

**ROBERTA NICE SALGADO SODRÉ**

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/C E  
SWISS, HAMSTER E *PROECHIMYS ROBERTI* À INFECÇÃO POR  
*LEISHMANIA (VIANNIA) NAIFFI* E *LEISHMANIA (VIANNIA)*  
*LINDENBERGI*.**

**BELÉM  
2005**

**ROBERTA NICE SALGADO SODRÉ**

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/C E  
SWISS, HAMSTER E *PROECHIMYS ROBERTI* À INFECÇÃO POR  
*LEISHMANIA (VIANNIA) NAIFFI* E *LEISHMANIA (VIANNIA)*  
*LINDENBERGI*.**

Dissertação apresentada ao Programa 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 parcial para a obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais.

**Orientadora:** Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa.

**BELÉM  
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical – NMT/UFGPA**

---

Sodré, Roberta Nice Salgado.

Avaliação da susceptibilidade de camundongos BALB/c e Swiss, hamster e *Proechimys roberti* à infecção por *Leishmania (Viannia) Naiffi* e *Leishmania (Viannia) Lindenbergi* / Roberta Nice Salgado Sodré; orientadora, Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa. – Belém: [s.n.], 2005.

Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, 2005.

1. Leishmaniose.
2. *Leishmania (V) naiffi* - *lindenbergi*.
3. modelos experimentais. I. Título.

CDD: 21. ed.: 616.9

---

**ROBERTA NICE SALGADO SODRÉ**

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/C E SWISS, HAMSTER E *PROECHIMYS ROBERTI* À INFECÇÃO POR *LEISHMANIA (VIANNIA) NAIFFI* E *LEISHMANIA (VIANNIA) LINDENBERGI*.**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Patologia das Doenças Tropicais pelo Programa de pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, pela comissão constituída dos seguintes professores:

**Orientadora:** Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa

Avaliadores:

1- \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Fernando Tobias Silveira  
(Instituto Evandro Chagas-IEC/ Universidade Federal do Pará-NMT)

2- \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Rita Catarina Medeiros Sousa  
(Universidade Federal do Pará-NMT)

3- \_\_\_\_\_  
Prof. Juarez Antônio Simões Quaresma  
(Universidade Federal do Pará-NMT)

Suplente: \_\_\_\_\_  
Prof<sup>a</sup> Rosana Maria feio Libonati  
(Universidade Federal do Pará-NMT)

**BELÉM  
2005**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por guiar todos os meus passos e que me deu força nos momentos difíceis para que mais uma etapa fosse concluída.

Aos meus pais Maira e Paulo, pelo imenso amor, carinho, compreensão e presença constante em todos os momentos de minha vida.

A Dra Edna Ishikawa, por todos os ensinamentos desde a época da minha iniciação científica até a realização do mestrado, contribuindo para o meu amadurecimento científico e profissional. Agradeço pela orientação, pela paciência e por estar sempre disposta a me auxiliar nos momentos de dúvida.

Ao Dr. Adevaldo Silva, responsável pelo Biotério Central do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio importante cedendo os animais utilizados neste estudo.

Ao Dr. Fernando Silveira, pela intensa colaboração e amizade, por oferecer sugestões para o melhoramento do meu trabalho.

Ao Dr. Adelson Souza, pelo estímulo e constante apoio durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Leishmanioses do IEC: Nonato, Brandão, Martins, Aprígio, Iorlando, Machado, Júlio, Leônidas, Graça, Rose, Zuíla e Domingas, pela colaboração técnica durante a realização deste trabalho como também pela amizade.

Ao mestrando Dirceu Costa, pelo companheirismo desde a época da graduação e por me ajudar no procedimento técnico de extração das glândulas salivares dos flebotomíneos.

As amigas de laboratório Yara e Marliane, pela ajuda e esclarecimento de algumas técnicas utilizadas.

As mestrandas Liliane, Luciana e Simone e ao estagiário de iniciação científica do Laboratório de Leishmanioses do IEC, Thiago Santos, pelo convívio amigo e ajuda em alguns momentos da realização deste trabalho.

A Maria José Mateus e a equipe da Biblioteca do IEC, pela colaboração na busca de informação bibliográfica.

As minhas amigas de coração Paloma, Tinara e Daniele, pelo apoio nos momentos de angústias e por compartilhar muitas alegrias.

Ao meu noivo Marcus, por sempre me apoiar e acompanhar o meu desenvolvimento profissional desde a entrada na universidade até a conclusão do mestrado. Agradeço por entender os momentos difíceis e pelo intenso companheirismo.

## RESUMO

*Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* são espécies causadoras da leishmaniose cutânea na Amazônia e apresentam grande similaridade no seu perfil isoenzimático, anticorpos monoclonais e produção de infecção inaparente em hamsters. O fato de não se ter um modelo experimental altamente suscetível à infecção por *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi*, o objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de camundongos BALB/c e Swiss, hamster e *Proechimys roberti* à infecção por essas duas espécies. Foram preparados inóculos com glândulas salivares e sem glândulas, associados às formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania*. Doze animais de cada espécie foram divididos em quatro grupos (machos e fêmeas inoculados com glândulas salivares e machos e fêmeas sem glândulas salivares). Todos foram inoculados intradermicamente na face dorsal das duas patas traseiras e foram observados durante 90 dias. No período de 30, 60 e 90 dias pós-inoculação, os animais foram sacrificados e diferentes fragmentos de pele do local de inoculação foram divididos e utilizados na cultura in vitro, exame microscópico direto e reação em cadeia da polimerase (PCR). Não foi possível observar lesões nos animais inoculados com *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* tanto na presença ou ausência de glândulas salivares. Assim como, formas amastigotas durante 30, 60 e 90 dias após a inoculação. Na cultura, todos os animais inoculados com *L. (V.) lindenbergi* não desenvolveram formas promastigotas. Por outro lado, todos os grupos de camundongos BALB/c inoculados com *L. (V.) naiffi* apresentaram positividade quando sacrificados com 30 dias após inoculação e até 90 dias nos machos inoculados com glândulas salivares e fêmeas inoculadas sem glândulas salivares. A PCR apresentou baixa sensibilidade comparada à cultura. Desse modo, concluímos que *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* são espécies que apresentam baixa infectividade e nenhum dos animais utilizados no estudo podem ser considerados modelo experimental altamente susceptíveis à infecção por essas duas espécies.

**Palavras chaves:** *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, modelos experimentais.

## ABSTRACT

*Leishmania (Viannia) naiffi* and *Leishmania (Viannia) lindenbergi* are species that cause cutaneous leishmaniasis in Amazonia and present great similarity in its isoenzymatic profile, monoclonal antibodies and production of unapparent infection in hamsters. The fact of not having a highly susceptible experimental model to the infection for *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lindenbergi*, the objective of this study was to evaluate the susceptibility of BALB/c and Swiss mice, hamsters and *Proechimys roberti* to the infection for those two species. It was prepared inoculums with salivary glands and without glands for each group of animals, associated to the promastigotes. The experimental animals, of both sexes, were inoculated intradermally in the dorsal surface of back feet and they were observed for 90 days. In the period of 30, 60 and 90 days after inoculation, the animals were sacrificed and different fragments of skin of the inoculation place were used in the culture, microscopic exam and polymerase chain reaction (PCR). It was not possible to observe lesions in the animals inoculated with *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lindenbergi* even at the presence or absence of salivary glands. As well as, forms amastigotes during 30, 60 and 90 days after the inoculation. In the culture, all the animals inoculated with *L. (V.) lindenbergi* haven't developed promastigotes. For the other hand, BALB/c mice inoculated with *L. (V.) naiffi* presented positively when sacrificed 30 days after inoculation. PCR presented low sensibility compared to the culture. This way, we concluded that *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) lindenbergi* is species that present low infectivity and none of the animals used in the study experimental model can be considered highly susceptible to the infection for those two species.

Key words: *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi*, experimental models.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1	HISTÓRICO.....	9
1.2	CONCEITO.....	10
1.3	BIOLOGIA E ETIOLOGIA.....	12
1.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
1.5	ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS.....	18
1.6	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS.....	19
1.7	IDENTIFICAÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> .....	20
1.8	TRATAMENTO E CONTROLE.....	21
1.9	INFECÇÃO EXPERIMENTAL <i>IN VIVO</i> .....	22
1.10	<i>LEISHMANIA (VIANNIA) NAIFFI</i> E <i>LEISHMANIA (VIANNIA) LINDENBERGI</i> .....	27
1.11	JUSTIFICATIVA.....	29
1.12	OBJETIVOS.....	30
1.12.1	<b>Geral</b> .....	30
1.12.2	<b>Específicos</b> .....	30
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
2.1	SELEÇÃO DE CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i> .....	31
2.2	SELEÇÃO DE ANIMAIS.....	31
2.3	RECUPERAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i> E CULTIVO <i>IN VITRO</i> .....	32
2.4	CONTAGEM DE PARASITAS.....	32
2.5	FLEBOTOMÍNEOS E EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES.....	33

2.6	INOCULAÇÃO <i>IN VIVO</i> .....	33
2.7	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO.....	34
2.7.1	<b>Exame microscópico</b> .....	34
2.7.2	<b>Cultivo</b> .....	35
2.7.3	<b>Extração de DNA</b> .....	35
2.7.4	<b>Reação em cadeia da polimerase</b> .....	36
2.8	ASPECTOS ÉTICOS.....	37
3	<b>RESULTADOS</b> .....	38
3.1	OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA NO SÍTIO DE INOCULAÇÃO.....	38
3.2	OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA.....	38
3.3	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELA CULTURA .....	38
3.3.1	<b>Infecção por <i>L. (V.) lindenbergi</i></b> .....	38
3.3.2	<b>Infecção por <i>L. (V.) naiffi</i></b> .....	39
3.4	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.....	41
4	<b>DISCUSSÃO</b> .....	43
5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	53
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	54
	<b>APÊNDICE</b> .....	66
	<b>ANEXO</b> .....	68

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

As leishmanioses são enfermidades que vem afligindo o homem desde a antiguidade. Os primeiros relatos sobre leishmaniose tegumentar podem ser encontrados na literatura do primeiro século D.C na Ásia Central, onde a doença era conhecida como “Úlcera de Balkh”, devido a cidade de Balkh no norte do Afeganistão, considerada área endêmica para a doença. Outros relatos podem ser vistos no Novo Mundo, em cerâmicas sul-americanas da época de 400 a 900 anos D.C. Comumente, essas cerâmicas mostravam faces humanas com mutilações no nariz e nos lábios semelhantes às causadas por leishmaniose mucocutânea (Lainson, 1997; Lainson & Shaw, 1998).

A primeira observação do parasita pertencente ao gênero *Leishmania* foi feita por Cunningham em 1885, em casos de leishmaniose visceral na Índia. Em seguida, vários pesquisadores passaram a encontrar e descrever o parasita, até que Ross em 1903, criou o gênero *Leishmania*. No mesmo ano, Wright descobriu o agente etiológico do “Botão do Oriente”, nome referido a doença no Afeganistão, incluindo no mesmo gênero com o nome de *Leishmania tropica*. No Brasil, a natureza leishmaniótica das lesões cutâneas só foi confirmada pela primeira vez por Lindenberg em 1909, que encontrou formas amastigotas do parasito em material obtido de lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior de São Paulo. Em 1911, Gaspar Vianna, observando que o parasita apresentava características morfológicas que o diferenciava da *Leishmania tropica*, atribuiu o nome da primeira espécie associada à doença, como *Leishmania brasiliensis*. Posteriormente, foram atribuídos nomes espécie-específicos para

cada localidade, como por exemplo, *L. tropica mexicana*, atribuída ao parasita causador da doença “Úlcera de Chilero” no México (Lainson, 1982; Silveira *et al.*, 1997).

Em continuidade aos estudos sobre a doença, o modo de transmissão passou a ser questionado. Em 1913, Brumpt e Pedroso relataram as primeiras observações epidemiológicas sobre a doença, denominando-a “leishmaniose americana das florestas” devido ao fato de que sua transmissão se relacionava com o ambiente silvestre. Finalmente, Aragão em 1922, relatou evidências da transmissão envolvendo flebotomíneos. Anos depois, no Velho Mundo, Shortt *et al.* em 1926, definiram o papel desses insetos na transmissão das leishmanioses (Falqueto & Sessa, 1997).

## 1.2 CONCEITO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma zoonose de alta frequência, de evolução crônica e não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença acomete o homem e pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (Lainson & Shaw, 1992).

A doença acomete isoladamente ou em associação, a pele e mucosas do nariz, boca, faringe e laringe, gerando assim um espectro de quatro formas clínicas da doença que são: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutâneo-mucosa (LMC), leishmaniose cutânea anérgica difusa (LCAD) e leishmaniose cutânea disseminada borderline (LCDB) (Silveira *et al.*, 2004).

A LCL é uma forma normoreativa caracterizada por lesão inicial, geralmente única, denominada de úlcera leishmaniótica, acometendo principalmente os membros, face e pescoço, com tendência a cura espontânea. Os pacientes acometidos por essa forma apresentam reação de Montenegro positiva, demonstrando a presença de uma resposta imunológica satisfatória para destruir o parasita e obter cura após o tratamento utilizado (Silveira *et al.*, 2004).

A LCM é uma forma caracterizada por um comprometimento mucoso, que pode surgir meses ou anos após a cicatrização da lesão de pele inicial, podendo sofrer metástase e disseminar por via hematogênica atingindo o tecido nasobucofaríngeo (Marsden, 1986)

A LCAD é uma forma incomum da doença, sendo assim, de grande interesse médico (Silveira *et al.*, 1991). Caracteriza-se pelo número elevado de lesões disseminadas, podendo ser placas infiltradas, nódulos ou tubérculos, as quais apresentam riqueza parasitária em toda a sua evolução. As lesões são inicialmente localizadas, disseminando-se por via hematogênica por todo o corpo. A reação de Montenegro é sempre negativa, devido à deficiência imunológica específica (anergia) do hospedeiro a antígenos de *Leishmania*. Dessa forma, o paciente não responde bem aos tratamentos normalmente utilizados (Silveira *et al.*, 2004).

A forma hiporeativa reversível LCDB, comporta-se como uma forma intermediária. Nessa forma, há o aparecimento de lesão inicial (primária), com posterior disseminação após alguns meses de infecção (metastização secundária). As lesões são preferencialmente infiltradas, com número limitado. A reação ao teste de Montenegro é negativa antes do tratamento e após, observa-se uma conversão tornando-a positiva. Os pacientes após um período de tratamento evoluem para a cura (Silveira, 2001).

Tem sido relatada também, a ocorrência de LTA em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo esta co-infecção facilitada devido a uma progressiva desregulação do sistema imunológico dos hospedeiros. Nos casos publicados, tem se observado uma diversidade clínica, quadros mais graves, disseminação, comprometimento dos órgãos internos e refratariedade aos tratamentos habituais (Guiguemde *et al.*, 2003; Sampaio *et al.*, 2002).

### 1.3 BIOLOGIA E TAXONOMIA

Com relação à posição taxonômica do parasita, a doença é causada por espécies de parasitas do gênero *Leishmania* Ross, 1903, que pertencem a Classe Zoomastigophorea, Ordem Kinetoplastida e Família Trypanosomatidae. Vários caracteres podem ser utilizados para classificação taxonômica de *Leishmania*, como: especificidade do hospedeiro, características genotípicas do DNA genômico e DNA do cinetoplasto, características fenotípicas como a morfologia, caracterização enzimática, estruturas de proteínas, lipídios e carboidratos, e também a detecção por anticorpos monoclonais e etc (Peters, 1986; Shaw, 1994).

O parasita apresenta a seguinte classificação taxonômica:

Reino **Protista** Haeckel 1866

Sub-Reino **Protozoa** Goldfuss 1817

Filum **Sarcomastigophora** Honinberg e Balamuth 1963

Sub-filum **Mastigophora** Deising 1866

Classe **Zoomastigophorea** Calkins 1909

Ordem **Kinetoplastida** Honinberg 1963, emend. Vickerman 1976

Sub-ordem **Trypanosomatina** Kent 1880

Família **Trypanosomatidae** Doflein 1901, emend. Grobben 1905

Gênero *Leishmania* Ross 1903

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), compreendendo uma fase evolutiva nos hospedeiros invertebrados (insetos vetores) que albergam as formas promastigotas e outra fase nos hospedeiros vertebrados, representados por mamíferos, nos quais a forma amastigota pode ser encontrada (Lainson, 1985).

Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos como roedores, edentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais, canídeos e primatas. A infecção nestes animais é geralmente inaparente e benigna, indicando um relacionamento equilibrado entre o parasita e o animal. O homem e alguns animais domésticos são considerados como hospedeiros acidentais apresentam uma infecção produzindo comumente lesões de pele (Lainson, 1985; Lainson *et al.*, 1994). No tecido destes mamíferos, o parasita é visto como uma pequena forma arredondada, sem flagelo livre, denominada amastigota, que se multiplica dentro de macrófagos da pele (Lainson & Shaw, 1992).

Os insetos vetores, hospedeiros invertebrados, são conhecidos como flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Psychodopygus* e *Lutzomyia* (Ordem **Díptera**: Família **Psychodidae**: Subfamília **Phlebotominae**) no Novo Mundo (Desjeux, 1992). Nas Américas, são conhecidas mais de 350 espécies dos gêneros *Psychodopygus* e *Lutzomyia*, mas somente 32 delas são implicadas como vetores da leishmaniose. Desse total, 330 ocorrem no

Brasil, encontrando-se na Região Amazônica aproximadamente 115 espécies descritas, sendo 24 antropófagas (Grimaldi & Tesh, 1993).

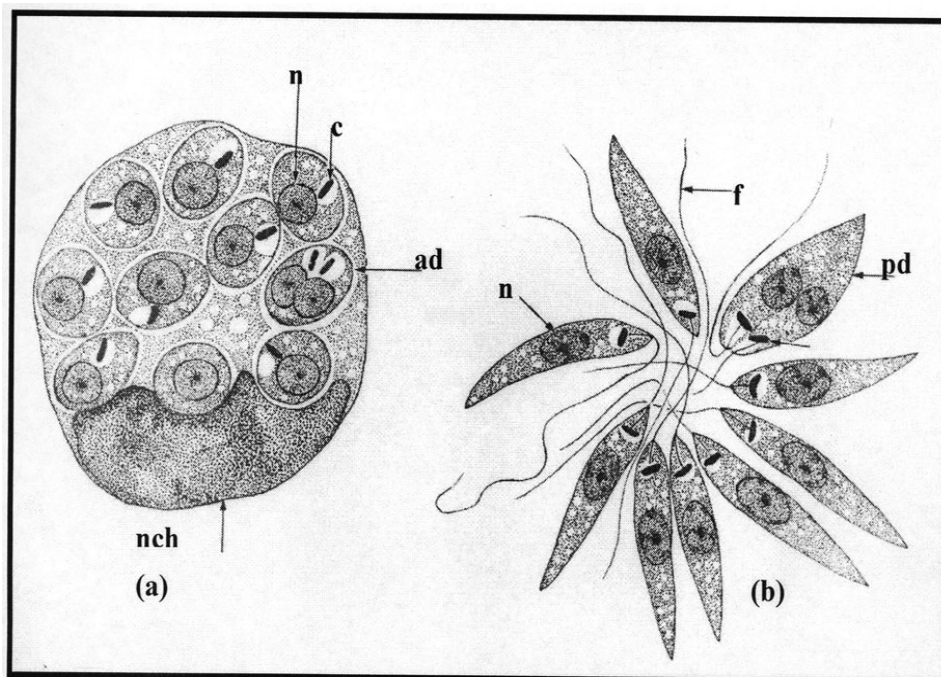
No intestino desses insetos, as amastigotas ingeridas durante o repasto sanguíneo, transformam-se em promastigotas (Ilustração 1), com um longo flagelo livre e corpo fusiforme (Lainson, 1997). Esta forma também pode ser encontrada em meios de cultivo *in vitro*.

Durante o ciclo evolutivo do parasito, a infecção do inseto ocorre quando a fêmea dos flebotomíneos, ao realizar repasto sanguíneo, pica um vertebrado infectado e juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas (Ilustração 1). No trato digestivo a forma amastigota modifica-se e transforma-se em promastigota, que se multiplica por divisão binária. Em seguida, ocorre migração desses flagelados para a região anterior do estômago, colonizando o esôfago e a faringe. Nesta fase, as promastigotas se diferenciam para promastigotas metacíclicas infectantes, que são responsáveis por transferir a infecção para novos hospedeiros quando são injetadas na pele durante a picada do inseto infectado (Lainson, 1978; Lainson & Shaw, 1992).

Ao realizar repasto sanguíneo, a fêmea de flebotomíneo infectada, introduz sua probócida na parte superficial da derme do hospedeiro vertebrado, e na presença da ação enzimática e vasodilatadora da saliva, injeta as formas promastigotas no local da picada (de Almeida *et al.*;2003). Estas são fagocitadas por macrófagos teciduais onde rapidamente se transformam em amastigotas, localizando-se no interior de vacúolos parasitóforos. Estas, já adaptadas ao novo meio fisiológico, resistem a ação destruidora das enzimas lisossomais multiplicando-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma. A infecção é mantida pelo



rompimento da célula infectada, liberando amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos (Lainson, 1997). Esta capacidade de sobreviver a diferentes meios, assim como ligação ao macrófago com sua posterior internalização, provavelmente, deve-se a uma molécula de superfície denominada de lipofosfoglicano (LPG) (Sacks *et al.*, 2000; Ilg, 2001).



**Ilustração 1:** Formas evolutivas de *Leishmania*:

(a) amastigotas no macrófago, (b) promastigotas no vetor flebotomíneo (Lainson, 1982). Ad= amastigota em divisão; pd= promastigota em divisão; c= cinetoplasto; f= flagelo; n= núcleo; nch= núcleo da célula hospedeira.

Com base no comportamento dos parasitas no intestino do inseto vetor, Lainson e Shaw (1987) agruparam as espécies de *Leishmania* em 2 subgêneros: *Viannia* Lainson e Shaw 1987 e *Leishmania* Ross 1903. Sendo assim, no subgênero *Leishmania* o ciclo no vetor está restrito à porção anterior e média do tubo digestivo, onde o parasita se multiplica livremente ou aderente às paredes do estômago (seção suprapilaria). No subgênero *Viannia*, o ciclo no vetor inclui uma fase prolongada na qual a promastigota dirige-se para o intestino e coloniza a região do piloro e íleo (seção peripilaria) e permanece aderida pelo flagelo ao epitélio intestinal através de

hemidemosomas. Até o momento, as espécies deste subgênero são encontradas somente nas Américas.

A etiologia de LTA inclui uma multiplicidade de espécies dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. São conhecidas cerca de 31 espécies de *Leishmania* no mundo inteiro, das quais 22 são encontradas no Novo Mundo. Destas, apenas 14 são incriminadas como agentes etiológicos de LTA (Tabela1), dentre as quais 7 espécies têm registro na Região Amazônica como causadoras de LTA: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (Silveira *et al.*,2002;2004).

**Tabela 1-** Espécies de *Leishmania*, agentes etiológicos de LTA

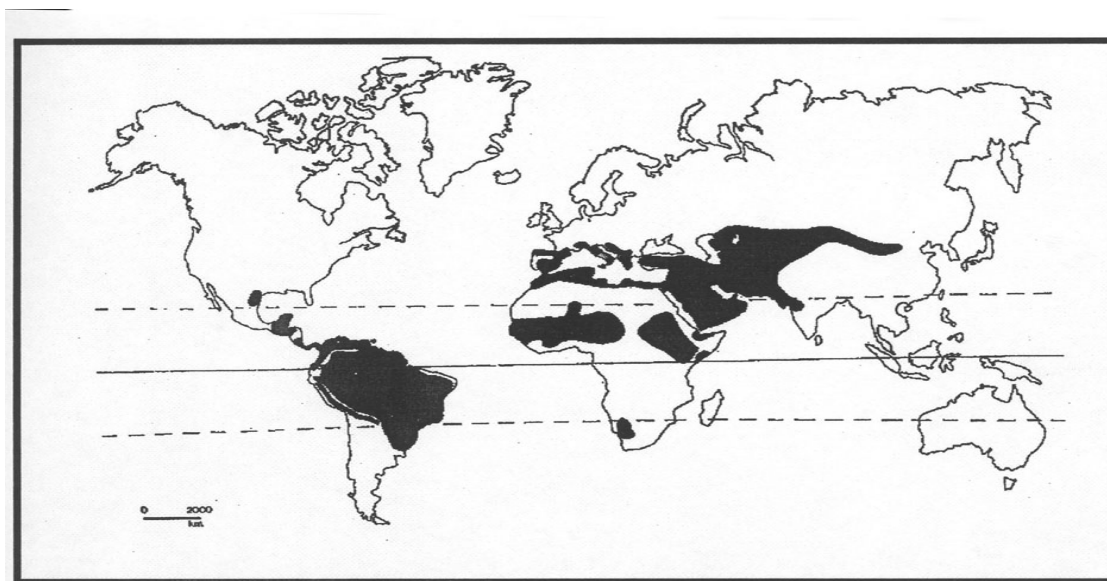
<b>Subgênero <i>Viannia</i> Lainson &amp; Shaw, 1987</b>		<b>Subgênero <i>Leishmania</i> Ross, 1903</b>	
<i>L.(V.) braziliensis*</i>	Vianna, 1911	<i>L.(L.) mexicana</i>	Biagi, 1953
<i>L.(V.) peruviana</i>	Velez, 1913	<i>L.(L.) pifanoi</i>	Medina & Romero, 1959
<i>L.(V.) guyanensis*</i>	Floch, 1954	<i>L.(L.) amazonensis*</i>	Lainson&Shaw, 1972
<i>L.(V.) panamensis</i>	Lainson & Shaw, 1972	<i>L.(L.) garnhami</i>	Scorza <i>et al.</i> , 1979
<i>L.(V.) lainsoni *</i>	Silveira <i>et al.</i> , 1987	<i>L.(L.)venezuelensis</i>	Bonfante-Garrido,1980
<i>L.(V.) naiffi*</i>	Lainson & Shaw, 1989		
<i>L.(V.) shawi *</i>	Lainson <i>et al.</i> , 1989		
<i>L.(V.) colombiensis</i>	Kreutzer, 1991		
<i>L.(V.) lindenbergi *</i>	Silveira <i>et al.</i> , 2002		

\* reportadas na Amazônia Brasileira

#### 1.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A leishmaniose tegumentar apresenta ampla distribuição geográfica (Ilustração 2), sendo registrada no Velho Mundo na Bacia do Mediterrâneo, Sudão e parte oriental da África, bem como no Oriente Médio e parte oriental da China, onde mais de 90% dos casos ocorridos no mundo provem dos seguintes países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão. Nas Américas, a LTA ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina, cujo foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países com exceção do Uruguai e do Chile (Desjeux, 1992; Gontijo & Carvalho, 2003).

No Brasil a doença tem uma ampla distribuição, tendo ocorrência em todos os Estados, desde áreas de crescimento populacional, principalmente nas regiões Norte e Centro-Oeste, como também em regiões consolidadas, ou mesmo com redução da população, como no Nordeste e Sudeste (FUNASA,2002).



**Ilustração 2:** Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar segundo Lainson, 1997.

## 1.5 ASPECTOS ECO-EPIDEMIOLÓGICOS

As características ecológicas peculiares da LTA associadas aos seus agentes etiológicos devem-se as barreiras ambientais próprias do hospedeiro, que limitam cada espécie de *Leishmania* a um vetor específico, assim como ao reservatório. A relação existente entre mamíferos e flebotomíneos em nichos ecológicos específicos é condicionada por diversos fatores ambientais e por ações diversas dos homens, uma vez que migrações populacionais para áreas de abertura de florestas, por exemplo, tem produzido modificações ecológicas atingindo a epidemiologia de LTA e conseqüentemente ocasionando um aumento da doença (Grimaldi *et al.*, 1989).

Portanto, o índice mais alto de LTA encontra-se na mão-de-obra associada com a construção de novas estradas que cortam áreas de florestas, ou com o desmatamento relacionado à agricultura e silvicultura. Na Amazônia, a LTA pode ser considerada como uma doença ocupacional, atingindo principalmente trabalhadores que penetram nas florestas para desempenhar atividades como construção de estradas, hidrelétricas ou projetos que requerem a penetração e abertura de florestas nativas (Lainson, 1981)

Por outro lado, atualmente têm-se observado mudanças nos padrões epidemiológicos de transmissão. Neste contexto, alguns países da América do Sul, tais como Bolívia, Peru, Venezuela e Brasil, tem apresentado perfis de transmissão doméstico e peridoméstico (Campbell-Ledrum *et al.*, 2001). No Brasil, geralmente isto ocorre em áreas de colonização antiga, estando relacionada a fluxos migratórios e aglomerados na periferia de centros urbanos. Nestes locais, algumas espécies de flebotomíneos provavelmente se adaptaram a este novo habitat e passaram a

ter, como principais reservatórios, cães, equinos e roedores, desempenhando um papel importante na manutenção da infecção em ambientes intradomiciliares (Grimaldi *et al.*, 1989).

## 1.6- ASPECTOS IMUNOLÓGICOS

Após a inoculação das formas promastigotas de *Leishmania* através da picada do mosquito na pele, o parasita invade as células hospedeiras, gerando assim, resposta celular e humoral desenvolvida pelo sistema imune do homem (Ritting & Bogdan, 2000; de Almeida *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos de mecanismos de resposta imune foi realizada em modelos murinos, sendo caracterizados dois padrões de resposta Th1 e Th2, os quais são similares em humanos. Os macrófagos possuem uma função central na leishmaniose, onde são importantes não só como os hospedeiros do parasita, mas também apresentam-se com a primeira linha de defesa para o hospedeiro, participando da apresentação de antígenos ao linfócito T (Sunderkötter *et al.*, 1993). A ativação dos macrófagos desencadeia a produção de óxido nítrico, representando um importante mecanismo na destruição dos parasitas intracelulares (Liew *et al.*, 1990; Mossalayi *et al.*, 1999).

Os Linfócitos T podem ser subdivididos em pelo menos duas subpopulações: Th1, que produz  $\text{INF}\gamma$ , IL-2, IL-12,  $\text{TNF}\alpha$  e Th2, que produz IL-4, IL-5 e IL-10 (Mosmann & Coffman, 1989). Essas duas subpopulações de células estão relacionadas com a resolução ou exacerbação (células Th1 e Th2, respectivamente) da leishmaniose (Liew, 1989).

## 1.7- IDENTIFICAÇÃO DE *LEISHMANIA*

Devido à multiplicidade de espécies existentes na Região Amazônica, a correta identificação desses parasitas faz-se necessária, não apenas para um melhor entendimento da epidemiologia, como também para um tratamento correto. A identificação de *Leishmania* se baseia na combinação de caracteres epidemiológicos e biológicos extrínsecos, como quadro clínico de infecção no homem, estudo da infecção no flebotomíneo, comportamento do parasito em hospedeiros mamíferos, etc. Estes são sustentados por caracteres intrínsecos como os imunológicos, bioquímicos e moleculares (Lainson *et al.*, 1994).

Testes imunológicos utilizando anticorpos monoclonais tem sido amplamente utilizados na identificação das espécies de *Leishmania*, sendo o mais importante o teste de reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (McMahon Pratt & David, 1981; Grimaldi & McMahon Pratt, 1996). É uma técnica que apresenta vantagens por ser rápida e sensível não requerendo grandes quantidades de parasitos cultivados (Shaw *et al.*, 1989). São utilizados um painel de 23 anticorpos monoclonais (B2, B5, B11, B12, B13, B18, B19, M2, T3, D13, M11, M12, CO1, CO2, CO3, L1, W1C, N2, N3, LA2, WH1, WA2, V1) para a identificação a nível específico do parasito através dos perfis monoclonais observados.

A identificação bioquímica é representada pela eletroforese de isoenzimas, onde as amostras são submetidas a um campo elétrico, gerando bandas correspondentes a uma determinada enzima, com substratos específicos (Kreutzer *et al.*, 1987). Este método permite o estudo das similaridades e diferenças entre os organismos ao nível de suas enzimas, através da comparação das bandas reproduzidas pelas amostras. Diferenças no perfil eletroforético indicam variações nos genes que regulam a produção das mesmas (Miles, 1986).

Em relação aos métodos moleculares, várias técnicas têm sido utilizadas, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que utiliza oligonucleotídeos derivados da seqüência nucleotídica de regiões comuns a todos os cinetoplastos- kDNA, a do RNA ribossômico- rRNA e da seqüência nuclear (Noyes *et al.*, 1996), e algumas de suas derivações como a amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), a qual utiliza uma única seqüência iniciadora, sendo bastante utilizada em estudos na detecção de polimorfismo, apresentando grandes vantagens para a detecção de variabilidade genética (Ishikawa *et al.*, 2002; Steindel *et al.*, 1994) e o polimorfismo no comprimento do fragmento de restrição (RFLP) (Marfurt *et al.*, 2003; Volponi *et al.*, 2004).

## 1.8 TRATAMENTO E CONTROLE

O tratamento de LTA foi introduzido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna em 1912, com o uso de Antimonial tártaro ermético, sendo utilizado durante muitos anos. Atualmente a droga de primeira escolha é o antimonial pentavelante. Este antimonial é indicado para o tratamento de todas as formas da doença. Não havendo resposta satisfatória, as drogas de segunda escolha são a Anfotericina B e a pentamidina (FUNASA, 2000).

Outra alternativa na terapêutica é o uso de vacinas para a imunoterapia e imunoprofilaxia. No Brasil, a vacina tem como antígenos promastigotas mortas de *L. amazonensis* (Leishvacin®, Biobrás, Monte Carlos, MG). Uma observação importante é que esta vacina produz uma resposta predominante de células T CD8+, assim como observado em pacientes com leishmaniose após um tratamento bem sucedido (Modabber, 1995; Mayrink *et al.*, 1999). Entretanto, ainda apresentam eficácia limitada nos estudos experimentais.

A prevenção e o controle das várias formas da doença nas grandes regiões endêmicas florestais são bastante difíceis devido a seu caráter zoonótico. Algumas medidas de proteção individual, como o uso de mosquiteiros, repelentes, entre outros, podem dificultar o contato com os insetos vetores. Um diagnóstico precoce e capacitação de equipes para informar a população sobre a doença, também são medidas importantes (Lainson *et al.*, 1986).

### 1.9 INFECÇÃO EXPERIMENTAL *IN VIVO*

A maioria dos conhecimentos sobre as leishmanioses tem sido gerada por estudos experimentais em animais, como roedores e primatas. Espera-se que estes imitem características patológicas e respostas imunológicas semelhantes às observadas em humanos expostos às várias espécies de *Leishmania*. (Hommel *et al.*, 1995; Olobo *et al.* 2001).

Muitos primatas não humanos têm sido utilizados em estudos experimentais, entre os quais o macaco *Cebus apella* tem-se mostrado susceptível a leishmaniose cutânea experimental. Silveira *et al.* (1990), avaliaram os aspectos evolutivos da infecção no primata pela *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* e confirmaram sua infectividade às duas espécies de *Leishmania* pela produção de um quadro lesional. O macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) apresenta aproximadamente 92% de similaridade com o DNA humano, e é uma das espécies de primatas do Velho Mundo mais utilizadas nas pesquisas biomédicas. A inoculação intradérmica de promastigotas de *L. major* nesses primatas resultou em nódulos que progrediram para úlceras, havendo, posteriormente, uma cura espontânea (Olobo *et al.*, 2001). Podem também ser úteis como modelo para leishmaniose visceral em estudos com *L.(L.) donovani* e *L.(L.) infantum*, onde reproduzem mudanças clínicas e imunopatológicas semelhantes à infecção



humana (Githure *et al.*, 1986; Binhazim *et al.*, 1993). O macaco de cheiro (*Saimiri sciurus*) ao ser infectado com *L. braziliensis* e *L. panamensis* apresentou formação de lesões cutâneas, bem como o desenvolvimento de lesões satélites semelhantes às observadas em humanos (Pung & Kuhn, 1987; Lujan *et al.*, 1990).

Os modelos mais utilizados em estudos experimentais em leishmaniose são os roedores. Dentre eles, o camundongo (*Mus musculus*) tem sido infectado com diferentes espécies de *Leishmania* em estudos imunológicos para a observação de diferentes tipos de respostas no processo de infecção. Dumas *et al.*(2003), avaliaram o padrão de citocinas produzidos em camundongos à infecção por *L. major*. Também usando *L. major*, Muller *et al.*(2003) observaram o papel das células T helper na produção de citocinas neste modelo animal.

Este roedor é utilizado também em estudos de avaliação de drogas. Em 1988, Rezai *et al.*, investigaram os efeitos da droga levamisole no curso da infecção por *L. major*, no qual os camundongos que receberam a medicação apresentaram uma infecção de menor severidade comparados ao grupo controle.

O camundongo pode ser útil no entendimento da relação parasito-hospedeiro. A fim de avaliar a patogênese de *L. major*, Bosque *et al.*(1995), inocularam formas promastigotas em diferentes locais como patas, orelhas e cauda. Assim, puderam ser comparados os camundongos susceptíveis e resistentes e a diferenciação de linfócitos T CD4 e CD8 estimulados pelos peptídeos de *Leishmania*.

O camundongo BALB/c (Ilustração 3) tem sido considerado susceptível a muitas espécies de *Leishmania*. Diaz *et al.*(2003), utilizaram este modelo para examinar a produção de óxido nítrico durante o curso da infecção por *L. mexicana*, o que resultou no desenvolvimento de lesões crônicas progressivas com predominância de IL-4 e células Th2. Este animal possibilitou a avaliação do papel realizado por citocinas na diferenciação das células Th durante a doença progressiva apresentada (Gumy *et al.*, 2004).



**Ilustração 3:** Camundongos BALB/c

Para avaliar a eficácia da imunoterapia específica contra a infecção por *L. donovani* na leishmaniose visceral, foram observados nos camundongos BALB/c os efeitos do tratamento com vacina na resposta humoral, os níveis de citocinas e a carga parasitária no fígado. Os resultados indicaram o potente efeito da vacina na modulação da infecção (Santos *et al.*, 2003).

Camundongos BALB/c podem ser úteis na análise da fase infectiva das promastigotas. Sacks e Perkins (1984), avaliaram a infectividade da fase logarítmica e estacionária de crescimento, ao inocularem  $10^4$  ou  $10^6$  promastigotas de *Leishmania tropica* nas patas traseiras de camundongos BALB/c. A infecção com promastigotas da fase estacionária resultaram em lesões dentro de 4 semanas enquanto na fase logarítmica, apenas após 7 a 10 semanas, houve o aparecimento de lesões na pata.

Camundongos BALB/c, C57BL/6 e DBA/2 foram infectados experimentalmente com  $10^4$  amastigotas de *Leishmania amazonensis* na pata traseira. Observou-se que os camundongos BALB/c e C57BL/6 desenvolveram lesões progressivas, enquanto DBA/2 apresentou lesão discreta persistente. Após oito meses de infecção, foi possível observar metástase nas patas e no nariz e órgãos viscerais. O camundongo DBA/2 mostrou-se mais resistente a infecção por essa espécie de *Leishmania*, não apresentando generalização para outros pontos (Abreu-Silva *et al.*, 2004).

Outro roedor bastante utilizado em estudos experimentais é o hamster (*Mesocricetus auratus*). Giannini (1974) avaliou os efeitos de várias fases de crescimento das formas promastigotas nesses animais, assim como a idade destes no momento da infecção por *L. donovani*. Foi observado que hamsters adultos são mais resistentes à infecção que os mais jovens, e que há diferenças de infectividade de promastigotas retiradas da fase logarítmica e da fase estacionária.

O local de inoculação parece influenciar na evolução clínica de hamsters infectados por *L. (V.) panamensis*. Osório *et al.* (2003), observaram que hamsters inoculados no focinho mostraram lesões severas mais rápido quando comparadas aos inoculados nas patas. Além de apresentarem um infiltrado inflamatório mais extensivo e um maior título de anticorpos.

De acordo com Melby *et al.* (2001), este roedor é um bom modelo para leishmaniose visceral humana. Dessa forma, foi avaliado o efeito do tratamento com terbinafine (agente antifúngico sintético que interfere na biosíntese do ergosterol) em hamsters infectados com *L.*

*chagasi*. Observou-se que não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo não tratado com a droga (Simões-Matos *et al.*, 2002).

A infecção com promastigotas e amastigotas de *L. infantum* foi avaliada por mais de 32 semanas usando o hamster como modelo experimental. O resultado foi uma doença visceral progressiva, como observado em cães e humanos, havendo uma diferença no período de incubação, que foi mais longo na infecção com promastigotas do que com amastigotas (Rica-Capela *et al.*, 2003).

Em regiões endêmicas para leishmaniose, a doença clínica é geralmente reportada mais freqüentemente em homens do que mulheres. Travi *et al.*(2002b) realizaram um estudo experimental em hamsters a fim de observar a influência do gênero (macho ou fêmea) no curso da infecção por *L.(V.) panamensis* e *L.(V.) guyanensis*. Lesões em hamsters machos foram de maior tamanho e mais severas, tendo uma maior carga parasitária nos linfonodos que as fêmeas.

O roedor *Proechimys* (Ilustração 4) tem sido incriminado como hospedeiro natural de espécies patogênicas em muitos focos endêmicos da leishmaniose na América do Sul. Na Colômbia, a espécie *Proechimys semispinosus* é o mamífero pequeno mais abundante de florestas tropicais úmidas, onde a leishmaniose cutânea é endêmica. Dessa forma, foi avaliada neste país, a susceptibilidade desse roedor às espécies *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) chagasi*. Os animais infectados experimentalmente com promastigotas de *L. panamensis* desenvolveram lesões não ulceradas, enquanto aqueles inoculados com *L. chagasi* tornaram-se infectados subclínicamente (Travi *et al.*, 2002a)

Lainson *et al.*(2002), investigaram a susceptibilidade de uma espécie comum da Amazônia, *Proechimys guyanensis* à infecção com *L. chagasi*, no qual nenhuma infecção foi detectada pelos métodos utilizados, apesar dos hamsters terem apresentado fígado e baço rico em amastigotas.



**Ilustração 4:** *Proechimys* sp.

#### 1.10 *LEISHMANIA (VIANNIA) NAIFFI* E *LEISHMANIA (VIANNIA) LINDENBERGI*

*Leishmania (V.) naiffi* Lainson & Shaw 1989, foi isolada pela primeira vez do fígado e baço do tatu (*Dasypus novemcintus*), coletados no Estado do Pará. Até o momento, este é o único hospedeiro reservatório conhecido desta espécie. O parasita apresenta crescimento vasto em meio de cultura, mas cresce pobremente na pele de hamsters, raramente produzindo uma lesão cutânea quase inaparente, contendo, muito escassamente, pequenas amastigotas.

Os hospedeiros invertebrados conhecidos são *Psychodopygus paraensis*, *Ps. ayrozai* e *Ps. Squamiventris* (Arias *et al.*,1985; Grimaldi *et al.*, 1991), os quais têm sido encontrados infectados, entretanto, há muitas dúvidas de qual destes é o principal vetor. A distribuição geográfica não tem sido muito estudada, mas já foram registrados isolados de humanos, do

hospedeiro reservatório e de mosquitos vetores nos Estados do Pará e Amazonas (Lainson *et al.*, 1990; Naiff *et al.*, 1991). Há também registro no Estado de Rondônia de isolados do tatu (Naiff *et al.*, 1989) e de flebotomíneos do gênero *Psychodopygus* da região (Gil *et al.*, 2003). Foi registrado um caso fora do Brasil, em um soldado francês que esteve visitando a Guiana Francesa, Martinica e Guadelupe (Darie *et al.*, 1995). Os autores sugerem que a infecção pode ter sido adquirida em qualquer um desses três lugares, sendo mais provável na Guiana Francesa.

O parasita causa lesões ulceradas, geralmente pequenas e únicas, sendo assim consideradas como infecções benignas ou ocultas na pele do homem, da mesma forma como ocorre em hamsters (Lainson *et al.*, 1994; Lainson & Shaw, 1998).

Silveira *et al.* (2002), descreveram um novo parasita denominado *Leishmania* (*V.*) *lindenbergi*, que foi isolado de soldados do 2º Batalhão de Infantaria (2º BIS) localizado em Belém, próximo a uma área de floresta primária. Um outro caso detectado foi de uma mulher adulta que morava próximo ao local. Em todos os casos, os parasitas isolados mostram ser idênticos e se diferenciaram de todas as espécies de *Leishmania* reconhecidas na Região Amazônica brasileira e de algumas outras partes da América Latina. Todos os pacientes apresentaram lesões cutâneas sugestivas de *Leishmania*. As características morfológicas mostraram uma semelhança com outros membros do subgênero *Viannia*.

Em relação ao comportamento do parasita em hamster, nenhum animal desenvolveu lesão de pele visível durante o período de 2 a 3 meses após a inoculação. Entretanto, o parasita foi isolado da cultura de pele retirada do local de inoculação, apresentando crescimento discreto a moderado. As amastigotas foram muito escassas e não foi possível detectá-las na coloração pelo

giemsa. Em relação a reação com anticorpos monoclonais, B2, B12 e N2 foram os melhores epítomos utilizados para reconhecer o parasita. Ainda não é conhecido o hospedeiro reservatório e o inseto vetor, apesar da grande suspeita de *Lutzomyia antunesi*.

## 1.11 JUSTIFICATIVA

Vários conhecimentos sobre as interações parasita-hospedeiro, respostas imunológicas, avaliação de drogas, entre outras, utilizando diferentes espécies de *Leishmania* são gerados por estudos experimentais. Assim, muitos roedores são utilizados e já demonstram ser modelos importantes em estudos com diferentes enfoques. Pois, acredita-se que estes podem imitar algumas situações semelhantes em humanos.

Além disso, a maioria dos estudos experimentais em animais abrange espécies do subgênero *Leishmania*, principalmente *L. major*. No entanto, poucos trabalhos relatam a susceptibilidade de roedores as espécies do subgênero *Viannia*. (Rey *et al.*, 1990; Travi *et al.*, 2002b; Ozório *et al.*, 2003).

O fato de ainda não ter sido identificado o reservatório natural e o vetor transmissor da espécie *L. (V.) lindenbergi* e por este apresentar grande similaridade com a espécie *L. (V.) naiffi* em relação à infecção inaparente em hamsters (Silveira *et al.*, 2002), pensou-se em avaliar a susceptibilidade de diferentes roedores, como hamsters, camundongos e *Proechimys*, à infecção por essas duas espécies, na tentativa de conhecer um modelo ideal para estudos de experimentação.

## 1.12 OBJETIVOS

### 1.12.1 Geral

Avaliar a susceptibilidade dos camundongos (*Mus musculus*) da linhagem BALB/c e Swiss, hamsters (*Mesocricetus auratus*) e *Proechimys roberti* à infecção por *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi*.

### 1.12.2 Específicos

- Observar a infectividade das amostras em 30, 60 e 90 dias após a inoculação nos animais pelo método parasitológico direto, desenvolvimento no meio de cultivo e a observação do aparecimento de lesões;
- Realizar o isolamento de parasitas em meio de cultivo *in vitro*;
- Observar a positividade da infecção pela técnica de PCR a partir dos fragmentos de tecidos obtidos do sítio de inoculação;
- Comparar o efeito de extratos de glândulas salivares extraídos de *Lutzomyia longipalpis* no inóculo das duas espécies de parasitas.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 SELEÇÃO DE CEPAS DE *LEISHMANIA*

Foi selecionada do criobanco do Laboratório de Leishmanioses da Seção de Parasitologia do Instituto Evandro Chagas-SVS, uma cepa de *L. (V.) naiffi* MHOM/BR/93/M14299, isolada da lesão de um paciente proveniente do Estado do Amazonas e uma de *L. (V.) lindenbergi* MHOM/BR/96/M15733, isolada de paciente proveniente de Belém. Estas amostras foram previamente identificadas com anticorpos monoclonais e isoenzimas.

### 2.2 SELEÇÃO DE ANIMAIS

Foram selecionados para o estudo os seguintes roedores: camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem BALB/c, camundongos da linhagem Swiss, *Proechimys roberti* e hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos e fêmeas, de três a cinco semanas de idade, obtidos de colônias do biotério central do Instituto Evandro Chagas-SVS. Estes animais foram mantidos em gaiolas apropriadas no biotério experimental do laboratório de Leishmanioses-IEC sob condições adequadas de ração e água, conforme orientação do responsável pelo biotério do IEC.

## 2.3 RECUPERAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *LEISHMANIA* E CULTIVO *IN VITRO*

As cepas de *Leishmania* foram retiradas do nitrogênio e transferidas para o meio de cultura bifásico de ágar-sangue Difco B45 (Laboratories, Detroit, Mich, USA), suplementado com sangue de coelho e antibiótico (APÊNDICE I), preparado conforme descrito por Walton *et al.* (1977). Para recuperar a virulência das cepas, formas promastigotas de *Leishmania* na fase estacionária foram retiradas diretamente da cultura e inoculadas por injeção intradérmica na face dorsal da pata traseira, esquerda e direita, de quatro hamsters jovens. Após 3 e 5 dias de inoculação, de cada dois hamsters, foram retirados fragmentos da pele do local inoculado e passados novamente para o meio de cultura.

O crescimento e a morfologia do parasita (formas promastigotas) foram observados em intervalos de 5 a 7 dias. Após atingirem a fase estacionária de crescimento, foi realizada a contagem dos parasitos para a inoculação *in vivo*.

## 2.4 CONTAGEM DE PARASITAS

As formas promastigotas foram lavadas três vezes com PSG 4:6 estéril (APÊNDICE II), submetidas à centrifugação a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C. Ao sedimento final adicionou-se proporcional volume de PSG 4:6. Uma alíquota da suspensão foi então preparada com PSG 4:6 1% formol e os parasitas foram contados nos quatro quadrantes da Câmara de Neubauer. Em seguida, calculou-se o fator de diluição para obter uma suspensão de aproximadamente  $2 \times 10^7$  parasitas/mL.

## 2.5 FLEBOTOMÍNEOS E EXTRATOS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Para a obtenção das glândulas salivares, foram utilizadas fêmeas de *Lutzomyia longipalpis* com aproximadamente 25 dias de vida, da colônia de flebotomíneos do insetário do laboratório de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas-SVS. Os flebotomíneos, inicialmente, foram submetidos a uma temperatura de 5 graus negativos durante 15 minutos para serem sacrificados e em seguida lavados com solução tamponada a fim de eliminar os pêlos e as cerdas do corpo. Posteriormente, com auxílio de uma lupa entomológica, os flebotomíneos foram dissecados e retiradas as glândulas salivares que foram armazenadas em tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL, contendo 500 µL de PSG 4:6 estéril. Estes tubos foram mantidos a – 20°C até o momento do uso em associação com *Leishmania*. Para cada espécie de *Leishmania* foi utilizado um total de cinco pares de glândulas salivares.

## 2.6 INOCULAÇÃO *IN VIVO*

Foi preparado um inóculo com uma suspensão de aproximadamente  $2 \times 10^7$  parasitas/mL de *L. (V.) naiffi* misturadas com 500 µL da suspensão de glândula salivar e outro sem a glândula salivar. Também foi preparado inóculos do mesmo modo utilizando *L. (V.) lindenbergi*. Foram utilizados um total de 12 animais de cada espécie, sendo dividido em quatro grupos de três animais: hamsters, camundongos, BALB/c, camundongos swiss e *Proechimys* para cada amostra, sendo divididos em 4 grupos: animais machos inoculados com promastigotas associadas com glândulas salivares, machos inoculados somente com promastigotas, fêmeas inoculadas com promastigotas associadas com glândulas salivares e fêmeas inoculadas somente com promastigotas.

Em cada animal foi inoculado, intradermicamente, 0,1 mL de cada inóculo preparado, em cada pata, recebendo uma carga total de  $4 \times 10^6$  promastigotas. Os animais foram observados semanalmente para a avaliação do surgimento e o desenvolvimento de lesão ou algum sinal de infecção no local da inoculação.

## 2.7 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO

Após 30, 60 e 90 dias da inoculação, os animais foram sacrificados para avaliar a infecção. Para a eutanásia, os animais foram colocados em um recipiente de alumínio contendo solução de éter e clorofórmio durante 3 minutos. O local de inoculação foi lavado com sabão e os pelos removidos utilizando-se lâminas de bisturi. Soluções de álcool a 70%, álcool iodado e éter foram utilizadas para a assepsia do local e em seguida, foram retirados pequenos fragmentos de pele do local da inoculação que foram utilizados para impregnação em lâminas e corados pelo Giemsa, para a realização do cultivo e extração de DNA para a realização do PCR.

### 2.7.1 Exame microscópico

Os fragmentos retirados da pele dos animais foram utilizadas para preparar impregnações em lâmina que foram fixadas com álcool metílico absoluto (metanol) e coradas pelo Giemsa (APÊNDICE III), diluindo-se 1 mL do corante em 15 mL de água tamponada (APÊNDICE IV). O tempo de coloração foi de 30 a 40 minutos que depois de lavadas em água corrente e seca à temperatura ambiente, foram examinadas em microscópio óptico com objetiva de 100 x em óleo de imersão para a observação das formas amastigotas.

### **2.7.2 Cultivo**

Os fragmentos de pele foram retirados e colocados em meio de cultura bifásico de ágar-sangue Difco B45 para a observação do crescimento das formas promastigotas das duas espécies de *Leishmania* estudadas. Para cada animal sacrificado foram utilizados quatro tubos de meio de cultivo. A cada semana, eram retiradas pequenas gotas da cultura e colocadas entre lâmina e lamínula, sendo posteriormente levadas ao microscópio óptico com objetiva de 40 x para a observação do crescimento das formas promastigotas.

### **2.7.3 Extração do DNA**

Os fragmentos de pele retirados do local da inoculação foram mantidos em solução NET/1%SDS a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Os fragmentos foram triturados e incubados em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Foi acrescentado RNase ( $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. A solução foi então adicionada de proteinase K ( $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubada a  $55^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O DNA foi extraído utilizando fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) submetido a centrifugação de  $3.000\ \text{x g}$  por 5 minutos e precipitado com 0,1 volume de 3M acetato de sódio e 2,5 volume de etanol absoluto gelado. As amostras foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 8 horas ou mais, e então foram centrifugadas a  $10.000\ \text{x g}$  por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e ao sedimento foi adicionado  $200\ \mu\text{L}$  de etanol a 70%. Centrifugou-se por 5 minutos a  $10.000\ \text{x g}$  e após, o etanol foi descartado e o sedimento seco foi ressuscitado em  $30\ \mu\text{L}$  ou  $50\ \mu\text{L}$  de TE (APÊNDICE V) suficiente para solubilizar o DNA, sendo mantido a  $-4^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

#### 2.7.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a realização da técnica de PCR, cada reação de amplificação foi feita em um volume final de 25  $\mu\text{L}$  contendo 2,5 U/ $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (GIBCO), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTPs, 1,5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 50 mM de KCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 8,5, com 25  $\mu\text{moles}$  dos oligonucleotídeos sintéticos (primers) por reação e 2  $\mu\text{L}$  de DNA extraído. Os “primers” utilizados foram B1 (5'- GGG-GTT-GGT-GTA-ATA-TAG-TGG- 3') e B2 (5'- CTA-ATT-GTG-CAC-GGG-GAG-G- 3'), iniciadores capazes de detectar espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Em um termociclador programado, esta reação foi incubada a uma temperatura inicial de 95°C por cinco minutos, seguindo de 35 ciclos nas seguintes temperaturas: 94°C por 1 minuto, 61,5°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Após os 35 ciclos, a etapa de extensão da molécula a 72°C foi de sete minutos.

Os produtos amplificados pela reação de PCR foram analisados pela eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% (APÊNDICE VI), utilizando-se uma alíquota de 12  $\mu\text{L}$  do produto da reação com 2  $\mu\text{L}$  de solução indicadora (APÊNDICE VII). A eletroforese foi feita em tampão TBE (APÊNDICE VIII) e processada por cerca de 1 hora a 100V. O DNA foi corado com brometo de etídio, com concentração final de 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Os fragmentos de amplificação foram visualizados em transluminador de ultravioleta (UV) para a análise. Cada amostra foi testada por três vezes.

## 2.8 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de ética em pesquisa com animais (CEPAN) do Instituto Evandro Chagas e aprovado segundo o parecer N° 0018/2004 conforme ANEXO I.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA NO SÍTIO DE INOCULAÇÃO

Os animais foram observados semanalmente, durante um período de 90 dias após a inoculação. Durante este período, nenhum animal apresentou sinal de infecção ou lesão visível em relação à infecção por *L. (V.) lindenbergi* e *L.(V.) naiffi*.

#### 3.2 OBSERVAÇÃO MICROSCÓPICA

As lâminas impregnadas com fragmentos de pele retirados do local de inoculação dos animais estudados que foram coradas pelo Giemsa, foram analisadas em microscópio óptico. Não foi possível observar formas amastigotas nos campos analisados tanto pela infecção com *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) lindenbergi* em todos os animais sacrificados durante os períodos de 30, 60 e 90 pós-inoculação.

#### 3.3 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELA CULTURA

##### 3.3.1- Infecção por *L.(V.) lindenbergi*

Em relação à infecção pela cepa de *L.(V.) lindenbergi*, M15733, inoculados com ou sem extrato de glândulas salivares, camundongos BALB/c, camundongos Swiss, *Proechimys robertii* e hamsters, todos os animais sacrificados apresentaram cultura negativa dos fragmentos de pele retirados do local da inoculação com 30, 60 e 90 dias após a inoculação intradérmica. As culturas foram analisadas durante um período de até 2 meses após a retirada dos fragmentos.



### 3.3.2 Infecção por *L.(V.) naiffi*

Todos os camundongos BALB/c machos e fêmeas inoculados com glândulas salivares e sem glândulas salivares apresentaram positividade na cultura quando sacrificados no período de 30 dias após a inoculação da cepa de *L.(V.) naiffi*, M14299.

Após 60 dias de inoculação, somente os camundongos machos inoculados com glândulas salivares e fêmeas inoculadas sem a presença de glândulas apresentaram formas promastigotas na cultura.

Após 90 dias de inoculação, ainda foi possível observar os camundongos machos inoculados com glândulas salivares e fêmeas inoculadas sem a presença de glândulas apresentarem formas promastigotas na cultura, conforme (Tabela2).

**Tabela 2:** Resultados de cultura com 30, 60 e 90 dias após inoculação de promastigotas de *L.(V.) naiffi* em camundongos BALB/c

BALB/c infectado com <i>L. (V.) naiffi</i>	30 dias	60 dias	90 dias
	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos
Machos com glândulas salivares	2/4 (50%)	2/4 (50%)	1/4 (25%)
Fêmeas com glândulas salivares	1/4 (25%)	0	0
Machos sem glândulas salivares	2/4 (50%)	0	0
Fêmeas sem glândulas salivares	2/4 (50%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)

Em relação aos camundongos da linhagem Swiss, apenas o grupo de machos inoculados com glândulas salivares apresentou formas promastigotas na cultura com 30 dias pós-inoculação. No período de 60 e 90 dias, não foi possível observar positividade em nenhum grupo deste animal. (Tabela 3)

**Tabela 3:** Resultados de cultura com 30, 60 e 90 dias após inoculação de promastigotas de *L.(V.) naiffi* em camundongos Swiss

Swiss infectado com <i>L. (V.) naiffi</i>	30 dias	60 dias	90 dias
	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos
Machos com glândulas salivares	2/4 (50%)	0	0
Fêmeas com glândulas salivares	0	0	0
Machos sem glândulas salivares	0	0	0
Fêmeas sem glândulas salivares	0	0	0

Em relação aos hamsters, somente o grupo de hamsters machos inoculados sem glândulas salivares apresentou positividade em cultura após 30 e 60 dias de inoculação com *L.(V.) naiffi*. Após 90 dias, todos os grupos foram negativos (Tabela 4).

**Tabela 4:** Resultados de cultura com 30, 60 e 90 dias após inoculação de promastigotas de *L.(V.) naiffi* em hamster

hamster infectado com <i>L. (V.) naiffi</i>	30 dias	60 dias	90 dias
	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos	Nº. de tubos positivos
Machos com glândulas salivares	0	0	0
Fêmeas com glândulas salivares	0	0	0
Machos sem glândulas salivares	2/4 (50%)	2/4 (50%)	0
Fêmeas sem glândulas salivares	0	0	0

Nenhum dos animais sacrificados de *P. roberti* apresentaram culturas positivas nos 3 períodos estudados neste trabalho.

Assim, o número total de animais infectados nos 3 períodos em relação a infecção por *L. naiiffi* está apresentado na Tabela 5, onde observa-se uma prevalência de camundongos BALB/c.

**Tabela 5:** Número total de animais infectados por *L. naiiffi* nos três períodos do estudo

Animais	30 dias	60 dias	90 dias	Total
Camundongos BALB/c	4	2	2	8
Camundongos Swiss	1	0	0	1
Hamster	1	1	0	2
<i>Proechimys roberti</i>	0	0	0	0
Total	6	3	2	<b>11</b>

Todas as culturas foram observadas periodicamente para avaliação do crescimento das formas promastigotas.

#### 3.4 AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada com fragmentos de pele retirado do sítio de inoculação dos animais estudados, foi capaz de detectar apenas algumas amostras de camundongos BALB/c do grupo de fêmeas inoculadas com *L. (V.) naiiffi* associadas a glândulas salivares, com 30 dias após inoculação. A PCR amplificou um fragmento de aproximadamente

700 pb, correspondente ao tamanho do kDNA do subgênero *Viannia*. Nenhuma amostra de fragmento de pele de animais inoculados com *L. (V.) lindenbergi* foi detectado positivamente.

## 4 DISCUSSÃO

Uma variedade de métodos intrínsecos e extrínsecos tem sido utilizada para a caracterização e identificação de *Leishmania* e dentre as características biológicas, recomenda-se a observação da infectividade ou a virulência dos clones nos roedores (WHO, 1984). Para este propósito, o hamster é geralmente o animal mais apropriado, por ser bastante sensível a muitas cepas de *Leishmania*, podendo ser inoculado de maneira intraperitoneal para as espécies causadoras da leishmaniose viscerotrópicas e inoculação intradérmica para as dermatrópicas. Em geral, esses animais são capazes de apresentar características patológicas e imunológicas notáveis quando exposto a uma variedade de espécies de *Leishmania* (Hommel *et al.*, 1995).

No entanto, em 1989, quando Lainson & Shaw descreveram a espécie *L. (V.) naiffi* e em 2002, Silveira e colaboradores descreveram *L. (V.) lindenbergi*, observaram que estes parasitas apresentavam um crescimento vasto em meio de cultivo, porém, seus comportamentos biológicos *in vivo*, mostravam-se limitados na pele de hamsters, onde configurava uma infecção inaparente.

Campos em 2003, obteve resultados *in vitro* semelhantes aos achados *in vivo* pelos autores acima citados, ao avaliar a infectividade de diferentes espécies do subgênero *Viannia* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Comparado as outras espécies, *L.(V.) naiffi* apresentou baixo número de parasitas multiplicando-se no interior de macrófagos, provando assim, ter um menor índice de infectividade em relação as outras espécies estudadas.

Na tentativa de avaliar um modelo experimental susceptível a estas espécies, realizamos inoculações na pele de hamsters, camundongos isogênicos BALB/c, camundongos Swiss e

*Proechimys* com uma concentração de  $2 \times 10^6$  de promastigotas de *L.(V.) naiffi* em cada pata traseira desses animais, no entanto todos demonstraram uma infecção inaparente. Durante o período de três meses, não foi possível observar aparecimento de lesão ou qualquer sinal de infecção no sítio de inoculação.

Este comportamento biológico também pode ser observado em outros estudos, pela inoculação intradérmica de biópsia retirada de uma lesão de paciente nas duas patas traseiras de hamsters, no qual não se observou lesão de pele visível após 2 meses de inoculação (Lainson *et al.*, 1990). Durante um período maior de observação, 8 meses após a inoculação em hamsters de material de biópsia ou de cultura utilizando *L.(V.) naiffi*, nenhum sinal de infecção foi detectado (Naiffi *et al.*, 1991).

Outra característica observada nos trabalhos com *L.(V.) naiffi* é a presença de raras ou escassas amastigotas em lâminas preparadas por impregnações de fragmentos retirados da pele de hamsters inoculados com *L. (V.) naiffi*. Lainson & Shaw (1989), relataram que a presença das formas amastigotas é tão escassa que geralmente só foram detectadas após desenvolvimento em meio de cultura. Todas as lâminas preparadas com material de pele dos quatro tipos de animais estudados, coradas pelo Giemsa, foram analisadas ao microscópio óptico, que também não foi possível observar qualquer presença de formas amastigotas. Por outro lado, lâminas preparadas com material retirado da borda de lesões de pacientes com *L. (V.) naiffi* apresentaram grande quantidade de formas amastigotas (Naiffi *et al.*, 1991; Pratlong *et al.*, 2002). Provavelmente, isso pode indicar não apenas a baixa infectividade desses parasitas, como também pelos animais serem considerados geneticamente resistentes a infecção.

Apesar da ausência de formas amastigotas nas lâminas analisadas, foi possível observar que o cultivo realizado com os fragmentos de pele retirados do local de inoculação de hamsters, camundongos BALB/c e um camundongo Swiss apresentou-se positivo em alguns tubos e esses desenvolveram muito bem na sua forma promastigota.

Em experimentos com outras espécies de *Leishmania*, o hamster é considerado um bom modelo experimental para leishmaniose cutânea causado por parasitas do subgênero *Viannia*. Rey *et al.*(1990) inocularam  $10^6$  promastigotas de *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(V.) panamensis* nas patas traseiras de hamsters. A susceptibilidade do hamster a *L. guyanensis* foi alta em relação à severidade das lesões, frequência de metástases para outros locais, invasão visceral e o número de parasitas isolados no meio de cultura Senekjie após 8 semanas de inoculação. Em relação a *L. panamensis*, a susceptibilidade foi moderada apresentando lesões com tamanhos intermediários, com grande número de parasitas detectados na cultura. Por outro lado, a susceptibilidade a *L. braziliensis* foi baixa, não havendo isolamento do parasita na cultura após 8 semanas de inoculação.

Os resultados obtidos com camundongos BALB/c na cultura dos fragmentos de pele coletados no local de inoculação foram bastante satisfatórios. Todos os animais desta linhagem independente do sexo, sacrificados com 30 dias pós-inoculação apresentaram crescimento das formas promastigotas na cultura. Com 60 e 90 dias pós-inoculação, foi possível isolar parasitas de camundongos BALB/c machos inoculados com glândulas salivares e fêmeas inoculadas sem glândulas salivares. Observamos desta forma que, os camundongos BALB/c são bem mais susceptível à *L. naiffi* quando comparados ao isolamento em meio de cultivo quando sacrificados com 30 dias após a inoculação.

Quanto as espécie *L.(V.) lindenbergi* (Silveira *et al.*, 2002), foi realizado o mesmo procedimento de *L. (V.) naiffi*. Foi inoculado intradermicamente  $2 \times 10^6$  promastigotas nas duas patas traseiras de hamsters, camundongos BALB/c, camundongos Swiss e *Proechimys roberti* com ou sem a presença de glândulas salivares. Semelhante ao observado com *L. (V.) naiffi*, os animais acompanhados durante o período de até 90 dias, não apresentaram nenhuma lesão ou sinal de infecção, assim como o exame direto de lâminas impregnadas com fragmentos de pele retirados em 30, 60 e 90 dias após a inoculação não revelou a presença de amastigotas, indicando que estas duas espécies têm baixa infectividade e não conseguem se multiplicar bem nos macrófagos dos animais estudados.

Por outro lado, diferentemente de *L. (V.) naiffi*, a cultura realizada dos fragmentos de pele retirados do local de inoculação não revelaram a presença de promastigotas de *L. (V.) lindenbergi* nos períodos de 30, 60 e 90 após a inoculação. Um fato interessante foi observado quando realizamos a recuperação da virulência das cepas de *Leishmania* estudadas. As promastigotas na fase de crescimento foram retiradas diretamente da cultura e inoculadas nas duas patas traseiras de hamsters jovens de ambos os sexos. Os animais foram sacrificados após 3 e 5 dias de inoculação e passados novamente para a o meio de cultura B45. Neste período, foi possível isolar formas promastigotas tanto de *L. (V.) naiffi* quanto de *L. (V.) lindenbergi*. Dessa forma, sugere-se que em um período curto após a inoculação (3 a 5 dias), o parasita destas duas espécies encontra-se presente na pele de hamsters, multiplicando-se e conseguem ser isolados na cultura.

Entretanto, num período acima de 30 dias após a inoculação, apenas parasitas de *L. (V.) naiffi* conseguem ser isolados de fragmentos retirados do local de inoculação, enquanto para *L. (V.) lindenbergi*, todas as culturas apresentam-se negativas. Estas evidências indicam que essas



duas espécies, apesar de muito semelhantes, têm um comportamento diferente em animais experimentais. Provavelmente, *L. (V.) lindenbergi* deve sofrer muito mais ação do sistema imune do animal e não consegue sobreviver por um período mais longo.

Em relação à infecção no roedor *Proechimys roberti* por *L. naiffi* e *L. lindenbergi*, todos os métodos de avaliação apresentaram-se negativos. Não foi possível observar qualquer sinal de infecção no local de inoculação, assim como as culturas dos fragmentos retirados da pele foram negativas e não foi possível observar formas amastigotas nas lâminas coradas. Estes resultados indicam que este animal não é um modelo susceptível as espécies de *Leishmania* estudadas e não pode ser considerado um modelo adequado para estudos de interações parasita-hospedeiro no laboratório. Esta espécie encontra-se distribuída no leste da Amazônia e na região de Cerrado no Brasil Central (Weksler *et al.*, 2001). Os roedores *Proechimys* sp, tem sido incriminados como hospedeiros naturais de espécies patogênicas de *Leishmania*, tais como *L.(V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, na América do Sul (Lainson *et al.*, 1979). Dedet *et al.* (1989), ao coletarem uma variedade de mamíferos silvestres de diversos locais do nordeste da Guiana Francesa, identificaram 89 *Proechimys* sp. As espécies *L.guyanensis* e *L. amazonensis* foram isoladas da pele intacta de dois e três *Proechimys*, respectivamente, sendo identificados como *P. cuvieri*.

Poucos estudos utilizam esses roedores em estudos de inoculação experimental. Travi *et al.*(2002a) avaliaram a susceptibilidade do *P. semispinosus* a infecção por *L. panamensis* e *L. chagasi*. Os animais inoculados nas patas traseiras com promastigotas de *L. panamensis* desenvolveram lesões nodulares não ulceradas e não foi possível recuperar o parasita de nenhum dos animais na cultura dos tecidos da pele, linfonodos, fígado e baço no período de 13 semanas

após a inoculação. *L. chagasi* não conseguiu infectar experimentalmente *P. semispinosus*, sendo considerado um modelo não susceptível a esta espécie.

Vários trabalhos têm avaliado o papel de glândulas salivares dos vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* na infecção por *L. major*, *L. (L.) amazonensis* e *L.(V.) braziliensis* em modelos animais (Titus & Ribeiro, 1988; Samuelson *et al.*, 1991; Theodos *et al.*, 1991). A saliva do vetor contém muitas moléculas com atividades farmacológicas incluindo um potente vasodilatador (Lerner *et al.*, 1991), e estudos têm demonstrado a sua capacidade de imunossuprimir a resposta imune do hospedeiro e acentuar as infecções por *Leishmania* (Titus & Ribeiro, 1990). Monteiro (2000) inoculou na pata de camundongos BALB/c dois estímulos:  $1 \times 10^6$  promastigotas de *L. major* e  $1 \times 10^6$  promastigotas associadas ao extrato de uma glândula salivar. Foi observado que os animais injetados com parasita associado ao extrato de glândulas salivares apresentaram um aumento significativo nas lesões em relação aos animais injetados somente com *L. major*.

O efeito exacerbativo das glândulas salivares de *L. longipalpis* em condições experimentais no curso da infecção de leishmaniose cutânea causada por *L. major*, também foi observado na infecção por *L. amazonensis*. Observou-se que tanto a saliva de *L. longipalpis* quanto de *P. papatasi* (vetor primário natural de *L. major* no Velho Mundo) aumentaram a infecção por *L. major* em camundongos (Theodos *et al.*, 1991). Camundongos BALB/c imunizados intradermicamente com lisados de glândulas salivares de *L. longipalpis* desenvolvem uma imunidade protetora parcial à infecção com *L. amazonensis* associado a glândulas, com baixos números de mononucleares e fagócitos no local da infecção. (Thiakaki *et al.*, 2005)

Diferentemente dos achados com *L.braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis*, as glândulas salivares de *L. longipalpis* não pareceram importantes na infecção por *L. naiffi* e *L. lindenbergi* nos roedores utilizados neste estudo, pois não foi observada qualquer exacerbação no período estudado. A razão para essa diferença no efeito das glândulas deve-se provavelmente a baixa infectividade das espécies estudadas enquanto *L.braziliensis*, *L. major* e *L. amazonensis* são espécies conhecidamente bastante infectivas e apresentam um elevado potencial patogênico ao homem, causando, por exemplo, lesões disseminadas pelo corpo ou a invasão de mucosas em humanos (Abdel-Hameed *et al.*,1990; Siveira *et al.*, 2004). Por outro lado, *L.(V.) naiffi* apresenta baixo grau patogênico para o homem, e tem sido encontrada menos frequentemente infectando o homem na Amazônia, e nos poucos casos registrados a infecção tem se manifestado em lesões cutâneas simples, de fácil resolução e sem seqüelas. Da mesma forma, isso tem sido observado com *L. lindenbergi*, onde pacientes apresentam uma a duas lesões ulceradas de fácil tratamento.

Em relação à reação em cadeia da polimerase-PCR, é uma técnica altamente sensível capaz de amplificar *in vitro* uma determinada seqüência do DNA pela ação da enzima *Taq* DNA polimerase, gerando assim, milhões de cópias do segmento específico (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Muitos estudos têm avaliado se esta técnica seria uma ferramenta útil no diagnóstico das leishmanioses. Rodrigues *et al.*(2002), avaliaram o PCR para o diagnóstico de leishmaniose cutânea em regiões de alta endemicidade em Pernambuco e compararam com os métodos convencionais de diagnóstico, como cultura, exame microscópico e histológico. O PCR realizado de material de biópsia de pacientes detectou DNA em 84/88 pacientes de casos confirmados resultando em uma sensibilidade de 95,4%, sendo significante maior do que os outros métodos utilizados.

O mesmo foi observado em biópsias de lesões retiradas de pacientes de áreas endêmicas da Venezuela, onde o PCR detectou parasitas de *Leishmania* em 97% dos casos (Rodríguez *et al.*, 1994). Entretanto, há trabalhos que conflitam com esses resultados, onde o PCR não se mostrou muito sensível ou específico em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea (de Bruijin & Barker, 1992; Mathis & Deplazes, 1995; Weigle *et al.*, 2002). Essas diferenças podem ocorrer talvez pela quantidade de amostras de DNA usadas para o PCR, ou outras dificuldades como possíveis contaminações na amostra ou na reação, assim como a presença de substâncias contidas nas amostras clínicas que poderiam inibir a reação de amplificação pela DNA polimerase (Degraeve *et al.*, 1994).

Na avaliação da técnica de PCR em nosso estudo, não utilizamos biópsia de lesões obtidas diretamente de pacientes, mas sim fragmentos de pele retirados do local de inoculação de promastigotas de *L. naiffi* e *L. lindenbergi* de hamsters, camundongos BALB/c e Swiss e *Proechimys roberti*, os quais não apresentavam lesão ou qualquer sinal de infecção. Observamos positividade em algumas amostras de camundongos BALB/c do grupo de fêmeas inoculadas com *L. (V.) naiffi* associadas a glândulas salivares, com 30 dias após inoculação. A técnica de PCR foi testada por três vezes e não obtivemos êxito em amplificar o DNA de todas as amostras que foram positivas na cultura, apresentando desta forma uma baixa sensibilidade. Uma possível explicação para os resultados seria a quantidade de parasitas no local do sítio de inoculação.

Foram retirados diferentes fragmentos do mesmo local de inoculação das patas traseiras dos animais e separados para a preparação de lâminas, cultura e PCR. Possivelmente os fragmentos retirados para o PCR não continham parasitas que não puderam ser detectados, ou a quantidade de parasitas era muito escassa a ponto de ser perdida durante a extração do DNA.

Apesar de não ser objetivo deste estudo, e também da baixa amostragem para se comparar qual o gênero foi mais predominante, observamos na cultura de fragmentos de pele no período estudado, uma positividade maior de animais machos em relação às fêmeas, mas não podemos afirmar qual foi mais susceptível. Estudos epidemiológicos indicam que as leishmanioses ocorrem mais freqüentemente em homens adultos do que mulheres (Jones *et al.*, 1987; Weigle *et al.*, 1993). Ainda não esclarecido se essa diferença esta relacionada aos riscos de exposição devido às distintas atividades de homens e mulheres ou se diferenças relacionadas ao gênero na resposta imune do hospedeiro desempenha um papel na resistência e susceptibilidade à infecção.

Estudos experimentais de modelos animais focalizando a influência do gênero na infecção por *Leishmania* são escassos. Há observações demonstrando que o gênero pode influenciar no curso da infecção com *Leishmania* spp e que tanto hormônios femininos e masculinos podem mediar a resistência e susceptibilidade à infecção (Alexander & Stimson, 1988; Roberts *et al.*, 1996; Roberts *et al.*, 2001). Alexander (1988) observou que camundongos DBA/2 machos foram mais susceptíveis a infecção por *L. mexicana* do que as fêmeas. O mesmo foi encontrado por Travi *et al.*(2002b), ao avaliar a influência do gênero em hamsters na infecção por *L.(V.) panamensis* e *L.(V.) guyanensis*.

A avaliação da evolução clínica de lesões primárias produzidas pela infecção com essas duas espécies demonstrou que machos foram significativamente mais susceptíveis que as fêmeas. Entretanto, alguns estudos demonstraram que camundongos B10/129 e DBA/2 machos foram mais resistentes do que as fêmeas a infecção por *L. major* (Giannini, 1986; Alexander, 1988). Observa-se então que ainda não se tem estabelecido o gênero mais susceptível para estudos experimentais em leishmanioses. Provavelmente, cada espécie de *Leishmania* pode ter mais

afinidade a um gênero do que o outro. Não fomos capazes de afirmar qual o gênero mais susceptível, sendo necessário outros estudos mais específicos com as espécies *L. naiffi* e *L. lindenbergi* utilizando uma amostragem maior, a fim de definir estas questões.

## 5 CONCLUSÕES

- Todas as espécies de animais utilizados no estudo, após inoculação com *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) lindenbergi*, observados durante 30, 60 e 90 dias, não foram considerados modelos altamente susceptível à infecção.
- O camundongo BALB/c foi considerado pouco mais susceptível à *L.(V.) naiffi* quando comparado ao outros animais em relação ao isolamento em meio de cultivo com 30 dias após a inoculação.
- *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) lindenbergi* demonstraram que são parasitas que apresentam uma baixa infectividade para os modelos experimentais utilizados.
- Não foi possível observar um efeito exacerbativo das glândulas salivares de *L. longipalpis* na infecção por *L. (V.) naiffi* e *L.(V.) lindenbergi* nos animais experimentais.
- Apesar de *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* serem bastante semelhantes no perfil com anticorpos monoclonais e na eletroforese de isoenzimas, estas duas espécies parecem apresentar um comportamento biológico distinto nos animais experimentais utilizados, demonstrando serem espécies diferentes.
- A técnica de PCR não apresentou alta sensibilidade na detecção do DNA de parasitas nos fragmentos de pele dos animais inoculados com *L. (V.) lindenbergi* e *L. (V.) naiffi*, quando comparado com o isolamento em cultivo *in vitro*.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-HAMEED, A.A.; AHMED, B.O.; MOHAMEDANI, A.A.; EL-HARITH, A.; VAN-EYS, G. A case of diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.84: 535-536, 1990.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v.121: 179-87, 2004.

ALEXANDER, J. Sex differences and cross-immunity in DBA/2 mice infected with *L. mexicana* and *L. major*. **Parasitology**, v.96: 297-302, 1988.

ALEXANDER, J.; STIMSON, W.H. Sex hormones and the course of parasitic infection. **Parasitology Today**, v.4: 189-193, 1988.

ARIAS, J.R.; MILES, M.A.; NAIFF, R.D.; POVOA, M.M.; FREITAS, R.A.; BIANCARDI, C.B.; CASTELLON, E.G. Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation *in vitro* and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44: p.1098-1108, 1985.

ASHFORD, R.W., DESJEUX, DERAADT, P. Estimation of population of infection and number of cases of leishmaniasis. **Parasitology Today**, v. 8: p. 104-105, 1992.

BINHAZIM, A.A.; SHIN, S.S.; CHAPMAN, W.L. JR.; OLOBO, J. Comparative susceptibility of African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*) to experimental infection with *Leishmania (Leishmania) donovani* and *Leishmania (Leishmania) infantum*. **Laboratory Animal Science**, v. 43(1): p. 37-47, 1993.

BOSQUE, F.; MOUFQIA, J.; BELKAID, Y.; COLLE, J.-H.; LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; MILON, G. Parasite-host relationships: *in situ* study of *Leishmania* spp. in resistant and susceptible mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 89(1): p. 19-22, 1995.



CAMPBELL-LEDNUM, D.; DUJARDIN, J.P.; MARTINEZ, E.; FELICIANGELI, M.D.; PEREZ, J.E.; SILANS, L.N.M.P.; DESJEUX, P. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **96(2)**: p. 159-162, 2001.

CAMPOS, M.B. Estudo da infectividade de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. **Tese de Mestrado apresentada ao Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará**. 85p, Belém-Pará, 2003.

DARIE, H., DENIAU, M., PRATLONG, F., LANOTTE, G., TALARMIN, A., MILLET, P., HOUIN, R., DEDET, J.P. Cutaneous leishmaniasis of humans due to *Leishmania (Viannia) naiffi* outside Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **89**: p. 476-477, 1995.

DE ALMEIDA, M.C.; VILHENA, V.; BARRAL; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infections: analysis of its first steps. A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **98(7)**: p.861-70, 2003.

DE BRUIJIN, M.H.L.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, v.**52 (Basel)**: p.45-58, 1992.

DEDET, J.P.; GAY, F.; CHATENAY, G. Isolation of *Leishmania* species from wild mammals in French Guiana. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.**83**: 613-15, 1989

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of Molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*- a Mini-Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.**89(3)**: p.463-69, 1994.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Statistics Quarterly**, v. **45**: p.267-275, 1992.

DIAZ, N.L.; FERNANDEZ, M.; FIGUEIRA, E.; RAMIREZ, R.; MONSALVE, I.B.; TAPIA, F.J. Nitrite oxide and cellular immunity in experimental cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. **28(3)**: p. 288-93, 2003.

DONNELLY, K.B.; LIMA H.C.; TITUS, R.G. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with *Leishmania braziliensis* in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. **Journal of Parasitology**, v.84(1): 97-103, 1998.

DUMAS, C.; MUYOMBWE, A.; ROY, G.; MATTE, C.; OUELLETTE, M.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Recombinant *Leishmania major* secreting biologically active granulocyte-macrophage colony-stimulating factor survives poorly in macrophages in vitro and delays disease development in mice. **Infection and Immunity**, v. 71(11): p. 6499-509, 2003.

FALQUETO A., SESSA P.A. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Veronesi **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1997. p.1221-1233.

FERREIRA, M.E.& GRATTAPAGLIA, D. In: **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMPRAPA-CENARGEN, p220, 1995.

FUNASA/OMS. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, 62p, 2000.

FUNASA, 2002. Vigilância e monitoramento da leishmaniose tegumentar americana em unidades territoriais- Brasil, 1994-2001. Boletim eletrônico epidemiológico, <http://www.funasa.gov.br>.

GIANNINI, M.S. Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age on promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. **The Journal of Protozoology**, v. 21(4): p. 521-527, 1974.

GIANNINI, M.S. Sex-influenced response in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis in mice. **Parasite Immunology**, v.8: 31-37, 1986.

GIL, L.H.S., BASANO, S.A., SOUZA, A.A., SILVA, M.G.S., BARATA, I., ISHIKAWA, E.A., CAMARGO, L.M.A., SHAW, J.J. Recent observations on the sand fly (Díptera: Phlebotomidae) fauna of the State of Rondônia, Western Amazônia, Brazil: the importance of *Psycodopygus davisi* as a vector of zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98(6): p. 721-755, 2003.

GITHURE, J.I.; SHATRY, A.M.; TARARA, R.; CHULAY, J.D.; SULEMAN, M.A.; CHUNGE, C.N.; ELSE, J.G. The suitability of East African primates as animal models of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80(4): p. 575-76, 1986.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. **36(1)**: p. 71-80, 2003.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R.B; McMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of Leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **41(6)**: p. 687-725, 1989.

GRIMALDI, G.Jr.; MOMEN, H.; NAIFF, R.D.; McMAHON-PRATT, D.; BARRET, T.V. Characterization and classification of leishmanial parasites from human, wild mammals and sand flies in the Amazon Region of Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **44**: p. 645-61, 1991.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the of the New World: Current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. **6 (3)**: p. 230-250, 1993.

GRIMALDI, G.Jr.; McMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **91(1)**: p. 37-42, 1996.

GUIGUEMDE, R.T.; SAWADOGO, O.S.; BORIES, C.; TRAORE, K.L.; NEZIEN, D.; NIKIEMA, L.; PRATLONG, F.; MARTY, P.; HOUIN, R.; DENIAU, M. *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **97(2)**: 168-9, 2003.

GUMY, A.; LOUIS, J.A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and it importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**, v. **34(4)**: p. 433-44, 2004.

HOMMEL, M.; JAFFE, C.L.; TRAVI, B.; MILON, G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. **89 (1)**: p. 55-73, 1995.

ILG, T. Lipophosphoglican of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. **Med. Microbiol. Immunology**, v.**190**: 13-17, 2001.

ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA, F.T.; MAGALHÃES, A.L.P.; GUERRA, R.B.; JR, M.N. MELO, GOMES, R.; SILVEIRA, T.G.V.; SHAW, J.J. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.96 (supplement 1): S1/111- S1/121, 2002.

JONES, T.C.; JOHNSON JR, W.D.; BARRETTO, A.C.; LARGO, E.; BADARO, R.; CERF, B.; REED, S.G.; NETTO, E.M.; TADA, M.S.; FRANÇA, T.F. Epidemiology of the American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. **The Journal of Infectious Disease**, v.156: 73-83, 1987.

KREUTZER, R.D.; SOURATY, N.; SEMKO, M.E. Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 36(1): p. 22-32, 1987.

LAINSON, R. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin America. **Nature**, v. 73: p. 595-599, 1978.

LAINSON, R. Epidemiologia e ecologia da leishmaniose tegumentar na Amazônia. **Hiléia Médica**, v. 3(1): p. 35-40, 1981.

LAINSON, R. Leishmaniasis. In: **Handbooks Series in Zoonoses**. Steele J.H. (ed.), CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, p.41-103, 1982.

LAINSON, R. Our present knowledge of the ecology and control of leishmaniasis in the Amazon region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18(1): p. 47-56, 1985.

LAINSON, R. *Leishmania* e Leishmaniose, com particular referência à Região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 11: p. 29 -40,1997.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South América leishmaniasis. In Wh Lumsdem & DA Evans (eds), **Biology of the Kinetoplastida**, Academic Press, London, New York, San Francisco, v2: p.1-117, 1979.

LAINSON, R.; SHAW, R. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, W. Peters & Killick- Kindrick (eds). London, Academic Press, p.1-120, 1987.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.N., a parasite of the armadillo, *Dasyurus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine Comparee**, v. **64(1)**: p. 3-9, 1989.

LAINSON, R., SHAW, J.J. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa:Kinetoplastida) in the Americans with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, v. **44**: p. 94-106, 1992.

LAINSON, R., SHAW, J.J. New World Leishmaniasis- The Neotropical *Leishmania* species. In: TOPLEY & WILSON **Microbiology and Microbial Infections**, **5**:(9<sup>o</sup> edicao), Ed. Feg. Cox, p. 241-66, 1998.

LAINSON, R.; SHAW, J.; SILVEIRA, F.T.; BRAGA, R.R.; RYAN, L.; POVOA, M.M.; ISHIKAWA, E.A.Y. A *Leishmania* e as leishmanioses. In: **Instituto Evandro Chagas; 50anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**. Belém, Fundação Serviço de Saúde Pública, v.1, p.83-124, 1986.

LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E.A.Y. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. **Annales de Parasitologie Humaine Comparee**, v. **65**: p. 282-284, 1990

LAINSON, R., SHAW, J.J., SILVEIRA, F.T., SOUZA, A.A., BRAGA, R.R., ISHIKAWA, E.A.Y. The dermal Leishmaniasis of Brazil with Special reference to the Eco-epidemiology of the disease in Amazônia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **89**: p. 435-443, 1994.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA, F.T. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **96**: p. 630-631, 2002.

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 sandfly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. **266 (17)**: p.11234-6, 1991.

LIEW, F.Y. Functional heterogeneity of CD4+T cells in leishmaniasis. **Immunology Today**, v. **10(2)**: p. 40-45, 1989.

LIEW, F.Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. **144(12)**: p. 4794-4797, 1990.

LIMA, H.C., TITUS, R.G. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania braziliensis* in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. **64(12)**: p.5442-45, 1996.

LUJAN, R.; CHAPMAN, W.L.JR; HANSON, W.L.; DENNIS, V.A. *Leishmania braziliensis* in the squirrel monkey: development of primary and satellite lesions and lack of cross-immunity with *Leishmania donovani*. **The Journal of Parasitology**, v. **76(4)**: p. 594-7, 1990.

MARFURT, J.; NASEREDDIN, A.; NIEDERWIESER, I.; JAFFE, C.L.; BECK, H.P.; FELGER, I. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. **41(7)**: p. 3147-53, 2003.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espúndia"/Escomel,1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.**80**: 859-76, 1986.

MATHIS, A.; DEPLAZES, P. PCR and *in vitro* cultivation for detection of *Leishmania* spp. in diagnostic samples from humans and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.**33**: 1145-49, 1995.

MAYRINK, W.; PINTO, J.; DA COSTA, C.; TOLEDO, V.; GUIMARAES, T.; GENARO, O.; VILELA, L. Evaluation of the Potency and stability of a candidate vaccine against American cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **61(2)**: p. 294-295, 1999.

McMAHON-PRATT, D; DAVID, J.R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, v. **291**: p. 581-583, 1981.

MELBY, P.C.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, J.E.; 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. **Journal of Immunology**, v. **166**: p.1912-20, 2001.

MILES, M.A. Identificación bioquímica de las leishmanias. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. **101(3)**: p. 217-230, 1986.

MODABBER, F. Vaccines against leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. **89(1)**: p. 83-88, 1995.

MONTEIRO, M.C. A migração leucocitária induzida por *L. major*: o efeito do extrato de glândulas salivares do vetor *Lutzomyia longipalpis*. **Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo**, 131p, Ribeirão Preto, 2000.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. **7**: p. 145-173, 1989.

MOSSALAYI, M.D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VICENDEAU; VOULDOUKIS, I. The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitology Today**, v. **15(8)**: p. 342-345, 1999.

MULLER, K.; BISCHOF, S.; SOMMER, F.; LOHOFF, M.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Differential production of macrophage inflammatory protein 1 gamma (MIP-1gamma), lymphotactin, and MIP-2 by CD4 (+) Th subsets polarized *in vitro* and *in vivo*. **Infection and Immunity**, v. **71(11)**: p. 6178-83, 2003.

NAIFF, R.D., FREITAS, R.A., NAIFF, M.F., ARIAS, J.R., BARRETT, T.V. Aspectos epidemiológicos de uma *Leishmania* de tatus (*Dasypus novemcinctus*). **Programas e Resumos do XI Congresso Brasileiro de Parasitologia**, Rio de Janeiro, p.89, 1989.

NAIFF, R.D., FREITAS, R.A., NAIFF, M.F., ARIAS, J.R., BARRETT, T.V., MOMEN, H., GRIMALDI JR., G. Epidemiological and Nosological aspects of *Leishmania naiffi* Lainson & Shaw, 1989. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. **86(3)**: p. 317-321, 1991.

NOYES, H.A.; BELLI, A.A.; MAINGON, R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for *Leishmania* identification. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. **55**: p. 98-105, 1996.

OLOBO, J.O.; GIRCHERU, M.M.; ANJILI, C.O. The African Green Monkey model for cutaneous and visceral leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. **17(12)**: p. 588-92, 2001.

OSORIO, Y.; MELBY, P.C.; PIRMEZ, C.; CHANDRASEKAR, B.; GUARIN, N.; TRAVI, B.L. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. **Parasite Immunology**, v. **25(3)**: p. 139-48, 2003.

PETERS, W. Taxonomy and phylogeny of the *Leishmania*. **Leishmania taxonomie et phylogènese. Applications éco-épidémiologiques. Colloque International. CNRS/ INSE RM. 1984, MONTEPELLIER, IMEE**, p.7-10, 1986.

PUNG, E.G.; KUHN, R.E. Experimental American leishmaniasis in the Brazilian squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): lesions, hematology, cellular, and humoral immune responses. **Journal of Medical Primatology**, v.**16(3)**: p.165-74, 1987.

REY, J.A.; TRAVI, A.Z.; VALENCIA; SARAVIA, N.G. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex *in vivo* and *in vitro*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.**43(6)**: p. 623-631, 1990.

REZAI, H.R.; BEHBEHANI, A.B.; GETTNER, S.; ARDEHALI, S. Effect of levamisole of the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.**82(3)**: p.243-9, 1988.

RICA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology research**, v.**89(3)**: p.163-9, 2003.

RITTING, M.G.; BOGDAN. *Leishmania*-Host cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v.**16(7)**: p. 292-297, 2000.

ROBERTS, C.W.; SATOSKAR, A.; ALEXANDER, J. Sex steroids, pregnancy-associated hormones and immunity to parasitic infection. **Parasitology Today**, v.**12**: 382-388, 1996.

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER, J. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical microbiology Reviews**, v.**14(3)**: 476-488, 2001.



RODRIGUES, E.H.G.; DE BRITO, M.E.F.; MENDONÇA, M.G.; WERKHAUSER, R.P.; COUTINHO, E.M.; SOUZA, W.V.; ALBURQUERQUE, M.F.P.M. *et al.* Evaluation of PCR for a diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in a area of endemicity in Northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40(10): p.3572-76, 2002.

RODRÍGUEZ, N.; GUZMAN, B.; RODAS, A.; TAKIFF, H.; BLOOM, B.R.; CONVIT, J. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32(9): p.2246-52, 1994.

SACKS, D.L.; PERKINS, P.V. Identification of an Infective Stage of *Leishmania* Promastigotes. **Science**, v.223: p.1417-19, 1984.

SACKS, D.L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPATH, G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sandfly interactions. **PNAS**, v.97(1): p.406-11, 2000.

SAMPAIO, R.N.R.; SALARO, C.P.; RESENDE, P.; DE PAULA, C.D.R. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35(6): 651-54, 2002.

SAMUELSON, J.; LERNER, E.; TESH, R.; TITUS, R. A mouse model of *Leishmania braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **Journal Experimental Medicine**, v.173: 49-54, 1991.

SANTOS, W.R.; AGUIAR, I.A.; PARAGUAI DE SOUZA, E.; DE LIMA, V.M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C.B. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with FML vaccine. **Vaccine**, v.21(32): p.4668-76, 2003.

SHAW, J.J. Taxonomy of the Genus *Leishmania*: Present and Future Trends and Their Implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89(3): p.471-478, 1994.

SHAW, J.J.; ISHIKAWA, E.A.Y.; LAINSON, R. A rapid and sensitive method for the identification of *Leishmania* with monoclonal antibodies using fluorescein-labelled avidin. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83: p.783-784, 1989.

SILVEIRA, F.T. Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da Leishmaniose Cutânea Disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Medicina do Estado de São Paulo**, 181p., São Paulo, 2001.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; SHAW, J.J.; GARCEZ, L.M.; SOUZA, A.A.; BRAGA, R.R.; ISHIKAWA, E.A. Leishmaniose cutânea experimental: II- Aspectos evolutivos da infecção no primata *Cebus apella* (Cebidae) pela *Leishmania (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.23(1): 5-12, 1990.

SILVEIRA, F.T., LAINSON, R., BRITO, A.C., OLIVEIRA, M.R.F., PAES, M.G., SOUZA, A.A.A., SILVA, B.M. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Leão, R.N.Q. **Doenças Infecciosas e parasitárias: Enfoque Amazônico. Raimundo Nonato Queiroz de Leao**. Belém: Editora CEJUP, p.619 a 630, 1997.

SILVEIRA, F.T., ISHIKAWA, E.A., SOUZA, A.A.A., LAINSON, R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* N. SP. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, v.9: p.43-50, 2002.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil-a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99(3): p.239-251, 2004.

SIMÕES-MATTOS, L.; TEIXEIRA, M.J.; COSTA, D.C.; PRATA JR.; J.R.C.; BEVILAQUA, C.M.L.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Evaluation of terbinafine treatment in *Leishmania chagasi*- infected hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Veterinary Parasitology**, v.103: 207-16, 2002.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; PINTO, C.J.; GRISARD, E.C.; MENEZES, C.L.; MURTA, S.M.; SIMPSON, A.J.; ROMANHA, A.J. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and isoenzyme analysis of *Trypanosoma rangeli* strains. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v.41(3): p.261-267, 1994.

THEODOS, C.M.; RIBEIRO, J.M.C.; TITUS, R.G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infection and Immunity**, v.59(5): 1592-98, 1991.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M.C. Salivary glands lysates from sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science**, v.239: p.1306-1308, 1988.

TITUS, R.G.; RIBEIRO, J.M.C. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitology Today**, v.6(5): p.157-60, 1990.

TRAVI, B.L.; ARTEAGA, L.T.; LEÓN, A.P.; ADLER, G.H. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97 (6): p.887-892, 2002a.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; MELBY, P.C.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAIVA, N.G. Gender in major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v.70(5): p.2288-96, 2002b.

VIEIRA, J.B., LACERDA, M.M., MARSDEN, P.D. Nacional reporting of Leishmaniasis: The Brazilian experience. **Parasitology Today**, v.6: p.339-340, 1990

VOLPONI, A.C.; PASSOS, V.M.; OLIVEIRA, G.C.; ROMANHA, A.J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90(1): p. 31-7, 2004.

WALTON, B.C, SHAW, J.J & LAISON, R. Observations on the in vitro cultivation of *Leishmania braziliensis*. **Journal of Parasitology**, v.63: p.118-119, 1977.

WEIGLE, K.A.; SANTRICH, C.; MARTINEZ, F.; VALDERRAMA, L.; SARAIVA, N.G. Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: Environmental and Behavioral risk factors for infection, clinical manifestations, and pathogenicity. **The Journal of Infectious Disease**, v. 168: 709-14, 1993.

WEIGLE, K.A.; LABRADA, L.A.; LOZANO, C.; SANTRICH, C.; BARKER, D.C. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40(2): p.601-606, 2002.

WEKSLER, M; BONVICINO, C.R.; OTAZU, I.B.; JUNIOR, J.S.S. **Journal of Mammalogy**, v.82(1): 109-22, 2001.

WHO - World Health Organization. The leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series 701**, 1984.

## APÊNDICE

### I- Meio de cultura Difco-B45

40 g Difco B45  
120 mL sangue de coelho desfribinado  
1,2 mL do antibiótico (gentamicina)  
1000 mL de água destilada

### II- Solução tampão de salina fosfatada e glicose (PSG)

3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
62,53 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
43,63 mM  $\text{NaCl}$   
55,5 mM Glicose

### III- Solução de Giemsa

3 g de Giemsa  
260 mL álcool metílico  
140 mL glicerol

### IV- Água tamponada pH7,5

3 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1000 mL água destilada

### V- TE pH 8

10 mM tris  
1 mM EDTA

### VI - Gel de agarose a 1%

1 g de agarose  
100 mL TBE

### **VII- Solução indicadora**

0,25% azul de bromofenol 0,25 g

0,25% xilenocianol 0,25 g

30 mL glicerol

100 mL H<sub>2</sub>O

### **VIII- Tampão TBE pH 8,3**

89 mM Tris-HCl,

89 mM Ácido bórico,

2mM EDTA (pH 8,0)

## ANEXO I



Protocolo CEPAN - Nº 012/2004

Parecer Nº 0018/2004

Belém/PA, 14 de dezembro de 2004.

Projeto: “Avaliação da susceptibilidade dos roedores *Mus musculus* e *Proechmyis guyanensis* à infecção pela *leishmania (Viannia) naiffi* e *leishmania (Viannia) lindebergi*”

Pesquisador Responsável: EDNA AOBA YOSSUI ISHIKAWA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.

Atenciosamente,

  
PAULO HENRIQUE GOMES DE CASTRO  
Coordenador do CEPAN/IEC