

**AYISA RODRIGUES DE OLIVEIRA**

**Avaliação do potencial de transmissibilidade de leishmaniose visceral em  
primatas-não-humanos de cativeiro da região metropolitana de  
Belo Horizonte – MG**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência  
Animal.

**Área de concentração:** Patologia Animal

**Orientador:** Prof. Dr. Renato de Lima Santos

**Co-orientador:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiane Alves da Paixão

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária da UFMG**  
**2019**

O48a Oliveira, Ayisa Rodrigues de, 1987-  
Avaliação do potencial de transmissibilidade de leishmaniose visceral em primatas-não-  
humanos de cativeiro da região metropolitana de Belo Horizonte – MG / Ayisa Rodrigues  
de Oliveira. – 2019.  
35 p. : il.

Orientador: Renato de Lima Santos

Co-orientador: Tatiane Alves da Paixão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Leishmaniose visceral – Teses. 2. Macaco – Teses. 3. Animais selvagens – Teses.  
4. Flebotomíneo – Teses. 5. Zoonoses – Teses. I. Santos, Renato de Lima. II. Paixão, Tatiane  
Alves da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

Scanned with


CDD – 599.8

## FOLHA DE APROVAÇÃO

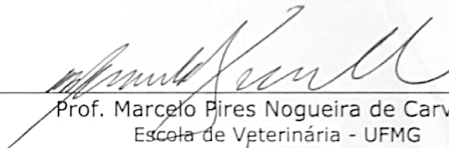
### AYISA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL .

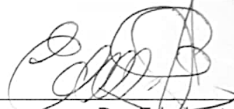
Aprovada em 30 de Janeiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Renato de Lima Santos  
Presidente - Orientador



Prof. Marcelo Pires Nogueira de Carvalho  
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Eusebio Santos Dias  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais, Rosane e José, e à minha irmã, Indira, por toda a confiança e dedicação que sempre depositaram em mim.

Agradeço ao meu marido, Moacir, por seguir comigo nessa jornada com muito companheirismo e carinho, sempre acreditando no meu potencial e me dando força a cada passo trilhado. Você e o Joey, nosso cachorro fofo, me trazem paz e tranquilidade em todos os meus períodos em Vila Velha.

Agradeço aos meus amigos, fiel trio ternura, amigos capixabas e, mais recente, os mucuras. Estar com vocês é o que faz cada obstáculo encontrado no dia-dia parecer mais leve e menos estressante...

Agradeço a Prof. Mayra e Prof. Tayse, pela confiança no meu trabalho e por me introduzirem tão bem nesse universo da patologia.

Agradeço aos professores da Patologia, por todos os ensinamentos, e às técnicas, Leimar, Natália, Valéria e Mariana, por toda a ajuda e disposição em nos socorrer quando a gente mais precisa, sempre mantendo o bom humor e nos garantindo boas gargalhadas!

Agradeço aos amigos de laboratório e departamento, é muito gratificante trabalhar com vocês...

Agradeço à equipe do zoológico de Belo Horizonte, por nos ajudar nesse estudo e em todos os outros que desenvolvemos em conjunto na instituição.

Agradeço ao Prof. Ricardo Fujiwara e sua equipe, pelo auxílio no desenvolvimento desse trabalho, sempre extremamente disponíveis!

E por fim, agradeço ao Prof. Renato e a Prof. Tatiane pela orientação, sempre muito atenciosos e disponíveis, e pelo modelo de ética e desempenho profissional. Vocês são admiráveis!

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO.....</b>	<b>07</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>08</b>
1.	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
2.	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>10</b>
	2.1 <b>Objetivos gerais.....</b>	<b>10</b>
	2.2 <b>Objetivos específicos.....</b>	<b>10</b>
3.	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>10</b>
	3.1 <b>Ordem Primata.....</b>	<b>10</b>
	3.2 <b>Leishmaniose.....</b>	<b>11</b>
	3.2.1 <b>Desenvolvimento no vetor.....</b>	<b>13</b>
	3.2.2 <b>Desenvolvimento no hospedeiro.....</b>	<b>14</b>
	3.3 <b>Leishmaniose visceral nos primatas não-humanos.....</b>	<b>16</b>
	3.4 <b>Primatas não-humanos como reservatórios da leishmaniose visceral</b>	<b>17</b>
	3.5 <b>Xenodiagnóstico.....</b>	<b>17</b>
4.	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
	4.1 <b>Animais.....</b>	<b>18</b>
	4.2 <b>Testes sorológicos.....</b>	<b>19</b>
	4.2.1 <b>Colheita de sangue.....</b>	<b>19</b>
	4.2.2 <b>ELISA anti- <i>Leishmania</i> (rKDDR e rK39).....</b>	<b>19</b>
	4.2.3 <b>Ensaio imunocromatográfico com rKDDR (fita de teste rápido).....</b>	<b>20</b>
	4.2.4 <b>ELISA anti- saliva de <i>Lu. longipalpis</i>.....</b>	<b>20</b>
	4.3 <b>Xenodiagnóstico.....</b>	<b>20</b>
	4.3.1 <b>Exposição aos flebotomíneos.....</b>	<b>20</b>
	4.3.2 <b>Extração de DNA.....</b>	<b>21</b>
	4.3.3 <b>Identificação e quantificação de <i>L. infantum</i> nos flebotomíneos.....</b>	<b>22</b>
	4.4 <b>Análise estatística.....</b>	<b>22</b>
5.	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
	5.1 <b>Animais positivos para <i>Leishmania</i> spp.....</b>	<b>22</b>
	5.2 <b>Xenodiagnóstico.....</b>	<b>23</b>
	5.3 <b>ELISA anti- saliva de <i>Lu. longipalpis</i>.....</b>	<b>24</b>
6.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>25</b>
7.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>27</b>
8.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>27</b>
9.	<b>APÊNDICE.....</b>	<b>34</b>
	Apêndice 1. Tabela com os protocolos anestésicos utilizados em cada espécie de primata não-humano do estudo durante o xenodiagnóstico.....	34

---

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 -	Espécies de primatas não-humanos mantidos em cativeiro na FPMZ-BH incluídas no estudo.	18
Tabela 2 -	Resposta sorológica dos animais positivos para leishmaniose nos três testes sorológicos realizados no estudo.	23

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 -	Distribuição mundial das espécies de primatas não-humanos e o grau de vulnerabilidade dessas espécies no seu habitat natural.	10
Figura 2 -	Distribuição mundial da leishmaniose visceral em cães e humanos causada por <i>Leishmania infantum</i> .	12
Figura 3 -	Desenvolvimento da <i>Leishmania</i> spp. no trato digestivo de flebotomíneos infectados.	14
Figura 4 -	Ciclo da <i>Leishmania</i> spp. no hospedeiro infectado.	15
Figura 5 -	Xenodiagnóstico em primatas não-humanos. FleboContainer (a e b) utilizado pra armazenar os flebotomíneos e através da área telada (b) permitir o repasto sanguíneo nos primatas do estudo.	20
Figura 6 -	Xenodiagnóstico em primatas não-humanos. Indivíduo da espécie <i>Pithecia irrorata</i> anestesiado e sendo exposto aos flebotomíneos para realização do xenodiagnóstico (a). Flebotomíneos com o abdômen ingurgitado e avermelhado após realização do repasto sanguíneo (b).	21
Figura 7 -	Transmissão de <i>Leishmania infantum</i> dos primatas não-humanos para o vetor <i>Lutzomyia longipalpis</i> . Relação de flebotomíneos positivos e negativos (n = 10) expostos aos primatas positivos para leishmaniose.	23
Figura 8 -	Análise quantitativa de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> nos <i>Lutzomyia longipalpis</i> expostos aos primatas não-humanos. Quantificação relativa de promastigotas de <i>L. infantum</i> em cada flebotomíneo positivo de acordo com a espécie de primatas positivas para leishmaniose no estudo. Os símbolos representam cada animal: símbolos abertos indicam flebotomíneos negativos e símbolos fechados representam os flebotomíneos positivos.	24
Figura 9 -	ELISA anti- saliva de <i>Lutzomyia longipalpis</i> . O.D. de cada animal avaliado agrupados de acordo com a família (a). O.D. dos animais agrupados em positivos ou negativos para leishmaniose no xenodiagnóstico (b). Os animais positivos tiveram valores de O.D. significativamente mais altos quando comparados com os animais negativos (*p = 0.0049 – Mann-Whitney). As linhas nos gráficos representam as medianas e cada ponto indicam a O.D. individual dos animais testados.	25

---

## RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose de importância mundial. No Brasil, a leishmaniose visceral é uma doença endêmica, causada pela *Leishmania infantum* (sinonímia *Leishmania chagasi*) e transmitida principalmente pelo flebotomíneo da espécie *Lutzomyia longipalpis*. Primatas não-humanos podem se infectar com *L. infantum*, porém, pouco se sabe sobre o papel dessas espécies como reservatórios. Neste estudo foi realizado xenodiagnóstico de 52 primatas não-humanos mantidos em cativeiro em Belo Horizonte, região endêmica para leishmaniose visceral. Todos os animais foram testados sorologicamente para leishmaniose e foi realizado qPCR nos flebotomíneos utilizados no xenodiagnóstico para a identificação e quantificação das promastigotas de *L. infantum*. Oito dos 52 primatas não-humanos foram positivos para *L. infantum* no xenodiagnóstico, incluindo três *Pan troglodytes*, três *Leontopithecus rosalia*, um *Sapajus apella* e um *Miopithecus talapoin*, dentre eles sete eram também sorologicamente positivos para *Leishmania* spp.. A quantidade de promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA variou de 5,67 a 1.181,93. Os animais positivos também apresentaram maior titulação de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis* quando comparados com os animais negativos, antes da realização do xenodiagnóstico. As espécies de primatas-não-humanos estudadas se mostraram capazes de infectar flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* com *L. infantum*, demonstrando um potencial como reservatório podendo atuar na manutenção deste agente em regiões endêmicas. Nossos achados também reforçam a importância dos primatas não-humanos como sentinelas de zoonoses e esse estudo tem importância direta com estratégias de saúde pública e na medicina da conservação.

**Palavras-chave:** xenodiagnóstico; leishmaniose; flebotomíneos; zoonoses; animais selvagens.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease of worldwide relevance. In Brazil, visceral leishmaniasis is endemic and caused by *Leishmania infantum* (synonym *Leishmania chagasi*) with *Lutzomyia longipalpis* being the most important invertebrate vector. Non-human primates can be infected with *L. infantum*, however, little is known about the role of these species as reservoirs. Fifty two non-human primates kept in captivity in Belo Horizonte, an endemic area for visceral leishmaniasis, were subjected to xenodiagnosis. Anti-*Leishmania* serologic tests were performed on all animals included in the study. Sand flies fed on all animals were tested by qPCR to identify and quantify *L. infantum* promastigotes. Eight of the 52 non-human primates were positive by xenodiagnosis, including three *Pan troglodytes*, three *Leontopithecus rosalia*, one *Sapajus apella*, and one *Miopithecus talapoin*, and seven of them were also positive at serology. Estimated numbers of 5.67 to 1,181.93 promastigotes/ $\mu$ g of DNA were observed. Positive animals had higher levels of IgG anti-*Lu. longipalpis* saliva when compared to negative animals, prior to xenodiagnosis. Captive non-human primates are capable of infecting *Lu. longipalpis* with *L. infantum*, been a potential reservoir and possible playing a role in the maintenance of this agent in the environment in endemic areas. Our findings also demonstrate the relevance of non-human primates as sentinels to zoonotic diseases. This study has implications for public health strategies and under a conservation medicine perspective.

**Keywords:** xenodiagnosis; leishmaniasis; sandfly; zoonosis; wild animals.

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral é uma zoonose causada por protozoário intracelular obrigatório do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida: família Trypanosomatidae) que infecta macrófagos de diversas espécies de mamíferos, incluindo o homem (WHO, 2010). Existem diferentes espécies de *Leishmania* que podem causar a leishmaniose visceral, sendo a *L. infantum* (sinônimo *L. chagasi*) a espécie com maior distribuição mundial (Lukes *et al.*, 2007). A principal forma de transmissão ocorre pela picada de fêmeas de flebotomíneos da subfamília Phlebotominae (WHO, 2010), sendo *Lutzomyia longipalpis* o vetor biológico mais relevante no Brasil (Lainson e Rangel, 2005).

Apesar da alta incidência, morbidade e mortalidade, a leishmaniose é uma das zoonoses mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente populações de países em desenvolvimento das regiões tropicais das Américas, Ásia e África, abrangendo também as regiões temperadas da América Latina (WHO, 2010). Mesmo tendo a distribuição geográfica conhecida, a leishmaniose, assim como outras doenças transmitidas por vetores, é uma doença dinâmica, cujas condições de transmissão sofrem recorrentes modificações dependentes de fatores ambientais, demográficos e associadas ao comportamento humano (Patz *et al.*, 2003; Colwell *et al.*, 2011).

O cachorro doméstico é reconhecidamente o reservatório mais importante da leishmaniose visceral em ambientes urbanos (Diniz *et al.*, 2008) e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010), os potenciais reservatórios silvestres da leishmaniose visceral no Novo Mundo são os canídeos selvagens, principalmente o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), e os gambás (*Didelphis marsupialis* e *Didelphis albiventris*). Contudo, muitas espécies de animais silvestres e sinantrópicos vem sendo investigadas como potenciais reservatórios, como algumas espécies de morcegos, felinos e primatas neotropicais (Lombardi *et al.*, 2014; Roque e Jansen, 2014).

São exigidos alguns critérios para classificar um animal como reservatório, dentre eles está a capacidade de um hospedeiro reservatório de manter na pele ou sangue periférico parasitas viáveis e em quantidades suficientes para que ocorra a transmissão para o vetor (WHO, 2010; Millán *et al.*, 2014). O xenodiagnóstico é uma ferramenta eficiente para avaliar essa capacidade de transmissão, no caso da leishmaniose, identificando se um determinado hospedeiro é capaz de transmitir *Leishmania* para o flebotomíneo, caracterizando-o como um animal com potencial de reservatório (Mol *et al.*, 2015; Sadlova *et al.*, 2015). Este risco de transmissão já foi avaliado por xenodiagnóstico em alguns potenciais reservatórios silvestres da leishmaniose, como em cachorros-do-mato (Courtenay *et al.*, 2002), coelhos selvagens (Jiménez *et al.*, 2014), lobos-guarás (Mol *et al.*, 2015) e cachorros-vinagre (Mol *et al.*, 2015). Porém, esse risco é completamente desconhecido no caso de primatas não-humanos.

Primatas não-humanos podem ser infectados por *Leishmania* apresentando sinais clínicos e achados anatomopatológicos semelhantes ao descrito em pacientes humanos, podendo, algumas vezes, serem portadores assintomáticos (Malta *et al.*, 2010; Miró *et al.*, 2018; Tinoco *et al.*, 2018). Contudo, existem poucos estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de leishmaniose em populações de primatas não-humanos de vida livre (Silveira *et al.*, 1990) e completa ausência de estudos científicos sobre o papel que esses animais tem na transmissão da leishmaniose.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Este trabalho objetivou, através da técnica de xenodiagnóstico, avaliar a competência de primatas não-humanos mantidos em cativeiro em uma região endêmica para leishmaniose visceral para transmitir *Leishmania infantum* para o mosquito-palha *Lutzomyia longipalpis*, principal vetor da leishmaniose visceral no Novo Mundo.

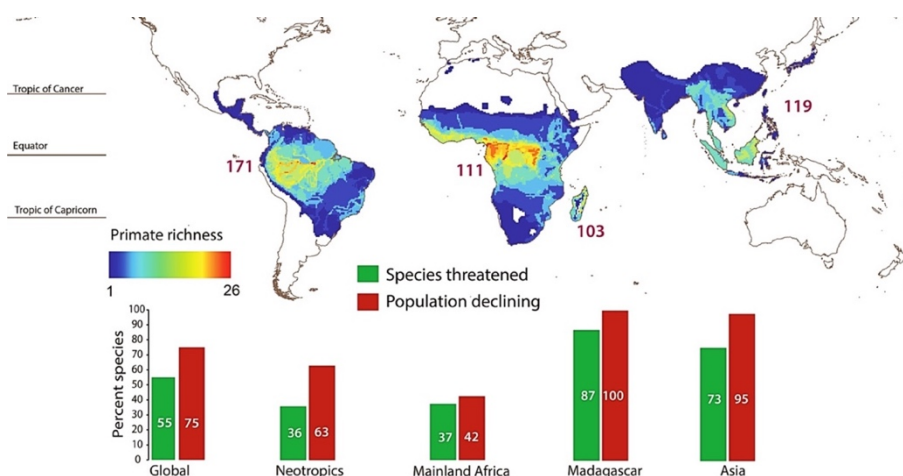
### 2.2 Objetivos específicos

- Estudo sorológico anti-*Leishmania* dos primatas não-humanos incluídos no trabalho.
- Avaliação da concordância dos três testes sorológicos utilizados para o diagnóstico de leishmaniose nos primatas não-humanos do estudo: ELISA com rKDDR, ELISA com rK39 e ensaio imunocromatográfico com rKDDR.
- Quantificação de promastigotas de *L. infantum* por flebotomíneo através de PCR em tempo real.
- Estudo sorológico anti-saliva de *Lu. longipalpis* dos primatas não-humanos incluídos no trabalho.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Ordem Primata

Todos os primatas, inclusive o homem, estão agrupados na ordem Primata, que é dividida em duas subordens: Prosimii ou prossímios (lemuriformes, lorosiformes e tarsiiiformes) e Antropoidea ou símios (catarrinos e platirrinos) (Auricchio, 1995). A diferença básica entre os dois grupos da subordem Antropoidea é que os catarrinos apresentam as narinas voltadas para baixo e focinho longo, enquanto que os platirrinos apresentam as narinas lateralizadas e focinho mais achatado, contudo também são observadas outras características físicas que distinguem esses grupos, como a calosidade isquiática nos catarrinos e a cauda preênsil nos platirrinos. A grande maioria dos indivíduos da ordem Primata estão atualmente distribuídos nas regiões tropicais ou semitropicais próximas à linha do equador (Figura 1) (Diniz, 1997; Estrada *et al.*, 2017).



**Figura 1. Distribuição mundial das espécies de primatas não-humanos e o grau de vulnerabilidade dessas espécies no seu habitat natural.** Fonte: Estrada et al., 2017.

Os catarrinos, ou primatas do Velho Mundo, estão distribuídos naturalmente pela África, Ásia e arquipélago malaio (Figura 1), e são representados por quatro famílias: Cercopithecidae (macaco rhesus, mandril e babuínos), Hylobatidae (gibões), Pongidae (orangotangos) e Hominidae (gorilas e chimpanzés) (Diniz, 1997; Nunes e Catão-Dias, 2014). São animais frugívoros de hábitos predominantemente diurnos (Nunes e Catão-Dias, 2014).

Os platirrinos, ou primatas do Novo Mundo, englobam uma grande variedade de espécies que habitam florestas tropicais da América Latina (Figura 1) e dada essa distribuição também são denominados de primatas neotropicais (Diniz, 1997; Verona e Pissinatti, 2014). Os primatas neotropicais são representados por cinco grandes famílias: Callitrichidae (micos e saguis), Cebidae (macacos-pregos e micos-de-cheiro), Aotidae (macacos-da-noite), Pitheciidae (parauacus, sauás e uacaris) e Atelidae (bugios, macacos-barrigudos, miquis e macacos-aranha), totalizando 171 espécies (Estrada *et al.*, 2017). Essas espécies apresentam comportamento predominantemente arbóreo e hábitos alimentares diversificados, com espécies que consomem frutos e folhas a espécies cuja a dieta é baseada em invertebrados e pequenos mamíferos (Verona e Pissinatti, 2014).

Ao todo a ordem Primata tem cerca de 500 espécies distribuídas naturalmente em 90 países, contudo 2/3 dessas espécies estão localizados em apenas quatro países, sendo o Brasil o único país da América Latina incluído nessa lista, juntamente com Madagascar, Indonésia e República Federativa do Congo (Estrada *et al.*, 2017). Adicionalmente cerca de 60% das espécies da ordem Primata encontram-se ameaçadas de extinção, principalmente devido a ações antrópicas não sustentáveis (Estrada *et al.*, 2017). Todos os primatas neotropicais estão incluídos no apêndice II da Convenção Internacional de Comércio e Transporte de Espécies Ameaçadas (CITES) indicando algum grau de vulnerabilidade dessas espécies (Verona e Pissinatti, 2014). Dos 18 gêneros existentes no grupo dos primatas neotropicais, 16 são encontrados no Brasil, o que representa mais de 70 espécies, sendo que pelo menos 38 são consideradas endêmicas no território brasileiro (Ryland *et al.*, 1997; Estrada *et al.*, 2017).

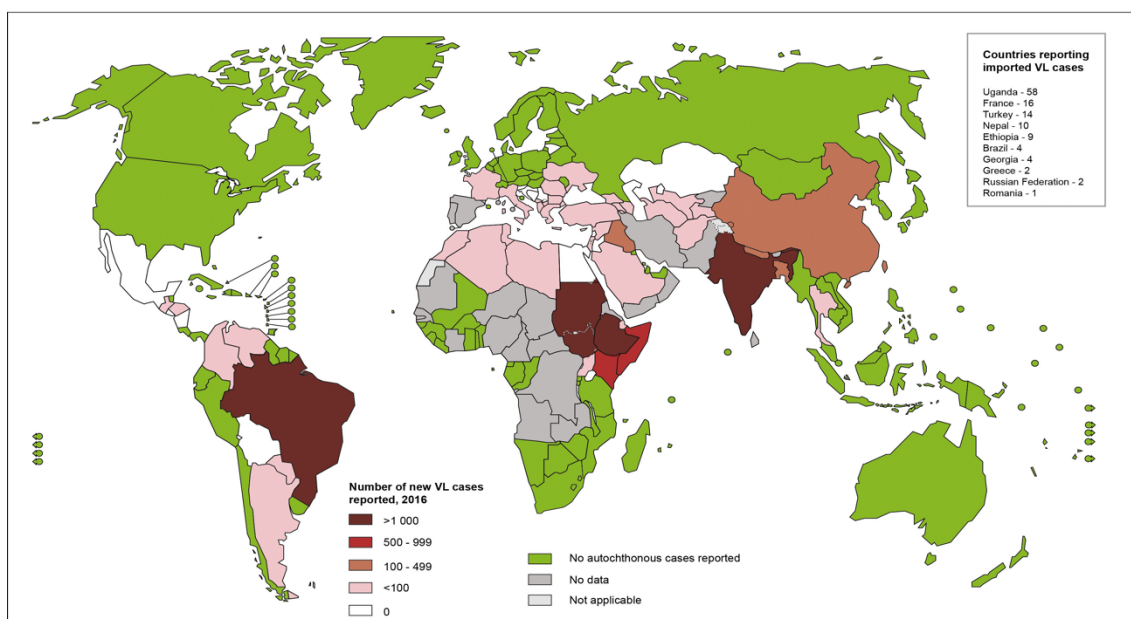
### 3.2 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença causada por protozoário intracelular obrigatório dimórfico do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida: família Tripanosomatidae), que parasita macrófagos de inúmeras espécies de mamíferos, incluindo o homem. A transmissão ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lane, 1993; WHO, 2010; Baneth e Solano-Gallego, 2012), contudo também há evidências de transmissão vertical e sexual de *L. infantum* em cães (Turchetti *et al.*, 2014). De acordo com a manifestação clínica em humanos a leishmaniose pode ser classificada como tegumentar, muco-cutânea e visceral.

Existem diferentes espécies de *Leishmania* que podem causar a leishmaniose e suas diversas manifestações clínicas. A *L. infantum* é a que tem maior distribuição mundial (Figura 2) (Lukes *et al.*, 2007), principalmente nos cães domésticos, que são considerados o reservatório zoonótico

mais importante da leishmaniose visceral (Diniz *et al.*, 2008). A *L. infantum* pertence ao complexo *donovani*, juntamente com a *L. donovani*, agente responsável pela maioria dos casos fatais de leishmaniose visceral em humanos no leste da África, Bangladesh, Índia e Nepal, com o humano como principal fonte de infecção (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Existem ainda dois outros grandes complexos, que em humanos estão associados à manifestação tegumentar e mucocutânea da doença: o complexo *mexicana*, onde as principais espécies são a *L. mexicana*, a *L. amazonensis* e a *L. pifanoi*; e o complexo *brasiliensis* com destaque para as espécies *L. brasiliensis* e *L. peruviana* (WHO, 2010).

Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide, 2016



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2018. All rights reserved

Data Source: World Health Organization  
Map Production: Control of Neglected  
Tropical Diseases (NTD)  
World Health Organization



**Figura 2. Distribuição mundial da leishmaniose visceral em cães e humanos causada por *Leishmania infantum*.** Fonte: WHO (<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>).

Apesar de ser uma zoonose com alta taxa de incidência, morbidade e letalidade, é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente populações carentes de países em desenvolvimento das zonas intertropicais da América e da África, se estendendo para regiões temperadas da América Latina (WHO, 2010). Assim como outras doenças transmitidas por vetores a leishmaniose é extremamente influenciada pela dinâmica de vetores, reservatórios e hospedeiros (Patz *et al.*, 2003). Há evidências de que a propagação da leishmaniose acompanha o movimento dos flebotomíneos de áreas povoadas pelos vetores para regiões antes livres. Esse movimento dos vetores está diretamente interligado às mudanças ambientais e climáticas (Colwell *et al.*, 2011), o que faz da leishmaniose uma doença de caráter dinâmico

### 3.2.1 Desenvolvimento no vetor

Os flebotomíneos, também chamados de mosquito-palha, são insetos dípteros pertencentes à família Psychodidae e cerca de 10% das espécies desse grupo atuam como vetores da leishmaniose (Lane, 1993; Bates, 2007). Neste grupo apenas as fêmeas se alimentam de sangue (Lane, 1993) e é no momento do repasto sanguíneo que o flebotomíneo se infecta ou transmite a *Leishmania* spp. para o hospedeiro. Ao se alimentar do sangue de um hospedeiro infectado o flebotomíneo ingere fagócitos parasitados pela forma amastigota da *Leishmania*, presentes usualmente na pele do hospedeiro. O desenvolvimento do parasita dentro do vetor é desencadeado pelas mudanças de condições ambientais enfrentadas ao se deslocar do hospedeiro para o intestino do flebotomíneo, como queda de temperatura e aumento do pH (Bates e Rogers, 2004).

Resumidamente e tomando como base o subgênero *Leishmania*, cujo ciclo de desenvolvimento dentro do vetor está melhor caracterizado, inicialmente, as amastigotas se transformam em uma forma flagelada com baixa motilidade, chamadas de promastigotas pró-cíclicas, que se multiplicam intensamente no sangue ingerido. Depois de alguns dias as promastigotas pró-cíclicas reduzem a capacidade de replicação e se diferenciam em uma forma mais alongada e com intensa motilidade, chamadas de promastigotas nectomonades (Bates, 2007). Essas formas vão migrar e se acumular na porção anterior do intestino médio por vezes aderindo às microvilosidades intestinais até chegar ao cardia (junção de transição do intestino médio para o intestino anterior), onde se transformarão em promastigotas leptomonades, que são formas pequenas que retomam a replicação (Gossage *et al.*, 2003; Bates, 2007). Essas formas são responsáveis por secretar um gel (“*Promastigote secretory gel*” – PSG) que, juntamente com as formas que se diferenciam em promastigotas metacíclicas (forma infectante), vão constituir um tampão obstruindo o intestino anterior, auxiliando na transmissão da *Leishmania* (Rogers *et al.*, 2002; Bates, 2007). Algumas promastigotas leptomonades aderem à superfície intestinal e se diferenciam em promastigotas haptomonades (Bates, 2007). A Figura 3 esquematiza o desenvolvimento das promastigotas ao longo do trato digestivo do vetor.

O mecanismo pelo qual as promastigotas metacíclicas são transmitidas para o hospedeiro através do vetor ainda não é bem esclarecida, contudo, a teoria mais aceita é que o tampão formado pelo PSG rico em promastigotas metacíclicas, ao obstruir o intestino anterior, leva a regurgitação do sangue recém ingerido junto com as formas infectantes presentes no tampão, transmitindo o parasita para o hospedeiro pelo contato direto com a pele lesionada (Rogers *et al.*, 2002; Kaye e Scott, 2011).

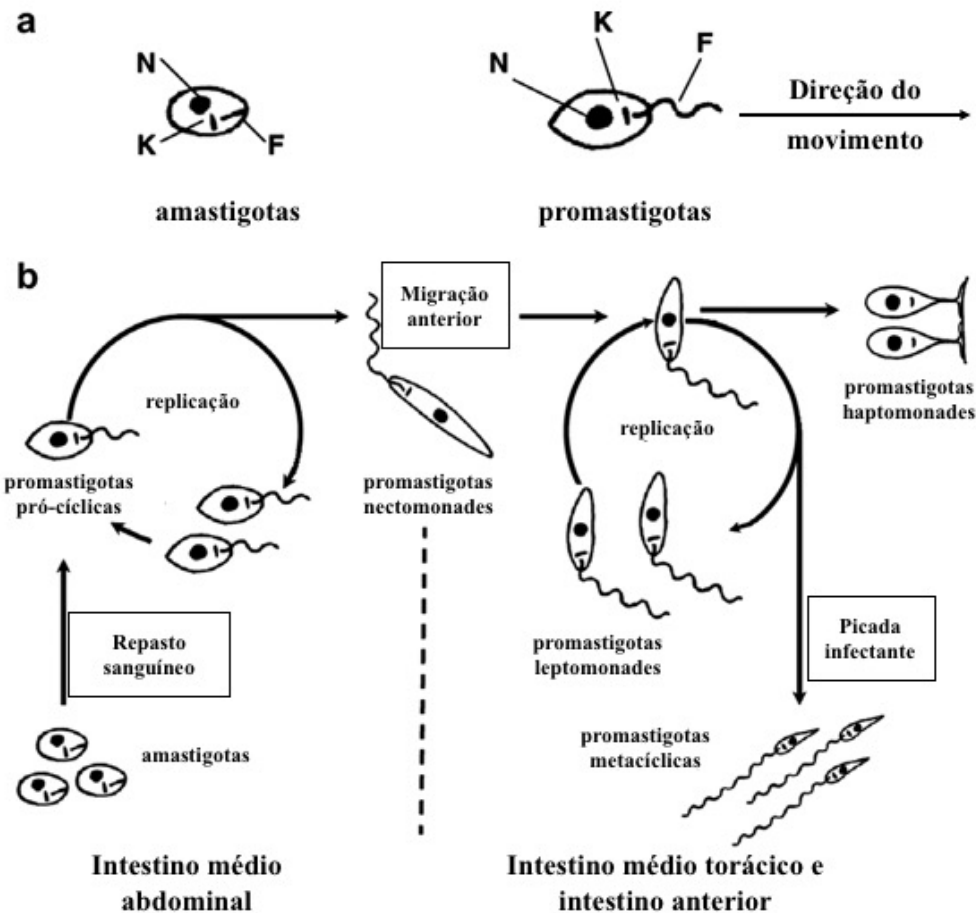
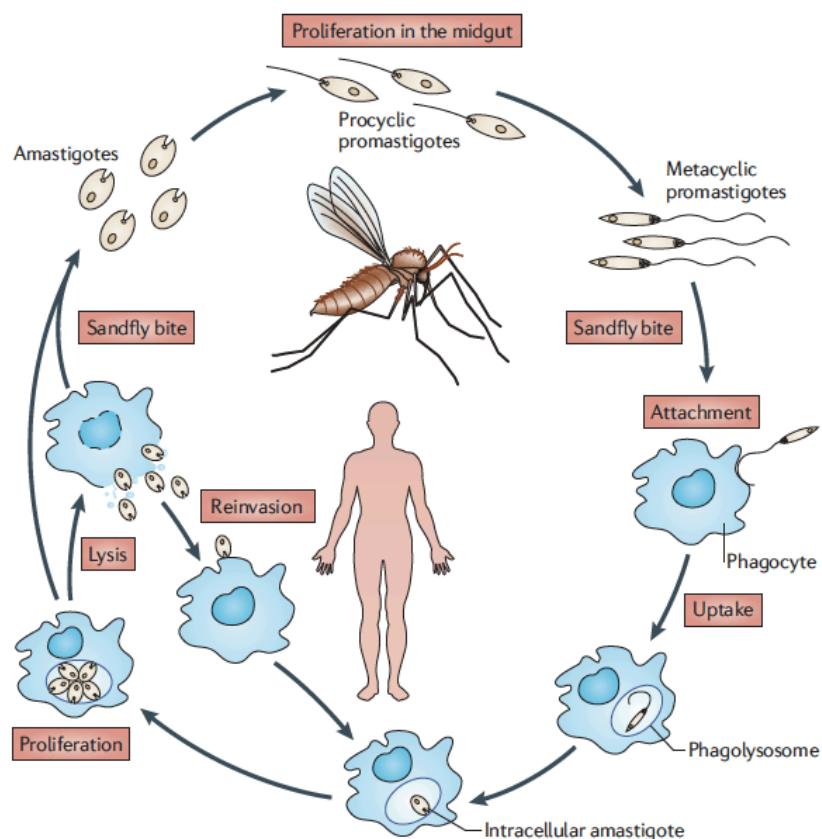


Figura 3. Desenvolvimento da *Leishmania* spp. no trato digestivo de flebotomíneos infectados. Fonte: Bates, 2007 (adaptado).

### 3.2.2 Desenvolvimento no hospedeiro

Após a regurgitação das promastigotas metacíclicas pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, há o contato da forma infectante com o tecido do hospedeiro e essas formas são fagocitadas pelas células fagocíticas presentes no local (Kaye e Scott, 2011). Anteriormente acreditava-se que apenas os macrófagos eram parasitados pela *Leishmania* spp., porém atualmente há estudos que evidenciam o parasitismo de diversos tipos celulares, inclusive células precursoras mielóides e até fibroblastos (Kaye e Scott, 2011). Outra célula fagocítica que vem ganhando importância na etapa inicial de infecção do hospedeiro é o neutrófilo. Acredita-se que estas sejam as primeiras células a entrarem em contato com as promastigotas metacíclicas e que atuem como “cavalos de tróia” ao serem parasitadas e posteriormente fagocitadas por macrófagos (Laskay *et al.*, 2003).

Ao serem fagocitadas as promastigotas metacíclicas se estabelecem nos fagolisossomos e se transformam em amastigotas (forma aflagelada). As amastigotas dão início a replicação dentro da célula hospedeira até que ocorra o rompimento dessa célula e, através da fagocitose, novas células sejam infectadas (Figura 4) (Kaye e Scott, 2011). Durante esse processo as células parasitadas se espalham para diversos tecidos do hospedeiro, com tropismo diferenciado de acordo com a espécie da *Leishmania* e com o hospedeiro infectado. O ciclo é completado quando um fagócito infectado é ingerido por outro flebotomíneo durante novo repasto sanguíneo.



**Figura 4. Ciclo da *Leishmania* sp. no hospedeiro infectado.** Fonte: Kaye e Scott, 2011.

Ao serem fagocitadas, as amastigotas, por meio da produção de alguns componentes como lipofosfoglicanos, inibem a maturação dos fagossomos e começam a se multiplicar, escapando dos mecanismos de defesa do hospedeiro e se disseminando, inicialmente, para os órgãos hemolinfáticos, como linfonodos, baço e medula óssea (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Nesse período os macrófagos parasitados processam os antígenos parasitários e os apresentam para o sistema imunológico e dependendo da resposta celular o curso da infecção pode evoluir para doença sintomática ou assintomática (Freitas e Santos, 2006).

Nos casos sintomáticos há produção deficiente de  $\text{INF-}\gamma$  resultando em macrófagos repletos de amastigotas. A resposta imunológica nesses casos é típica de Th2 com grande produção de IL-4, IL-3, IL-5, IL-10 e  $\text{TGF-}\beta$ , intenso estímulo de linfócitos B e superprodução de anticorpos anti-*Leishmania* (Freitas e Santos, 2006). Nos casos assintomáticos a produção de  $\text{INF-}\gamma$  pelos

linfócitos é suficiente para ativar os macrófagos que vão produzir radicais livres e óxido nítrico destruindo os parasitas e debelando a infecção. Nesses casos a resposta imunológica celular é do tipo Th1 com grande produção de IL-2 e INF- $\gamma$  (Freitas e Santos, 2006). Contudo, mesmo nos casos assintomáticos e casos de cura clínica não há completa eliminação do parasita, há o estabelecimento de uma relação de equilíbrio do parasita com o hospedeiro, com possibilidade de reativação da infecção em momentos de imunossupressão.

### 3.3 Leishmaniose visceral em primatas não-humanos

Existe uma variedade de estudos utilizando primatas não-humanos como modelos experimentais de leishmaniose visceral, incluindo espécies de primatas do Velho Mundo (Anuradha *et al.*, 1992; Porrozzi *et al.*, 2006; Grimaldi Jr *et al.*, 2014) e neotropicais (Dennis *et al.*, 1985; Madindou *et al.*, 1985; Broderson *et al.*, 1986; Carneiro *et al.*, 2011; Carneiro *et al.*, 2012). Nesses estudos dependendo da dose infectante, via de inoculação, espécie da *Leishmania* (*L. infantum* ou *L. donovani*) ou espécie de primatas utilizados, a infecção varia de manifestações brandas, como perda de peso e anemia leves até ao desenvolvimento de lesões típicas, como caquexia, linfadenomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia, em alguns casos com evolução para o óbito. Em cães a susceptibilidade ou resistência ao desenvolvimento da leishmaniose aparentemente tem base genética (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Em humanos o desenvolvimento da forma clínica da leishmaniose está associado principalmente ao estado imunológico do hospedeiro, com doença sintomática ocorrendo principalmente em crianças e idosos, em regiões de baixo índice de desenvolvimento humano e em pacientes co-infectados com HIV (WHO, 2010).

Carneiro *et al.* (2012) sugerem que algumas espécies de primatas neotropicais podem ser mais resistentes ao desenvolvimento da infecção por leishmaniose, não sendo recomendadas como modelos experimentais para a leishmaniose humana. Sustentando essa hipótese, em todos os estudos de prevalência de leishmaniose em primatas neotropicais naturalmente infectados, tanto de animais de vida livre quanto de cativeiro, todos os animais positivos eram assintomáticos (Malta *et al.*, 2010; Lombardi *et al.*, 2014; Paiz *et al.*, 2018; Trueb *et al.*, 2018). Contudo, mesmo aparentemente resistentes, há um relato de infecção natural por *L. infantum* com evolução para óbito em um *Callicebus nigrifrons* cativo do zoológico de Belo Horizonte (Malta *et al.*, 2010), região endêmica para leishmaniose visceral. Na necropsia deste animal foi observada emaciação marcante, edema pulmonar severo, esplenomegalia e linfadenomegalia moderada. Na histologia praticamente todos os órgãos examinados apresentavam macrófagos contendo amastigotas intracitoplasmáticas.

Nessa mesma instituição há um relato recente de um gorila jovem que apresentou um quadro de leishmaniose visceral clínica por *L. infantum* com alopecia, perda de peso progressiva, letargia, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenomegalia (Tinoco *et al.*, 2018). O diagnóstico foi realizado por visualização de amastigotas na punção de linfonodo e confirmado por PCR de sangue total. O animal foi tratado com anfotericina-B e teve completa recuperação. Outros dois casos sintomáticos de leishmaniose visceral por *L. infantum* em primatas do Velho Mundo ocorreram em dois orangotangos cativos de um zoológico de Madrid na Espanha (Miró *et al.*, 2018), região também endêmica para leishmaniose visceral. Neste caso ambos os animais apresentaram apatia, perda de peso progressiva, hepatomegalia e esplenomegalia. O diagnóstico foi realizado por visualização das amastigotas em punção de medula óssea e confirmado por PCR de sangue total e sorologia. Ambos os animais foram tratados e se recuperaram da doença clínica.

### 3.4 Primatas não-humanos como reservatórios da leishmaniose visceral

De acordo com a OMS para classificar um animal como reservatório são necessários alguns critérios (WHO, 2010), tais como: (a) a população e o tempo de vida desses reservatórios devem ser suficientes para que haja fornecimento alimentar constante para os vetores; (b) contato frequente entre o hospedeiro reservatório e o vetor, para que ocorram várias oportunidades de transmissão; (c) a proporção dos indivíduos infectados da população do hospedeiro reservatório deve ser superior a 20%, podendo haver variações de acordo com a sazonalidade; (d) o curso da infecção no hospedeiro reservatório deve ser longo e não-patogênico o suficiente para possibilitar a sobrevivência do parasita em períodos onde há redução da população de vetores; (e) e os parasitas devem estar disponíveis na pele e sangue dos hospedeiros reservatórios em concentrações suficiente para serem transmitidas aos vetores.

O canídeo doméstico é considerado o principal reservatório urbano da leishmaniose visceral (Diniz *et al.*, 2008; WHO, 2010). Os principais reservatórios selvagens de *L. infantum* nos países do Novo Mundo são os canídeos, principalmente o cachorro-do-mato, e gambás (WHO, 2010). Porém, outras espécies de mamíferos selvagens e sinantrópicos já foram identificadas como potenciais reservatórios, como algumas espécies de morcegos, felinos e primatas neotropicais (Roque e Jansen, 2014). A capacidade deste parasita em infectar novos hospedeiros e estabelecer novos reservatórios, associado às modificações ambientais antrópicas, como o desmatamento e fragmentação de habitat, permitem que a leishmaniose esteja cada vez mais presente e próxima das habitações humanas (Passos *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 2015).

A relevância de espécies silvestres no ciclo da leishmaniose ainda é pouco estabelecida (Lombardi *et al.*, 2014). Como foi observado anteriormente, os primatas não-humanos infectados podem permanecer assintomáticos, assim como ocorre em animais domésticos e em humanos (Marcondes *et al.*, 2006; Diniz *et al.*, 2008; WHO, 2010) podendo ter um papel na manutenção da *Leishmania* em regiões endêmicas, contudo, são necessários maiores estudos para avaliar a competência de transmissão de cada uma dessas espécies, para considera-las de fato como um potencial reservatório (Roque e Jansen, 2014).

### 3.5 Xenodiagnóstico

O xenodiagnóstico (do grego *xenos* = estrangeiro; *diagnosi* = diagnóstico) é uma ferramenta de diagnóstico indireto que utiliza a análise do vetor de um determinado parasita para identificar a doença no seu respectivo hospedeiro. Essa técnica foi desenvolvida por Brumpt em 1914, que identificou *Trypanosoma brazili* de cobras d'água (*Helicops modestus*) através do desenvolvimento do parasita em sanguessugas. Inicialmente essa técnica tinha como foco a detecção de *Trypanosoma cruzi* nos pacientes humanos cuja carga parasitária era muito baixa para um diagnóstico microscópico direto e ao utilizar o vetor, após um determinado tempo, a carga parasitária se multiplicava a ponto de possibilitar o diagnóstico (Schenone, 1999; Meiser e Schaub, 2011).

Por muitos anos o xenodiagnóstico foi a técnica considerada como padrão ouro para o diagnóstico de doenças associadas a vetores, como doença de Chagas e bartoneloses, contudo foi caindo em desuso com o desenvolvimento de outras técnicas mais sofisticadas como sorologia e diagnóstico molecular, sendo mantido como ferramenta de diagnóstico apenas em regiões carentes, cujo o acesso a laboratórios sofisticados é dificultado (Meiser e Schaub, 2011). Atualmente é uma

técnica utilizada principalmente na pesquisa de interações entre parasita-vetor-hospedeiro, abrangendo para o estudo de diversas doenças associadas a vetores, como arboviroses (Mourya *et al.*, 2007), doença de Lyme (Marques *et al.*, 2014) e leishmanioses (Magalhães-Junior *et al.*, 2016). O xenodiagnóstico é a única técnica capaz de averiguar a capacidade de um hospedeiro de infectar um vetor (Sadlova *et al.*, 2015).

No estudo de leishmanioses o xenodiagnóstico vem sendo amplamente utilizado na investigação de novos vetores e reservatórios. Já existem estudos avaliando a competência de potenciais reservatórios domésticos, como o gato doméstico (Silva *et al.*, 2010), e de potenciais reservatórios silvestres, como canídeos selvagens (Courtney *et al.*, 2002; Mol *et al.*, 2015), roedores (Travi *et al.*, 2002), marsupiais (Sherlock, 1996) e lagomorfos (Jiménez *et al.*, 2014). Em humanos essa competência também vem sendo investigada através do xenodiagnóstico, inclusive associando a co-infecção com agentes imunossupressores, como o HIV (Molina e Alvar, 1996; Ferreira *et al.*, 2018), contudo, em primatas não-humanos essa competência ainda não foi investigada, havendo apenas registros de que esses animais apresentam a infecção.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

O delineamento experimental empregado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) sob o protocolo número 94/2013. Para o estudo foram utilizados 52 primatas não-humanos mantidos em cativeiro na Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte (FPMZ-BH), totalizando 13 espécies, onze de primatas neotropicais e duas espécies de primatas do Velho Mundo (Tabela 1).

**Tabela 1. Espécies de primatas não-humanos mantidos em cativeiro na FPMZ-BH incluídas no estudo.**

Primatas Neotropicais			
Família	Nome científico	N	Identificação
Atelidae	<i>Alouatta caraya</i>	04	01 – 04
	<i>Alouatta guariba</i>	02	05 – 06
	<i>Lagothrix cana</i>	07	07 – 13
Aotidae	<i>Aotus nigriceps</i>	02	14 – 15
Callitrichidae	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	01	16
	<i>Leontopithecus rosalia</i>	15	17 – 31
	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	02	32 – 33
	<i>Saguinus imperator</i>	04	34 – 37
Cebidae	<i>Sapajus apella</i>	06	38 – 43

Pitheciidae	<i>Callicebus nigrifrons</i>	01	44
	<i>Pithecia irrorata</i>	03	45 – 47

#### Primatas do Velho Mundo

Família	Nome científico	N	Identificação
Cercopithecidae	<i>Miopithecus talapoin</i>	02	48 – 49
Hominidae	<i>Pan troglodytes</i>	03	50 – 52

## 4.2 Testes sorológicos

### 4.2.1 Colheita de sangue

Para a colheita de sangue e xenodiagnóstico os animais foram anestesiados com protocolos anestésicos variados de acordo com a espécie (Apêndice 1). As amostras de sangue dos 52 primatas não-humanos participantes do estudo foram colhidas imediatamente antes da exposição aos flebotomíneos no xenodiagnóstico através da veia femoral, respeitando o volume máximo de 1% do peso vivo do animal. Em seguida foram armazenadas em tubos estéreis sem anti-coagulante e posteriormente centrifugadas a 2.500 x g por 5 minutos a 4°C para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

### 4.2.2 ELISA anti-*Leishmania* (rKDDR e rK39)

As reações de ELISA foram realizadas em microplacas de polietileno (Costar, Cornig, USA) de 96 poços e fundo plano. Os poços foram sensibilizados com antígeno rKDDR (Safetest® Diagnósticos, Brazil) ou rK39 diluídos em tampão carbonato (carbonato de sódio 15 mM e bicarbonato de sódio 34 mM pH 9,6) por 24 horas a 4°C. Após a sensibilização os poços foram bloqueados com solução de PBS-BSA a 2% (pH 7,4) por 2 horas a temperatura ambiente. Após bloqueio, toda a solução dos poços foi removida. Em seguida, os soros foram diluídos em 1:100 de solução de 0,05% PBS-Tween 20, adicionados aos poços e incubados por 12 horas a 4°C. Os poços foram lavados por cinco vezes com PBS-Tween 20 0,05%. Em seguida anticorpo anti-IgG humano diluído em 1:2500 de solução de 0,05% PBS-Tween 20 foi adicionado a cada poço e incubado por 1,5 horas a 37°C. Os poços foram novamente lavados com 0,05% PBS-Tween 20 por cinco vezes e finalmente incubados ao abrigo de luz com solução reveladora, contendo 0,05% de *o*-phenylenediamina (OPD) e 0,1% de peróxido de hidrogênio diluídos em tampão de citrato (ácido cítrico 0,1 M e fosfato de sódio bifásico 0,2 M).

Após 10 minutos a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico e as densidades ópticas (O.D.) foram mensuradas em um leitor de microplacas de ELISA (BioRad 550, Brazil) a 490 nm. Para o controle negativo e positivo foram utilizadas amostras de soro humanas do banco de soros do Laboratório de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para cada placa, o ponto de corte (*cut off*) foi estabelecido a partir da média das leituras de absorbância de oito soros negativos, mais duas vezes o desvio padrão, sendo considerados positivos todos os soros que apresentaram valores de absorbância superiores ao *cut off*.

#### 4.2.3 Ensaio imunocromatográfico com rKDDR (fita de teste rápido)

O ensaio imunocromatográfico com rKDDR (Safetest® Diagnósticos, Brazil) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, foi adicionada 20 µL de cada amostra de soro diretamente à fita de teste seguido de uma gota, equivalente a 40 µL, de tampão PBS. O resultado foi observado após 10 a 20 minutos de incubação em temperatura ambiente com o aparecimento de duas tarjas vermelhas nos animais positivos e apenas uma tarja vermelha nos animais negativos.

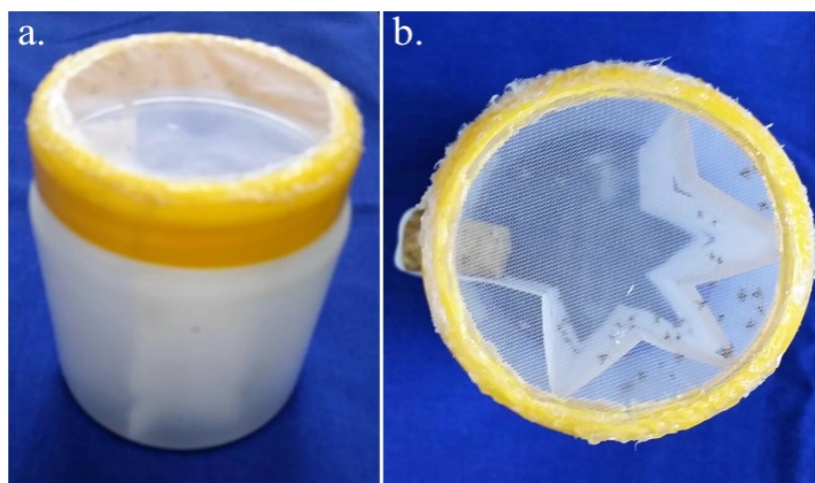
#### 4.2.4 ELISA anti- saliva de *Lu. longipalpis*

Pares de glândulas salivares de *Lu. longipalpis* fêmeas criadas no Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (LFIH/ICB-UFMG) foram dissecadas e armazenadas em PBS a -80°C. Imediatamente antes do uso, as glândulas salivares dissecadas foram rompidas por ultrasonicação em tubos cônicos de 1,5 mL e centrifugadas em 15.680 x g por 2 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e diluído em tampão carbonato (carbonato de sódio 15 mM e bicarbonato de sódio 34 mM pH 9,6) na concentração de 2,5 pares de glândulas salivares/mL. O ELISA foi realizado de acordo com Quinnell *et al.* (2018) com pequenas modificações. Para controle positivo foi utilizada amostra de soro de um dos chimpanzés do estudo (animal 50) colhida três meses após o xenodiagnóstico e como controle negativo foram utilizados poços sem a adição do antígeno (saliva).

### 4.3 Xenodiagnóstico

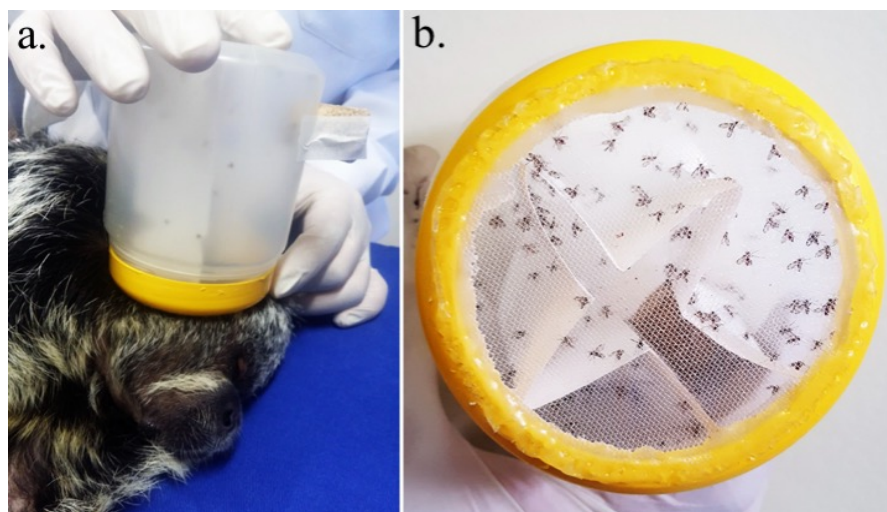
#### 4.3.1 Exposição aos flebotomíneos

Para o xenodiagnóstico de cada animal foram utilizadas 50 fêmeas não-infectadas de flebotomíneos da espécie *Lu. longipalpis* criadas em condições controladas no LFIH/ICB-UFMG. Os flebotomíneos eram colocados em um frasco vedado com a boca telada – *FleboContainer* (Figura 5) (Costa-Val *et al.*, 2007; Mol *et al.*, 2015).



**Figura 5. Xenodiagnóstico em primatas não-humanos.** *FleboContainer* (a e b) utilizado pra armazenar os flebotomíneos e através da área telada (b) permitir o repasto sanguíneo nos primatas do estudo.

Durante a anestesia os animais foram expostos aos mosquitos pelo contato direto da área telada do frasco com a orelha do animal durante 30 minutos (Figura 6), como descrito anteriormente por Mol *et al.* (2015). O repasto sanguíneo foi considerado suficiente quando visualmente era observado que mais de 70% dos flebotomíneos tinham se alimentado.



**Figura 6. Xenodiagnóstico em primatas não-humanos.** Indivíduo da espécie *Pithecia irrorata* anestesiado e sendo exposto aos flebotomíneos para realização do xenodiagnóstico (a). Flebotomíneos com o abdômen ingurgitado e avermelhado após realização do repasto sanguíneo (b).

Posteriormente, os flebotomíneos foram alimentados com sacarose a 50% e mantidos em ambiente com temperatura de 28°C por cinco dias. No quinto dia após o repasto os mosquitos foram eutanasiados por congelamento, separados em microtubos individuais e armazenados a -80°C para análises futuras.

#### 4.3.2 Extração de DNA

Dez flebotomíneos fêmeas de cada animal que visualmente fizeram repasto sanguíneo foram selecionadas aleatoriamente e maceradas individualmente em microtubos de 1,5 mL. Em seguida foram homogeneizadas em 50 µL de tampão de lise (cloridrato de sódio 0,08 M, sacarose 0,16 M, EDTA 0,06 M, SDS 0,5%, Tris-Cl 0,1 M, pH 8,6) e incubadas por 30 minutos a 65°C. Posteriormente foi adicionado ao homogeneizado 7,1 µL de acetato de potássio a 8 M para concentração final de 1 M. A amostra foi homogeneizada no vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Após incubação a amostra foi centrifugada a 26.500 x g por 10 minutos e o sobrenadante transferido para outro microtubo de 1,5 mL. Em seguida foi adicionado 100 µL de etanol a 95% e a mistura foi centrifugada a 26.500 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado 100 µL de etanol 70% para lavagem do *pellet* de DNA. A mistura foi novamente centrifugada a 26.500 x g por 10 minutos, o sobrenadante descartado e os tubos foram secados a temperatura ambiente até completa remoção do etanol residual. O *pellet* de DNA foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura e armazenado a -20°C até futuras análises.

### 4.3.3 Identificação e quantificação de *L. infantum* nos flebotomíneos

Os flebotomíneos positivos foram identificados através da realização de qPCR. Para a reação foram utilizados *primers* com alvo em DNA de miniciclos do quinetoplasto da *Leishmania* sp. específico para o complexo *donovani* (Lachaud *et al.*, 2002) com as seguintes sequências: senso 5'-CTTTTCTGGTCCC GCGGGTAGG-3', anti-senso 5'-CCACCTGGCCTATTTTACACCA-3', gerando um produto final de 145 pb; e *primers* com alvo no gene constitutivo GAPDH do inseto: senso 5'-TTCGCAGAAGACAGTGATGG-3', anti-senso 5'-CCCTTCATCGGTCTGGACTA-3', com produto final de 132 pb. A qPCR foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 0,2 µM de cada *primer*, 5 µL de SYBR Green PCR master mix 1x (Applied Biosystems, USA) e 4 µL de DNA (5 ng/µL). As reações foram realizadas em equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, USA) seguindo desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 1 minuto.

Dez flebotomíneos de cada animal, sorologicamente positivos ou não, foram primeiramente testados na qPCR em dois *pools* de cinco flebotomíneos cada. Os animais positivos no *pool* foram incluídos na análise quantitativa, independente do resultado da sorologia. A quantificação de promastigotas em cada flebotomíneo foi realizada através da curva padrão gerada na qPCR de diluições seriadas de DNA extraído de cultura pura de *L. infantum* na concentração inicial de 10<sup>8</sup> promastigotas/µL. O cálculo de promastigotas/µg de DNA foi realizado baseado no Ct da amplificação do kDNA de cada flebotomíneo positivo e no declive (*slope*) e na interseção de y da curva padrão de *L. infantum*, gerando a seguinte equação:  $10^{(Ct - \text{interseção-y})/(\text{declive})} \times 50$ .

### 4.4 Análise estatística

As frequências de espécies de primatas não-humanos positivos no xenodiagnóstico foram comparadas utilizando teste de Qui-quadrado com intervalo de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). Para a comparação entre os demais dados foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O teste de Kappa foi realizada para avaliar o grau de concordância entre os testes sorológicos utilizados. Toda a análise estatística foi realizada no programa Prism versão 7.0 (GraphPad).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Animais positivos para infecção por *Leishmania* spp.

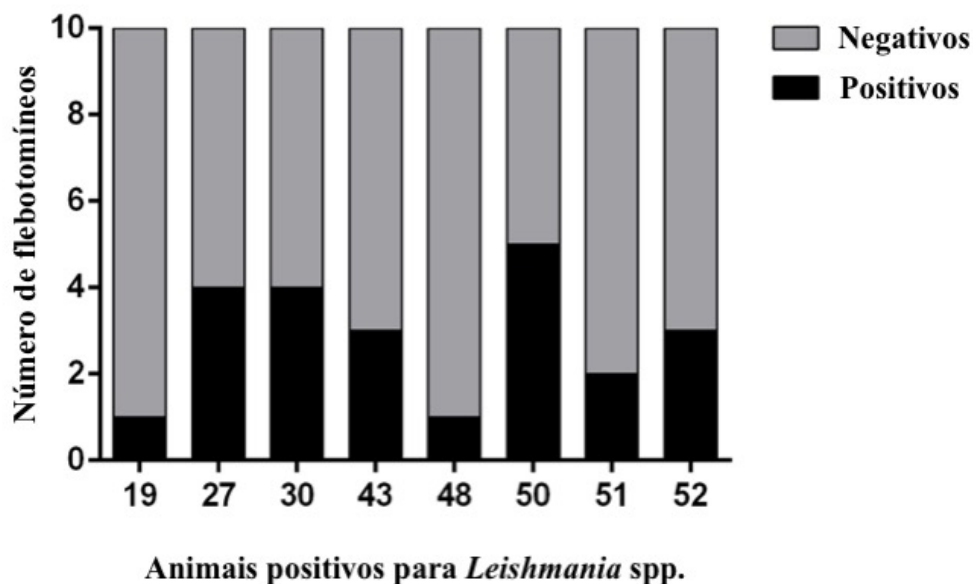
Sete dos 52 primatas não-humanos (13,46%) foram positivos para *Leishmania* spp. nos testes sorológicos utilizando a rKDDR como antígeno (Tabela 2). Nos outros dois testes sorológicos, com rK39 e o teste rápido, cinco animais foram positivos (9,61%). Contudo, todos os testes sorológicos tiveram excelente concordância entre si, com coeficiente Kappa igual a 0,87, utilizando o ELISA de rKDDR como teste ouro. Um dos indivíduos da espécie *L. rosalia*, apesar de negativo nos testes sorológicos, foi positivo no qPCR do *pool* de flebotomíneos. No total foram oito animais positivos, sendo: três *P. troglodytes* (100% 3/3), três *L. rosalia* (20% 3/15), um *S. apella* (16,67% 1/6) e um *M. talapoin* (50% 1/2).

**Tabela 2. Resposta sorológica dos animais positivos para leishmaniose nos três testes sorológicos realizados no estudo.** Legenda: ID: identificação individual. NA: não aplicável. \* Animal positivo apenas no qPCR do *pool* de flebotomíneos.

Espécies	ID	rKDDR (O.D.)	rK39 (O.D.)	Teste rápido
<i>Pan troglodytes</i>	50	+ (0.3232)	– (0.2352)	–
	51	+ (1.2434)	+ (1.5628)	+
	52	+ (1.8469)	+ (2.1753)	+
<i>Leontopithecus rosalia</i>	19	+ (0.5595)	+ (0.4301)	+
	27	+ (0.3964)	+ (0.4298)	+
	30*	– (0.0443)	– (0.0605)	–
<i>Sapajus paella</i>	43	+ (0.7985)	+ (0.3595)	+
<i>Myopithecus talapoin</i>	48	+ (0.3510)	– (0.2157)	–
	<b>Cut off</b>	0.2326	0.2563	NA

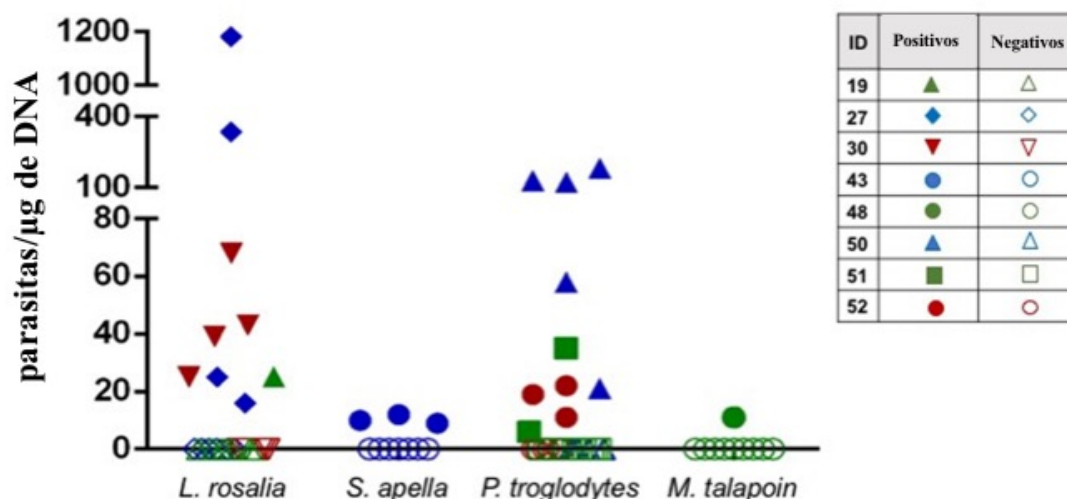
## 5.2 Xenodiagnóstico

Todos os animais positivos foram capazes de infectar pelo menos um flebotomíneo (Figura 7).



**Figura 7. Transmissão de *Leishmania infantum* dos primatas não-humanos para o vetor *Lutzomyia longipalpis*.** Relação de flebotomíneos positivos e negativos (n = 10) expostos aos primatas positivos para leishmaniose.

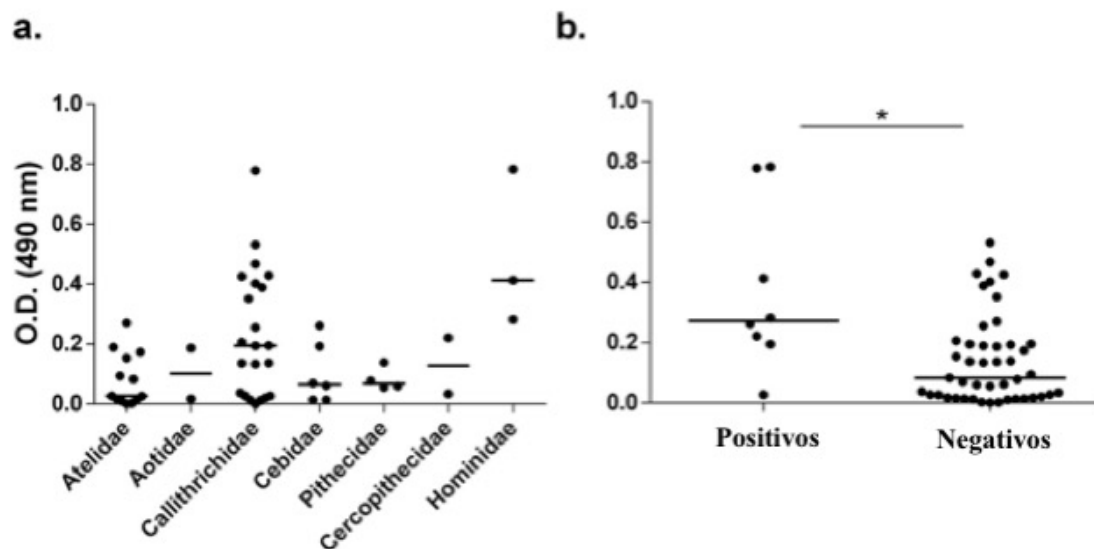
O número de promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA variou de 5,67 a 1.181,93 nos animais positivos. No estudo *L. rosalia* foi mais eficiente que *S. apella* em infectar o vetor ( $p = 0.0328$ ; Kruskal-Wallis), com média de 194 e 10 promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA de flebotomíneo, respectivamente. Apesar do *M. talapoin* ter um flebotomíneo infectado também com 10 promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA, não pode ser realizado teste estatístico, pois apenas um flebotomíneo foi infectado. *P. troglodytes* teve uma média de 59 promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA. A Figura 8 mostra a quantidade de promastigotas/ $\mu\text{g}$  de DNA de cada flebotomíneo positivo de cada espécie de primata do presente estudo.



**Figura 8. Análise quantitativa de promastigotas de *Leishmania infantum* nos *Lutzomyia longipalpis* expostos aos primatas não-humanos.** Quantificação relativa de promastigotas de *L. infantum* em cada flebotomíneo positivo de acordo com a espécie de primatas positivas para leishmaniose no estudo. Os símbolos representam cada animal: símbolos abertos indicam flebotomíneos negativos e símbolos fechados representam os flebotomíneos positivos.

### 5.3 ELISA anti- saliva de *Lu. longipalpis*

Os animais positivos para leishmaniose apresentaram valores de O.D. anti-saliva de *L. longipalpis* significativamente maiores que os animais negativos ( $p = 0.0049$ ; Mann-Whitney), apesar de não ter sido observada diferença significativa entre as O.D. das famílias de primatas não-humanos avaliados (Figura 9).



**Figura 9.** ELISA anti- saliva de *Lutzomyia longipalpis*. O.D. de cada animal avaliado agrupados de acordo com a família (a). O.D. dos animais agrupados em positivos ou negativos para leishmaniose no xenodiagnóstico (b). Os animais positivos tiveram valores de O.D. significativamente mais altos quando comparados com os animais negativos (\* $p = 0.0049$  – Mann-Whitney). As linhas nos gráficos representam as medianas e cada ponto indicam a O.D. individual dos animais testados.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo relata pela primeira vez a capacidade de primatas não-humanos assintomáticos transmitirem *L. infantum* para *Lu. longipalpis*, o principal vetor biológico da leishmaniose no Novo Mundo. Infecções naturais e doenças associadas a *Leishmania* em primatas não-humanos vem sendo ocasionalmente relatadas, e há evidências de infecção em animais de vida livre e cativeiro baseadas em testes sorológicos e PCR (Malta *et al.*, 2010; Lima *et al.*, 2012; Rovirosa-Hernández *et al.*, 2013; Roque e Jansen, 2014; Souza *et al.*, 2014; Bueno *et al.*, 2017; Miró *et al.*, 2018; Tinoco *et al.*, 2018). Os primatas não-humanos são frequentemente utilizados como modelo de infecção experimental de leishmaniose, principalmente para estudos imuno-clinico-patológicos e para o desenvolvimento de vacinas, com respostas semelhantes aos observados em pacientes humanos (Broderon *et al.*, 1986; Carneiro *et al.*, 2011; Porrozzini *et al.*, 2006; Grimaldi Jr *et al.*, 2014). O xenodiagnóstico é a única ferramenta capaz de confirmar a habilidade de um potencial reservatório de infectar o vetor de um determinado parasita.

A carga parasitária observada nos flebotomíneos infectados deste estudo foi considerada baixa. Flebotomíneos expostos a cães infectados sintomáticos ou assintomáticos apresentaram média de parasitas de 84 e 10 parasitas por flebotomíneo, respectivamente, mas um cão sintomático infectou um flebotomíneo com 29.774 parasitas (Borja *et al.*, 2016). No presente estudo também foi observado um animal da espécie *L. rosalia* que infectou um flebotomíneo com uma carga elevada de parasitas (1.181,93 parasitas/ $\mu\text{g}$  de DNA). Os flebotomíneos infectados podem ser classificados como “*super-spreader*” quando carregam altas doses infectantes ( $> 600$  parasitas) e são responsáveis por epidemias com elevada carga de doença; e como “*endemic-spreader*”, com

baixas cargas parasitárias e responsáveis por endemias com baixa manifestação de doença (Courtney *et al.*, 2017). Portanto, os resultados deste estudo sugerem que algumas espécies de primatas não-humanos podem ter um papel no ciclo endêmico da *Leishmania*, transmitindo baixas doses infectantes aos flebotomíneos, favorecendo a circulação de flebotomíneos “*endemic-spreader*” e perpetuando o “modo discreto e assintomático” da leishmaniose. Este quadro dificilmente favorece ao aparecimento da doença clínica, contudo, pode auxiliar na manutenção da *Leishmania* numa determinada população que habita regiões endêmicas (Courtenay *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que a dose infectante de promastigotas nos flebotomíneos naturalmente infectados permanece desconhecida, com relatos que indicam de centenas a milhares de promastigotas necessárias para o estabelecimento da infecção no hospedeiro (Warburg e Schlein, 1986; Rogers *et al.*, 2004; Borja *et al.*, 2016). Alguns estudos evidenciam a necessidade de obstrução física do intestino anterior do flebotomíneo para que ocorra a transmissão do parasita para o hospedeiro (Bates, 2007; Rogers, 2012). Essa obstrução é resultado da associação de promastigotas com um gel secretado por promastigotas (*promastigote secretory gel* – PSG) que formam um tampão que distende e obstrui o trato digestivo anterior do flebotomíneo (Rogers *et al.*, 2002; Rogers *et al.*, 2012). Essa obstrução leva a regurgitação de promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo, resultando na infecção do hospedeiro (Rogers *et al.*, 2002). Para que haja produção suficiente de PSG para obstrução do trato digestivo é necessário um número mínimo de promastigotas. Contudo, o número de promastigotas aumenta em até 16 vezes dentro do flebotomíneo (Rogers *et al.*, 2002; Rogers, 2012), e os flebotomíneos tendem a se tornar ainda mais parasitados após o segundo repasto sanguíneo, mesmo quando o segundo repasto é feito em um hospedeiro não infectado (Serafim *et al.*, 2018). Portanto, é razoável considerar que mesmo baixas cargas parasitárias, como as observadas nos flebotomíneos deste estudo, poderiam eventualmente levar a uma carga parasitária infectante em ambientes endêmicos.

Em humanos a capacidade de transmissão da *Leishmania* para flebotomíneos é aumentada em pacientes sintomáticos e imunocomprometidos (Costa *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2018). Porém, essa tendência ainda é questionada em cães domésticos (Soares *et al.*, 2011; Laurenti *et al.*, 2013; Borja *et al.*, 2016). Na mesma instituição onde o presente trabalho foi executado já foram diagnosticados dois casos de leishmaniose visceral sintomática em primatas não-humanos: um caso em um *Callicebus nigrifrons* no ano de 2008 (Malta *et al.*, 2010) e outro caso em um *Gorilla gorilla* no ano de 2016 (Tinoco *et al.*, 2018), dando suporte ao conceito de que primatas não-humanos cativos de áreas endêmicas são susceptíveis ao desenvolvimento de leishmaniose.

Três testes sorológicos para identificação de animais soropositivos para *Leishmania* spp. foram realizados neste estudo: dois ELISAs com diferentes antígenos (rKDDR e rK39) e um ensaio imunocromatográfico (teste rápido) com rKDDR como antígeno. Todos os três testes tiveram resultados semelhantes, mesmo com a utilização de anticorpos secundários anti-IgG humano nos protocolos de ELISA. No teste rápido a reação ocorre por interação direta do anticorpo primário presente no soro dos animais testados com o antígeno específico presente na fita. Contudo, é importante ressaltar que os testes sorológicos não discriminam animais persistentemente infectados, ou recentemente infectados e que não realizaram soroconversão, dos que foram expostos à *Leishmania* anteriormente, mas não permanecem infectados (Mol *et al.*, 2015; Mendonça *et al.*, 2017). Portanto, neste trabalho também foi realizado o qPCR do *pool* de flebotomíneos de todos os animais do estudo, independente dos resultados dos testes sorológicos, para garantir que todas os flebotomíneos infectados fossem identificados, mesmo em animais sorologicamente negativos. Interessantemente, foi observada elevada O.D. de IgG anti-saliva de

*Lu. longipalpis* nos animais positivos para leishmaniose, corroborando estudos anteriores em cães e humanos, onde a sorologia anti-saliva de flebotomíneo está diretamente associada a maior exposição dos hospedeiros aos flebotomíneos, aumentando o risco de infecção (Barral *et al.*, 2000; Batista *et al.*, 2016; Lestinova *et al.*, 2017; Quinnell *et al.*, 2018).

A leishmaniose clínica em primatas não-humanos é incomum, com escassos relatos na literatura. Em primatas neotropicais há apenas um relato do desenvolvimento da doença (Malta *et al.*, 2010) e em primatas do velho mundo foram relatados dois casos recentes, um afetando dois orangotangos (Miró *et al.*, 2018) e um caso de um gorila jovem (Tinoco *et al.*, 2018). Todos esses casos ocorreram em regiões endêmicas para leishmaniose. Carneiro *et al.* (2012) sugere que primatas neotropicais tem resistência imunológica inata para a infecção por *L. infantum*, e o presente estudo sugere que chimpanzês são mais predispostos a infecção por *Leishmania* spp. quando comparados com outras espécies de primatas não-humanos de uma mesma região endêmica para leishmaniose. Todos os chimpanzês deste estudo foram positivos no xenodiagnóstico e tiveram elevados níveis de IgG anti-saliva de *Lu. longipalpis*, sugerindo também alta exposição aos flebotomíneos.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstrou pela primeira vez que primatas não-humanos de cativeiro podem ser susceptíveis a infecção de *Leishmania* e que são capazes de transmitir o patógeno para flebotomíneos. Este estudo conscientiza sobre a necessidade de melhorar as estratégias de saúde pública com foco no controle do vetor e da doença, principalmente em áreas endêmicas para leishmaniose. Adicionalmente, este estudo enfatiza a importância dos primatas não-humanos, de vida livre ou cativos, como sentinelas para importantes zoonoses, o que é altamente relevante do ponto de vista da medicina da conservação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANURADHA, P. R.; ZEHRA, K.; KATIYAR, J.C. et al. The Indian langur preliminary report of new nonhuman primate host for visceral leishmaniasis. *Bull. World Health Organ.*, v.70, n.1, p.63-72, 1992.

AURICCHIO, P. Primatas do Brasil. Terra Brasilis: São Paulo, 1995. p.168.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmaniasis: Global Aspects of Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. (Ed) Infectious diseases of the dog and cat. Elsevier Saunders: Missouri, 2012. p.734.

BARRAL, A.; HONDA, E.; CALDAS, A. et al. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.62, n.6, p.740-745, 2000.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* v.37, p.1097-1106, 2007.

- BATES, P.A.; ROGERS, M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.*, v.4, p.601-609, 2004.
- BATISTA, L.F.S.; MATTA, V.L.R.; TOMOKANE, T.Y. et al. Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.49, n.3, p.361-364, 2016.
- BORJA, L.S.; SOUSA, O.M.F.; SOLCÁ, M.S. et al. Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sand fly vectors. *Vet. Parasitol.*, v.229, p.110-117, 2016.
- BRODERSON, J.R.; CHAPMAN JR, W.L.; HANSON, W.L. Experimental visceral leishmaniasis in the owl monkey. *Vet. Pathol.*, v.23, p.293-302, 1986.
- BUENO, M.G.; CATÃO-DIAS, J.L.; LAROQUE, P.O. et al. Infectious diseases in free-ranging blonde capuchins, *Sapajus flavius*, in Brazil. *Int. J. Primatol.*, v.38, n.6, p.1017-1031, 2017.
- CARNEIRO, L.A.; SILVEIRA, F.T.; CAMPOS, M.B. et al. Susceptibility of *Cebus apella* Monkey (Primates: Cebidae) to experimental *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.53, n.1, p.45-50, 2011.
- CARNEIRO, L.A.; LAURENTI, M.D.; CAMPOS, M.B. et al. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to ex vivo *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.54, n.2, p.95-101, 2012.
- COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. *Vet. Parasitol.*, v.182, p.14-21, 2011.
- COSTA, C.H.N.; GOMES, R.B.B.; SILVA, M.R.B. et al. Competence of the human host as a reservoir of *Leishmania chagasi*. *J. Infect. Dis.*, v.182, p.997-1000, 2000.
- COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; GONTIGO, N.F. et al. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. *Vet J.*, v.174, p.636-643, 2007.
- COURTENAY, O.; PETERS, N.C.; ROGERS, M.E.; BERN, C. Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and host to inform leishmaniasis transmission dynamic and control. *Plos Pathog.*, v.13, n.10, p.1-13, 2017.
- COURTENAY, O.; QUINNELL, R.J.; GARCEZ, L.M.; DYE, C. Low infectiousness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. *Parasitology*, v.125, p.407-414, 2002.
- DENNIS, V.A.; CHAPMAN, W.L.; HANSON, W.L.; LUJAN, R. *Leishmania donovani*: clinical, hematologic and hepatic changes in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Parasitol.*, v.71, n.5, p.576-582, 1985.
- DINIZ, L.S.M. Primatas em cativeiro: Manejo e problemas veterinários – Enfoque para espécies neotropicais. Ícone: São Paulo, 1997. p.23-46.

- DINIZ, S.A.; SILVA, F.L.; CARVALHO, N.A.V. et al. Animal reservoirs for visceral leishmaniasis in densely populated urban areas. *J. Infect. Dev. Ctries.*, v.2, p.24-33, 2008.
- ESTRADA, A.; GARBER, P.A.; RYLANDS, A.B. et al. Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter? *Sci Adv.*, v.3, n.1, p.1-16, 2017.
- FERREIRA, E.C.; CRUZ, I.; CAÑAVATE, C. et al. Mixed infection of *Leishmania infantum* (syn. *chagasi*) and *Leishmania braziliensis* in rodents from endemic urban area of the New World. *Vet Res.*, v.11, n.71, p.1-7, 2015.
- FERREIRA, G.R.; RIBEIRO, J.C.C.B.; MENESES FILHO, A. et al. Human competence to transmit *Leishmania infantum* to *Lutzomyia longipalpis* and the influence of human immunodeficiency virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.98, n.1, p.126-133, 2018.
- FREITAS, L.A.R.; SANTOS, W.L.C. Leishmaniasis. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed) *Bogliolo, patologia*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006. p.1359-1367.
- GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *Int. J. Parasitol.*, v.33, p.1027-1034, 2003.
- GRIMALDI JR, G.; TEVA, A.; PORROZZI, R. et al. Clinical and parasitological protection in a *Leishmania infantum*-macaque model vaccinated with adenovirus and the recombinant A2 antigen. *Plos Negl. Trop. Dis.*, v.8, n.6, p.1-13, 2014.
- JIMÉNEZ, M.; GONZÁLEZ, E.; MARTÍN-MARTÍN, I. et al. Could wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) be reservoirs for *Leishmania infantum* in the focus of Madrid, Spain? *Vet. Parasitol.*, v.202, p.296-300, 2014.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.*, v.9, p.604-615, 2011.
- LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.210-215, 2002.
- LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.100, n.8, p.811-827, 2005.
- LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; DA MATTA, V.L.R. et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. *Vet. Parasitol.*, v.196, p.296-300, 2013.
- LANE, R.P. Sandflies (Phlebotominae). In: LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. (Eds.) *Medical Insects and Arachnids*. Chapman and Hall: London, 1993. p.78-119.

- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends. Microbiol.*, v.11, p.210-214, 2003.
- LESTINOVA, T.; ROHOUSOVA, I.; SIMA, M. et al. Insights into the sand fly saliva: Blood-feeding and immune interactions between sand flies, hosts, and *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v.11, n.7, p.1-26, 2017.
- LIMA, V.M.F.; SANTIAGO, M.E.B.; SANCHES, L.C.; LIMA, B.D. Molecular diagnosis of *Leishmania amazonensis* in a captive spider monkey in Bauru, São Paulo, Brazil. *J Zoo Wildl Med.*, v.43, n.4, p.943-945, 2012.
- LOMBARDI, M.C.; TURCHETTI, A.P.; TINOCO, H.P. et al. Diagnosis of *Leishmania infantum* infection by Polymerase Chain Reaction in wild mammals. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34, p.1243-1246, 2014.
- LUKES, J.; MAURICIO, I.L.; SCHONIAN, G. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.22, p.9375-9380, 2007.
- MALTA, M.C.C.; TINOCO, H.P.; XAVIER, M.N. et al. Naturally acquired visceral leishmaniasis in non-human primates in Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.169, p.193-197, 2010.
- MADINDOU, T.J.; HANSON, W.L.; CHAPMAN JR, W.L. Chemotherapy of visceral leishmaniasis (*Leishmania donovani*) in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.79, n.1, p.13-19, 1985.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J.T.; MOTA, T.F.; PORFIRIO-PASSOS, G. et al. Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. *Vet. Parasitol.*, v.223, p.120-126, 2016.
- MARCONDES, J.S.; FEITOSA, F.L.F.; IKEDA-GARCIA, F.A. et al. Avaliação do proteinograma sérico de cães com e sem sintomas neurológicos, naturalmente infetados por *Leishmania chagasi*. *Rev. Bras. Clin. Vet.*, v.13, n.1, p.20-24, 2006.
- MARQUES, A.; TELFORD III, S.R.; TURK, S. et al. Xenodiagnosis to Detect *Borrelia burgdorferi* Infection: A First-in-Human Study. *Clin. Infect. Dis.*, v.58, n.7, p.937-945, 2014.
- MEISER, C.K.; SCHAUB, G.A. Xenodiagnosis. In: MEHLHOM, H. (Ed) Nature Helps...How Plants and Other Organisms Contribute to Solve Health Problems. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Berlin, 2011. p.273-299.
- MENDONÇA, I.L.; BATISTA, J.F.; WERNECK, G.L. et al. Serological tests fail to discriminate dogs with visceral leishmaniasis that transmit *Leishmania infantum* to the vector *Lutzomyia longipalpis*. *Rev. Bras. Med. Trop.*, v.50, n.4, p.483-488, 2017.
- MILLÁN, J.; FERROGLIO, E.; SOLANO-GALLEGO, L. Role of wildlife in the epidemiology of *Leishmania infantum* infection in Europe. *Parasitol. Res.*, v.113, p.2005-2014, 2014.

- MIRÓ, G.; TROYANO, A.; MONTOYA, A. et al. First report of *Leishmania infantum* infection in the endangered orangutan (*Pongo pygmaeus pygmaeus*) in Madrid, Spain. *Parasit. Vectors.*, v.11, n.185, p.1-7, 2018.
- MOL, J.P.S.; SOAVE, S.A.; TURCHETTI, A.P. et al. Transmissibility of *Leishmania infantum* from maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dogs (*Speothos venaticus*) to *Lutzomyia longipalpis*. *Vet. Parasitol.*, v.212, p.86-91, 2015.
- MOLINA, R.; ALVAR, J. A simple protocol for the indirect xenodiagnosis of *Leishmania infantum* in the blood of HIV-infected patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.90, n.6, p.639-640, 1996.
- MOURYA, D.T.; GOKHALE, M.D.; KUMAR, R. Xenodiagnosis: use of mosquitoes for the diagnosis of arboviral infections. *J. Vector Borne Dis.*, v.44, p.233–240, 2007.
- NUNES, A.L.V.; CATÃO-DIAS, J.L. Capítulo 35: Primates – Primatas do Velho Mundo (Babuíno, Mandril, Chimpanzé e Orangotango). In.: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS (Eds). *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária Volume 1*, Roca: São Paulo, 2014. p.744-763.
- PAIZ, L.M.; MOTOIE, G.; RICHINI-PEREIRA, V.B. et al. Antibodies and molecular detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* in samples of free-ranging marmosets (Primates: Callitrichidae: *Callithrix* spp.) in an area of canine visceral leishmaniasis in Southeastern Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018 Oct 18. doi: 10.1089/vbz.2018.2348. [Epub ahead of print].
- PASSOS, V.M.A.; FALCÃO, A.L.; MARZOCHI, M.C.A. et al. Epidemiological aspects of american cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.88, n.1, p.103-110, 1993.
- PATZ, J.A.; GITHEKO, A.K.; MCCARTY, J.P. et al. Climate change and infectious disease. In: MCMICHEL, A.J.; CAMPBELL-LENDRUM, D.H.; CORVALÁN, C.F. et al. (Eds). *Climate change and human health Risks and Responses*. Geneva: WHO Library, 2003. p.103-132.
- PORROZZI, R.; PEREIRA, M.S.; TEVA, A. et al. *Leishmania infantum*-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.100, p.926-937, 2006.
- QUINNELL, R.J.; SOREMEKUN, S.; BATES, P.A. et al. Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors.*, v.11, n.7, p.1-12, 2018.
- ROGERS, M.E.; CHANCE, M.L.; BATES, P.A. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology*, v.124, p.495-507, 2002.
- ROGERS, M.E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A.V. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. *Nature*, v.430, n.6998, p.463-467, 2004.

- ROGERS, M.E. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front. Microbiol.*, v.223, n.3, p.1-13, 2012.
- ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, v.3, p.251-262, 2014.
- ROVIROSA-HERNÁNDEZ, M.J.; CORTES-ORTÍZ, L.; GARCÍA-ORDUÑA, F. et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana* in free-ranging howler monkeys in Southeastern Mexico. *Am. J. Primatol.*, v.75, p.161-169, 2013.
- RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, R.A.; RODRIGUEZ-LUNA, E. Conservation of Neotropical Primates: Threatened Species an Analysis of Primate Diversity by Country and Region. *Folia Primatol.*, v.68, p.134-160, 1997.
- SADLOVA, J.; SEBLOVA, V.; VOTYPKA, J. et al. Xenodiagnosis of *Leishmania donovani* in BALB/c mice using *Phlebotomus orientalis*: new laboratory model. *Parasit. Vectors.*, v.8, p.158, 2015.
- SERAFIM, T.D.; COUTINHO-ABREU, I.V.; OLIVEIRA, F. et al. Sequential blood meals promote *Leishmania* replication and reverse metacyclogenesis augmenting vector infectivity. *Nat. Microbiol.*, v.3, n.5, p.548-555, 2018.
- SILVA, S.M.; RABELO, P.F.B.; GONTIJO, N.F. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.174, p.150-154, 2010.
- SILVEIRA, T.F.; MORAES, M.A.P.; LAINSON, R.; SHAW, J.J. Leishmaniose cutânea experimental III – aspectos histopatológicos do comportamento evolutivo da lesão cutânea produzida em *Cebus apella* (Primates: Cebidae) por *Leishmania (Viannia) lainsoni*, L. (V.) *braziliensis* e L. (*Leishmania*) *amazonensis*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.32, n.6, p.387-394, 1990.
- SOARES, M.R.A.; MENDONÇA, I.L.; BONFIM, J.M. et al. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: Relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.*, v.117, p.6-9, 2011.
- SOUZA, T.D.; TURCHETTI, A.P.; FUJIWARA, R.T. et al. Visceral leishmaniasis in zoo and wildlife. *Vet. Parasitol.*, v.200, p.233-241, 2014.
- SCHENONE, H. Xenodiagnosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.94, suppl.1, p.289-294, 1999.
- SHERLOCK, I.A. Ecological interactions of visceral leishmaniasis in the state of Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.91, p.671–683, 1996.
- TINOCO, H.P.; COSTA, M.E.L.T.; PESSANHA, A.T. et al. Visceral leishmaniasis in an infant gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*): clinical signs, diagnosis, and successful treatment with single-dose liposomal amphotericin B. *J Med Primatol*, v.47, n.6, p.1-3, 2018.

TRAVI, B.L.; ARTEAGA, L.T.; LEON, A.P.; ADLER, G.H. Susceptibility of spiny rats (*Proechimys semispinosus*) to *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.97, p.887-892, 2002.

TRÜEB, I.; PORTELA, R.D.; FRANKE, C.R. et al. *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* sp. infection in wildlife from urban rainforest fragments in Northeast Brazil. *J. Wildl. Dis.*, v.54, n.1, p.76-84, 2018.

TURCHETTI, A.P.; SOUZA, T.D.; PAIXÃO, T.A.; SANTOS, R.L. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* v.8, n.4, p.403-407, 2014.

VERONA, C.E.; PISSINATTI, A. Capítulo 34: Primates – Primatas do Novo Mundo (sagui, macaco-prego, macaco-aranha, bugio e muriqui). In.: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS (Eds). *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária Volume 1*, Roca: São Paulo, 2014. p.723-743.

WARBURG, A.; SCHLEIN, Y. The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.35, p.926–930, 1986.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Control of leishmaniasis: report of meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis*. 2010. Available on: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Leishmaniasis: Epidemiology. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2016*. Available on: <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>. Accessed on April 2019

## 9. APÊNDICE

**Anexo 1. Tabela com os protocolos anestésicos utilizados em cada espécie de primata não-humano do estudo durante o xenodiagnóstico.** Legenda: N: número de animais; ID: identificação individual.

<b>Primates Neotropicais</b>				
<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Protocolo anestésico</b>
Atelidae	<i>Alouatta caraya</i>	04	01 – 04	Tiletamina (125mg) + Zolazepam (125mg) 5mg/kg, intramuscular
	<i>Alouatta guariba</i>	02	05 – 06	Midazolam 0.6mg/kg e Quetamina 4-8mg/kg, ambos intramuscular; manutenção com isoflurano
	<i>Lagothrix cana</i>	07	07 – 13	Quetamina 5mg/kg, intramuscular; manutenção com isoflurano
Aotidae	<i>Aotus nigriceps</i>	02	14 – 15	Midazolam 0.6mg/kg e Quetamina 4mg/kg, ambos intramuscular; manutenção com isoflurano
Callitrichidae	<i>Leontopithecus chrysomelas</i>	01	16	Tiletamine (250mg) + Zolazepam (250mg) 4.5mg/kg, intramuscular
	<i>Leontopithecus rosalia</i>	15	17 – 31	17-20: Quetamina 8-10mg/kg, intramuscular; manutenção com isoflurano. 21-31: Tiletamina (125mg) + Zolazepam (125mg) 0.1mg/kg, intramuscular
	<i>Leontopithecus chrysopygus</i>	02	32 – 33	Midazolam 0.5mg/kg e Quetamina 8mg/kg, ambos intramuscular

	<i>Saguinus imperator</i>	04	34 – 37	34: Midazolam 0.6mg/kg e Quetamina 4-8mg/kg, ambos intramuscular; manutenção com isoflurano 35-37: Tiletamina (125mg) + Zolazepam (125mg) 0.1mg/kg, intramuscular
Cebidae	<i>Sapajus apella</i>	06	38 – 43	Tiletamina (125mg) + Zolazepam (125mg) 6mg/kg e xilazina 0.5mg/kg, intramuscular
Pitheciidae	<i>Callicebus nigrifrons</i>	01	44	Tiletamina (250mg) + Zolazepam (250mg) 4.5mg/kg, intramuscular
	<i>Pithecia irrorata</i>	03	45 – 47	Midazolam 0.5mg/kg e Quetamina 8mg/kg, ambos intramuscular
<b>Primatas do Velho Mundo</b>				
<b>Família</b>	<b>Nome científico</b>	<b>N</b>	<b>ID</b>	<b>Protocolo anestésico</b>
Cercopithecidae	<i>Miopithecus ogouensis</i>	02	48 – 49	Tiletamina (250mg) + Zolazepam (250mg) 4.5mg/kg, intramuscular
Hominidae	<i>Pan troglodytes</i>	03	50 – 52	50: Tiletamina (250mg) + Zolazepam (250mg) 13.5mg/kg, intramuscular
				51-52: Tiletamina (250mg) + Zolazepam (250mg) 13.5mg/kg, intramuscular; manutenção com propofol endovenoso e isoflurano