

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

**Perfil molecular de diferentes cepas do subgênero *Mundinia* e cinética da
visceralização por *Leishmania enriettii* em *Cavia porcellus***

EDNEIA VENÂNCIO ALVES SOBRINHO

BELO HORIZONTE

2020

EDNEIA VENÂNCIO ALVES SOBRINHO

Perfil molecular de diferentes cepas do subgênero *Mundinia* e cinética da visceralização por *Leishmania enriettii* em *Cavia porcellus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientador: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares

BELO HORIZONTE

2020

043

Sobrinho, Edneia Venâncio Alves.

Perfil molecular de diferentes cepas do subgênero *Mundinia* e cinética da visceralização por *Leishmania enriettii* em *Cavia porcellus* [manuscrito] / Edneia Venâncio Alves Sobrinho. - 2020.

53 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Leishmania enriettii*. I. Soares, Rodrigo Pedro Pinto. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Edneia Venâncio Alves Sobrinho412/2020/10
entrada
1º/2018
2018653606

Às dez horas do dia 15 de maio do ano de 2020, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/daniella-castanheira-bartholomeu>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Perfil molecular de diferentes cepas do subgênero *Mundinia* e cinética da visceralização por *Leishmania curiarii* em *Cavia porcellus*" área de concentração: Protozoologia. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares	IRR/FIOCRUZ	Aprovada
Dr. Gregório Guilherme Almeida	IRR/FIOCRUZ	Aprovada
Dr. Thiago de Castro Gomes	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.

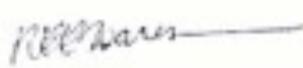
CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO(A) O(A) CANDIDATO(A):

Exigências	
Recomendações	Incluir todas as correções/sugestões da banca
Sugestões	

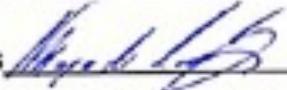
Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 15 de maio de 2020.

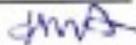

 Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares _____
 (Orientador)


 Dr. Gregório Guilherme Almeida _____


 Dr. Thiago de Castro Gomes _____

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Ata-COVID19- período isolamento social


 Prof. Helida Monteiro de Andrade
 Coordenadora do Programa de
 Pós-Graduação em Parasitologia
 ICB-UFMG - Port:7106-04/102021
 SIAPE nº 2167747

Trabalho realizado no Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do Instituto René Rachou, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Projeto Universal (302972/2019-6) e, pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMIG (PPM-00202-18); aprovado no Comitê de Ética (CEUA- Fiocruz LW-24-19) e contou com a colaboração do Dr. Wagner Tafuri, Dra Patrícia Quaresma, Dra Lucélia Pinheiro, Dra Larissa Paranaíba e Dra Patrícia Parreiras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte de conhecimento, ele que dá sabedoria e entendimento àqueles que o buscam.

E com imensa gratidão aos meus pais José e Lúcia, minhas fontes de sabedoria e exemplos de dignidade e honestidade, que me motivaram a seguir em frente na luta pelos meus sonhos. Aos meus irmãos Priscila e Stéfano pela paciência, incentivo e dedicação. Eles que compartilham e alimentam meus sonhos, me incentivando a continuar na caminhada, independente dos obstáculos.

De maneira especial agradeço ao meu orientador Dr. Rodrigo Soares pelo conhecimento construído ao longo desses anos, pela dedicação e paciência, pela disponibilidade com que me orientou e não poderia deixar de agradecer pela oportunidade e por confiar em meu trabalho.

A toda minha família, meus avôs e avós ausentes, pelos exemplos deixados, a todos os tios, tias, primos que me compreenderam e apoiaram ao longo da minha caminhada.

Ao Guilherme, pelo amor, pela paciência e principalmente pela compreensão, a Beth, Lorena e Diego pelo apoio e incentivo e claro por entenderem minha ausência.

A todos os amigos do laboratório, Camila, Jerônimo, Karine, Armando, Renata, Ana Salim, Flávia, Claudinha, Paulo Otávio, Ellen, Patrícia Quaresma, Patrícia Parreira, em especial a Larissa, Lucélia, Felipe e Igor que foram fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos amigos Mari, Thais, Aline, Léo, Glaucia e aos amigos da turma de Parasitologia 2018, os degradingolados, mas em destaque a Valéria, Andreia, Genil e Gustavo, eu não conseguiria sem eles.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, em especial da Profa Daniella, Hudson, Sumara e Sibebe. Igualmente, agradeço aos demais professores do programa pela contribuição de todos na minha formação como parasitologista.

Dedico este trabalho aos meus pais José Alves e Maria Lúcia e irmãos Priscila e Stéfano,
pelo respeito e carinho.

RESUMO

Leishmania enriettii foi descrita pela primeira vez em 1948 e em 2016, foi reclassificada em um novo subgênero, o *Mundinia*. Neste, estão também as espécies *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis* e *Leishmania macropodum*. Neste trabalho, tentamos estabelecer algumas relações filogenéticas entre três destas espécies e fornecer uma técnica molecular de identificação rápida desses parasitos. Os parasitos de cultura foram submetidos à técnica de PCR-RFLP com os iniciadores para os genes *hsp70* e ITS1. O fragmento do gene *hsp70* foi sequenciado e o dendograma produzido. Neste alvo, uma das cepas de *L. enriettii* (cobaia) agrupou-se no ramo *Leishmania*. Este resultado nos chamou a atenção e decidimos sequenciar também o fragmento do gene ITS1. Neste alvo, a cepa cobaia de *L. enriettii* agrupou-se com as das outras espécies do subgênero *Mundinia*. Após padronizar com sucesso este PCR, o mesmo foi utilizado para se estudar a visceralização em cobaias infectadas com a cepa L88 de *L. enriettii*. Análises histológicas de nosso grupo já indicavam este fenômeno em alguns órgãos (traquéia, baço, fígado e pulmão) em diferentes tempos de infecção (4, 8 e 12 semanas). Para tanto, extraímos o DNA destes blocos de parafina e realizamos novamente a PCR do gene *hsp70*. Foi observada uma clara cinética onde o DNA do parasito foi detectado na traquéia e baço após 4 e 8 semanas de infecção. Após 12 semanas nenhum DNA foi detectado. Feito, isso, a fim de se confirmar a presença do parasito no baço foi realizada uma infecção *in vivo*. Após 6 semanas, os animais foram submetidos à eutanásia para coleta de fragmentos de órgãos (espelho nasal, pulmão, baço, fígado e testículo). Os mesmos foram semeados em meio NNN-LIT e observados até o aparecimento dos parasitos. Foi possível isolar o parasito apenas do baço confirmando os resultados da histologia. Em conclusão, foi possível distinguir as diferentes cepas/espécies do subgênero *Mundinia* utilizando-se a técnica RFLP-PCR. Esta técnica foi eficaz para detectar DNA do parasito em alguns órgãos. Nossos resultados mostraram que a *L. enriettii* possui tropismo para o baço. Nossos dados moleculares sugerem que a cepa cobaia de *L. enriettii* possui um perfil desconhecido que deve ser melhor explorado para uma classificação taxonômica mais correta.

Palavras-chave: *Leishmania enriettii*, *Mundinia*, visceralização

ABSTRACT

Leishmania enriettii was first described in 1948 and, in 2016 it was reclassified into a new subgenus denominated *Mundinia*. In this subgenus, there are also other species such as *Leishmania martiniquensis*, *Leishmania orientalis* and *Leishmania macropodum*. In this study, we tried to establish phylogenetic relationships between three of these species and to provide a molecular technique for the rapid identification of these parasites. The cultured parasites were submitted to the PCR-RFLP technique with the primers for the *hsp70* and ITS1 genes. The *hsp70* gene fragment was sequenced and the dendrogram produced. In this target, one of the strains of *L. enriettii* (Cobaia) was grouped in the *Leishmania* branch. This result caught our attention and we also decided to sequence the ITS1 gene fragment. In this target, the Cobaia strain of *L. enriettii* was grouped with those of the other species of the subgenus *Mundinia*. After successfully standardizing this PCR, it was further used to study visceralization in guinea pigs infected with *L. enriettii* L88 strain. Histological analyses of our group have already indicated this phenomenon in some organs (trachea, spleen, liver and lungs) at different times of infection (4, 8 and 12 weeks post infection). Thus, we extracted the DNA from paraffin blocks and performed the PCR targeting the *hsp70* gene again. A clear kinetics was observed. Parasite's DNA was detected in the trachea and spleen after 4 and 8 weeks of infection. After 12 weeks, no DNA was detected. With these results in hands, an in vivo infection was performed in order to confirm the presence of the parasite in the spleen. After 6 weeks of infection, the animals were euthanized and organ fragments were collected (nasal mirror, lungs, spleen, liver and testicles). They were sown in NNN-LIT medium and observed until the parasites appearance. It was possible to isolate parasites only from spleen, confirming histology results. In conclusion, it was possible to distinguish the different strains / species of the subgenus *Mundinia* using the RFLP-PCR technique. This technique was effective in detecting parasite DNA in some organs. Our results showed that *L. enriettii* has tropism for the spleen. Our molecular data suggests that the Cobaia strain of *L. enriettii* has an unknown profile that should be better explored for a more correct taxonomic classification.

Key words: *Leishmania enriettii*, *Mundinia*, visceralization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crescimento para <i>Leishmania enriettii</i> (cepas L88 e Cobaia) em meio M199 completo.....	33
Figura 2: Amplificação dos fragmentos dos genes <i>hsp70</i> (A) e ITS1 (B).....	34
Figura 3: Perfil de restrição utilizando a enzima <i>HaeIII</i> dos fragmentos dos genes <i>hsp70</i> (A) e ITS1 (B).....	34
Figura 4: Dendograma gerado pelo método de máxima verossimilhança no Programa Mega X utilizando sequências do alvo <i>hsp70</i> .).....	35
Figura 5: Detecção de DNA em amostras de tecidos de <i>C. porcellus</i> infectados com <i>L. enriettii</i> usando o alvo <i>hsp70</i> em diferentes semanas pós-infecção.....	36
Figura 6: Desenvolvimento de lesões cutâneas em <i>C. porcellus</i> infectados por <i>L. enriettii</i>	37
Figura 7: Cultura contendo formas variantes de <i>L. enriettii</i> isolados do baço de <i>C. porcellus</i>	38
Figura 8: Amplificação do alvo <i>hsp70</i> (A) e perfil de restrição com a enzima <i>HaeIII</i> (B) dos isolados de cultura (1) e baço (2) de <i>L. enriettii</i>	38

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD: Demanda Bioquímica do Oxigênio
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
DMSO: dimetil sulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
gGAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GIPLs: Glicoinositol-fosfolípidos
GSF: Glândula Salivar de Flebotomíneo
HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
hsp70: proteína de choque térmico de 70 kilodáltons
ICB: Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ : interferon gama
IL: interleucina
ITS1: Espaçador transcrito interno 1
LC: Leishmaniose Cutânea
LPG: Lipofosfoglicano
LT: Leishmaniose Tegumentar
LV: Leishmaniose Visceral
mg: miligramas
mM: milimolar
ng: nanogramas
NK: célula *natural killer*
nm: nanomoles
NNN-LIT: Neal, Novy, Nicolle - Liver Infusion Tryptose
NO: óxido nítrico (nitric oxide)
°C: graus Celcius
pb: pares de bases
PBS: tampão fosfato-salino (phosphate-buffered saline)
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
PM: peso molecular
RFLP: Polimorfismo de Tamanho no Fragmento de Restrição
rpm: rotações por minuto
TNF: fator de necrose tumoral (tumor necrosis factor)

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

μL : microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Leishmanioses e <i>Leishmania enriettii</i>	15
2.2	Aspectos taxonômicos	17
2.3	Distribuição e Epidemiologia	18
2.4	Visceralização por <i>Leishmania enriettii</i>	20
3	JUSTIFICATIVA	22
4	OBJETIVO GERAL	23
4.1	Objetivos específicos:	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1	Cepas e condições de cultivo	24
5.2	Amostras de tecido parafinado	25
5.3	Procedimentos moleculares	25
5.3.1	Extração de DNA de promastigotas em meio de cultura	25
5.3.2	Extração de DNA de material parafinados	26
5.3.3	PCR-RFLP do alvo <i>hsp70</i>	27
5.3.4	PCR-RFLP do alvo ITS1	28
5.4	Sequenciamento dos alvos moleculares	28
5.5	Animais e Comissão de ética e Uso de Animais – CEUA	29
5.6	Infecção experimental	29
5.6.1	Inoculação intradérmica	29
5.7	Eutanásia e necropsia	30
5.8	Avaliações Clínicas	30
5.9	Isolamento de cepa	30
6	RESULTADOS	32
6.1	Curva de crescimento	32
6.2	Identificação específica das amostras estudadas	32
6.3	PCR RFLP dos alvos <i>hsp70</i> e ITS1 após digestão com <i>HaeIII</i>	33
6.4	Análise filogenética	34
6.5	Avaliação da presença de DNA de <i>L. enriettii</i> em diferentes órgãos de <i>C. porcellus</i>	35
6.6	Confirmação da visceralização de <i>L. enriettii</i> em <i>C. porcellus</i> experimentalmente infectados	36
7	DISCUSSÃO	39
8	conclusões	45
9	PERSPECTIVAS	46
10	REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Leishmania enriettii, é um parasito que recentemente foi incluído no subgênero *Mundinia*. Foi descrito pela primeira vez, em 1948, pelos pesquisadores brasileiros Muniz e Medina em seu único hospedeiro vertebrado conhecido, o cobaia (*Cavia porcellus*) (MUNIZ & MEDINA, 1948).

Após décadas do descobrimento de *L. enriettii*, um parasito semelhante foi encontrado infectando oportunisticamente cangurus na Austrália, a *Leishmania macropodum* (ROSE et al., 2004, DOUGAL et al., 2011). Seguido a estes parasitos, outras espécies foram descritas incluindo, *Leishmania (Mundinia) martiniquensis* (DESBOIS et al., 2014), *Leishmania (Mundinia) orientalis* (JARIYAPAN et al., 2018) e *Leishmania (Mundinia) macropodum* (KAUFER et al., 2017). Estes parasitos tem despertado a atenção especial dentro da Parasitologia, a ponto de ser descrito um novo subgênero (*Mundinia*), para agrupá-los (ESPINOSA et al., 2016). Uma característica marcante das espécies deste subgênero é sua plasticidade fenotípica sendo capazes de infectar vários hospedeiros vertebrados como o homem, bovinos, equinos e causar formas cutâneas e viscerais em pacientes HIV positivos (SERENO et al., 2019). Um outro aspecto interessante, é que os membros desse subgênero são capazes de infectar outros vetores não flebotomíneos como os ceratopogonídeos (SEBLOVA et al. 2015; CHANMOL et al., 2019).

A espécie *L. enriettii* foi utilizada por muitos anos como modelo de estudo para a leishmaniose cutânea, na quimioterapia e biologia molecular (PARAENSE, 1953; BRYCESON et al., 1974; SCHOTTELIUS, 1987; BELEHU & TURK, 1976; WONG & CHOW, 2006; WONG et al., 2007; PARANAIBA et al., 2015). Na literatura já foram investigados vários isolados das cepas referência para a espécie *L. enriettii*, destacam-se duas a L88 e a Cobaia isoladas em dois momentos distintos (1945 e 1985), respectivamente, que constituem um material biológico valioso por apresentarem características completamente diferentes. Baseado nisso, nosso grupo tem estudado estas cepas desde 2012 enfocando vários aspectos da interação parasito-hospedeiro (PARANAIBA et al., 2015; 2017; 2018; PINHEIRO et al., 2018).

Ao longo dos 75 anos da descoberta de *L. enriettii*, existem vários aspectos ainda não elucidados da infecção por esse parasito que necessitam ser compreendidos. Um destes aspectos inclui a tipagem molecular destas cepas/espécies utilizando uma metodologia mais simples do que um sequenciamento (JARIYAPAN et al., 2018). Além disso, embora estudos

iniciais tenham indicado a ocorrência de visceralização (MUNIZ & MEDINA, 1948), um estudo mais detalhado sobre a cinética deste fenômeno com técnicas mais sensíveis ainda não foi realizado.

Portanto, este trabalho é o primeiro com o objetivo de avaliar a capacidade de visceralização de *L. enriettii*, analisando a presença de seu DNA em diferentes órgãos de *C. porcellus*. Além disso, têm como finalidade, apresentar o perfil molecular de diferentes espécies do subgênero *Mundinia*, facilitando a identificação e diagnóstico dessas espécies. Este estudo poderá ajudar a entender como *L. enriettii* e suas correlatadas conseguem ter ampla plasticidade fenotípica, sendo capazes de infectar diferentes hospedeiros no mundo inteiro, causando formas cutâneas e viscerais (MUNIZ & MEDINA, 1948; DESBOIS et al., 2014; JARIYAPAN et al., 2018; KAUFER et al., 2017), permitindo uma melhor compreensão sobre a biologia desses parasitos .

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmanioses e *Leishmania enriettii*

As leishmanioses são doenças causadas pelos protozoários flagelados da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*. Elas causam um amplo espectro de manifestações clínicas, podendo se apresentar como tegumentar (LT) ou visceral (LV), de acordo com a espécie. Elas são transmitidas ao homem por picada de insetos hematófagos infectados, pertencente a dois gêneros principais: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (YOUNG & DUNCAN, 1994). Trabalhos recentes apontam membros da família Ceratopogonidae como potenciais vetores para espécies recentemente descritas de *Leishmania* (SEBLOVA et al., 2015; CHANMOL et al., 2019). Estas doenças são ocasionalmente antroponóticas, mas mais tipicamente zoonóticas, e existem várias espécies descritas que só são conhecidas por infectar animais (LAINSON & SHAW, 1997).

Dentre estas, a *Leishmania (Mundinia) enriettii* (MUNIZ & MEDINA, 1948; MACHADO et al., 1994; LAINSON & SHAW, 1997), é uma espécie ainda não descrita infectando o homem, que tem como hospedeiro vertebrado o roedor *Cavia porcellus*, conhecidos popularmente como cobaia. O subgênero *Mundinia* foi criado recentemente a fim de agrupar os parasitos incluídos anteriormente no complexo *enriettii* (DOUGALL et al., 2011) que são: *Leishmania (Mundinia) enriettii*, *L. (Mundinia) martiniquensis*, *L. (Mundinia) orientalis* (em substituição a “*L. siamensis*”) e *L. (Mundinia) macropodum* (ESPINOSA et al., 2016).

O primeiro caso reportado de *L. enriettii* foi descrito em 1946 por Muniz e Medina no Sul do Brasil. Ao estudar fungos *Paracoccidioide brasiliensis* isolados em Santa Catarina, Medina se deparou com animais apresentando formações tumorais nos pavilhões auriculares. Após realizar punção exploratória e estudos histopatológicos, foram observados infiltrados de células redondas, multinucleadas e macrófagos, cujo citoplasma apresentava numerosas formas amastigotas (MUNIZ & MEDINA, 1948; PARANAIBA et al., 2017). Estes autores fizeram um estudo bem detalhado sobre a biologia desta espécie que é referência para os parasitologistas desta área.

Muniz e Medina (1948) reproduziram a doença em cobaias. Após infecção experimental, foi observado o aparecimento das primeiras lesões na pele ou em locais diferentes dos que haviam sido inoculados. Em um período de 6 semanas, foram observadas lesões cutâneas generalizadas, na pele, orelhas e escroto. Quando puncionados, o expirado

destas lesões e de outras regiões aparentemente sadias, apresentavam macrófagos com infiltrado de parasitos. Com relação às modificações orgânicas, o baço, fígado, gânglios linfáticos e pulmão, apresentaram alterações como, por exemplo, hipertrofia dentre outras alterações histológicas. Os autores consideraram o cobaio 100% infectivo para *L. enriettii*, independente da via de inoculação (MUNIZ & MEDINA, 1948). Eles observaram que durante todo o curso da doença, ocorriam lesões longe do local de inoculação, resultado da disseminação sistêmica do parasito (MUNIZ & MEDINA, 1948). Essa disseminação estaria ocorrendo, segundo os autores, via linfática, o que mais tarde foi confirmado (MUNIZ & MEDINA, 1948; PARAENSE, 1953).

Muniz e Medina tentaram ainda reproduzir a doença em diferentes mamíferos, incluindo o macaco, o hamster, o cão e o preá (*Cavia aperea*). Utilizaram suspensões contendo cultura de *L. enriettii* através de inoculações subcutâneas ou peritoneais, mas não conseguiram reproduzir qualquer infecção detectável, com exceção em um hamster, que dos oito animais infectados, foi observado uma pequena lesão na pele (MUNIZ & MEDINA, 1948). Estes resultados foram criticados por Lainson (1979), que sugeriu ter ocorrido falha na observação da infecção em *C. aperea*, que poderia ter desenvolvido uma infecção inaparente e ausência nas lesões de pele (LAINSON et al., 1979). Além disso, esta infecção foi realizada com seringa sem a presença de glândulas salivares e naquela época não havia técnicas moleculares tão sensíveis para se detectar o parasito.

Na busca de um modelo animal interessante para a manutenção das espécies do subgênero *Mundinia*, um estudo recente realizou infecção em *C. porcellus* utilizando *L. enriettii*, *L. martiniquensis*, *L. orientalis*, *L. macropodum* e *Leishmania* sp (isolado de Gana) (BECVAR et al., 2020). Corroborando com os resultados da literatura, *L. enriettii* foi a única espécie capaz de causar lesões nas orelhas das cobaias. Isto em teoria mostra que *C. porcellus* não seria um bom hospedeiro para as espécies *Mundinia*. Entretanto, este trabalho não utilizou a glândula salivar de flebotômico junto com os parasitos o que poderia justificar este insucesso (PARANAIBA et al., 2015; PINHEIRO et al., 2018).

Os relatos de isolamento de *L. enriettii* na literatura são muito escassos e inclusive nem sabemos se ocorre um hospedeiro selvagem para esta espécie. Posteriormente ao isolamento da cepa L88 em 1945, em junho de 1988, dois cobaios comprados no mercado municipal em São Paulo foram levados para uma fazenda em Capão Bonito, em área próxima à Mata Atlântica. Após um período neste local, os animais desenvolveram nódulos nas orelhas, que ulceraram rapidamente, e foram então levados para o Instituto de Ciências Biomédicas em São Paulo. Após estudos isoenzimáticos, histológicos e parasitológicos os

autores também afirmaram se tratar de *L. enriettii* (MACHADO et al., 1994; LAINSON & SHAW, 1997). Entretanto, como estes animais se infectaram ainda permanece uma lacuna na literatura da epidemiologia das leishmanioses.

2.2 Aspectos taxonômicos

Inicialmente, a *L. enriettii* era considerada uma espécie do subgênero *Leishmania* por apresentar desenvolvimento suprapilárico de acordo com a classificação de Laison & Shaw (1987). Com a descrição de *L. macropodum* em 2011, os autores sugeriram a criação do termo complexo *enriettii* (DOUGALL et al., 2011; PARANAIBA et al. 2017). Este termo foi abandonado após a definição do subgênero *Mundinia*, sendo agora seu uso consagrado por vários autores (ESPINOSA et al., 2016; PARANAIBA et al., 2018; BUTENKO et al., 2019). O subgênero *Mundinia* é dito eclético, pois agrupa espécies que patogênicas ao homem (*L. martiniquensis/L. orientalis*) e outras que até o momento não foram descritas infectando o homem (*L. enriettii/L. macropodum*) e é encontrando em praticamente todos os continentes (PARANAIBA et al., 2018). De forma geral, a variedade de hospedeiros, patogenicidade e caráter oportunista das espécies pertencentes ao subgênero *Mundinia* pode ser explicada pela sua posição basal na filogenia de *Leishmania*.

Para esclarecer as relações taxonômicas dentro deste grupo controverso, estudos recentes realizaram o sequenciamento genômico total de *L. enriettii*, *L. martiniquensis* e *L. macropodum* (BUTENKO et al. 2019). Estes resultados confirmaram a separação dos 3 subgêneros em *Leishmania* e estes dados reforçam a hipótese da origem supercontinental do subgênero *Mundinia*. Isso explicaria, em parte, a sua distribuição em vários os continentes (KWAKYE-NUAKO et al., 2015). Outro fator interessante é que devido à sua posição no cladograma, o subgênero *Mundinia* seria o grupo mais primitivo entre as *Leishmania* spp. Isso poderia justificar sua alta plasticidade fenotípica e capacidade de causar tanto formas tegumentares quanto viscerais, reforçando a necessidade de maiores estudos com estes parasitos, atualmente um grupo bastante relevante dentro da parasitologia.

Recentemente, a técnica de sequenciamento permitiu a identificação da espécie *L. orientalis*, responsável por causar LC na Tailândia. Neste estudo, foi possível definir a classificação dessa espécie, anteriormente denominada “*L. siamensis*”. Os autores utilizaram análises de produtos amplificados por PCR dirigidas aos alvos *hsp70*, *ITS1*, *RNAPolIII* e *RPL23a*, seguida de sequenciamento e análise filogenética (JARIYAPAN et al., 2018). Juntamente com *L. martiniquensis*, essas espécies são responsáveis por praticamente todos

os casos de LC e LV reportados na Tailândia. A técnica de sequenciamento não está disponível em larga escala. Sendo assim, o desenvolvimento de metodologias e técnicas mais acessíveis são imprescindíveis para a correta identificação. Uma técnica mais acessível e muito utilizada é a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), seguida de RFLP (polimorfismo gerado por enzimas de restrição) (FERNANDES et al., 1994; MENDONZA-LEON et al., 1995). Esta técnica pode ser aplicada em diferentes amostras, como no tecido de pele ou fragmentos de órgãos, medula óssea ou sangue, permitindo assim a identificação e discriminação com diferentes espécies de *Leishmania* (MANNA et al. 2004). Neste contexto, propomos neste trabalho a utilização desta técnica para a identificação de 3 espécies do subgênero *Mundinia*.

2.3 Distribuição e Epidemiologia

Os parasitos do subgênero *Mundinia* estão amplamente distribuídos no mundo. Vários artigos descrevendo sua presença em áreas geograficamente distantes e distintas foram publicados nos últimos anos. Estes locais incluem Tailândia, Martinica, Suíça, Austrália, Gana, Brasil e Estados Unidos (PARANAIBA et al., 2018). Em 1948, a espécie *L. enriettii* após ser isolada de cobaias, permaneceu durante décadas a única espécie descrita no atual subgênero *Mundinia*. Embora existam relatos de infecções cutâneas na Ilha da Martinica que datam de 1917, somente em 2001, foi reportado o 1º caso comprovadamente causado por *Leishmania*. Entretanto, a espécie foi formalmente descrita em 2013 e denominada *L. martiniquensis* (NOYES et al., 2002; DESBOIS et al, 2014; POTHIRAT et al., 2014). Em 2002, em Gana, foi isolado uma cepa de lesões cutâneas de pacientes humanos (KWAKYE-NUAKU et al., 2015). Porém, o isolado de Gana ainda aguarda uma classificação mais adequada, devendo-se tratar de *L. orientalis* em razão dos estudos moleculares preliminares. Em 2008, *L. martiniquensis* foi isolada na Tailândia em lesões de LV em humanos. Surpreendentemente esta mesma espécie foi isolada de cavalos e vacas na Alemanha e Suíça em 2009, e nos Estados Unidos em 2011 (LOBSIGER et al., 2010; REUSS et al., 2012). Ainda em 2011, a espécie *L. macropodum* foi relatada, isolada de cangurus vermelhos e marsupiais que apresentavam LC (ROSE et al., 2004; DOUGALL et al., 2009; DOUGALL, 2011). Finalmente, em 2018 foi descrita a espécie *L. orientalis* responsável por LC em humanos (JARIYAPAN et al., 2018). Do que foi exposto, fica bastante evidente as modificações na taxonomia desta espécie ao longo dos anos, ainda sendo passível de novas alterações.

Ainda hoje, a identificação e confirmação do reservatório natural de *L. enriettii* é um problema na epidemiologia desta espécie. Um trabalho interessante avaliou por PCR a presença de *Leishmania* spp em carcaças de animais atropelados em estradas no estado de São Paulo (RICHINI-PEREIRA et al., 2014). Estes autores encontraram DNA de *Leishmania* no coração de um *Cavia aperea*. Porém, a espécie não foi identificada por estes autores. Embora seja comum encontrar roedores como reservatórios de *Leishmania* no Brasil, em 2004 na Austrália foi isolado de um canguru vermelho de cativeiro (*Macropus rufus*) um parasito similar que foi agrupado como membro do complexo *enriettii* (ROSE et al., 2004). Poucos anos depois, foram identificados em diferentes espécies de marsupiais Wallaroos (DOUGALL et al., 2011). Vale ressaltar que estes estudos na Austrália reativaram o interesse em se estudar *L. enriettii* em vários grupos no Brasil e no mundo.

Além das lacunas relacionadas aos hospedeiros vertebrados, ainda existem dúvidas em relação aos invertebrados. Nos artigos citados anteriormente, a fonte de infecção dos cobaias é, ainda hoje, um mistério. Em 1967, Luz et al., fizeram um trabalho de levantamento faunístico na região de Capão Bonito, onde haviam sido encontrados cobaias infectados. Foram coletados exemplares de *Lutzomyia monticola* e *L. correalimai*. A espécie *L. monticola* obteve 60% de infecção em seu intestino médio quando alimentadas em lesões de cobaias infectados. Porém, quando inoculadas na pele de cobaias as formas promastigotas não conseguiram produzir infecção. Portanto, não foi confirmada como espécie vetora, uma vez que não atende a todos os critérios de validação definidos por Killick-Kendrick (1999). Estes resultados também permitiram observar o desenvolvimento suprapilárico de *L. enriettii* em *Lu. monticola*.

Em 2011, pesquisadores chegaram ao mais próximo de confirmar outro díptero como espécie vetora (DOUGALL et al., 2011). Ao realizarem estudos com flebotomíneos do gênero *Sergentomyia* e não obter sucesso devido à baixa prevalência de infecção, eles partiram para investigação de vetores alternativos como ceratopogonídeos. Os dípteros do subgênero *Forcipomyia* (*Lasiohelea*) sp foram infectados artificialmente e apresentaram alta susceptibilidade para esta *Leishmania*. Embora este vetor tenha se mostrado muito suscetível sob condições de laboratório, o mesmo não era encontrado na região onde os cangurus desenvolveram as lesões. Esses resultados foram confirmados em outro ceratopogonídeo, o *Culicoides sonorensis* utilizando *L. enriettii* (SEBLOVA et al., 2015). Este parasito realizou a metaciclogênese completa dentro deste vetor e, curiosamente, apresentou uma infecção moderada no vetor permissivo *Lutzomyia longipalpis* sob as mesmas condições. Finalmente,

utilizando estes mesmos vetores, foi observado que os ceratopogonídeos se infectaram muito bem com *L. orientalis* (CHANMOL et al., 2019). Estudos recentes mostraram que *Lu. migonei* (um vetor permissivo) foi capaz de se infectar após alimentação em cobaias infectados experimentalmente com *L. enriettii* (BECVAR et al., 2020). Porém, o mesmo não ocorreu para *L. martiniquensis*, *L. macropodum*, *L. orientalis* e *Leishmania* sp (isolado de Gana).

Em última análise, a epidemiologia das espécies do subgênero *Mundinia*, incluindo a identidade e o potencial vetorial dos seus vetores ainda é bastante desconhecida. Entretanto, fica bem claro o potencial dos ceratopogonídeos como modelo de infecção para as espécies do subgênero *Mundinia*. Vale ressaltar que nenhum destes artigos mencionados anteriormente realizou experimentos de transmissão para atender aos critérios de Killick-Kendrick et al. (1999). Por fim, outros vetores além de flebotomíneos devem ser considerados estimulando trabalhos de campo nestes locais como parte dos estudos epidemiológicos.

2.4 Visceralização por *Leishmania enriettii*

Leishmania enriettii é conhecida por causar lesões cutâneas, que regredem após a 90 dias de infecção experimental. A cepa L88 provoca lesões ulceradas e mais exacerbadas na presença de GSF, o mesmo não é observado para a cepa Cobaia que produz apenas um nódulo (PARANAIBA et al., 2015; 2017). O estudo histopatológico das lesões, mostrou que de maneira semelhante ao que foi observado por Paranaíba et al (2015), a cepa L88 foi mais virulenta exibindo um perfil pró-inflamatório mais exacerbado que a cepa cobaia. Pinheiro et al. (2018) avaliou também a cinética do aparecimento dos macrófagos (L1 e CD163) nas diferentes cepas, na ausência/presença da GSF (Glândula Salivar de Flebotomíneo). Neste estudo, observou-se que houve variação, sugerindo que as proteínas da saliva são capazes de modular a infecção não só no início, mas também tardiamente durante a infecção. O grupo de pesquisa do Dr. Rodrigo Soares, atualmente, é o único que possui o modelo de infecção de *L. enriettii* em *C. porcellus* bem estabelecido. Esses resultados foram muito interessantes do ponto de vista da interação parasito hospedeiro, tadavia nenhum deles avaliou a capacidade de visceralização da espécie *L. enriettii* quando inoculada em *C. porcellus*.

Muniz e Medina conseguiram reisolar *L. enriettii* de diferentes órgãos quando infectaram experimentalmente os cobaios, cultivando-os em meio NNN. Entretanto, não ficou esclarecido que mecanismos levariam a visceralização, nem o tempo de permanência

nesses órgãos. Com o objetivo de entender os mecanismos que levam a disseminação do parasito pelo corpo do hospedeiro, Paraense et al., (1953), infectaram experimentalmente *C. porcellus* com *L. enriettii*. Eles observaram que quando inoculados por via intradérmica na orelha dos cobaias, a *L. enriettii* era capaz de produzir uma infecção local. Estes autores sugeriram que os parasitos poderiam se disseminar via corrente linfática até os linfonodos, onde seriam destruídos, seguindo a partir daí por meio da via sanguínea. Entretanto, os mecanismos que levam este parasito ao seu tropismo a diferentes órgãos ainda permanecem obscuros (PARAENSE, 1953).

A capacidade de visceralização já foi vista em espécies do subgênero *Mundinia* como *L. martiniquensis*, um parasito oportunista que foi relatado em casos de infecção cutânea e visceral em indivíduos imunossuprimidos (LIAUTAUD et al., 2014, LEELAYOOVA et al., 2017). Em Londres, foi identificada “*L. siamensis*” em um caso isolado de paciente da Guiana, apresentando VL assintomático, negativa para HIV (POLLEY et al., 2018).

Resultados preliminares do nosso grupo da avaliação histológica da traqueia e pulmão de cobaias infectados com *L. enriettii*, revelaram um perfil inflamatório de moderado a intenso e difuso, alterando a arquitetura dos órgãos avaliados. Foi notório um infiltrado de células mononucleares e possível observar, também, a presença de formas amastigotas no interior de macrófagos na traquéia e pulmão (dados não publicados). Estes resultados nos impulsionaram a investigar mais a fundo a capacidade e a cinética da visceralização por *L. enriettii* em seu hospedeiro vertebrado. Conforme o que foi exposto, vários aspectos ainda permanecem desconhecidos, sendo necessários estudos sobre os mecanismos de disseminação do parasito, assim como, a resposta inflamatória frente à infecção de *L. enriettii* em *C. porcellus*, que permitam a compreensão da biologia deste parasito.

3 JUSTIFICATIVA

O subgênero *Mundinia* abrange espécies com importância médica humana e veterinária, especialmente em indivíduos imunossuprimidos. Esse fato reforça ainda mais a necessidade de se estudar estas espécies.

A caracterização molecular por meio da PCR-RFLP desses parasitos permite o emprego de metodologias rápidas e acessíveis, para identificação e diagnóstico de diferentes espécies desse subgênero, fornecendo também uma discriminação entre as espécies *L. enrietti*, *L. martiniquensis* e *L. orientalis* das demais espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*.

Muitos aspectos permanecem ainda obscuros com relação a *L. enrietti*, esse trabalho faz parte de uma linha de pesquisa que abrange aspectos como os hospedeiros silvestres, não é conhecido se ocorre um reservatório silvestre e qual seria este. Em 2016, Richini-Pereira publicou um trabalho interessante envolvendo animais silvestres, que revelou a presença de DNA de *Leishmania* sp no tecido cardíaco de carcaças de *Cavia aperea* atropelados, entretanto eles só chegaram em gênero. Outro fator importante que ainda não está elucidado seriam seus vetores, o único trabalho que estudou o hospedeiro invertebrado foi o de Luz (1967), e eles não conseguiram incriminar *Lu. monticola* como espécie vetora. Embora seja conhecido evidências da visceralização, não é conhecido como ela ocorre, se ocorre por exemplo, de forma transiente.

Com base nas informações citadas, esse trabalho visa elucidar a disseminação de *L. enrietti*, avaliando a visceralização em diferentes órgãos de *C. porcellus*. Além disso, a análise da patogenia dessa infecção permitirá esclarecer se ocorre cura clínica ou se a infecção permanece latente. Estes estudos utilizando técnicas mais modernas permitirão compreender melhor a biologia desse parasito.

4 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de tipagem em três espécies do subgênero *Mundinia* e avaliar a visceralização de *L. enriettii* em de *C. porcellus*.

4.1 Objetivos específicos:

- Determinar o perfil molecular de diferentes cepas do subgênero *Mundinia*;
- Detectar a presença do DNA de *L. enriettii* em órgãos de *C. porcellus*;
- Isolar o parasito do órgão de *C. porcellus*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Cepas e condições de cultivo

As formas promastigotas da cepa de *L. enriettii* (MCAV/BR/1945/L88) de referência da Organização Mundial de Saúde foi isolada de cobaias. Os parasitos foram mantidos em estufa BOD a 25 °C em meio definido 199 (Sigma®), acrescido de soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/ml), streptomomicina (50 µg/ml), glutamina (12,5 mM), hepes (40 mM), adenina (0,1mM) e hemina (0,0005%), pH 7,4 (Soares et al., 2002). As outras cepas de referência (Tabela 1) foram mantidas sob as mesmas condições até a extração do DNA.

Tabela 1: Cepas de referência da OMS utilizadas no estudo.

Espécie	Código Internacional	Forma Clínica
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/2903	LC
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	MHOM/BR/75/M4147	LC
<i>L. (Leishmania) major</i>	MHOM/IL/80/Friedlin	LC
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/75/PH8	LC
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/74/PP75	LV
<i>L. (Mundinia) enriettii</i>	MCAV/BR/1945/L88	LC
	MCAV/BR/1985/COBAIA_SP;	LC
<i>L. (Mundinia) martiniquensis</i>	MHOM/MQ/1992/MAR1	LV e LC
<i>L. (Mundinia) orientalis</i>	MHOM/MQ/2014/LSCM4	LC

Somente para *L. enrietti* (cepas L88 e Cobaia) foram realizadas curvas de crescimento. Os parasitos foram cultivados em garrafas de cultura sendo a curva de crescimento iniciada com 1×10^5 parasitos/mL. A mesma foi feita em triplicata, sendo o crescimento monitorado diariamente por dez dias e contados em câmara de Neubauer. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL. Os dados foram plotados e a análise foi feita pelo software GraphPad Prism 5.0. Foram determinadas a fase logarítmica e a estacionária do crescimento.

5.2 Amostras de tecido parafinado

As amostras de tecido parafinado foram obtidas por meio da colaboração da Dra. Lucélia Pinheiro do LPL (Laboratório de Patologia das Leishmanioses), Departamento de Patologia do ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais em parceria com o grupo pesquisa do Dr. Rodrigo Soares do Instituto René Rachou.

O material provindo do trabalho do doutorado da Pinheiro et al., (2018) foi obtido, após infecção pela cepa L88 de *L. enriettii* em *C. porcellus*, foram utilizados 3 animais para coleta dos tecidos nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas após infecção. Utilizaram-se os tecidos de traqueia, pulmão, baço e fígado, em blocos parafinados, que haviam sido previamente fixados em formol. Realizou-se cortes em micrótomo, em torno de 15 cortes por bloco, com espessura de 5µm cada corte, o material foi armazenado em tubos de poliestireno de 1,5 mL. Para extração do DNA, o material coletado foi agrupado em pool representando o 1º, 2º e 3º mês de infecção.

5.3 Procedimentos moleculares

5.3.1 Extração de DNA de promastigotas em meio de cultura

Amostras de parasitos (Tabela 1) e do isolado obtido após infecção, foram submetidas à extração do DNA genômico utilizando o Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com algumas modificações para otimização.

As formas promastigotas das amostras de *Leishmania*, na concentração de 10^7 parasitos, foram homogeneizadas no vórtex por 20 segundos, seguida da adição de 300 µL de solução de lise e 1,5 µL de proteinase K (1mg/mL), homogeneizadas por 20 segundos e incubadas a 65 °C por 1 hora. Após o período de incubação adicionou-se 100 µL de solução de precipitação de proteínas à solução, que foi homogeneizada por 20 segundos e incubada por cinco minutos no gelo. Posteriormente os tubos foram vortexados por 20 segundos, seguido de centrifugação por cinco minutos a 12000 g e a fase aquosa sobrenadante transferida para um tubo novo. Foram adicionados 300 µL de isopropanol vertendo cuidadosamente por inversão à amostra remanescente (fase aquosa), seguida de outra centrifugação por cinco minutos a 12000 g. Após esse passo, o sobrenadante foi descartado e o tubo foi seco em inversão contra papel absorvente. Foi adicionado 300 µL de etanol 70% ao tubo já seco e invertido várias vezes seguido de outra centrifugação a 12000 g por cinco

minutos. Por fim o sobrenadante foi descartado e o tubo permaneceu invertido contra papel absorvente até secar completamente. Ao final, foram adicionados 100 μL de solução de hidratação, seguida de incubação à 65 °C por uma hora e posteriormente deixadas a temperatura ambiente por 12 h, sendo estocadas ao final à temperatura de -20 °C.

Após a extração foi realizada a quantificação do DNA em todas as amostras, verificando a presença, concentração e qualidade do material extraído. Para este procedimento foi utilizado o espectrofotômetro de microvolume Nanodrop®-1000. As amostras de DNA foram diluídas para a concentração de 100ng/ μL para realização da PCR.

5.3.2 Extração de DNA de material parafinado

Para extração de DNA das amostras contendo material parafinado, foram testados dois protocolos, conforme descrito abaixo.

Protocolo 1 – Xilol (adaptado de TANG et al., 2009): foram adicionados 900 μL de Xilol nos tubos contendo o tecido parafinado e incubados por 20 min à 95 °C, após este passo, retirou-se o xilol, com auxílio de pipeta, preservando-se o tecido, repetimos este procedimento por mais 2 vezes.

Protocolo 2 – Óleo Mineral (adaptado de LIN et al., 2009): as amostras contendo o tecido parafinado foram acrescidas de 900 μL de óleo mineral e incubadas à 55 °C por 1 hora. Em seguida, retirou-se o óleo com auxílio de pipeta, preservando-se o tecido, repetimos este procedimento por mais 3 vezes.

Após certificar a ausência de parafina nas amostras, seguiu-se com a extração do DNA genômico utilizando o Kit de Extração de tecido e células Genra Puregene® da QIAGEN, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante com algumas modificações para otimização. Em todas as amostras foram adicionados 300 μL de solução de lise e 1,5 μL de proteinase K (1 mg/mL) seguido de incubação à 65 °C por 48 horas. Após esse período, foi adicionado 1,5 μL de RNase A, invertendo os tubos por aproximadamente 25 vezes, seguida de incubação a 37 °C por 45 min. Após o período de incubação adicionou o protocolo seguiu-se conforme descrito no item anterior.

5.3.3 PCR-RFLP do alvo *hsp70*

Para a PCR foi utilizado um par de iniciadores que amplificam a região de *hsp70* (Proteínas de Choque Térmico de 70 kilodaltons) que compreende uma família de genes altamente conservados com seqüências codificadoras em diferentes organismos (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007). Os iniciadores utilizados, que geram um fragmento de aproximadamente 1300 pares de bases, foram: *hsp70* F 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3' e *hsp70* R 5'CCGCCCATGCTCTGGTACATC3' (GARCIA et al., 2004).

Foram utilizados controles negativos sem DNA e positivos com DNA extraído de cultura de *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. enriettii* (L88 e Cobaia), *L. martiniquensis* e *L. orientalis* (Tabela 1).

As reações foram feitas com volume final de para um volume final de 25µL, sendo 5,0 µL de DNA, solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl) , 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP mix (New england), 5,0% DMSO (Invitrogen), 2,5 unidades de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,4 pmol de iniciador senso 0,4 pmol de iniciador anti-senso, acrescidos de água mili-Q para se obter o volume final. A amplificação do DNA molde foi processada em termociclador automático de DNA (Eppendorf) utilizando o seguinte protocolo, desnaturação inicial a 94 °C por 4 min, alternando 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 seg, anelamento a 61 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 3 min, seguido por um passo de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% corados com GelRed (Biotium), acrescidos de tampão da amostra (Loading Dye 6x - Promega), diferença de potencial de 100 V em tampão TBE (Tris borato EDTA). Um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb (1 Kb Plus DNA Ladder) foi utilizado. Os resultados foram observados e fotografados em transluminador.

As amostras foram submetidas à digestão utilizando a enzima *HaeIII* para análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP). A reação de digestão foi preparada para um volume final de 15 µL, contendo 0,1 µL de *HaeIII* (New england) (10 U/µL), 1,5 µL de tampão da enzima 10 x, 10 µL de produto de PCR e 2,4 µL de água mili-Q. A mistura então foi incubada a 37°C por 2 horas. Os perfis de restrição foram analisados em gel de agarose 4% e comparados com o padrão obtido pela digestão do produto de PCR das cepas utilizadas como referência (*L. guyanensis*, *L. braziliensis*, *L. major*, *L. amazonensis*, e *L. infantum*).

5.3.4 PCR-RFLP do alvo ITS1

Foram utilizados iniciadores LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S 5' TGATAACCACTTATCGCACTT 3', que amplificam um fragmento de aproximadamente 300 a 350 pares de bases (SCHÖNIAN et al., 2003). As reações de PCR foram feitas com o volume final de 25 µL. Foi adicionado solução tampão 1x (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500Mm KCl), 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTP mix, 0,5 pmol do iniciador LITSR, 0,5 pmol do iniciador L5.8S, 1 U de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 5 µL de DNA molde acrescidos de água mili-Q para se obter um volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada com desnaturação inicial de 95 °C por 5 min, alternando 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 seg, anelamento a 53 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min em equipamento termociclador automático de DNA (Eppendorf). A visualização da amplificação e a reação de RFLP subsequente, utilizando a enzima *Hae*III, foi preparada como descrito no item anterior.

5.4 Sequenciamento dos alvos moleculares

Os fragmentos do *hsp70* e ITS1 foram sequenciados através da metodologia empregada por Sanger (1975). Os produtos de PCR obtidos a partir da amplificação com os iniciadores foram preparados de forma a obter uma mistura contendo 1 µL dos produtos purificados, 1 µL de cada iniciador na concentração de 5,0 pmol/µL, senso e anti-senso, em tubos separados, 1,75 µL de 5x Sequencing Buffer, 0,5 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing e água destilada em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL. O programa utilizado foi temperatura inicial de 96 °C por 1 minuto, alternando 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, anelamento em temperaturas crescentes a partir de 50 °C aumentando 1 °C por segundo, seguido por passo de extensão a 60 °C por 4 minutos. As sequências foram determinadas pelo sequenciador automático de DNA ABI 3730xl DNA Analyzer. O eletroferograma correspondente a cada sequência obtida foi previamente avaliado no software FinchTV versão 1.4.0 (Geospiza, Inc, Seattle, WA). Posteriormente, foi utilizado o software BioEdit versão 7.0.9 (HALL, 2011) para construção da sequência complementar reversa proveniente do primer *reverse* e construção da sequência consenso. A similaridade entre as sequências foi verificada através da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) de acordo com as sequências homólogas depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, U.S. National Library of

Medicine). A ferramenta ClustalW (Bioedit) foi utilizada para obtenção do alinhamento múltiplo de nucleotídeos. Os dendogramas foram construídos pelo método de máxima verossimilhança e modelo Kimura-2-parâmetro (KIMURA, 1980) com suporte de 1000 replicações de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), utilizando o software Mega X (KUMAR et al., 2018).

5.5 Animais e Comissão de ética e Uso de Animais – CEUA

O modelo animal escolhido foi *C. porcellus* machos jovens, que foram criados conforme as Normas Internacionais de Criação e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Experimental Animals, 1996*) em consonância com o Comitê de Ética de Uso Animal CEUA - Fiocruz, com licença LW-24 /19, obtidos do Centro de Criação Animais de Laboratório (CECAL) – Fiocruz / Rio de Janeiro.

Os animais foram mantidos em gaiolas (94x61x30cm), com livre acesso à água e comida, em sala com temperatura controlada (em torno de 24 °C) e ciclo claro/escuro natural (12 horas de claridade a partir das 7:00 hrs) no Biotério de Experimentação do Instituto de pesquisa René Rachou. Foram mantidos os mesmos grupos de animais originários do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB- Fiocruz/RJ) para a devida ambientação dos mesmos, minimizando o estresse de adaptação.

5.6 Infecção experimental

Foram utilizados 6 animais experimentais machos jovens da espécie *C. porcellus*, com três semanas de vida. Esses animais foram criados conforme descrito no item 5.1. Os animais foram divididos em dois grupos e o experimento foi realizado conforme abaixo:

- Grupo 1: 2 animais - Controle PBS+GSF
- Grupo 2: 4 animais infectados com *L. enriettii* L88 + GSF

5.6.1 Inoculação intradérmica

Os animais foram anestesiados com quetamina (30-44 mg/kg) e xilazina (0,1-5,0 mg/kg), por via intra-muscular (IM) conforme a Resolução Normativa 33 do Concea de 2016 Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ da CEUA. Após a constatação da anestesia, para a inoculação intradérmica utilizou-se um volume de 100 µL de suspensão em seringa de 1 mL e agulhas de 27,5 G, contendo 10⁵ promastigotas de *L. enriettii* em PBS contendo extrato de glândula salivar de flebotômico (GSF).

As glândulas salivares de flebotomíneos fêmeas da espécie *L. longipalpis* foram dissecadas a partir da colônia pertencente ao Laboratório de Fisiologia de Insetos Hematófagos do Departamento de Parasitologia/UFMG oriunda de Teresina, PI. Dois pares de glândulas salivares foram dissecadas e colocadas em 20 μ L de PBS-1x e armazenadas a -80°C. Imediatamente antes da utilização, as glândulas foram sonicadas em banho por 10 segundos (Belkaid et al., 1998). Foi utilizado na inoculação intradérmica, um par de GSF em 100 μ L de suspensão, contendo a cultura de *L. enriettii*, por animal.

5.7 Eutanásia e necropsia

Antes da eutanásia os animais foram anestesiados com uma associação de quetamina (30-44 mg/kg) e xilazina (0,1-5,0 mg/kg), por via intra-muscular (IM), com agulha menor que 21G. Após a confirmação da anestesia, os animais foram eutanasiados com sobredose destes anestésicos e foi realizada punção cardíaca. Para confirmação da eutanásia foi aferido batimentos cardíacos e movimentos respiratórios.

Após a realização da eutanásia, a área da lesão do espelho nasal, assim como os órgãos (fígado, baço, pulmão e testículo) dos animais foram retiradas em capela de fluxo laminar. Utilizando-se pinças e tesouras estéreis, o material foi coletado e armazenado em tubo contendo RNAlater para posterior extração de DNA. Para tanto, o animal foi assepsiado com clorexidina (2%).

5.8 Avaliações Clínicas

O curso da infecção foi avaliado durante 12 semanas pós infecção, através da pesagem e monitoramento clínico, levando em consideração atividade motora geral, irritabilidade, movimentação, respiração, reflexo auriculares e corneal, tônus corporal, força ao agarrar, tremores, ptose palpebral, piloereção, hipotermia, alterações na pelagem, dermatites, aparecimento de lesão na pele, alopecia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, ou qualquer alteração pertinente, assim como a ocorrência de óbito.

5.9 Isolamento de cepa

Após 6 semanas de infecção 3 animais, sendo 1 animal do grupo controle (1) e 2 animais do grupo infectado (2), foram submetidos a eutanásia e fragmentos do focinho

(espelho nasal), pulmão, baço, fígado e testículo foram coletados para o isolamento em tubos poliestireno de 15 ml contendo meio de cultura NNN-Lit completo. As culturas foram mantidas em estufa (BOD) a 26 °C, e após 10 dias do isolamento, as culturas foram analisadas em microscópio óptico para a observação de formas promastigotas. Para as amostras negativas foi colocado meio de cultura completo e estas foram analisadas novamente após 5, 10 e 20 dias, quando não observadas formas promastigotas, as amostras eram descartadas. Para as amostras positivas foi feito um repique em garrafas de cultura com meio M-199 completo. Após 5 dias as culturas foram analisadas em microscópio invertido para observação dos parasitos. Quando as culturas estavam apresentando aproximadamente 10^7 parasitos/mL, estas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi utilizado para extração de DNA.

6 RESULTADOS

6.1 Curva de crescimento

Com o intuito de se conhecer o perfil de divisão da amostra e estimar a densidade à qual a cultura deve coletada para extração do DNA foi realizada uma curva de crescimento da cultura. As formas promastigotas de *L. enriettii* (L88 e Cobaia) foram cultivadas como descrito no item 5.2. Foi observado um grande aumento do número de parasitos na fase logarítmica de ambas as cepas, até o quarto dia de incubação, alcançando a fase estacionária após o 5º dia. A cepa L88 alcançou densidade máxima de $1,5 \times 10^7$ parasitos/mL, enquanto que para a Cobaia, este número foi de $1,2 \times 10^7$ parasitos/mL. Por esta razão foi escolhido o quarto dia do crescimento para extração do DNA (Figura 1). Para a infecção dos cobaias do estudo in vivo foi utilizada cultura no quinto dia de crescimento, rica em formas promastigotas.

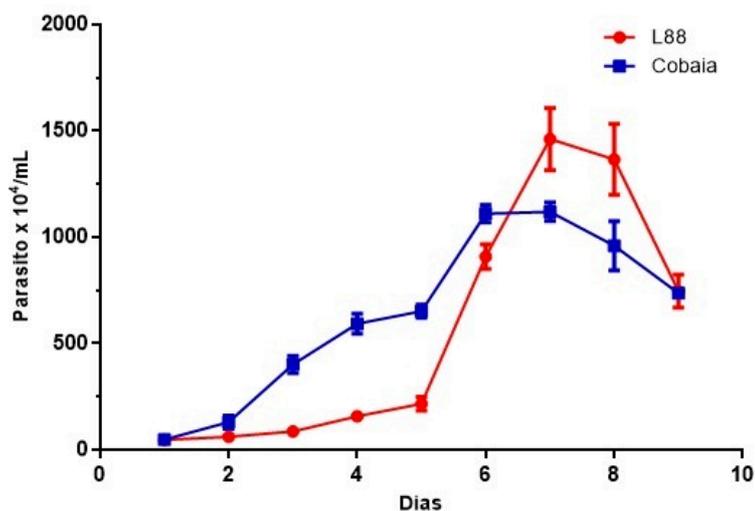


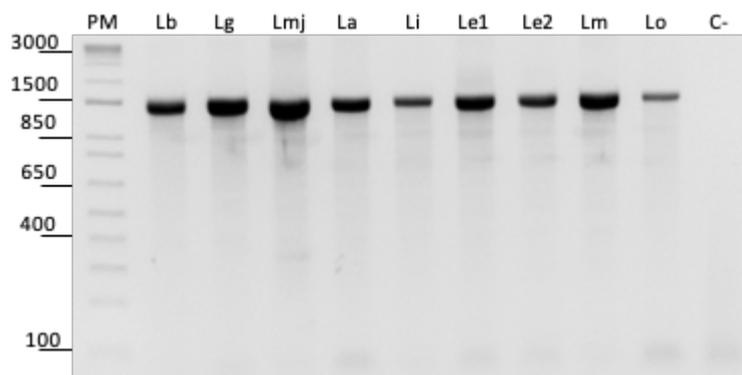
Figura 1: Curva de crescimento para as cepas de *L. enriettii* (L88 e Cobaia) em meio M199 completo.

6.2 Identificação específica das amostras estudadas

As amostras de *L. enriettii* (cepas L88 e Cobaia) utilizadas neste estudo foram amplificadas através da técnica de PCR (alvos *hsp70* e *ITS1*) e submetidas à digestão pela enzima *HaeIII*. Até o momento não era conhecido o perfil de amplificação nem o polimorfismo gerado por enzimas de restrição para esta cepa. Sendo assim utilizamos o DNA de oito espécies de *Leishmania*, conforme descrito no item 5.2 a fim de comparar os

fragmentos amplificados. Conforme esperado, nos alvos *hsp70* e *ITS1*, os fragmentos esperados de 1300 e 300 pb, respectivamente, foram visualizados em todas as amostras (figuras 2A e B).

A)



B)

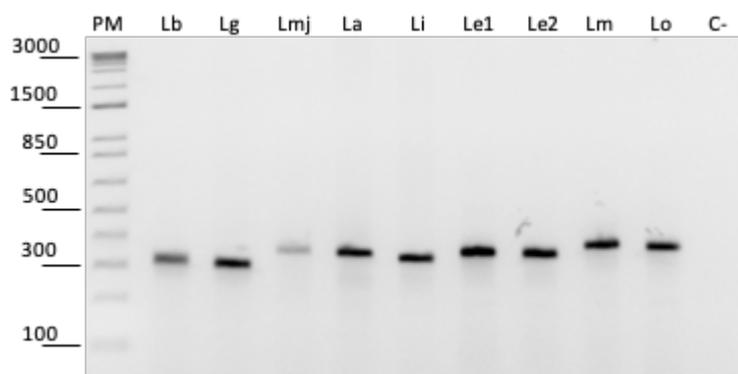


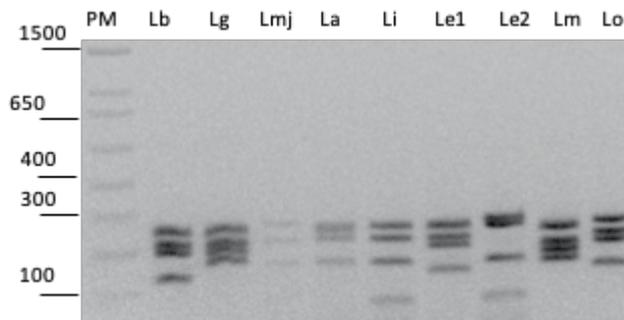
Figura 2: Amplificação dos fragmentos dos genes *hsp70* (A) e *ITS1* (B). PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; Lb – *L. braziliensis*; Lg – *L. guyanensis*; Lmj – *L. major*; La – *L. amazonensis*; Li – *L. infantum*; Le1 – *L. enriettii* (L88); Le2 – *L. enriettii* (Cobaia); Lm – *L. martiniquensis*; Lo – *L. orientalis*.

6.3 PCR RFLP dos alvos *hsp70* e *ITS1* após digestão com *HaeIII*

Na reação de PCR-RFLP dirigida ao alvo *hsp70*, nos perfis de restrição obtidos, as duas amostras de *L. enriettii* foram bem diferentes. A cepa L88 apresentou 4 bandas, sendo uma acima de 320pb um duplete em torno de 300 pb e uma quarta banda abaixo de 300pb, o perfil apresentado se mostrou idêntico ao de *L. orientalis*. A cepa cobaia apresentou um duplete, acima de 300 pb seguida de duas bandas espaçadas abaixo de 300 pb, semelhante ao perfil observado em *L. infantum*. As demais espécies utilizadas como controle tiveram seus perfis esperados de acordo com Garcia et al. (2004) (figura 3A). Já o perfil do alvo *ITS1* também se mostrou suscetível à enzima *HaeIII*. Foi observado que todas amostras estudadas incluindo

as de *L. enriettii* (L88 e Cobaia/Le1 e Le2) apresentaram perfil de restrição variável. Vale ressaltar que neste alvo o perfil da *L. enriettii* cepa L88 (Le1) foi diferente do de *L. orientalis* (Lo), ao contrário do que foi observado com *hsp70* (figura 3B).

A)



B)

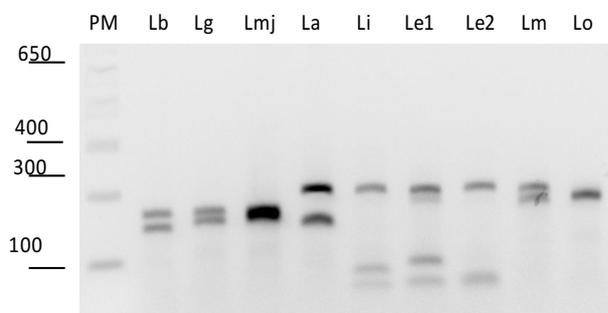


Figura 3: Perfil de restrição utilizando a enzima *HaeIII* dos fragmentos dos genes *hsp70* (A) e ITS1 (B). PM – Marcador de peso molecular de 100 pb; Lb – *L. braziliensis*; Lg – *L. guyanensis*; Lmj – *L. major*; La – *L. amazonensis*; Li – *L. infantum*; Le1 – *L. enriettii* (L88); Le2 – *L. enriettii* (Cobaia); Lm – *L. martiniquensis*; Lo – *L. orientalis*.

6.4 Análise filogenética

Para uma análise mais aprofundada dos alvos *hsp70* e ITS1, as sequências obtidas geraram dendogramas (figura 4A e B). Para o alvo *hsp70*, foram separados três grupos distintos contendo as espécies pertencentes ao subgênero *Mundinia*, *Viannia* e *Leishmania*. Conforme esperado, a cepa L88 de *L. enriettii* agrupou-se com *L. orientalis* e *L. martiniquensis*. As cepas do subgênero *Viannia* (*L. guyanensis* e *L. braziliensis*) e *Leishmania* (*L. infantum* e *L. amazonensis*) formaram ramos distintos. Entretanto, a cepa cobaia de *L. enriettii* agrupou-se no subgênero *Leishmania*. Para o alvo ITS1, os mesmos grupos foram obtidos, porém a cepa Cobaia se agrupou dentro do subgênero *Mundinia*.

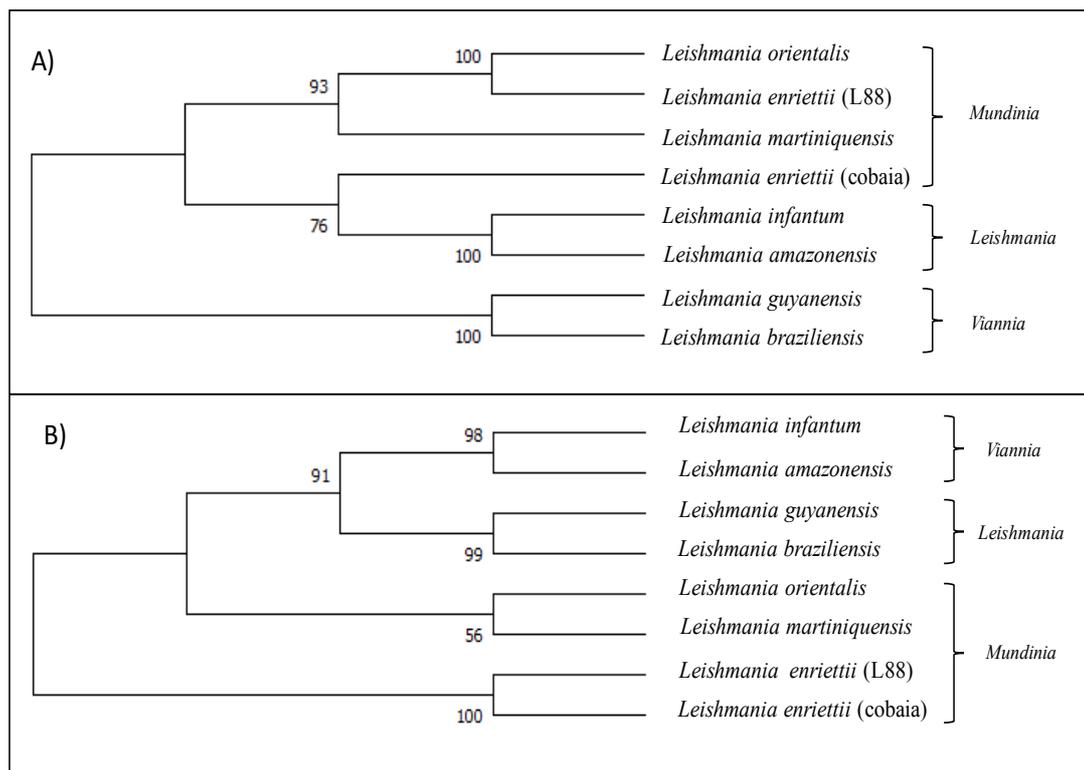


Figura 4: Dendrograma gerado pelo método de máxima verossimilhança no Programa Mega X utilizando sequências do alvo *hsp70* (A) e ITS1 (B)

6.5 Avaliação da presença de DNA de *L. enriettii* em diferentes órgãos de *C. porcellus*

Em um artigo anterior de nosso grupo (Pinheiro et al., 2018) foram obtidos cortes histológicos emblocados em parafina de diversos órgãos. O DNA dessas amostras nos períodos de 4, 8 e 12 semanas após infecção foi extraído e submetido a PCR utilizando o alvo *hsp70*. Conforme esperado, o fragmento de 1300 pb foi detectado na traquéia (30 DPI - Dias pós infecção) e baço (30 e 60 DPI). Este fragmento também foi observado no controle positivo (cepa L88 de *L. enriettii*), ao passo que no decorrer de 90 DPI não foi detectado nenhuma reação positiva na PCR, indicando ausência de DNA do parasito, nesse período (figura 5).

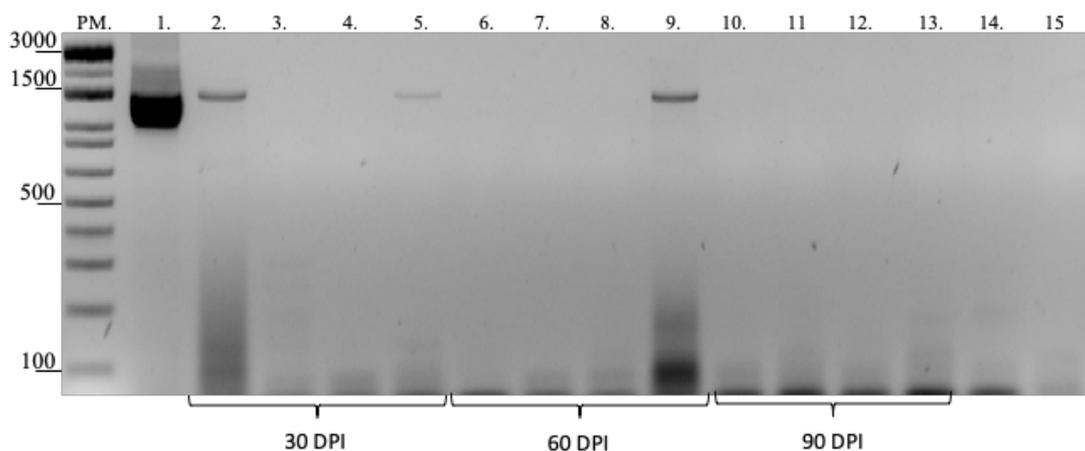


Figura 5: Detecção de DNA em amostras de tecidos de *C. porcellus* infectados com *L. enriettii* usando o alvo *hsp70* em diferentes semanas pós-infecção. PM- Marcador de peso molecular de 100 pb, 1- controle positivo de *L. enriettii* (cepa L88); Amostras de traqueia (2, 6 e 10); Amostra de pulmão (3, 7 e 11); Amostras de fígado (4, 8 e 12); amostra de baço (5, 9 e 13); 14- controle negativo (tecido de fígado de animal não infectado; 15- branco.

6.6 Confirmação da visceralização de *L. enriettii* em *C. porcellus* experimentalmente infectados

Os resultados mostrados no item anterior mostraram que o DNA da *L. enriettii* foi encontrado inicialmente na traqueia e posteriormente no baço. Ao final de 12 semanas nenhum DNA foi detectado nos órgãos avaliados. Por esta razão, realizamos uma infecção *in vivo* com *C. porcellus* e determinamos o período de 6 semanas pós-infecção para realizar a eutanásia. Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para coleta de órgãos a fim de se obter o isolado da cepa L88. O exame clínico dos animais infectados com a cepa L88 associados a GSF revelou lesão ulcerada no espelho nasal que surgiu a partir da quarta semana pós- infecção. Essa lesão se apresentou de forma mais acentuada na sexta semana, conforme podemos observar na figura 6. Os animais do grupo controle se apresentaram normais para todos os critérios analisados.

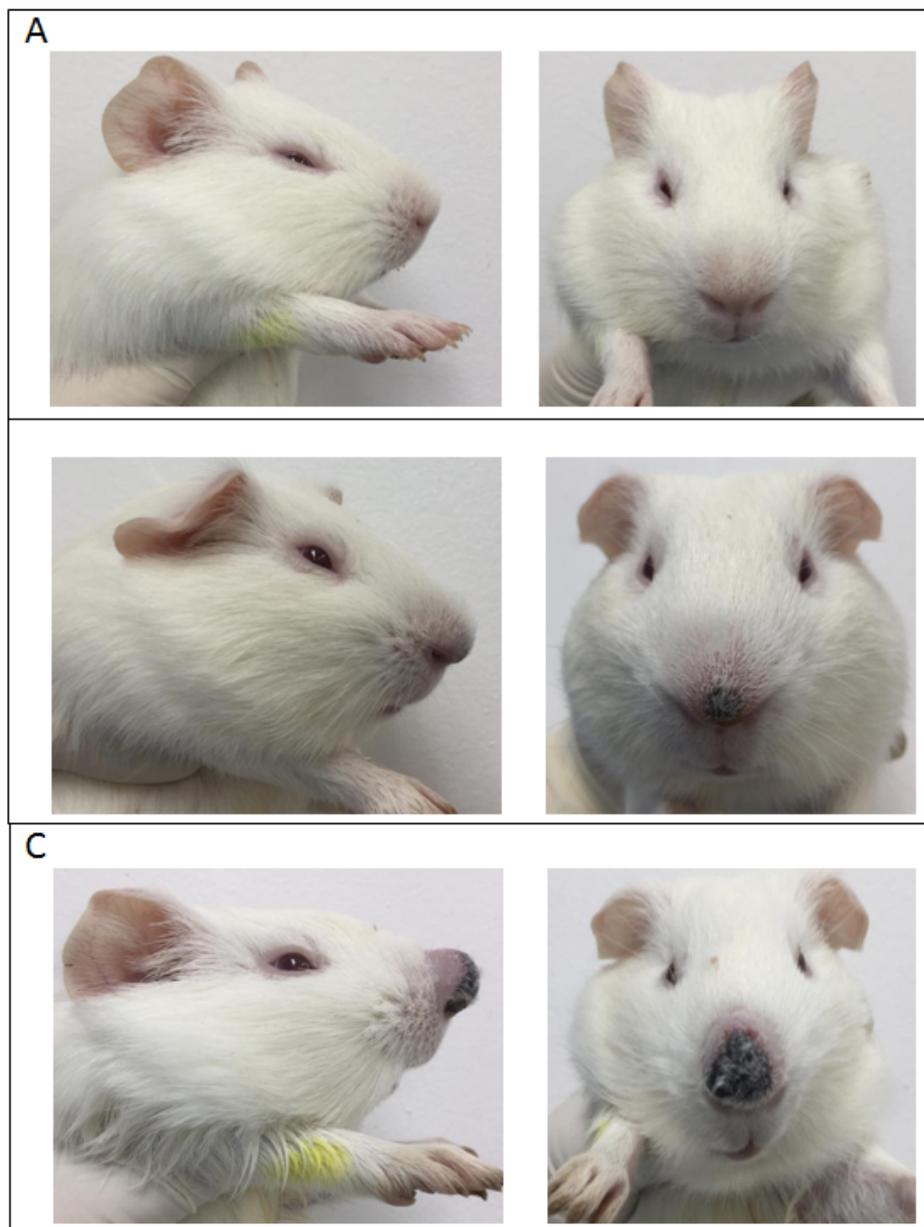


Figura 6: Desenvolvimento de lesões cutâneas em *C. porcellus* infectados por *L. enriettii* L88. A - *C. porcellus* (controles negativos) B - 4^a semana de infecção. C- 6^a semanas de infecção. Visão lateral (esquerda), visão frontal (direita).

Os órgãos dos animais foram retirados e os fragmentos plantados no meio NNN-LIT. Após 18 dias detectamos a presença de parasitos isolados apenas do baço de um dos animais (figura 7). Nas demais amostras, mesmo após 30 dias, não foi observada presença de parasitos.

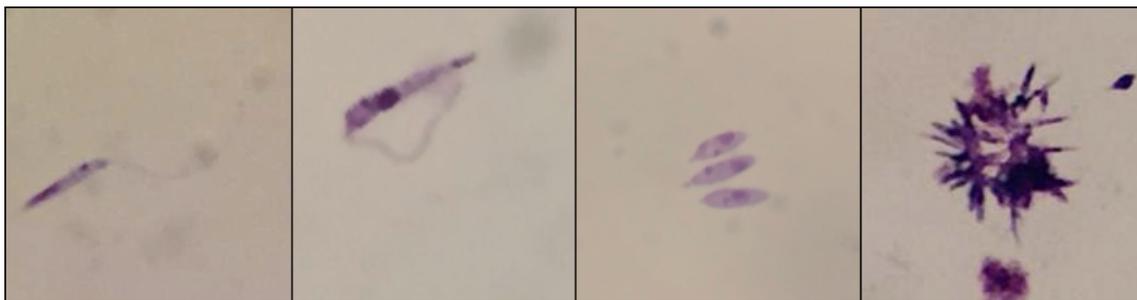


Figura 7: Cultura contendo formas variantes de *L. enriettii* isolados do baço de *C. porcellus*.

A fim de se confirmar se o isolado inoculado no espelho nasal e o proveniente do baço seriam os mesmos as amostras foram novamente analisadas molecularmente por PCR-RFLP do alvo *hsp70*. Conforme esperado, o fragmento de 1300 pb foi obtido em ambas amostras (figura 8A). Após tratamento com *HaeIII* as mesmas também produziram o mesmo perfil (figura 8B). Este perfil foi idêntico aos obtidos nos estudos moleculares (figuras 2 e 3).

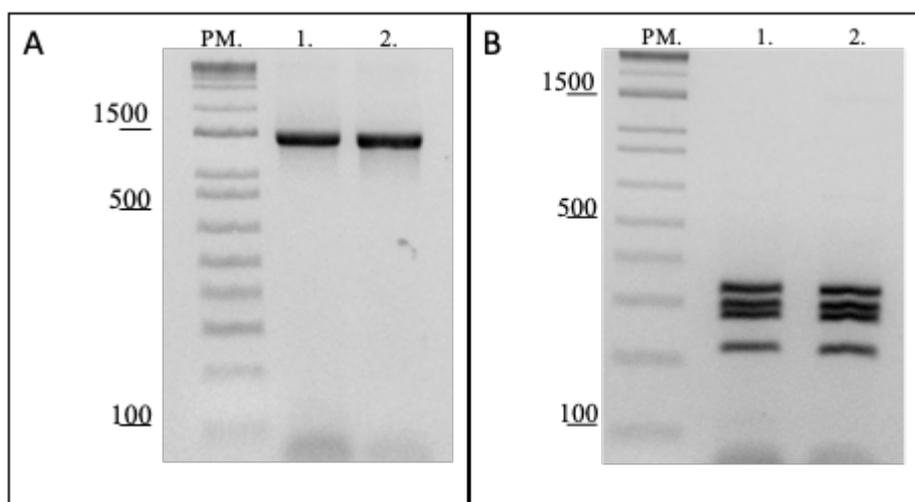


Figura 8: Amplificação do alvo *hsp70* (A) e perfil de restrição com a enzima *HaeIII* (B) dos isolados de cultura (1) e baço (2) de *L. enriettii*.

7 DISCUSSÃO

O subgênero *Mundinia* tem ganhado destaque mundialmente por apresentar espécies com alta plasticidade fenotípica, sendo capazes de infectar diferentes hospedeiros que variam desde equinos, cangurus, cobaias ou até o homem (podendo causar formas viscerais em pacientes imunossuprimidos) (BUTENKO et al., 2019; PARANAIBA et al., 2017a). Além disso, em todas as análises filogenéticas, este subgênero representa o ramo mais antigo do gênero *Leishmania*, sugerindo sua origem anterior ao rompimento de Gondwana. Essa publicação trouxe novas informações que foram cruciais para o entendimento da evolução da *Leishmania* (BUTENKO et al., 2019)

A correta identificação de uma espécie pode delinear os eventos que se seguem após a infecção, como a cura, a piora ou até mesmo a morbi-mortalidade (OLIVEIRA et al., 2013). A identificação correta permite distinguir as espécies de *Leishmania* de diferentes regiões e contribuir com a epidemiologia da doença. A distinção entre as espécies é de fundamental importância para se proceder ao diagnóstico correto, além de impactar diretamente na escolha do tratamento, permitindo também a implementação de medidas de prevenção e controle. A técnica de PCR é usada amplamente no diagnóstico de diversas infecções, uma vez que, permite de forma rápida a identificação da espécie causadora. Desta forma, ela tem sido empregada de forma alternativa na identificação de espécies de *Leishmania*, dado que ser aplicada diretamente em amostras clínicas (BENSOUSSAN et al., 2006). Na literatura científica, estão disponíveis diversos iniciadores específicos, como o *hsp70*, *g6pd* e ITS, que possibilitam a discriminação de gêneros, subgêneros e espécies.

Neste estudo, empregou-se o uso do iniciador, cujo alvo é uma parte do gene que codifica a proteína de choque térmico de 70 kilodáltons (*hsp70*). Essas proteínas estão classificadas dentre as mais conservadas ao longo da evolução, sendo expressa por diversos organismos, incluindo os kinetoplastídeos, entre eles as *Leishmania* (FOLGUEIRA et al., 2007). Elas são agrupadas em família de acordo com sua massa molecular (SATO et al., 1995). São expressas por indução de estresse celular, como o calor, mas também são encontradas em temperaturas normais, desempenhando papéis na função celular (FOLGUEIRA et al., 2007). A técnica PCR-RFLP do *hsp70* é bastante utilizada e o polimorfismo gerado na digestão permite a distinção entre diversas espécies de *Leishmania* (GARCIA et al., 2004; GRAÇA et al., 2012). Entretanto, o seu uso como potencial ferramenta para discriminar as espécies do subgênero *Mundinia* ainda não foi determinado.

O alvo *hsp70* já foi utilizado na caracterização molecular das espécies pertencentes ao subgênero *Mundinia* em comparação com algumas espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, como também cepas variantes e não variantes de *L. braziliensis* (QUARESMA et al., 2012, 2017, 2018). Nossos resultados demonstraram que a análise do perfil com ambos os alvos permitiu separar algumas espécies dentro dos três subgêneros. Vale ressaltar que o alvo *hsp70* discriminou muito melhor do que o alvo ITS1. Para o alvo *hsp70*, os perfis observados para os controles foram os esperados (GARCIA et al., 2004). Entretanto, para as espécies do subgênero *Mundinia* os resultados foram variáveis. Por exemplo, comparando a cepa L88 com a cepa cobaia de *L. enriettii*, o perfil das mesmas foi completamente diferente. Porém, o perfil da cepa L88 foi idêntico ao de *L. orientalis* e diferente da *L. martiniquensis*. Deste modo, decidimos utilizar outro alvo (ITS1) para tentar refinar um pouco mais esta tipagem. O ITS1 é uma região intergênica não-codificante do espaçador transcrito interno do DNA ribossomal e também é muito utilizado em *Leishmania* (SCHONIAN et al., 2003, CUPOLILLO et al., 2003; HAJJARAN et al., 2011; REGO et al., 2015). O perfil das diferentes espécies observado para o ITS1 foi mais eficiente do que o de *hsp70* para discriminar as cepas, inclusive separando a L88 de *L. enriettii* da *L. orientalis*. Um resultado interessante deste gel foi o perfil semelhante entre as duas cepas de *L. enriettii* e *L. infantum*. Com base nos nossos resultados, ambos os alvos foram complementares entre si, e decidimos sequenciar os fragmentos para a construção dos dendogramas.

Com base na estrutura do dendograma, observamos claramente a separação em três grupos principais contendo os três subgêneros. Em ambos os dendogramas, as espécies do subgênero *Mundinia* ficaram mais próximas do subgênero *Leishmania* utilizando os marcadores *hsp70* e ITS1. Na literatura, utilizando um número maior de genes (ESPINOSA et al., 2016) ou sequenciamento total (BUTENKO et al., 2019) observou-se que o subgênero *Mundinia* também foi mais próximo ao subgênero *Leishmania*. No dendograma, construído após sequenciamento, utilizando o *hsp70*, de forma inesperada e surpreendente, a cepa Cobaia de *L. enriettii*, que já havia apresentado perfis completamente diferentes da cepa L88 nos dois alvos moleculares, agrupou-se com as espécies do subgênero *Leishmania*. Esta cepa foi isolada em cobaias na região do Capão Bonito (SP) em 1985, cerca de 40 anos após o isolamento da cepa L88. Essa cepa nos foi fornecida pelo banco de cepas da FIOCRUZ (CLIOC) e não possui um perfil que nos leva a suspeitar de contaminação e ou infecção mista. Por esta razão, realizamos um novo sequenciamento do alvo ITS1 para completar estas análises, e ao contrário do alvo *hsp70*, observamos que as cepas L88 e Cobaia de *L. enriettii*, agruparam-se com as espécies do subgênero *Mundinia*. Contudo, ambos os dendogramas

foram eficientes para discriminar os 3 subgêneros. O agrupamento da cepa Cobaia no dendograma do alvo *hsp70*, ainda é uma incógnita, mas ressalta a importância de se utilizar mais de um marcador para uma conclusão mais definitiva da tipagem (JARIYAPAN et al., 2018). Deste modo, precisamos esclarecer o real status taxonômico da cepa Cobaia, solicitando uma nova amostra para comparação, e realizando análises mais avançadas com outros alvos (RNAPol II e RPL23a) e sequenciamento total dessa cepa. Biologicamente, esta cepa tem um comportamento menos virulento que a cepa L88 não sendo capaz de causar lesões ulceradas em *Cavia porcellus*. Este resultado nos chamou a atenção também porque realizamos duas infecções experimentais (PARANAIBA et al., 2015; PINHEIRO et al., 2018) e o seu perfil menos virulento foi confirmado. Portanto, se esta cepa realmente for algo que pertença ao subgênero *Leishmania* sem tropismo dermatrópico, iremos preencher esta lacuna acerca de cepa Cobaia. Em conclusão, recomendamos a utilização do ITS1 para a tipagem das espécies do subgênero *Mundinia*.

As leishmanioses incluem um amplo espectro de manifestações clínicas que incluem espécies com caráter dermatrópico ou viscerotrópico bem definidos para algumas espécies. Entretanto, espécies como *L. infantum* (viscerotrópica) podem apresentar lesões cutâneas atípicas em pacientes na América Central (ARAUJO-FLORES et al., 2018; BELLI et al., 1999). *Leishmania donovani* pode causar lesões dérmicas após falha terapêutica, conhecidas como PKDL (Post-kala-azar dermal *Leishmaniasis*) (HERWALDT, 1999). *Leishmania amazonensis* (dermotrópica) foi isolada de linfonodos de cães com sintomatologia semelhante à leishmaniose visceral canina causada por *L. infantum* (VALDIVIA et al., 2017) e também de vísceras de roedores (ABREU-SILVA et al., 2004; BRUZUAL et al., 2008). Finalmente, *L. martiniquensis*, é capaz de causar tanto LV quanto LC (CHUSRI et al., 2012) e este padrão foi observado em um paciente HIV positivo sugerindo um aspecto oportunista comumente observado nas espécies do subgênero *Mundinia*. Entretanto, este aspecto na *L. enriettii* ainda não está bem definido.

Em relação aos experimentos de visceralização, resultados histológicos preliminares de nosso grupo já indicavam a presença de formas amastigotas de *L. enriettii* na traquéia e pulmão (dados não publicados). Este material estava armazenado no biorepositório do Departamento de Patologia ICB/UFMG e nos foi cedido pelo Prof. Dr. Wagner Tafuri, colaborador deste trabalho (PINHEIRO et al., 2018). Sabe-se que a *L. enriettii* provoca uma lesão cutânea que se cura espontaneamente após três meses conforme dados publicados de nosso grupo (PARANAIBA et al., 2015; PINHEIRO et al., 2018; BECVAR et al., 2020). Entretanto, os estudos histológicos envolvendo essa espécie, até o momento foram restritos

a região da derme. Não sabíamos, portanto, se ocorria cura parasitológica ou se a infecção permanecia latente, restando assim, uma lacuna sobre a disseminação de *L. enriettii* em *C. porcellus*. No caso da cepa L88, que se mostrou mais virulenta que a cepa Cobaia, os estudos histológicos mostraram um infiltrado pro-inflamatório intenso, com acantose, vários tipos celulares incluindo macrófagos contendo formas amastigotas. Neste mesmo trabalho, que utilizou uma cepa preferencialmente dermatrópica, foi observada também a presença de estruturas sugestivas de granulomas (PINHEIRO, et al, 2018). Em outra espécie viscerotrópica, *L. infantum*, estas estruturas inflamatórias com aspecto de granulomas também foram observadas (McELRATH et al., 1988; RODRIGUES et al., 2016). Esses granulomas também estão presentes em tecido de fígado de cães naturalmente infectados (TAFURI et al., 2001). Portanto, análises mais detalhadas dos órgãos retirados serão necessárias para avaliar a presença destas estruturas nas vísceras de *C. porcellus*.

Após 12 semanas de infecção, este infiltrado diminuiu e a lesão se curou na pele. Essa cura pode ter sido devido à alta capacidade de *L. enriettii* de induzir uma resposta pró-inflamatória intensa (PARANAÍBA et al., 2015). Este trabalho mostrou que os glicoconjugados (LPGs e GIPLs) destes parasitos foram os mais pró-inflamatórios desencadeando a produção de NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-12. Este dado é interessante, uma vez que, em outras espécies que não se curam espontaneamente como *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, os glicoconjugados das mesmas não possuem esta mesma capacidade (IBRAIM et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2016). Entretanto, quando os animais foram submetidos à eutanásia, aproveitamos para também coletar vários órgãos para se investigar uma possível visceralização e patologias nestes órgãos.

Após avaliarmos a presença de DNA de *L. enriettii* nos blocos de parafina contendo os tecidos da traqueia, pulmão, baço e fígado, constatamos com sucesso a possível passagem e/ou presença do parasito em traquéia e baço. Foi observado inicialmente, a presença do DNA na traquéia e este resultado pode ter sido devido à migração linfática ou sanguínea do espelho nasal para este órgão. Após 8 semanas, concomitante ao desaparecimento de DNA neste órgão, a sua presença se intensificou no baço atingindo um pico em 8 semanas. Após 12 semanas, o DNA não foi mais encontrado nestes quatro órgãos estudados, o que não podemos descartar que possa ocorrer em outras partes como pele e testículos.

Trabalhos iniciais de Muniz & Medina (1948) e Paraense (1953) já alertavam para a possível visceralização deste parasito em outros órgãos. Nestes trabalhos, na cinética da infecção experimental de *L. enrietti* em *C. porcellus*, os autores observaram a infecção até 365 dias depois da infecção e descrevem reações inflamatórias marcantes na derme e órgãos

internos. Foi observado também que ocorriam lesões longe dos locais de inoculação e independente na via, mas não ficou esclarecido como ocorria essa disseminação. Nossos resultados diferem dos observados por estes autores, uma vez que, a PCR mostrou desaparecimento do DNA após 12 semanas. Estes achados podem se justificar pelas diferenças nas nossas condições experimentais, que utilizaram extrato de glândula salivar, cujas propriedades imunomodulatórias são cruciais para o repasto sanguíneo do vetor e estabelecimento do parasito na pele e corroboram com estas observações iniciais usando técnicas moleculares mais modernas que não estavam disponíveis naquela época. Com base nos resultados da histologia podemos afirmar que nestes órgãos poderia ter havido uma cura esterilizante de *L. enriettii* após 12 semanas de infecção e este resultado seria concomitante ao desaparecimento da lesão no espelho nasal.

Em todo caso, com base nestes resultados não podemos afirmar se foi mesmo o parasito que estava presente nestes órgãos ou se foram resíduos de DNA de parasitos destruídos que foram detectados. Para resolver esta dúvida, realizamos experimentos *in vivo* já direcionando os nossos tempos de coleta baseados nos resultados da histologia.

Após detectar a presença do parasito na traqueia e no baço, sendo que neste último ele permaneceu até a 8ª semana de infecção, realizamos a infecção experimental, com o intuito de isolar o parasito e confirmar se o DNA detectado na PCR era proveniente da visceralização. A 6ª semana foi escolhida, pois na PCR observamos uma reação mais forte, sugerindo maior concentração de DNA e, em teoria de parasitos. Este período também coincide com o pico do desenvolvimento da lesão cutânea (PARANAIBA et al., 2015; PINHEIRO et al., 2018). Desse modo, conseguimos obter de um animal o isolado do baço com sucesso, onde formas flageladas foram observadas após 18 dias do isolamento. A fim de se confirmar se o isolado se tratava realmente da *L. enriettii*, realizamos a PCR-RFLP do alvo *hsp70* e digestão com *HaeIII*, utilizando como controle positivo a cepa L88 que foi inoculada no espelho nasal. Dessa forma, vimos que a amostra do isolado apresentou perfil de restrição idêntico ao perfil observado pelo controle, confirmando assim o parasitismo no baço, por meio de por técnicas moleculares e parasitológicas.

Ainda não se é conhecido o perfil imunológico na resposta de cobaias infectados com *L. enriettii*. Faz-se necessário um estudo mais específico, a fim de se conhecer os mecanismos que levam a disseminação deste parasito e conseqüente progressão da doença. Entretanto, já estamos trabalhando na execução do projeto que pretende avaliar a expressão de citocinas imunomodulatórias para caracterizar a resposta inflamatória local e sistêmica. Esta será uma

perspectiva importante para se entender os mecanismos imunológicos celulares em resposta a este parasito.

Os dados aqui apresentados sugerem que a *L. enriettii* é capaz de visceralizar, ainda que de forma transiente. Características estas, já reportadas por outras espécies do subgênero *Mundinia*, como a *L. martiniquensis* (BUALERT et al., 2012; CHUSRI et al., 2012) isolada de pacientes HIV positivos que apresentavam leishmaniose cutânea e visceral na Tailândia.

No presente trabalho, ampliou-se o conhecimento acerca da biologia de *L. enriettii*, preenchendo lacunas sobre a disseminação e potencial visceralização, permitindo afirmar que ao causar lesão ulcerativa no segundo mês de infecção, essa espécie é capaz de disseminar, visceralizando principalmente no baço e permanecendo por mais de 2 meses no órgão. Os nossos dados histológicos sugerem que juntamente com a cura clínica da lesão cutânea, ocorre também a eliminação do parasito no baço após 3 meses de infecção. Portanto, iremos avaliar agora *in vivo* realizando uma cinética incluindo períodos mais longos para se isolar o parasito do baço e confirmar se ocorre ou não eliminação completa.

8 CONCLUSÕES

- O alvo ITS1 foi melhor que a *hsp70* para discriminar as espécies do subgênero *Mundinia*;
- A *Leishmania enriettii* é capaz de visceralizar de forma transiente na traqueia e no baço.

9 PERSPECTIVAS

- Investigar através do sequenciamento do genoma total o real status taxonômico da cepa Cobaia de *L. enrietti*;
- Realizar estudo imunológico para avaliação do perfil de citocinas apresentados durante a infecção de *L. enrietti* em *C. porcellus*;
- Realizar análise histopatológica dos diferentes órgãos estudados (fígado e baço) a fim de se conhecer as principais alterações;

10 REFERÊNCIAS

ABREU-SILVA AL, CALABRESE KS, CUPOLILO SMN, CARDOSO FO, SOUZA CSF (2004). Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol.* 2004 May 26;121(3-4):179-87.

ADLER S, THEODOR O (1957). Transmission of Disease Agents by Phlebotomine Sand Flies. *Annual Review of Entomology*, 2(1), 203–226. doi:10.1146/annurev.en.02.010157.00122

ARAUJO FLORES GV, PACHECO CMS, TOMOKANE TY, OCHOA WS, VALERIANO C et al., (2018) Evaluation of regulatory immune response in skin lesions of patients affected by nonulcerated or atypical cutaneous *Leishmaniasis* in honduras, central america. *Mediators Inflamm.* 2018 Mar 21;2018:3487591. doi: 10.1155/2018/3487591.

BECVAR T, SIRIYASATIEN P, BATES P, VOLF P, J SADLOVA (2020). Development of *Leishmania (Mundinia)* in guinea pigs. *Parasites Vectors* (2020) 13:181 doi.org/10.1186/s13071-020-04039-9

BELEHU A, TURK JL (1976). Establishment of Cutaneous *Leishmania enriettii* Infection in Hamsters. *Infection and Immunity* 13, 1235–1241.

BELLI A, GARCÍA D, PALACIOS X, RODRIGUEZ B, VALLE S, VIDEA E, TINOCO E, MARÍN F, HARRIS E (1999) Widespread atypical cutaneous *Leishmaniasis* caused by *Leishmania (L.) Chagasi* in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg* 61(3):380–385. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.380>

BENSOUSSAN E, NASEREDDIN A, JONAS F, SCHNUR LF AND JAFFE CL (2006). Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous *Leishmaniasis*. *J. Clin. Microbiol.* 44:1435-1439

BRUZUAL E, ARDAY L, PARTE-PÉREZ M (2008). Diseminación tisular y efectos histopatológicos producidos por *Leishmania mexicana amazonensis* en roedores infectados experimentalmente. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 28:139-144. ^[L]_[SEP]

BRYCESON ADM, BRAYT RS, AND DUMONDE DC. (1974). Experimental cutaneous *Leishmaniasis* iv. selective suppression of cell-mediated immunity during the response of guinea-pigs to infection with *Leishmania enriettii*. *Clin. exp. Immunol* 16, 189–202

BUALERT L, CHARUNGKIATTIKUL W, THONGSUKSAI P, MUNGTHIN M, SIRIPATTANAPIPONG S, KHOSITNITHIKUL R, et al (2012). Autochthonous disseminated dermal and visceral *Leishmaniasis* in an AIDS patient, southern Thailand, caused by *Leishmania siamensis*. *Am J Trop Med Hyg.*86:821–4.

BUTENKO A, KOSTYGOV AY, SADLOVA J, KLESCHENKO Y, BECVAR T, PODESVOVA L, et al. Comparative genomics of *Leishmania (Mundinia)*. BMC Genomics (2019) 20:726 <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6126-y>

CHANMOL W, JARIYAPAN N, SOMBOON P, BATES MD, BATES PA, (2019) Development of *Leishmania orientalis* in the sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and the biting midge *Culicoides soronensis* (Diptera: Ceratopogonidae). Acta Trop. 2019 Nov;199:105157. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105157. Epub 2019 Sep 3.

CHUSRI S, THAMMAPALO S, CHUSRI S, THAMMAPALO S, SILPAPOJAKUL K, SIRIYASATIEN P (2014). Animal reservoirs and potential vectors of *Leishmania siamensis* in southern Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health;45:13–9.

CUPOLILLO E, BRAHIM LR, TOALDO CB, DE OLIVEIRA-NETO MP, DE BRITO ME, FALQUETO A, DE FARIAS NAIFF M, GRIMALDI G JR (2003). Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 41(7): 3126-32

DESBOIS N, PRATLONG F, QUIST D, DEDET JP. (2014) *Leishmania (Leishmania) martiniquensis* n. sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), description of the parasite responsible for cutaneous *Leishmaniasis* in Martinique Island (French West Indies). Parasite. 21:12.

DOUGALL A, SHILTON C, LOW CHOY J, ALEXANDER B AND WALTON S, (2009). New reports of Australian cutaneous *Leishmaniasis* in Northern Australian macropods. Epidemiol. Infect., 137, 1516–1520. Cambridge University Press. doi:10.1017/S0950268809002313

DOUGALL AM, ALEXANDER B, HOLT DC, HARRIS T, SULTAN AH, BATES PA, ROSE K, WALTON SF, (2011). Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. Int J Parasitol; 41:571–579.

ESPINOSA OA, SERRANO MG, CAMARGO EP, TEIXEIRA MMG, AND SHAW JJ (2016). An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitology, 1–13. doi:10.1017/S0031182016002092.

FERNANDES O, MURTHY VK, KURATH U, DEGRAVE W, AMPBELL DA (1994). Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol. Biochem. Parasitol., v. 66, p. 261-277

FOLGUEIRA C, REQUENA JM (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol Rev; 31: 359–377.

GARCIA L, KINDT A, BERMUDEZ H, LLANOS-CUENTAS A, DE DONCKER S, AREVALO J, (2004) Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology*; 42:2294–7.

GRAÇA GC, VOLPINI AC, ROMERO GA, OLIVEIRA NETO MP, HUEB M, PORROZZI R, BOITÉ MC, CUPOLILLO E (2012). Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous *Leishmaniasis* and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 107(5):664-74.

HAJJARAN H, VASIGHEH F, MOHEBALI M, REZAEI S, MAMISHI S, CHAREDAR S (2011). Direct diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous *Leishmaniasis* patients using PCR-RFLP. *J Clin Lab Anal*. 25(1):20-4.

HERWALDT BL (1999). *Leishmaniasis*. *Lancet*. Oct 2;354(9185):1191-9.

IBRAIM IC, DE ASSIS RR, PESSOA NL, CAMPOS MA, MELO MN, TURCO SJ, SOARES RP (2013). Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasites & Vectors*. 6: 1 – 11. *International* 66, 884–888. doi:10.1016/j.parint.2016.10.003

JARIYAPAN N, DAROONTUM T, JAIWONG K, CHANMOL W, INTAKHAN N, SORSUWAN S, BATES P A, (2018). *Leishmania (Mundinia) orientalis n. sp.* (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous *Leishmaniasis*. *Parasites & Vectors*, 11(1). doi:10.1186/s13071-018-2908-3

KAUFER A, ELLIS J, STARK D, BARRATT J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors* (2017) 10:287 DOI 10.1186/s13071-017-2204-7

KILLICK-KENDRICK R (1979). Biology of *Leishmania* in Phlebotomine Sandflies. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. *Biology of the Kinetoplastida*. London: Academic Press. p. 395-460.

KILLICK-KENDRICK R (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clinics in dermatology* 17, 279–289.

KWAKYE-NUAKO G, MOSORE M-T, DUPLESSIS C, BATES MD, PUPLAMPU N, MENSAH-ATTIPOE I, BATES PA (2015). First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous *Leishmaniasis* in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International Journal for Parasitology*, 45(11), 679–684. doi:10.1016/j.ijpara.2015.05.001

LAINSON R, SHAW JJ, WARD RD, READY PD, NAIFF RD (1979). *Leishmaniasis* in Brazil. XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous *Leishmaniasis* in north Pará State. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 73: 239–242.

LAINSON R, SHAW JJ, (1997). Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniases in biology and medicine. Biology and Epidemiology*; 1: 1–120.

LEELAYOOVA S, SIRIPATTANAPIPONG S, MANOMAT J, PIYARAJ P, TAN-ARIYA P, BUALERT L, MUNGTHIN M (2017). *Leishmaniasis* in Thailand: A Review of Causative Agents and Situations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 96(3), 2017, pp. 534–542. doi:10.4269/ajtmh.16-0604

LIAUTAUD B, VIGNIER N, MIOSSEC C, PLUMELLE Y, KONE M, DELTA D, et al. 2015. First Case of Visceral *Leishmaniasis* Caused by *Leishmania martiniquensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 92, 317–319. doi:10.4269/ajtmh.14-0205.

LOBSIGER L, MÜLLER N, SCHWEIZER T, FREY CF, WIEDERKEHR D, ZUMKEHR B, et al., (2010) An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. *Vet Parasitol*;169:408–14.

MACHADO MI, MILDRE RV, PACHECO RS, SILVAM, BRAGA RR AND LAINSON R (1994). Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. *Parasitology* 109 (Pt 2), 135–8. doi: 10.1017/S003118200007624.

MACHADO PR, ROSA ME, COSTA D, MIGNAC M, SILVA JS, SCHRIEFER A, TEIXEIRA MM, BACELLAR O, CARVALHO EM (2011). Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated *Leishmaniasis*: In situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 105: 438-444.

MANNA L, PACIELLO O, MORTE RD, GRAVINO AE, (2012). Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasites & Vectors*. Sept. N.5. P. 216

MENDOZA-LEON A, HAVERCROFT JC, BARKER DC (1995). The RFLP analysis of the β -tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitol.*, v.11.

MUNIZ J, MEDINA HS (1948). Leishmaniose tegumentar do cobaio (*Leishmania enriettii* n.sp). *Hospital*; 33: 7–25.

NOGUEIRA PM, ASSIS RR, TORRECILHAS AC, SARAIVA EM, PESSOA NL, CAMPOS MA et al., (2016). Lipophosphoglycans from *Leishmania amazonensis* Strains Display Immunomodulatory Properties via TLR4 and Do Not Affect Sand Fly Infection.

PLoS Negl Trop Dis. 2016 Aug 10;10(8):e0004848. doi: 10.1371/journal.pntd.0004848.

NOYES H, PRATLONG F, CHANCE M, ELLIS J, LANOTTE G, DEDET JP (2002). A previously unclassified trypanosomatid responsible for human cutaneous lesions in Martinique (French West Indies) is the most divergent member of the genus *Leishmania* ss. *Parasitology*;124:17–24.

OLIVEIRA FS, VALETE-ROSALINO CM, PACHECO SJ, COSTA FA, SCHUBACH AO, PACHECO RS (2013). American tegumentary *Leishmaniasis* caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. *Parasit Vectors*. 6:189. *rês Braços, Bahia Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; 28:325-332.

PARAENSE WL (1953). The spread of *Leishmania enriettii* through the body of the guineapig. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 47, 556–60. doi: 10.1016/S0035-9203(53)80008-8.

PARANAÍBA, LF, ASSIS RR, NOGUEIRA PM, TORRECILHAS, AC, CAMPOS JH, SILVEIRA ACO, MARTINS-FILHO AO, PESSOA NL, CAMPOS MA, PARREIRAS PM, MELO MN, GONTIJO NF, SOARES RPP (2015). *Leishmania enriettii*: biochemical characterization of lipophosphoglycans (LPGs) and glycoinositolphospholipids (GIPLs) and infectivity to *Cavia porcellus*. *Parasit. Vectors* 8:31. doi: 10.1186/s13071-015- 0633-8

PARANAÍBA LF, PINHEIRO LJ, TORRECILHAS AC, MACEDO DH, MENEZES-NETO A, TAFURI WL, SOARES RPP (2017a). *Leishmania enriettii* (Muniz & Medina, 1948): a highly diverse parasite is here to stay. *PLoS Pathog*. 13:e1006303. doi: 10.1371/journal.ppat.1006303

PARANAÍBA LF, PINHEIRO LJ, TORRECILHAS AC, MACEDO DH, MENEZES-NETO A, TAFURI WL, SOARES RPP (2017b). An overview on *Leishmania (Mundinia) enriettii*: biology, immunopathology, LRV and extracellular vesicles during the host–parasite interaction. *Parasitology* doi: 10.1017/S0031182017001810 [Epubahead of print].

PINHEIRO LJ, PARANAÍBA LF, ALVES AF, PARREIRAS PM, GONTIJO NF, SOARES RPP, TAFURI WL (2018). Salivary Gland Extract Modulates the Infection of Two *Leishmania enriettii* Strains by Interfering With Macrophage Differentiation in the Model of *Cavia porcellus*. *Frontiers in Microbiology*. 9:969.

POLLEY SD, WATSON J, CHIODINI PL, LOCKWOOD DNJ (2018). Visceral *Leishmaniasis* in Traveler to Guyana Caused by *Leishmania siamensis*, London, UK. *Emerg Infect Dis*. 2018 Jan;24(1):155-156. doi: 10.3201/eid2401.161428.

POTHIRAT T, TANTIWORAWIT A, CHAIWARITH R, JARIYAPAN N, WANNASAN A, SIRIYASATIEN P et al., (2014). First Isolation of *Leishmania* from Northern Thailand:

Case Report, Identification as *Leishmania martiniquensis* and Phylogenetic Position within the *Leishmania enriettii* Complex. doi:10.1371/.

QUARESMA PF, CARVALHO GM, RAMOS MC, ANDRADE FILHO JD (2012). Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. Jun; 107(4):480-5.

QUARESMA PF, DE BRITO CFA, RUGANI JMN, FREIRE JM, BAPTISTA RP, MORENO EC, GONTIJO RC et al., (2018). Distinct genetic profiles of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-*Leishmaniasis* patients from an endemic area in Brazil. Parasitology. Aug; 145(9):1161-1169. doi: 10.1017/S0031182018000276.

QUARESMA PF, DE BRITO CFA, RUGANI JMN, FREIRE JM, BAPTISTA RP, MORENO EC, GONTIJO RC, REGO FD, DINIZ JE, MELO MN, GONTIJO CMF. Distinct genetic profiles of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* associate with clinical variations in cutaneous-*Leishmaniasis* patients from an endemic area in Brazil. Parasitology. 2018 Aug;145(9):1161-1169. doi: 10.1017/S0031182018000276.

REGO FD, RUGANI JM, SHIMABUKURO PH, TONELLI GB, QUARESMA PF, GONTIJO CM (2015). Molecular detection of *Leishmania* in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) from a cutaneous *Leishmaniasis* focus at Xakriabá Indigenous Reserve, Brazil. PLoS One. 2015 Apr 8;10(4):e0122038. doi: 10.1371/journal.pone.0122038

REUSS SM, DUNBAR MD, CALDERWOOD MAYS MB, OWEN JL, MALLICOTE MF, et al., (2012) Autochthonous *Leishmania* *siamensis* in horse, Florida, USA. Emerg Infect Dis;18:1545–7.

RICHINI-PEREIRA VB, MARSON PM, HAYASAKA EY, VICTORIA C, SILVA RC, LANGONI H (2014). Molecular detection of *Leishmania* spp. In road-killed wild mammals in the Central Western area of the State of São Paulo, Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, 20:27.

RODRIGUES V, CORDEIRO-DA-SILVA A, LAFORGE M, SILVESTRE R, ESTAQUIER J, (2016) Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. Parasites & Vectors 9:118 DOI 10.1186/s13071-016-1412-x

ROSE K, CURTIS J, BALDWIN T, MATHIS A, KUMAR B, SAKTHIANANDESWAREN A, SPURCK T, LOW CHOY J, HANDMAN E (2004). Cutaneous *Leishmaniasis* in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. Int. J. Parasitol. 34, 655–664.

SATO H, YAMAGUCHI M, SHIBASAKI T, ISHII T, BANNA I (1995). Induction of stress proteins in mouse peritoneal macrophages by the anti-rheumatic agents gold sodium

thiomalate and auranofin. *Biochem Pharm.* 49(10):1453-7.

SCHÖNIAN G, NASEREDDIN A, DINSE N, SCHWEYNOCH C, SCHALLIG HD, PRESBER W, JAFFE CL (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 47(1): 349-358

SCHOTTELIUS, J (1987) Selective lectin reactions of two stocks of *Leishmania enriettii* with differing pathogenicity. *Parasitol Res* **73**, 1–8. <https://doi.org/10.1007/BF00536329>

SEBLOVA V, SADLOVA J, VOJTKOVA B, VOTYPKA J, CARPENTER S, BATES PA, VOLF P (2015). The Biting Midge *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae) Is Capable of Developing Late Stage Infections of *Leishmania enriettii*. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004060.

SERENO, D (2019). *Leishmania (Mundinia)* spp.: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. *New Microbe and New Infect*; 30. [oi.org/10.1016/j.nmni.2019.100540](https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100540)

TAFURI WL, OLIVEIRA MR, MELO MN, (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 96, p. 203-212, 2001.

VALDIVIA HO, ALMEIDA LV, ROATT M, REIS-CUNHA, PEREIRA AAS, GONTIJO C, FUJIWARA RT et al (2017). Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral *Leishmaniasis* in Governador Valadares, southeastern Brazil. *Sci Rep.* 2017; 7: 40804. doi: 10.1038/srep40804

WONG IL, CHOW LM (2006). The role of *Leishmania enriettii* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. *Mol Biochem Parasitol.* 2006 Dec;150(2):278-87. DOI:10.1016/j.molbiopara.2006.08.014

WONG ILK, CHAN K-F, BURKETT BA, ZHAO Y, CHAI Y, SUN H, CHAN TH AND CHOW LMC (2007). Flavonoid dimers as bivalent modulators for pentamidine and sodium stibogluconate resistance in *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 930–940.

YOUNG DG AND DUNCAN MA, (1994). Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in the Mexico, the West Indies, Central and the South America (Diptera:Psychodidae). *Mem. Am. Entomol. Inst.* 54, 881p.