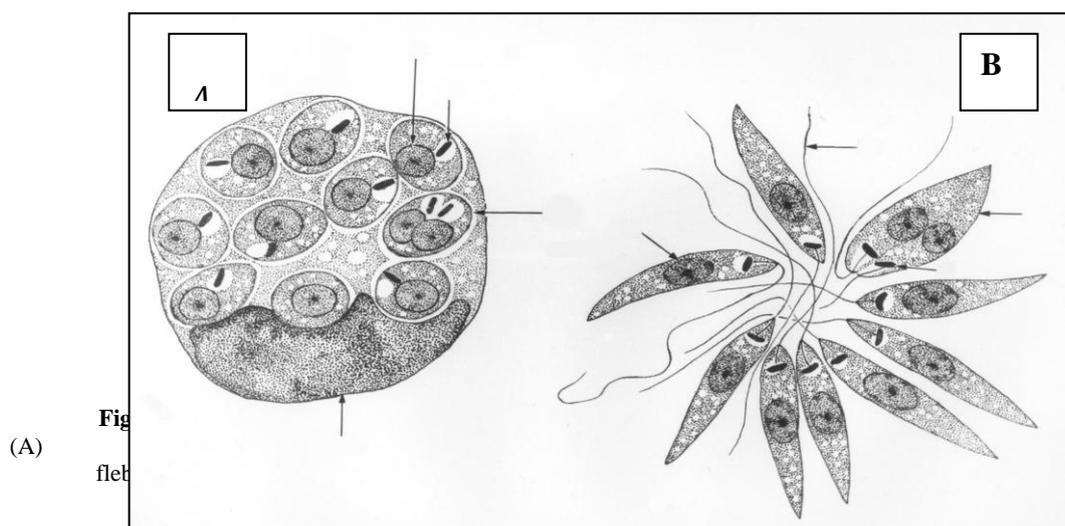
Sub-Ordem TRYPANOSOMATINA Kent 1880

Família TRYPANOSOMATIDAE Doflein 1901, emend GROBBEN 1095

Gênero *Leishmania* Ross 1903

1.5 BIOLOGIA

A *L.(L.) chagasi* é um protozoário que tem tropismo primário pelo Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), destacando-se as células presentes no baço, fígado, medula óssea e linfonodos. A evolução da infecção depende da cepa do parasito, idade e mecanismos de defesa do homem, o que pode resultar em cura espontânea ou evolução para cronicidade. A forma amastigota (Fig 3 A), obrigatoriamente intracelular, multiplica-se principalmente nos macrófagos e, em menor extensão, em células dendríticas (célula de Langerhans) dos hospedeiros vertebrados, enquanto a forma promastigota (forma infectante para o hospedeiro vertebrado) (Fig 3 B) é fagocitada por células mononucleares, onde se transforma em forma amastigota e esta segue o desenvolvimento e multiplicação intracelular; com a forma de numerosos amastigotas- filhos, a membrana celular rompe-se e algumas novamente serão fagocitadas por células mononucleares. Isto induz à hiperplasia celular do SFM, levando à hepatoesplenomegalia, adenomegalias discretas, pneumonite intersticial pela ocupação e lesão de células alveolares e infiltração da medula óssea, determinando seqüestro esplênico e fenômenos hemorrágicos (Lainson, 1982; Badaro & Duarte, 1997).



Dependendo dos fatores do hospedeiro (resposta imunológica), do parasito (virulência da cepa) e do vetor, a infecção no macrófago pode ficar limitada a poucas formas amastigotas, sem produzir sintomatologia (infecção inaparente ou assintomática), ou ainda produzir um grande número destas formas que são responsáveis por quadros sintomáticos na pele ou sistêmico e visceral (Silveira et. al., 1997).

1.6 LVA: PRIMATAS NÃO HUMANOS COMO MODELOS EXPERIMENTAIS

Face à estreita relação filogenética dos primatas não humanos com o homem, vários trabalhos tanto no Velho (Misra et. al., 2001, 2002, 2004; Dube et. al., 1998, 1999) como no Novo Mundo (Chapman et. al., 1981; Broderson et. al., 1986; Marsden et. al., 1981; Santos et. al., 2005) tem demonstrado que esses animais são um modelo em potencial, para testar a susceptibilidade à leishmaniose visceral, sendo capazes de desenvolver manifestações clínicas e imunopatológicas semelhantes a dos humanos acometidos pela doença.

O estudo da LVA em primatas neotropicais tem se constituído objeto de grande interesse, face às evidências acumuladas sobre a capacidade de determinadas espécies em reproduzir os aspectos clínicos observados na LVA humana, reforçando com isto, o seu emprego como modelo de estudo dessa patologia no homem. Neste sentido cabe dizer que trabalhos prévios (Chapman et. al., 1981; Broderson et. al. 1986; Santos et. al., 2005) já haviam demonstrado a susceptibilidade de alguns desses primatas à infecção por agentes determinantes da leishmaniose visceral.

Destaca-se nos estudos experimentais em primatas não humanos a importância da concentração dos inóculos utilizados, a via de inoculação e a forma inoculada do parasito (amastigota ou promastigota), como fatores preponderantes no estabelecimento da infecção e nas diferentes respostas dos primatas frente ao parasito.

No velho mundo, Githure et. al.(1986) ao investigarem a susceptibilidade de primatas da África Oriental (*Cercopithecus aethiops*) como modelo experimental de infecção por *L.(L.) donovani*, sugeriram que o tamanho do inóculo e a via de administração podem ser um importante fator no estabelecimento da infecção. Foram utilizadas

inoculações intravenosas, intraperitoneais e intradérmicas, simultaneamente com uma suspensão de 3×10^7 de amastigotas, obtidas a partir de hamsters e de cultura de promastigotas de tecidos, com a mesma quantidade de inóculo (1mL), encontrando resultados positivos até o quarto mês após as inoculações. No oitavo mês os primatas foram sacrificados.

Anuradha et. al. (1992), utilizaram uma concentração de 1×10^8 de formas amastigotas de *L. (L.) donovani*, por via intravenosa, no macaco indiano *Presbytis entellus* obtendo resultados positivos quanto ao modelo experimental usado.

Os resultados de estudo com o primata *Cercopithecus aethiops* (macaco verde da África) demonstraram a susceptibilidade do mesmo à infecção experimental por *L.(L.) donovani* de origem humana, e moderada susceptibilidade à infecção por *L.(L.) infantum* de origem canina (Binhazim et. al.,1993). Na comparação da susceptibilidade à infecção experimental, foram inoculadas 10^7 amastigotas/Kg (com média de 3.9Kg/ macaco) de *L. (L.) donovani* pela via intravenosa, e o mesmo inóculo e via de inoculação para *L. (L.) infantum*. Em ambos os experimentos foram encontrados após eutanásia e necropsia, parasitos no fígado e no baço após 12 semanas.

Dois anos depois, Gicheru et. al. (1995), usaram inóculo de 8×10^7 promastigotas de *L. (L.) donovani*, via intradérmica, para infectar o macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Dos nove animais inoculados, quatro desenvolveram manifestações clínicas da doença e morreram 18 meses após a inoculação.

Recentemente, Misra et. al. (2001) utilizaram o macaco indiano *Presbytis entellus* e desafiaram com 1×10^8 amastigotas de *L. (L.) donovani*, por via intravenosa, 60 dias após esquema de vacinação com *L.(L.) Major* e BCG, obtendo resultados clínicos e imunológicos que consideraram satisfatórios quanto ao modelo usado.

Por último, Misra et. al.(2002) utilizando o mesmo macaco indiano *Presbytis entellus*, demonstraram a susceptibilidade do primata à infecção experimental por *L.(L.) donovani* com um inóculo de 2×10^6 de formas promastigotas por via intradérmica associadas a $\frac{1}{2}$, 5 ou 10 pares de glândulas salivares que apresentaram um efeito quimioatraente e vasodilatador, potencializando a infecção.

A respeito de experimentos ocorridos no novo mundo, na infecção experimental por *L.(L.) chagasi* em *Callithrix jacchus jacchus*, o experimento foi iniciado a partir da inoculação intraperitoneal de 1mL de uma suspensão de formas

amastigotas de fígado e de baço de hamster. Após 601 dias, foi realizada eutanásia e necropsia, e os exames histopatológicos demonstraram a presença de formas amastigotas no fígado e no baço (Marsden et. al., 1981).

No mesmo ano, Chapman et. al.(1981), descreveram a susceptibilidade de duas espécies de primatas não humanos do novo mundo à infecção experimental por *L.(L.) donovani*. No primeiro experimento em *Aotus trivigatus*, os primatas desenvolveram leishmaniose visceral fulminante após a inoculação, via endovenosa, de 32.5×10^6 de formas amastigotas de *L.(L.) donovani*, havendo morte dos mesmos entre 18 e 24 dias após a inoculação. No segundo experimento, o parasito foi inoculado via endovenosa em *Saimiri sciureus*, nos quais foram encontradas formas amastigotas no fígado e no baço, 52 dias após a inoculação de 32.5×10^6 de formas amastigotas.

Posteriormente, Broderson et. al.(1986) estudaram o desenvolvimento da leishmaniose visceral em oito macacos da noite (*Aotus trivigatus*) após a inoculação via endovenosa de 32.5×10^6 de formas amastigotas de *L.(L.) donovani*. Seis macacos morreram em um período de 93 dias e dois se recuperaram da doença. Entretanto, todos apresentaram numerosos macrófagos parasitados, demonstrando grande susceptibilidade do primata à infecção por *L.(L.) donovani*.

2. JUSTIFICATIVA:

A melhor forma de prevenir esta patologia seria através de uma vacina com capacidade de proteger o ser humano da infecção pela *L.(L.) chagasi*, entretanto, considerando-se razões de ordem ética que proíbem o envolvimento de seres humanos em ensaios científicos que coloquem em risco a integridade da saúde, tem sido incentivado o desenvolvimento de modelos animais que possibilitem o estudo da patologia e da imunologia induzidas por esses protozoários (Olobo et. al., 2001).

Neste contexto, o programa de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas vem obtendo resultados bastante satisfatórios na utilização do primata *Cebus apella* como modelo de estudo da leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*, *L. lainsoni* e *L. amazonensis* (Silveira et. al., 1989, 1990; Garcez et. al., 1997) e também como modelo de estudo da leishmaniose visceral causada pela *L.(L.) chagasi* (Santos et. al., 2005)

Apesar dos esforços que o Ministério da Saúde vem desenvolvendo no sentido de controlar a transmissão da LVA no Brasil, é notório que os resultados não estão correspondendo ao esperado, visto que os indicadores de frequência estão apontando para um crescente aumento do número de casos anuais em todo o território nacional. Esse fato vem corroborar com o que foi dito anteriormente, prevenção da infecção com uma vacina efetiva seria a melhor arma no controle da doença. Entretanto, os modelos de estudos até então apresentados tem sido baseados em protocolos experimentais excessivamente artificiais, tanto em relação à via de inoculação (intravenosa), quanto na forma do parasito usada para a inoculação experimental (amastigotas), o que pode resultar em um desvio da resposta imune, diferentemente do que seria esperado em um modelo experimental menos artificial.

Alguns artigos que descrevem a susceptibilidade de primatas não humanos em relação à leishmaniose visceral causada por *L. (L.) donovani*, mencionam uma quantidade exagerada do inóculo ou uma via de inoculação que transponha as barreiras naturais do organismo frente à infecção, como por exemplo, a utilização de 10^8 amastigotas por via intravenosa (Anarudha et. al., 1992) e a utilização de 32.5×10^6 amastigotas via safena (Madindou et. al., 1985)

As vias intravenosa e intraperitoneal são visivelmente as que causam maior impacto no sentido de instalar a doença, entretanto, são as que extrapolam o sentido da pesquisa que é o de tentar encontrar um modelo de infecção semelhante ao humano. Nesse sentido, seria oportuno estabelecer um modelo de estudo da LVA em espécies neotropicais de primatas não humanos, nascidos e criados em cativeiro, possibilitando assim, investigar os aspectos patológicos e imunopatológicos da doença, assim como, de imunoproteção contra a *L. (L.) chagasi*, que viessem consubstanciar o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a LVA.

3. OBJETIVOS:

3.1 GERAL: Avaliar a susceptibilidade do primata neotropical *Cebus apella* (Primates: Cebidae) à infecção por *L. (L.) chagasi*, visando determinar o potencial desse primata em reproduzir os aspectos clínicos e patológicos observados na doença humana.

3.2 ESPECÍFICOS:

3.2.1 Avaliar o potencial de infectividade de formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* inoculadas por via intradérmica no primata *Cebus apella*.

3.2.2 Comparar a infectividade de dois esquemas de inoculação com formas promastigotas de *L.(L.) chagasi*, sendo um com dose única (30×10^6) e outro com 5 doses iguais, sucessivas (30×10^6) a intervalos de uma semana, simulando possíveis contatos sucessivos com o parasito.

3.2.3 Avaliar o efeito das glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* na infectividade do inóculo.

3.2.4 Estudar o desenvolvimento da infecção através de métodos parasitológicos afim de o padrão de resposta imune entre primata e homem

3.2.5 Estudar o comportamento da resposta imune específica, humoral e celular, a fim de confrontar a resposta imune do primata aquela do homem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

O trabalho foi desenvolvido no âmbito do programa de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas (IEC), constando de laboratórios de análises e no Centro Nacional de Primatas (CENP), constando de biotério destinado ao manejo de primatas, segundo especificações do próprio centro.

4.2. ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

No presente estudo, foram utilizados dez (10) espécimes do primata *Cebus apella* (7 machos e 3 fêmeas) livres de contato prévio com *Leishmania*. Seus pesos variaram de 1.600 a 3.520 gramas, todos originados por reprodução em cativeiro, sendo todos jovens, procedentes do Centro Nacional de Primatas (CENP).

Durante o experimento, os animais foram mantidos em biotério isolado para primatas, em gaiolas individuais adequadas ao manejo, com as seguintes dimensões: 50 cm de largura, 80 cm de altura e 70 cm de profundidade. A dieta dos animais consistiu em leite, ovos, frutas, legumes variados, ração peletizada e água.

4.3. PARASITO

Durante tentativa de estabelecimento da infecção no primata, foi utilizada uma cepa de *L.(L.) chagasi* (MCAN/BR/99/M18.011, Imperatriz, MA), criopreservada no banco de amostras de *Leishmania* do Programa de Leishmanioses do IEC e mantida no laboratório, através de repiques semanais, em meio de cultura Difco B45 (Apêndice). Antes do início do experimento, essa cepa foi reinoculada em “hamster” com a finalidade de reativar a sua infectividade.

4.4. GLÂNDULAS SALIVARES DE *LUTZOMIA LONGIPALPIS*

Na tentativa de se estabelecer a infectividade do inóculo, foram utilizadas 5 pares de glândulas salivares de *Lutzomyia longipalpis* associadas a cada dose do inóculo.

Para a extração de glândulas salivares foram utilizadas fêmeas de flebotomíneos nascidas e criadas no insetário de flebotomíneos do IEC com aproximadamente 25 dias de vida. Os flebotomíneos vivos foram submetidos a uma temperatura de 5 graus negativos durante 15 minutos e posteriormente lavados em solução tamponada a fim de que fossem eliminados os pêlos. Posteriormente, as fêmeas foram separadas, colocadas em lupas de aumento e com o auxílio de pequenas pinças retirou-se das mesmas as suas glândulas salivares que foram armazenadas em solução tampão de salina fosfatada (PBS, pH 7,2) (Apêndice), para posterior associação com o parasito (Lima & Titus, 1996).

4.5. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A padronização do inóculo foi feita pela contagem de promastigotas em câmara de Neubauer, da mesma forma que o método convencional de contagem de leucócitos sangüíneos. Em seguida, foi calculado o fator de diluição, de modo que a concentração final correspondesse à aproximadamente 30×10^7 de promastigotas /mL. Assim, com o auxílio de uma seringa de 1mL graduada, foi injetado apenas 0,1mL em cada sítio de inoculação (30×10^6)

A fim de se obter a imobilização e induzir anestesia nos animais para a realização das inoculações e dos exames de rotina, utilizou-se a Ketamina e a Xilazina na dose de 20 mg/ Kg de peso, em injeções intramusculares.

Objetivando-se assegurar a infectividade dos inóculos usados nos primatas, foram inoculados pela via intraperitoneal, dois hamsters para cada inoculo usado nos primatas, totalizando 10 inoculações.

4.5.1 EXPERIMENTO I: foram utilizados 6 primatas, divididos em 2 grupos da seguinte maneira:

Grupo I - 3 primatas foram inoculados, intradermicamente, na face dorsal da base da cauda, previamente depilada, com dose única de 30×10^6 de formas promastigotas metacíclicas obtidas da fase estacionária de cultivo (meio Difco B45), a partir de tecido de hamster (baço e fígado) infectado com *L.(L.) chagasi*. O veículo para a preparação dos inóculos consistiu de 0,1 mL de fosfato de sódio glicosado (PSG 4:6, pH8,0).

Grupo II - 3 primatas foram inoculados, intradermicamente, na face dorsal da base da cauda, previamente depilada, com 5 doses sucessivas, a intervalos de 7 dias, de 30×10^6 de formas promastigotas metacíclicas obtidas da fase estacionária de cultivo (meio Difco B45), a partir de tecido de hamster (baço e fígado) infectado com *L.(L.) chagasi*. O veículo para a preparação dos inóculos consistiu de 0,1 mL de fosfato de sódio glicosado (PSG 4:6, pH8,0).

4.5.2 EXPERIMENTO II: foram utilizados 4 primatas, divididos em 2 grupos da seguinte maneira:

Grupo I - Dois primatas foram inoculados, intradermicamente, na face dorsal da base da cauda, previamente depilada, com dose única de 30×10^6 de formas promastigotas metacíclicas obtidas da fase estacionária de cultivo (meio Difco B45), a partir de tecido de hamster (baço e fígado) infectado com *L.(L.) chagasi*, associada ao conteúdo de 5 pares de glândulas salivares de *L. longipalpis*. O veículo para a preparação dos inóculos consistiu de 0,1 mL de fosfato de sódio glicosado (PSG 4:6, pH8,0).

Grupo II - 2 primatas foram inoculados, intradermicamente, na face dorsal da base da cauda, previamente depilada, com 5 doses sucessivas a intervalos de 7 dias de 30×10^6 de formas

promastigotas metacíclicas obtidas da fase estacionária de cultivo (meio Difco B45), a partir de tecido de hamster (baço e fígado) infectado com *L.(L.) chagasi*, cada dose sendo associada ao conteúdo de 5 pares de glândulas salivares de *L. longipalpis*. O veículo para a preparação dos inoculo consistiu de 0,1 mL de fosfato de sódio glicosado (PSG 4:6, pH8,0).

4.6. PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

A- Clínico: consistiu na tomada da temperatura corpórea, do peso, além do exame físico dos animais, visando-se o possível desenvolvimento de visceromegalia nos animais.

B- Laboratorial inespecífico: consistiu na realização de hemograma e dosagem de proteína total.

C- Laboratorial específico: consistiu na pesquisa do parasito através de punção da medula óssea (Figura 4), a qual foi usada para a preparação de esfregaços corados por Giemsa (Apêndice) para microscopia ótica, semeadura em meio de cultura Difco B45 (Apêndice) e inoculação em hamster , visando o isolamento do parasito.

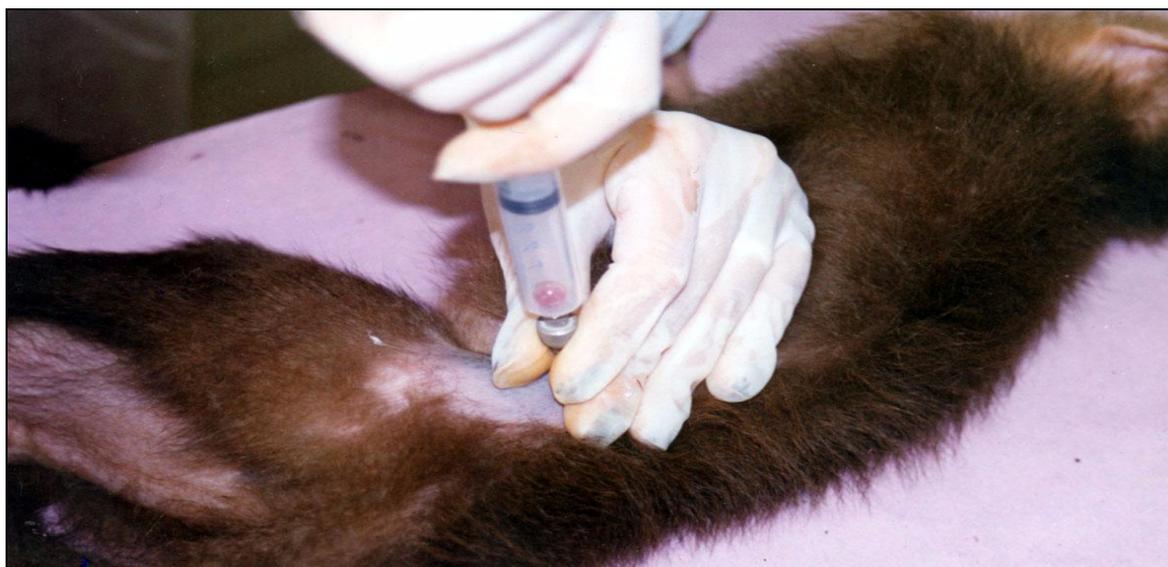


Figura 5 – Técnica de punção da medula óssea

D- Imunológico: parte do soro separado das coletas de sangue para avaliação laboratorial inespecífica era imediatamente congelado a 70°C negativos para os testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI) (Apêndice), visando detectar anticorpos IgG contra o parasito (Guimarães et. al., 1974). Também foram realizados testes intradérmicos de Montenegro (Apêndice) objetivando-se a avaliação da resposta de hipersensibilidade celular ao final do experimento (Silveira et. al., 1990).

O antígeno empregado nos testes foi preparado de acordo com o método descrito por Shaw & Lainson (1975). As injeções intradérmicas eram feitas com 0,1mL do antígeno (10×10^6) de promastigotas / mL), na face anterior do antebraço dos animais e a leitura realizada após 48 horas.

4.7. PERIODICIDADE DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES DE AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL:

Com exceção do critério de avaliação laboratorial específico, o qual foi iniciado aos 45 dias p.i., e imunológico, que foi processado ao final do experimento, todos os outros critérios foram feitos antes da inoculação e, em seguida, a intervalos regulares de 45 dias.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Foi utilizado o programa BioEstat 3.0 para análises de possíveis diferenças de resultados de avaliação da infecção experimental

4.9 ASPECTOS ÉTICOS:

O projeto intitulado “**Avaliação de susceptibilidade do primata *Cebus apella* (Primates: Cebidae) à infecção experimental com diferentes inóculos de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) chagasi*” foi elaborado e submetido a apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas (IEC), sendo considerado aprovado pelo mesmo.**

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA INFECÇÃO

Experimento I- Os animais do primeiro experimento foram avaliados ao longo de 11 meses em intervalos de tempo regulares de 45 dias. Ao longo das avaliações não se observou nenhum sinal ou sintoma que fossem relacionados à infecção. Em nem um dos dois grupos (o primeiro onde se utilizou o modelo com uma única inoculação de 30×10^6 de formas promastigotas e o segundo com 5 doses sucessivas do mesmo inóculo) houve variações significativas de temperatura (Tabela 1) que pudessem evidenciar alguma alteração orgânica sofrida pelos mesmos. Além disso, não se observou aumento do volume abdominal que evidenciasse uma possível visceromegalia.

Em relação à variação de peso observada ao longo das avaliações, destaca-se que na 10^a semana após o início do experimento, todos os primatas do experimento I perderam em média 600g de peso, entretanto, ao final do experimento todos tiveram um acréscimo de aproximadamente 2 kg, tomando-se como base o peso inicial (Tabela 1).

Tabela 1 – Média da variação de temperatura e do peso dos animais do experimento I ao longo de 11 meses de avaliação

Animal de experimentação	Temperatura média ° C	Peso médio (Kg)
EXIg1a	39,5	1.842
EXIg1b	39,0	2.010
EXIg1c	38,5	2.025
EXIg2a	38,5	3.552
EXIg2b	38,5	2.212
EXIg2c	38,5	2.120

Experimento II: Os animais do segundo experimento foram avaliados ao longo de 26 semanas (6 meses e meio), mantendo-se os mesmos critérios de avaliação clínica do primeiro experimento e não se observou nenhuma variação considerável dos parâmetros de avaliação em nem um dos dois grupos

(o primeiro onde se utilizou o modelo com uma única inoculação de 30×10^6 de formas promastigotas e o segundo com 5 doses sucessivas do mesmo inóculo, ambas associadas à glândulas salivares de *L. longipalpis*). O peso também sofreu acréscimo de aproximadamente 2Kg, a temperatura manteve-se constante ao longo das avaliações e, além disso, não houve alterações no exame físico (Tabela 2).

Tabela 2 – Média da variação de temperatura e do peso dos animais do experimento II ao longo de 26 semanas de avaliação.

Animal de experimentação	Temperatura média °C	Peso médio (Kg)
EXIIg1a	39,5	2.180
EXIIg1b	38,5	3.404
EXIIg2a	38,5	3.490
EXIIg2b	39,5	3.700

5.2 AVALIAÇÃO DE EXAMES LABORATORIAIS INESPECÍFICOS

Com respeito à avaliação hematológica, observou-se que nenhum um dos animais inoculados (tanto do primeiro quanto do segundo experimentos), houve alteração que sugerisse uma mudança no quadro hematológico do animal face a uma possível progressão da infecção, mantendo-se as mesmas observações em relação ao proteinograma (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3 – Média da variação de eritrócitos, leucócitos e proteinemia dos animais do experimento I ao longo de 11 meses de avaliação.

Animal de experimentação	Eritrócitos mm ³	Leucócitos cel/mm ³	Proteinemia g/dl
EXIg1a	3.920.000	4.800	9.7
EXIg1b	4.150.000	5.300	10.2
EXIg1c	4.250.000	4.800	9.6
EXIg2a	3.990.000	7.400	9.0
EXIg2b	4.100.000	5.100	9.6
EXIg2c	3.800.000	8.900	9.3

Tabela 4 – Média da variação de eritrócitos, leucócitos e proteinemia dos animais do experimento II ao longo de 26 semanas de avaliação.

Animal de experimentação	Eritrócitos mm ³	Leucócitos cel/mm ³	Proteinemia g/dl
EXIIg1a	4.970.000	5.100	9.7
EXIIg1b	4.930.000	8.900	9.0
EXIIg2a	5590.000	7.400	9.0
EXIIg2b	4.890.000	6.100	9.3

5.3 AVALIAÇÕES DE EXAMES LABORATORIAIS ESPECÍFICOS

Nos animais do primeiro experimento, tanto no modelo com uma única inoculação de 30×10^6 de formas promastigotas, quanto no modelo de doses sucessivas, não foi detectada a presença do parasito na medula óssea durante os 11 meses de observação. Nos animais do segundo experimento, após 26 semanas, repetiram-se os mesmos resultados negativos, mesmo com a associação de 5 pares de glândulas salivares de *L. longipalpis* para cada inóculo.

As sementeiras em meio de cultura Difco B45, em todas as avaliações, não demonstraram o parasito ao longo de observações diárias por 7 dias. Os hamsters usados para cada punção de medula não demonstraram visceromegalia. Após eutanásia e retirada de fígado e de baço destes hamsters para avaliação parasitológica, o protozoário não foi encontrado em esfregaços corados por Giemsa ou em meio de cultura Difco B45.

5.4 AVALIAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE DOS PRIMATAS

O teste de Montenegro, feito somente ao final dos dois experimentos, para avaliar a resposta imune celular (hipersensibilidade) dos animais, revelou-se negativo em todos os 10 animais inoculados (Figuras 5 e 6). A figura 7 apresenta um resultado controle positivo, com reação é de 30mm (Santos et. al., 2005).

Os resultados dos testes sorológicos de imunofluorescência indireta (IFI) de todos os primatas ao longo de todo o experimento mantiveram-se negativos.

5.5 AVALIAÇÕES DA INFECTIVIDADE DOS INÓCULOS USADOS NOS PRIMATAS

É importante destacar que todos os hamsters usados como controle da infectividade dos inóculos desenvolveram sinais e sintomas da doença, além de ter sido determinado o parasito tanto esfregaços de vísceras (fígado e baço), quanto em meio de cultura Difco B45.

5.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os resultados observados não demonstraram variações significantes quanto aos padrões de normalidade para avaliação através de métodos estatísticos.



Figura 5 - Resultado de intradermoreação de Montenegro negativa após 48 horas em animal do experimento I, segundo grupo.



Figura 6 – Resultado de intradermoreação de Montenegro negativa após 48 horas em animal do experimento II , segundo grupo.



Figura 7 – Resultado de intradermoreação de Montenegro positiva após 48 horas em animal controle (Santos et. al., 2005).

6. DISCUSSÃO

A utilização de primatas não humanos como modelo de estudo da LVA, tem sido alvo de vários trabalhos tanto no Velho (Misra et. al., 2001, 2002, 2004) como no Novo Mundo (Broderson et. al., 1986), visando estabelecer um sistema biológico experimental que possibilite avaliar certos aspectos que tomam parte da interação entre as espécies de *Leishmania* do complexo *donovani* e as respostas clínica e imunopatológica do homem. Por essa razão, não só várias espécies de primatas (*Callithrix jacchus jacchus*, *Aotus trivigatus*, *Cercopithecus aethiops*, *Presbytis entellus*, *Cebus apella*...) têm sido experimentadas, como também, têm sido usadas as três espécies de *Leishmania* que são agentes da doença nesses continentes: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi*. Entretanto, não obstante alguns desses trabalhos terem documentado sucesso quanto ao uso de uma determinada espécie de primata, vale ressaltar, que esse tipo de resultado só foi conseguido após a utilização de um inóculo de formas promastigotas ou amastigotas de uma das três espécies de *Leishmania* acima citadas, o que caracteriza um sistema de experimentação muito diferente dos mecanismos naturais de transmissão da leishmaniose visceral via flebotomíneo.

No tocante aos experimentos com a *L. (L.) chagasi*, agente da leishmaniose visceral do Novo Mundo, faz-se importante mencionar o trabalho de Marsden et. al. (1981), que usaram um “pool” de fígado e baço de hamster infectado com o parasito para inocular, via intravenosa, o primata *Callithrix jacchus*. Além deste, Chapman & Hanson (1981) também usaram um inóculo, por via intravenosa, de amastigotas (30×10^6) de *L. (L.) chagasi* para demonstrar a infecção do primata *Saimiri sciureus*.

A título de exemplo, devemos mencionar o trabalho de Santos et. al. (2005), que usaram inóculo de 30×10^6 amastigotas de *L.(L.) chagasi*, via intravenosa, para infectar o primata *Cebus apella*. Foi possível demonstrar a infecção patente dos animais, através da visualização de formas amastigotas do parasito em esfregaços de medula óssea, desde o primeiro até o sexto mês após a inoculação. Em seguida, não foi mais possível demonstrar a infecção até o último momento (11º mês) de acompanhamento do experimento, revelando que os animais foram capazes de provocar o “clearance” da infecção.

Conforme exposto acima, a avaliação de uma dada espécie de primata quanto a sua susceptibilidade à infecção experimental por uma das espécies agentes de leishmaniose visceral pode ser feita utilizando-se inóculos de formas amastigotas ou promastigotas, entretanto, observou-se a clara preferência pela utilização de formas amastigotas em grandes concentrações que variaram entre 30×10^6 e 10×10^7 (Misra et. al., 2001; Santos et. al., 2005). Faz-se importante

salientar que a concentração (**30x 10⁶**) usada neste estudo foi equivalente a de trabalhos prévios que obtiveram resultados satisfatórios, porém com formas amastigotas. Apesar do modelo padronizado com dose única (formas promastigotas) não ter se mostrado capaz de instalar a doença ou infecção patente, estes resultados negativos não devem ser atribuídos a uma concentração insuficiente de formas promastigotas para causar a infecção no animal.

As inoculações sucessivas poderiam ser preponderantes na quebra da resistência natural do primata. Após vários contatos sucessivos com o parasito, assim como poderia ocorrer naturalmente em humanos, o protozoário poderia transpor as barreiras naturais de defesa do organismo causando infecção, como já foi demonstrado experimentalmente por Misra et. al., 2002. Apesar disso, o modelo de cinco doses sucessivas de **30 x 10⁶** de formas promastigotas metacíclicas obtidas da fase estacionária de cultivo, que totalizaram uma concentração final de **15 x 10⁷**, tanto no experimento I quanto no experimento II, também se mostrou incapaz de transpor a resistência do *Cebus apella* frente à infecção.

A via utilizada (intradérmica), representa um dos aspectos mais relevantes do presente estudo. A este respeito, foi visto que, na maioria dos trabalhos anteriormente citados (Chapman et. al., 1981; Broderson et. al., 1986; Anuradha et. al., 1992; Binhazim et.al., 1993), a via intravenosa assume grande influência no desenvolvimento das infecções experimentais. Contudo, estes modelos de estudo contornam barreiras naturais do sistema imune dos primatas, facilitando assim, a instalação da doença e impedindo um estudo adequado deste parâmetro de avaliação (imunológico). Outros autores (Githure et. al., 1986, 1995; Misra et. al., 2002), também demonstraram resultados positivos através da via intradérmica consubstanciando o modelo onde animais foram inoculados intradermicamente, para que não houvesse uma transposição de barreiras naturais de resposta frente ao parasito, como por exemplo, a migração de macrófagos para o local da inoculação. Apesar disso, a via utilizada neste estudo não se mostrou capaz de instalar a infecção.

Quanto a utilização de glândulas salivares de *L. longipalpis*, alguns trabalhos comprovaram a potencialização do inóculo a partir da associação do mesmo com pares de glândulas salivares do vetor (Lima & Titus, 1996; Misra et. al., 2002), entretanto, estas associações no experimento II não alcançaram o afeito almejado, ratificando assim, os resultados negativos em relação à susceptibilidade do primata *Cebus apella* frente ao parasito.

Quanto aos achados parasitológicos, observou-se que a infecção não evoluiu em nenhum dos 10 exemplares, não importando a concentração do inóculo ou a associação do mesmo à glândulas salivares. Não houve a visualização do parasito em esfregaços a partir de medula, que representam o método direto de diagnóstico laboratorial, sem que haja eutanásia dos primatas para visualização de formas amastigotas no fígado e no baço (Chaman et. al., 1981; Binhazim et. al., 1993). Já se tem evidências da eficácia do mielograma (punção de medula óssea) no diagnóstico laboratorial específico de leishmaniose visceral em primatas a partir de trabalhos prévios realizados em nosso laboratório (IEC) (Santos et. al., 2005) e somos, portanto, inclinados a descartar um possível diagnóstico equivocado, o que nos leva a crer que, de fato, a resposta do sistema imune do primata supera o contato com o parasita antes mesmo que se instale a infecção.

Ratificando os resultados negativos, não foi possível demonstrar em nenhum dos dez animais inoculados a presença de reação de Montenegro positiva, caracterizando a ausência de resposta imune celular (resposta de hipersensibilidade), sendo que os resultados da sorologia também foram coerentes, no sentido de apresentar os resultados negativos com todos os testes demonstrando títulos nunca superiores a 80. A este respeito, Santos et. al., (2005) chegou a demonstrar reação de Montenegro positiva de 30mm e títulos que evoluíram progressivamente até o 11^o mês p.i., que chegaram a 5.120, servindo como um bom controle positivo para o presente estudo.

No experimento I, não foi possível estabelecer correlação entre a ação do parasito e a perda significativa de peso apenas na 10^a semana p.i., já que não houve nenhuma outra alteração que pudesse consubstanciar este fato. Assim, atribui-se esta perda de peso a problemas temporários de manejo. Se observada a elevação média de peso(2kg) dos primatas nos dois experimentos, tomando-se como base o peso inicial, admite-se a importância do manejo para este parâmetro de avaliação.

Ainda em referência à 10^a semana no experimento I, supõem-se que mesmo sob um estresse nutricional momentâneo, que provavelmente acarretou uma debilidade imunológica, não houve o favorecimento da infecção experimental.

Considerando-se estes resultados mais recentes, acredita-se que o primata *Cebus apella* parece apresentar mecanismos de resistência natural eficientes contra a infecção por *L. (L.) chagasi*, não representando um bom modelo experimental para o estudo dos aspectos clínicos e imunopatológicos da leishmaniose visceral humana, uma vez que,

embora tenha-se utilizado nos dois experimentos, concentrações finais que variaram entre 30×10^6 e 15×10^7 , e no segundo experimento a associação do inóculo à glândulas salivares de *L. longipalpis*, não se obteve nem um indício de que o protozoário, por algum momento, conseguiu superar as defesas naturais do hospedeiro.

Neste sentido, os resultados observados no presente estudo nos levam a crer que provavelmente o macrófago ativado é capaz de eliminar o parasito ainda ao nível da resposta imune inata, não chegando a ativar a resposta imune específica, daí a ausência de achados imunológicos específicos de resposta humoral frente ao parasito.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos sugerir que:

1. O primata *Cebus apella* parece apresentar mecanismos de resistência natural (imune inata) eficiente contra a infecção por *L. (L.) chagasi*, não representando um bom modelo experimental para o estudo dos aspectos clínicos e imunopatológicos da leishmaniose visceral humana

2- Embora se tenha utilizado nos dois experimentos, concentrações finais que variaram entre 30×10^6 e 150×10^6 , e no segundo experimento a associação do inóculo à glândulas salivares de *L. longipalpis*, não se obteve nenhum indício de que o protozoário, por algum momento, conseguiu superar as barreiras naturais do hospedeiro.

APÊNDICE

I Corante Giemsa

- 3g de Giemsa
- 260 ml álcool metílico
- 140 ml glicerol

II Meio de Cultura Difco B45

- 40g Difco B45
- 120 ml sangue de coelho desfibrinado (adicionar 0,2 ml de gentamicina para cada 20 ml de sangue)
- 1000 ml água destilada

III Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI) do IEC

- Tirar o soro da geladeira
- Tirar as lâminas do freezer
- Diluir os soros
- Levar para estufa à 37° C durante 30 minutos
- Lavar com PBS cada lâmina e mergulhá-las durante 10 minutos e mais 5 minutos em água destilada
- Preparar o conjugado
- Colocar o conjugado e incubar à 37° C durante 30 minutos
- Lavar com PBS cada lâmina e mergulhá-las durante 10 minutos e mais 5 minutos em água destilada
- Secar e colocar glicerina
- Levar ao microscópio com objetiva de 40X

IV Punção aspirativa de Medula Óssea

- Animais devidamente anestesiados
- Local de realização: ambulatório
- Material necessário para realização:

ANTISSEPSIA

1 Luvas

COLETA

Seringa 5 ml

ESFREGAÇO

Lâmina desengordurada

2 Álcool a 70% Agulha especial com mandril

3 Gaze

• Local da punção: crista ilíaca

Polegar posicionado abaixo da crista ilíaca, indicador acima da crista ilíaca, para firmarem a pele; penetrar a epiderme com a agulha; posicionar a agulha em 90° e proceder a introdução da mesma em osso, com firmeza.

• Risco específico: Ultrapassar a tábua óssea interna e atingir alça intestinal

• Vantagens: menos doloroso; risco praticamente nulo

V- Solução tampão de salina fosfatada (PBS) pH 7,2

1,04g Na₂ HPO₄

0,358g Na₂ HPO₄ H₂O

7,905g NaCl

1000mL água destilada

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS :

- ANDRADE, Z. A. et al. Immunopathology of experimental cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Pathol.** v.114, p.137-148, 1984.

- ANURADHA et. Al. The Indian langur: preliminary report of a new nonhuman primate host for visceral leishmaniasis. **Bulletin of the World Health Organization**,1: 63-72, 1992.

- AWADH, A.B.; SAUG,S.S.; WILLIE,L.; CHAPMAN, Jr.; JOSEPH, O. Comparative susceptibility of African Green Monkeys (*Cercopithecus aethiops*) to Experimental infection with *Leishmania leishmania donovani* and *Leishmania leishmania infantum*. **The American Association Laboratory animal Science**,43: 37-47, 1993.

- BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (calazar). In: **VERONESI, Ricardo; FOCCACIA, Renato. Tratado de doenças infecciosas.** São Paulo: Atheneu, v.2, p.1234-1259, 1997.

- BINHAZIM, A. A. et al. Comparative susceptibility of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) to experimental infection with *Leishmania (L.) donovani* I and *Leishmania (L.) infantum*. **Lab. Anim. Sci.**; V 43, nº 1; p 37-47, 1993.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Ministério de Saúde, 2003.120p.

- BRODERSON JR et. al. Experimental visceral leishmaniasis in owl monkey. **Vet. Pathol.**, nº 23, 293-302, 1986.

- CHAPMAN, W. L., HANSON, W. L. & HENDRICKS, Visceral leishmaniasis in the squirrel monkey (*Saimiri sciurea*). **The Journal of Parasitology**, 67: 740, 1981.

- CHAPMAN, W. L., HANSON, W. L. & HENDRICKS. *Leishmania donovani* in the owl monkey (*Aotus trivigatus*). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 75: 124-125, 1981.

- CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoários do gênero *Leishmania* patogênico para o homem: *Leishmania chagasi*. **O Hospital. Rio de Janeiro.** v.11. p.3-9, 1937.

- DENNIS, V. A. et.al. *Leishmania donovani*: clinical, hematologic and hepatic changes in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). **The Journal of Parasitology**, 71: 576, 582, 1985.

- DUBE, A. et al. Vaccination of langur monkeys (*Presbytis entellus*) against *L. donovani* with autoclaved *L. major* plus BCG. **Parasitology**. 1998; 116: 219-21.

- DUBE, A. et al. *Leishmania donovani*: cellular and humoral immune responses in Indian langur monkeys, *Presbytis entellus*. **Acta. Tropical**. 1999; V 73 n^o1: 37-48.

- GARCEZ LM et. al. Experimental cutaneous leishmaniasis. IV. The humoral response of *Cebus apella* (Primates: Cebidae) to infections of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) lainsoni* and *L. (V.) braziliensis* using direct agglutination test. **Acta Tropical**, 68, 65-76, 1997.

- GITHURE et. al. The suitability of East African primates as animal models of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, V 80, 575-576, 1986.

- GICHERU, et. al. Visceral leishmaniasis in vervet monkeys: immunological responses during asymptomatic infections. **Scand J Immunol**. 1995; V41 n^o2: 202-8.

- GUIMARÃES, M. C. S.; GIOVANNINI, V. L.; CAMARGO, M. E. Antigenic standardization for mucocutaneous leishmaniasis immunofluorescence test. **Rev. Inst. Med. Tropical. São Paulo**, V 16: 145-148, 1974.

- LAINSON, R et. al. Leishmaniasis in Brazil. IV. The fox, *Cerdocyon thous* (L), as a reservoir of *Leishmania donovani* in Pará State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v 63, 741-745, 1969.
- LAINSON, R. Leishmaniasis. In: Handbook Series in Zoonoses. **STEELE J. H. (ed), CRC Press Inc, Boca Raton, Florida**, p. 41-103, 1982.
- LAINSON, R. et. al. Isolation of *Leishmania* from monkeys in the Amazon Region of Brasil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 82:231,1988
- LIMA, H. C.; TITUS, R.G. Effects of Sand Fly Vector Saliva on Development of Cutaneous Lesions and the Immune Response to *L. brasilienses* in BALB/c Mice. **Infection And Imummunity** .De. p. 5442-5445, 1996
- MADINDOU,T.J.; HANSON, W. L.; CHAPMAN, Jr. Chemotherapy of leishmaniasis (*Leishmania donovani*) in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, **V79**, n° 1: 13-19, 1985.
- MARSDEN PD et. al. Experimental *Leishmania chagasi* infections in the marmoset *Callithrix jacchus jacchus*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, V 75, 314-315, 1981.
- MARZOCHI, M. C. A. Visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro. **Parasitology Today**. **v.10.n.1.1994**.

- MISRA, A. et al. Successful vaccination against *Leishmania donovani* infection in Indian langur using alum-precipitated autoclaved *Leishmania major* with BCG. **Vaccine**. 2001; 19 (25-26): 3485-92.

- MISRA, A. et al. Establishment of asymptomatic *Leishmania donovani* infection in Indian langurs (*Presbytis entellus*) through intradermal route. **Indian J. Exp. Biol.** 2002; 40 (5): 605-8.

- MISRA, A.; DUBE, A.; NAIK, S. Immune responses in normal Indian langur monkeys (*Presbytis entellus*) primate model for visceral leishmaniasis. **J. Med. Primatol.** 2004; V 33 n° 2: 65-9.

- MOLL, H. et al. Dendritic cells in *Leishmania major* - immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. **Eur. J. Immunol.** v.25, p.693-699, 1995.

- OLOBO, J. O.; GICHERU, M. M.; ANJILI, C. O. The African Green Monkey model for cutaneous and visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology.** v. 17. n. 12. 2001.

- PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in Biology and in Medicine., **Academic Press**, 1987.

- REY, L. C. Calazar: Diagnóstico e tratamento. In: **Curso Nestle de Atualização em Pediatria. Fortaleza.Resumos.** p.238-287, 1997.

- SANTOS, D. C. et. al. Experimental evidence demonstrating the natural resistance of the monkey *Cebus apella* (*Primates: Cebidae*) to infection with *Leishmania (L.) chagasi*, in : **Third World Congress on Leishmaniosis, Palermo-Terrasini Sicily; Italy.** P.204, 2005

- SHAW, J. J. & LAINSON, R. Leishmaniasis in Brazil: Some observations on intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 69: 323-335, 1975.

- SILVEIRA FT et. al. Leishmaniasis in Brazil. XVIII. Further evidence incriminating the fox *Cerdocyon thous* as a reservoir of American visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, 76, 830-832, 1982.

SILVEIRA FT et. al. Leishmaniose cutânea experimental. II. Aspectos evolutivos da infecção no primata *Cebus apella* (Cebidae) por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, 23, 5-12, 1990.

SILVEIRA FT et. al. Leishmaniose tegumentar americana. IN: **Doenças infecciosas e parasitárias, Enfoque amazônico.** Belém, CEJUP, 1997.

- WHO-World Health Organization. Control of leishmaniasis. Report of a Who Expert Committec. World Health Organization, Geneva, Switzerland. **Technical Report Series**, 1990. 793 p.