



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

**Avaliação clínica e parasitológica da coinfeção
experimental por *Leishmania* (*Leishmania*)
amazonensis e *Leishmania* (*L.*) *infantum* em hamster
(*Mesocricetus auratus*)**

Jordanna Luíza de Lima Celeste

Belo Horizonte
2015

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

**Avaliação clínica e parasitológica da coinfeção
experimental por *Leishmania* (*Leishmania*)
amazonensis e *Leishmania* (*L.*) *infantum* em hamster
(*Mesocricetus auratus*)**

Orientadora: Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte
2015

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

“A imperfeição é bela, a loucura é genial e é melhor ser absolutamente ridículo que absolutamente chato.”

Marilyn Monroe

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelas bênçãos concedidas durante esta caminhada.

Aos meus pais, Márcio e Cida, e à minha irmã Dhara, pelo apoio, incentivo, todo amor e carinho. Agradeço a eles por ter me tornado a pessoa que sou hoje.

Aos meus avós, Paulo (*in memoriam*) e Graça por tudo que sempre fizeram por mim.

Ao meu amor, amigo e companheiro de todas as horas, Fernando. Agradeço pela paciência, pelo apoio, pela força nos momentos difíceis, por todo amor e por tornar meus dias mais felizes.

Aos meus familiares e amigos, em especial ao meu tio Walter, sua ajuda foi essencial.

Aos meus futuros sogros, Fernando e Rosa, por toda a ajuda que sempre me deram.

Ao professor Dr. Wilson Mayrink por me dar a oportunidade de entrar em contato com a pesquisa, foi assim que tudo começou.

À minha orientadora e professora Dra. Héli da Monteiro de Andrade, por toda a dedicação, paciência e carinho. Obrigada por compartilhar comigo toda sua experiência e conhecimento.

À minha colega de experimentos e amiga Ana Paula, agradeço pela parceria e amizade sincera.

Ao Dr. João Carlos França pela ajuda no projeto piloto e com o meio NNN.

Aos meus colegas do laboratório: Adriana, Angélica, Bruna, Elaine, Gabriela, Henrique, Ivana, Júnior, Kléber, Luíza, Ramon, Simone, Tamara e professor Dr. Alexandre, que de alguma maneira me ajudaram, e o convívio com cada um de vocês torna meus dias melhores. Agradeço também aos colegas que passaram pelo laboratório durante todos esses anos.

Às “DIVAS” pela amizade, apoio nos momentos difíceis e por alegrarem meus dias.

À turma de mestrado “Naldo”, por todos os momentos intensos que passamos juntos.

À professora Dra. Maria Norma Melo e a Soraia pela ajuda no projeto piloto e também por tirarem minhas dúvidas todas as vezes que eu as procurava no laboratório.

Ao professor Dr. Wagner Luiz Tafuri e a Dra. Carolina Carvalho pela ajuda com as análises histopatológicas.

Ao Dr. Ricardo Gazzinelli e a Eneida por permitirem que eu utilizasse o laboratório para realizar uma das etapas da técnica de PCR.

À Dra. Roberta Caldeira pela ajuda com a técnica de PCR-RFLP.

Aos funcionários do biotério, Carlos, Márcia e “Batata” pela ajuda com os hamsters.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG.

A todos os funcionários, em especial Sumara e Sibeles, professores e colegas do Departamento de Parasitologia da UFMG.

Às agências financiadoras CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Resumo

No Brasil, encontram-se duas formas clínicas das leishmanioses: Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). A LV tem como agente etiológico *Leishmania (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) atingindo principalmente órgãos como o baço e fígado, e a LT apresenta diversas manifestações clínicas e tem como agentes etiológicos várias espécies, incluindo *L. (L.) amazonensis*, causando lesões cutâneas. Sabe-se que no país existem áreas de sobreposição dessas duas espécies, o que pode possibilitar a ocorrência de coinfeção. Embora seja mais comum o relato de LV causada por *L. infantum* e de LT causada por *L. amazonensis*, no Brasil há relatos de casos de visceralização causada por *L. amazonensis* em humanos e cães de área urbana. Por serem considerados bons modelos experimentais em infecções por *Leishmania* spp, hamsters foram utilizados nesse estudo para um melhor entendimento desse tipo de infecção. Assim, as espécies *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**) foram inoculadas separadamente e simultaneamente nesses animais, pelas vias intraperitoneal e subcutânea, e estes foram acompanhados durante 90 dias. A via de inoculação não teve influência nas alterações clínicas das infecções por *L. infantum* ou *L. amazonensis*, porém, *L. infantum* tem estabelecimento mais típico por via IP enquanto *L. amazonensis* por via SC. *L. amazonensis* possui capacidade de invadir baço e fígado mais precocemente que *L. infantum* em todas as situações avaliadas, mas *L. infantum* pode prevalecer com o passar do tempo. A coinfeção foi mais grave, com *L. amazonensis* provocando esplenomegalia precoce e lesões de pele no local do inóculo e disseminadas.

Abstract

In Brazil, there are two clinical forms of leishmaniasis: Visceral Leishmaniasis (VL) and Tegumentary Leishmaniasis (LT). The VL has the etiologic agent *Leishmania (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) affecting mainly organs such as the spleen and liver, and TL has several clinical manifestations and has as etiological agents several species, including *L. (L.) amazonensis*, causing skin lesions. It is known that in country there are overlapping areas of these two species, which may facilitate the occurrence of coinfection. Although it is more common VL caused by *L. infantum* and TL caused by *L. amazonensis*, in Brazil there are reports of visceralization caused by *L. amazonensis* in humans and dogs from urban areas. Hamsters are considered good experimental models in *Leishmania* spp infections and were used in this study to a better understanding of this type of infection. Thus, the species *L. (L.) infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) and *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**) were inoculated separately and simultaneously in these animals by intraperitoneal and subcutaneous routes, and they were followed for 90 days. The route of inoculation had no influence on the clinical changes of infection by *L. infantum* or *L. amazonensis*, however, *L. infantum* has more typical establishment intraperitoneally while *L. amazonensis* subcutaneously. *L. amazonensis* has the capacity to invade the spleen and liver earlier than *L. infantum* in all situations evaluated, but *L. infantum* can prevail over time. The coinfection was more severe, with *L. amazonensis* causing early splenomegaly and skin lesions in the inoculum site and disseminated.

Lista de figuras

Figura 1: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 1 inoculadas com *L. infantum* (■), não inoculadas (●) e do grupo controle inoculadas com salina (▲), não apresentando diferença significativa entre elas durante os 90 dias de observações.....35

Figura 2: Imagens representativas das lesões nas patas inoculadas com *L. amazonensis* nos animais do GRUPO 2 (via SC) aos 30, 60 e 90 DAI. Aos 90 DAI observa-se um animal (G) com uma lesão também na pata dianteira (não inoculada).....36

Figura 3: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 2 inoculadas com *L. amazonensis* (●), não inoculadas (■) e do grupo controle inoculadas com salina (▲), apresentando diferença significativa (* $p < 0.05$) a partir de 30 DAI.....36

Figura 4: Imagens representativas das lesões e inchaço na bolsa escrotal (A, B, D, E, G) e nas patas (C, F, H) dos animais do GRUPO 5 (*L. amazonensis* via IP) observadas aos 90 DAI.....37

Figura 5: Imagens representativas das lesões nas patas inoculadas com *L. amazonensis* nos animais do GRUPO 3 (coinfecção) aos 30, 60 e 90 DAI. Aos 90 DAI observa-se um animal com uma lesão também na pata esquerda inoculada com *L. infantum* (F).....38

Figura 6: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 3 (coinfecção) inoculadas com *L. amazonensis* (●), *L. infantum* (■) e do grupo controle com salina (▲). Patas inoculadas com *L. amazonensis* apresentando diferença significativa (* $p < 0.05$) a partir de 30 DAI.....39

Figura 7: Imagens representativas das lesões e inchaço na bolsa escrotal (A, B, D, E, G) e nas patas (C, F, H) dos animais do GRUPO 6 (coinfecção) observadas aos 90 DAI.....39

Figura 8: Média da espessura das patas inoculadas com *L. infantum* do GRUPO 1 (■) e GRUPO 3 (coinfecção ▲); e média da espessura das patas inoculadas com *L. amazonensis* do GRUPO 2 (●) e GRUPO 3 (coinfecção ▼). (* $p < 0.05$ e # indica $p > 0.05$).....40

Figura 9: Animal não infectado, inoculado com salina pelas duas vias, subcutânea e intraperitoneal, apresentando-se sadio, sem nenhuma lesão ou alteração.....42

Figura 10: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....44

Figura 11: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....47

Figura 12: Imagens representativas de amastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia de biópsia de pele da pata inoculada com *L. amazonensis* do G3 (coinfecção) pela via SC (A) e pele da bolsa escrotal do G6 (coinfecção) pela via IP (B) aos 90 DAI. Aumento 100X.....48

Figura 13: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais com coinfecção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. No G3 foram avaliadas separadamente a pata inoculada com *L. infantum* e inoculada com *L. amazonensis*. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....51

Figura 14: Corte histológico de pele de hamsters infectados por *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfecção pelas vias SC e IP. Figuras A - D imagens representativas da infecção via subcutânea, E - F via intraperitoneal. (A) Observar alterações do epitélio comuns a todos os grupos: Acantose (AC), Hiperceratose (H), Degeneração (D) e sem a presença de inflamação comum ao grupo G1 e G4. Em (B e C) observar inflamação intensa e difusa (setas pretas) com áreas de necrose (N) em (B) comum ao grupo G2 e G3 inoculado com *L. amazonensis* e sem em (C) com áreas de acantose (AC) comum ao grupo G3 inoculado com *L. infantum*. Em (D) detalhe do infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares linfócitos (setas brancas), plasmócitos (cabeça de setas pretas) e macrófagos vacuolizados (setas pretas) repletos de formas amastigotas. Em (E) observar inflamação intensa e difusa (setas pretas) com áreas de necrose (N), acantose (AC) e em (F) macrófagos vacuolizados (setas pretas) repletos de formas amastigotas marrons imunomarcadas, comum ao grupo G5 e G6. (A - E) coloração pela H&E e em (F) imuno-histoquímica. (A, D, F) 16 µm (400x), (B, C, E) = 32 µm (200x).....52

Figura 15: Porcentagem de amostras de biópsia de pele positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfeção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.....53

Figura 16: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....55

Figura 17: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....57

Figura 18: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais com coinfeção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....59

Figura 19: Corte histológico de baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfeção. Figuras A - B imagens representativas da infecção via subcutânea, C - D via intraperitoneal. (A) observar inflamação (INF), espessamento capsular e órgão congesto (cabeça preta de setas) comuns aos grupos G1 - G3. Em (B) observar polpa vermelha (PV) congesta e polpa branca (PB) reativa com evidência de centros germinativos (CG) comuns aos grupos G1 - G3, G5 e G6. (C) Inflamação e espessamento capsular, comum a todos os grupos, polpa vermelha (PV) congesta e perda da arquitetura da polpa branca (PBH) comum ao grupo G4. (D) detalhe de macrófagos (setas pretas) repletos de formas amastigotas marrons imunomarcadas e linfócitos (setas brancas) comuns aos grupos G3, G4 e G6. (A - C) coloração pela H&E e em (D) imuno-histoquímica. (A - C) = 32 µm (200x) e (D) 8 µm (1000x).....60

Figura 20: Porcentagem de amostras de baço positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfeção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.....61

Figura 21: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....64

Figura 22: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....66

Figura 23: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais com coinfeção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).....68

Figura 24: Corte histológico de fígado de hamsters infectados com *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfeção. Figuras A - D imagens representativas da infecção via subcutânea, E – F via intraperitoneal. (A, B e C) Observar órgão com capilares sinusoides (S) congestionados (cabeça de setas pretas) e inflamação portal (EP). Em (B) degeneração (setas pretas pequenas), em (C) observar inflamação granulomatosa, granulomas (G) comuns a todos os grupos. (D) Detalhe do granuloma, formado por linfócitos (setas brancas), macrófagos (setas pretas grandes) e células epitelióides (cabeça de setas brancas). Em (E) detalhe de macrófagos com amastigotas marrons imunomarcadas (setas pretas grandes) comuns aos grupos G2, G4 e G6. (F) Detalhe de granuloma com célula gigante (CG) comum aos grupos G3, G4 e G6. (A – D e F) coloração pela H&E e em (E) imuno-histoquímica. (A, C) = 32 µm (200x), (B, D, E) = 16 µm (400x) e (F) = 8 µm (1000x).....69

Figura 25: Porcentagem de amostras de fígado positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfeção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.....70

Figura 26: Gel de agarose 1,5% corado por brometo de etídio com amostras positivas de pele, baço e fígado dos animais dos grupos inoculados via SC e IP apresentando fragmento de aproximadamente 300 pb. Marcador molecular (M); controle positivo (CP); amostras 1 a 6 (pele do G1 a G6); amostras 7 a 12 (baço do G1 a G6); amostras 13 a 18 (fígado do G1 a G6); controle negativo (N).....71

Figura 27: Gel de poliacrilamida 6% corado por prata mostrando o perfil de algumas amostras dos grupos de infecção única por *L. infantum* e *L. amazonensis* após a técnica de RFLP. Peso molecular (M); padrão *L. amazonensis* (La); padrão *L. infantum* (Li); amostras 1 a 4 (perfil *L. amazonensis*) apresentando fragmentos de aproximadamente 186 e 142 pb; amostras 5 a 7 (perfil *L. infantum*) com aproximadamente 184, 72 e 55 pb.....72

Figura 28: PCR-RFLP - Espécies de *Leishmania* encontradas nos órgãos (A) e nas culturas positivas (B) do GRUPO 3 (coinfecção via SC) nas amostras de pele da pata direita inoculada com *L. amazonensis* = P (L.a.), pele da pata esquerda com *L. infantum* = P (L.i.), baço = B e fígado = F durante os 90 dias de infecção. Aos 30 e 90 DAI não se observou cultura positiva do fígado. Perfil misto (*L.a.* + *L.i.*); perfil *L. infantum* (*L.i.*) e perfil *L. amazonensis* (*L.a.*).....74

Figura 29: PCR-RFLP- Espécies de *Leishmania* encontradas nos órgãos (A) e nas culturas positivas (B) do GRUPO 6 (coinfecção via IP) nas amostras de pele = P, baço = B e fígado = F durante os 90 dias de infecção. Aos 30 DAI não se observou cultura positiva de pele. Perfil misto (*L.a.* + *L.i.*); perfil *L. infantum* (*L.i.*) e perfil *L. amazonensis* (*L.a.*).....75

Figura 30: Gel de poliacrilamida 6% corado por prata com amostras dos grupos de coinfecção: GRUPO 3 via SC (A) e GRUPO 6 via IP (B). Peso molecular (M); padrão *L. amazonensis* (La); padrão *L. infantum* (Li); amostras de fígado (órgão e cultura) 1 a 4 e 8 a 11 (perfil misto) apresentando fragmentos de aproximadamente 186, 142, 72 e 55 pb; amostras de pele 5, 6 e 12 (perfil *L. amazonensis*) com aproximadamente 186 e 142 pb; amostras de baço 7, 13 e 14 (perfil *L. infantum*) com aproximadamente 184, 72 e 55 pb.....76

Lista de tabelas

Tabela 1: Composição dos grupos experimentais de acordo com via e local da inoculação e espécie utilizada.....29

Tabela 2: Média de peso dos animais inoculados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, coinfeção e controle com salina pelas vias SC e IP. Durante os 90 dias de observações os animais não apresentaram alterações significativas de peso.....40

Tabela 3: Alterações clínicas observadas nos animais inoculados com *L. infantum*, *L. amazonensis* e coinfeção pela via subcutânea (SC) aos 30, 60 e 90 DAI e via intraperitoneal (IP) aos 30 e 90 DAI. *L.a.* = *L. amazonensis*; *L.i.* = *L. infantum*; NO = não observado; NR = não realizado.....41

Lista de siglas e abreviaturas

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

DAI: Dias após a infecção

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IP: Intraperitoneal

ITS1: *Internal Transcribed Spacer 1*

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LMC: Leishmaniose Mucocutânea

LT: Leishmaniose Tegumentar

NNN: Meio de cultura Novy, McNeal e Nicolle

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: Pares de base

PBS: Tampão Salina Fosfato

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PKDL: Leishmaniose Dérmica Pós Calazar

RFLP: Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição

RPM: Rotação por minuto

SC: Subcutânea

TBE: Tris Borato EDTA

WHO: *World Health Organization*

Sumário

1. Introdução.....	17
2. Justificativa.....	26
3. Objetivos	27
3.1- Objetivo geral	27
3.2- Objetivos específicos	27
4. Materiais e métodos	28
4.1- Parasitos	28
4.2- Animais e Grupos experimentais	28
4.3- Avaliações Clínicas.....	29
4.4- Avaliações Parasitológicas.....	30
4.4-1. Microscopia.....	30
4.4-2. Isolamento em meio de cultura	30
4.4-3. PCR-RFLP	31
4.5- Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica.....	32
5. Resultados	34
5.1- Avaliações clínicas	34
5.1-1. Infecção por <i>L. infantum</i> (Via SC e IP).....	34
5.1-2. Infecção por <i>L. amazonensis</i> (Via SC e IP)	35
5.1-3. Coinfecção (Via SC e IP).....	37
5.2- Avaliações parasitológicas e histopatológicas	42
5.2-1. Pele	42
5.2-2. Baço.....	54
5.2-3. Fígado.....	62
5.2-4. PCR-RFLP	71
6. Discussão.....	77

7. Considerações Finais	84
8. Referências bibliográficas	85
9. Anexo	95

1. Introdução

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (Ross 1903) pertencentes à Família Trypanosomatidae, Ordem Kinetoplastida, Classe Zoomastigophora, Sub-Filo Mastigophora, Filo Sarcomastigophora e Sub-Reino Protozoa. O gênero é dividido em dois subgêneros de acordo principalmente com o desenvolvimento do parasito no intestino do inseto vetor: o subgênero *Leishmania* se desenvolve no intestino médio e anterior e o subgênero *Viannia* no intestino posterior de onde migram para o intestino médio e anterior. Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são conhecidas por causar algum tipo de manifestação clínica em seres humanos (Lainson & Shaw 1987; Ashford 2000).

A transmissão do parasito ocorre através da picada de fêmeas dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo), que pertencem à Ordem Diptera, Família Psychodidae e Sub-Família Phlebotominae. Cerca de 30 espécies diferentes de flebotomíneos podem atuar como vetores da doença (Ashford 2000; Desjeux 2004). Os parasitos possuem hospedeiros vertebrados que são mamíferos pertencentes às ordens: Edentata (tatus e preguiças), Carnivora (cães e gatos), Rodentia (ratos), Primatas (humanos e macacos), Marsupialia (gambás) e Perissodactyla (cavalos) (Gramiccia & Gradoni 2005).

Leishmania tem um ciclo de vida que se mantém através da transmissão entre flebotomíneos e mamíferos. A forma alongada, móvel, com núcleo central, cinetoplasto terminal e flagelo bem desenvolvido é denominada promastigota. São encontradas livres ou aderidas ao trato digestivo do flebotomíneo, no qual passam por processos de diferenciação e divisão até chegarem à forma promastigota metacíclica, que não se dividem e são infectantes para o hospedeiro vertebrado. São transmitidas no momento da picada, quando a fêmea do inseto realiza o repasto sanguíneo, regurgitando os parasitos juntamente com a saliva. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos, e dentro dessas células, os parasitos internalizados ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma), envolvido na destruição de microorganismos. O parasito apresenta mecanismos que os permitem evadir-se da ação microbicida do macrófago, dentre outros, e após se estabelecerem no meio intracelular se transformam em amastigotas. Sendo esta uma forma arredondada ou fusiforme, com único núcleo, cinetoplasto e bolsa flagelar com flagelo rudimentar. As amastigotas se dividem dentro da célula hospedeira até rompê-la, permitindo a infecção dos fagócitos que estiverem no

local, permanecendo ali e se proliferando mesmo sob a ação de enzimas lisossomais, propagando a infecção. As células do sistema mononuclear fagocitário infectadas são capturadas pelo vetor juntamente com o sangue no momento do repasto sanguíneo e, em seguida, as amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do inseto, dando continuidade ao ciclo de vida do parasito. Amastigotas e promastigotas se dividem repetidamente por divisão binária longitudinal (Lainson & Shaw 1978; Ashford 2000; Choi & Lerner 2001).

Diversas espécies de *Leishmania* podem causar leishmanioses em adultos e crianças. Um dos maiores fatores que determinam o tipo de patologia é a espécie do parasito envolvida. O primeiro sinal de infecção tipicamente é um pequeno eritema no local onde o vetor infectado realizou o repasto sanguíneo e regurgitou os parasitos na pele. Uma vez que a infecção se estabelece, se inicia uma reação inflamatória, que na derme causa a forma cutânea da doença, podendo ser localizada ou difusa; na mucosa causa a forma mucocutânea; e a propagação metastática da infecção para órgãos como o baço, fígado, linfonodos e medula óssea caracteriza a forma visceral. *Leishmania* tende a se localizar em tecidos onde células como monócitos e macrófagos existam em grande número (Berman 2005; Reithinger & Dujardin 2007; Kobets et al. 2012).

Clinicamente as leishmanioses são classificadas nas seguintes formas: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose cutânea disseminada *borderline* (LCDB), Leishmaniose Dérmica Pós Calazar (PKDL) e a Leishmaniose Visceral (LV) (Ashford 2000). No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito, a cepa, resposta imune e estado nutricional do hospedeiro (Castellano 2005). A infecção, nas diferentes formas da doença, caracteriza-se por parasitismo de células do sistema mononuclear fagocitário da derme, mucosas ou vísceras (Quinnell & Courtenay 2009).

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença responsável por consideráveis morbidades de um grande número de pessoas em focos endêmicos, embora não seja fatal e em alguns casos o processo de cura ocorra sem tratamento com o desenvolvimento de imunidade celular e humoral do hospedeiro (Rangel & Lainson 2009).

A LC, que é a forma mais comum da LT, inicia-se no local de entrada do parasito e se manifesta primeiro como pápulas que se transformam em úlceras localizadas, podendo ser únicas ou múltiplas e normalmente aparecem em áreas expostas, como face, braços e pernas. A maioria dos casos são relatados já na fase

ulcerativa. O período de incubação pode variar de duas semanas até vários meses. É causada, principalmente por *Leishmania (Leishmania) major* e *L. (L.) tropica* no Velho Mundo, *L. (L.) mexicana*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* no Novo Mundo, incluindo o Brasil. A LCD é rara e produz lesões crônicas nodulares e não ulcerativas disseminadas na pele, acometendo indivíduos com deficiência na resposta celular. No Velho Mundo pode ser causada pela *L. (L.) aethiopica* enquanto no Novo Mundo é mais associada a *L. (L.) amazonensis*. Na LMC, as lesões podem destruir parcial ou totalmente a mucosa do nariz, da boca e faringe; ocorre no Novo Mundo após uma leishmaniose cutânea não tratada adequadamente, normalmente causada por *L. (V.) braziliensis*. A LCDB é considerada uma forma intermediária entre LCD e LMC onde os pacientes apresentam primeiramente lesão cutânea localizada e depois lesões mucosas, a disseminação ocorre de forma rápida e esses casos estão associados às espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Ashford 2000; Desjeux 2004; Oliveira et al. 2004; Silveira et al. 2004; Berman 2005).

A PKDL é uma forma rara da LT e é normalmente observada após uma leishmaniose visceral devido à infecção por *L. donovani* em países como Sudão e Índia (Murray et al. 2005).

A LV é caracterizada em sua forma típica por febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, associado a achados laboratoriais incluindo pancitopenia, leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, com intenso e difundido parasitismo em órgãos como fígado, baço e medula óssea. O período de incubação pode variar de dois a quatro meses. A doença pode ter evolução aguda, subaguda ou crônica. Um espectro de manifestações clínicas ocorre na LV, que vai desde assintomática ou oligossintomática, com a possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes. É causada por *Leishmania (L.) donovani* no Velho Mundo, tendo como reservatório os seres humanos e *Leishmania (L.) infantum* no Sudeste da Europa, na região do Mediterrâneo e no Novo Mundo, incluindo o Brasil, tendo os canídeos como reservatórios domésticos (Desjeux 2004; Oliveira et al. 2004; WHO 2014).

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública, sendo consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em conjunto, como uma das seis mais destacadas doenças tropicais de países em desenvolvimento, e atualmente encontram-se entre as principais endemias no mundo (WHO, 2014).

Constituem doenças endêmicas em países tropicais, subtropicais e temperados, ocorrendo em 98 países do mundo. Atualmente, existem cerca de 12 milhões de casos de leishmanioses em todo o mundo, 350 milhões de pessoas são consideradas com risco de contrair a doença e estima-se que 2 milhões de novos casos ocorram a cada ano, sendo cerca de 1,5 milhões de casos de LT e 500.000 de casos de LV. Mais de 90% dos casos de LV estão concentrados em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A distribuição da LT é mais ampla, ocorrendo nas Américas, Região Mediterrânea, Ásia Ocidental e Central e no Oriente Médio. Dez países apresentam de 70 a 75% dos casos mundiais de LT: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão, Costa Rica e Peru. Considerando que em poucos países a notificação é compulsória, estima-se que a incidência das leishmanioses seja subestimada (Desjeux 2004; den Boer et al. 2011; WHO 2014). Dujardin (2006) considera que mudanças ambientais, estado imunológico e falha no tratamento constituem os três principais fatores de risco responsáveis pela emergência, reemergência e propagação da doença.

A LT apresenta-se em fase de expansão geográfica no Brasil. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, começou a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões periurbanas. No período de 1988 a 2007, apresentou média anual de 27.736 casos autóctones registrados no Brasil, e coeficiente de detecção médio de 17,3 casos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2007; Ministério da Saúde 2009).

No Brasil, a LV é uma doença endêmica, no entanto, têm sido registrados surtos frequentes. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas, hoje, encontra-se em expansão para grandes centros. Está distribuída em 21 unidades da federação, atingindo as cinco regiões brasileiras. Até o ano de 2009, a média anual de casos foi de 3.379 casos e a incidência de 1,9 casos por 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2006; Ministério da Saúde 2009).

Embora no Brasil frequentemente a espécie *L. infantum* seja responsável pelos casos de LV e a espécie *L. amazonensis* esteja associada a casos de LT, Barral et al. (1991) trabalhando com pacientes no interior do estado da Bahia, demonstraram que *L. amazonensis* pode causar um amplo espectro de formas clínicas de leishmanioses, que vão desde infecção assintomática à formas desfigurantes e até mesmo à forma visceral, que é potencialmente fatal. No mesmo estudo, foi mostrado que *L. amazonensis* e *L. infantum* foram isoladas de uma mesma localidade, e os autores especularam que a

visceralização causada por *L. amazonensis* pode estar relacionada com uma cepa em particular que circula na região ou com uma infecção mista entre as duas espécies, o que poderia explicar as manifestações clínicas típicas da doença visceral.

Alguns trabalhos (Tolezano et al. 2007; Dias et al. 2011; Hoffmann et al. 2012) têm demonstrado o desenvolvimento de LV causada por *L. amazonensis* acometendo cães de área urbana nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná, e o nosso grupo trabalhando com cães da cidade de Porteirinha (MG), relatou que em 68 animais com suspeita clínica de LV, todos positivos na sorologia pelo ELISA e com o isolamento de *Leishmania* a partir de medula óssea, foram encontrados por PCR-RFLP 39% de animais infectados por *L. amazonensis* e 61% infectados por *L. infantum*. Essa porcentagem elevada de animais infectados por *L. amazonensis* ficou acima do esperado, principalmente por ter sido identificada a partir de amostras isoladas de medula óssea, indicando visceralização (Fonseca et al. 2011).

A visceralização causada por espécies de *Leishmania* responsáveis pela LT incluindo *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. tropica* e *L. major*, já foram relatadas em infecções em animais experimentais, como camundongos e hamsters (Almeida et al. 1996; Abreu-Silva et al. 2004; Soliman 2006; Mahmoudzadeh-Niknam et al. 2007; Kobets et al. 2012; Gomes-Silva et al. 2013; Ribeiro-Romão et al. 2014) mostrando que algumas espécies podem se disseminar para vários órgãos, causando mudanças patológicas similares as produzidas em seres humanos e em cães com a forma visceral.

Barral et al. (1991) e Magill et al. (1993) observaram a visceralização de *L. amazonensis* e *L. tropica* respectivamente, em humanos, apresentando alterações patológicas similares com as produzidas por espécies causadoras da forma visceral da doença. Uma possível variação genética pode ser a razão da tendência à visceralização de parasitos que causam a forma cutânea, porém, outros fatores devem ser considerados, como a resposta imune e características do indivíduo e a espécie ou cepa do parasito (Soliman 2006).

A infecção natural por diferentes espécies de *Leishmania* no mesmo indivíduo, especialmente em áreas de sobreposição de espécies, pode ser mais prevalente do que previamente relatado (Ibrahim et al. 1994). Este tipo de infecção poderia explicar diferenças no curso clínico da doença bem como os casos de resistência em muitos pacientes, com elevado potencial de evolução para formas graves se não for diagnosticada e nem tratada corretamente, podendo ser uma das razões de falha no tratamento (Silveira et al. 1984; Abdullah et al. 1998; Antoniou et al. 2004).

Casos de coinfeção com duas espécies de *Leishmania* em diferentes países já foram relatados em seres humanos. No Brasil, as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* foram encontradas em lesões distintas de um paciente (Silveira et al. 1984) e em outro relato, *L. braziliensis* e *L. donovani* encontradas em lesão cutânea e medula óssea respectivamente (Oliveira Neto et al. 1986); no Quênia, um paciente diagnosticado com LV apresentou *L. donovani* e *L. major* na cultura de aspirado do baço (Mebrahtu et al. 1991); em amostras de aspirado de linfonodos, quatro casos de coinfeção foram relatados em pacientes diagnosticados com LV, um paciente com *L. donovani* e *L. aethiopica*, e três com *L. donovani* e *L. major* no Sudão (Ibrahim et al. 1994); no Iraque, *L. donovani* e *L. major* encontradas em medula óssea e lesão cutânea respectivamente (al-Diwany et al. 1995); na Bolívia um paciente com leishmaniose cutânea difusa apresentou *L. amazonensis* e *L. infantum* na mesma lesão, explicando assim as características atípicas encontradas nas lesões cutâneas (Martinez et al. 2002); infecção mista com duas cepas de *L. infantum* em amostras de medula óssea, que foi responsável por falha terapêutica na Grécia (Antonioni et al. 2004); no Irã foi encontrada *L. tropica* em lesão oral e *L. major* em lesão nasal (Shirian et al. 2012); três pacientes do Sudão, diagnosticados com leishmaniose cutânea e sem sintomas de LV, apresentaram *L. donovani* e *L. major* em amostras de aspirado de lesão ulcerada localizada (Babiker et al. 2014); *L. mexicana* e *L. braziliensis*, e *L. amazonensis* e *L. mexicana* em lesões de pacientes com LC no México (Monroy-Ostria et al. 2014).

Foram relatados também alguns casos de coinfeção em cães naturalmente infectados no Brasil. Madeira et al. (2005, 2006), relataram casos de cães com *L. braziliensis* encontrada em lesão cutânea e *L. infantum* no sangue, linfonodos e baço, no estado do Rio de Janeiro. Infecção mista com *L. infantum* em amostras de medula óssea e *L. braziliensis* em lesão no focinho e na pele da orelha, em Minas Gerais (Quaresma et al. 2011); no Rio de Janeiro, *L. braziliensis* em lesão cutânea no focinho e *L. infantum* em fragmento do baço (Silva et al. 2011) e *L. braziliensis* em lesão cutânea e *L. infantum* em fragmentos do baço e linfonodos (Pires et al. 2014).

Soares et al. (2013) relataram em Minas Gerais o primeiro caso no mundo de infecção mista em cavalos (*Equus caballus*) naturalmente infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis* encontradas tanto em amostras de aspirado de medula óssea como também em biópsia de lesões ulceradas. Mostrando também a capacidade de visceralização de *L. braziliensis*.

No Brasil, as espécies de *Leishmania* responsáveis pelas formas tegumentar e visceral da doença possuem ampla distribuição geográfica, principalmente *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Existem áreas de sobreposição onde ocorrem casos autóctones tanto de LV causada por *L. infantum* quanto de LT causada por *L. amazonensis*, como por exemplo, a região Norte (Pará), região Nordeste (Bahia, Maranhão e Ceará), região Sudeste (Minas Gerais) e Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (Ministério da Saúde 2006, 2007).

Em áreas de sobreposição de LV e LT o controle torna-se bem complexo, pois, no Brasil, as medidas de prevenção e vigilância são totalmente distintas para as duas formas clínicas, e devem se basear em métodos de diagnóstico parasitológico em conjunto com a identificação da espécie de *Leishmania* envolvida, pois a detecção e compreensão dessas coinfeções é de grande importância (Madeira et al. 2006; Silva et al. 2011; Pires 2014).

Savani et al. (2009) relataram o primeiro caso de infecção natural por *Leishmania* do subgênero *Viannia* em *Lutzomyia longipalpis* e segundo caso de *L. amazonensis* nesta espécie. A presença de *Lutzomyia longipalpis* infectados com *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. (Viannia) sp.* indicam a possibilidade de transmissão de LV e LC para cães e humanos na área de estudo no Mato Grosso do Sul, demonstrando o papel desse flebotomíneo como possível vetor de outras espécies do parasito com o qual estavam infectados.

Os hospedeiros vertebrados estão expostos a um grande número de picadas de flebotomíneos, o que aumenta a possibilidade de infecção com diferentes cepas ou espécies do parasito (Shirian et al. 2012). Além disso, infecção mista do mesmo macrófago com diferentes espécies de *Leishmania* se mostrou experimentalmente possível, apesar de que na natureza isso seria raro, pois o número de parasitos por célula imediatamente após a picada do inseto vetor é muito baixo (Abdullah et al. 1998).

Infecções experimentais por *Leishmania* podem ser realizadas utilizando diversos modelos, e a evolução deste tipo de infecção em animais experimentais depende de vários fatores, incluindo a cepa e a virulência do parasito, o modelo utilizado, a via de inoculação, o órgão avaliado e o tempo após infecção (Kaye et al. 2004; Garg & Dube 2006). Para obter infecção experimental com cultura de promastigotas ou amastigotas em diferentes modelos animais, um grande número de parasitos são usados, independente da via de inoculação (Melby et al. 2001).

O animal mais suscetível e adequado para infecções por *Leishmania* é o golden hamster, que são da Classe Mammalia, Ordem Rodentia, Família Cricetidae, Gênero *Mesocricetus*, Espécie *Mesocricetus auratus* (Andrade et al. 2006). Outros animais, como por exemplo, camundongos da linhagem BALB/c, também são utilizados, mas não são uniformemente suscetíveis a infecções com diferentes espécies de *Leishmania* como o hamster. As vias de inoculação mais utilizadas em hamsters são a intradérmica ou subcutânea, geralmente no focinho ou patas traseiras com espécies de *Leishmania* dermatrópicas, ou via intraperitoneal com espécies causadoras da forma visceral da doença (Evans 1989).

Animais experimentais são muito utilizados para estudo das leishmanioses, e o hamster é considerado um bom modelo para LV devido a sua suscetibilidade à infecção por diferentes espécies de *Leishmania* e o desenvolvimento de sinais clínicos e alterações patológicas que são semelhantes aos observados na doença humana e canina (Moreira et al. 2012). As lesões na pele desenvolvidas por estes animais são muito similares com as observadas em humanos com a forma cutânea da LT, transformando-o em um promissor modelo de estudo (Hommel et al. 1995). Em adição à sua utilização como um modelo de doença, o hamster é o animal mais utilizado em laboratório para o isolamento de cepas (Oliveira et al. 2004).

Diversos trabalhos utilizaram o hamster *Mesocricetus auratus* como modelo experimental infectado com *Leishmania infantum* (Laurenti et al. 1990; Corbett et al. 1992; Riça-Capela et al. 2003; Miguel et al. 2009; Oliveira et al. 2011; Moreira et al. 2012), *Leishmania braziliensis* (Almeida et al. 1996; Gomes-Silva et al. 2013; Ribeiro-Romão et al. 2014), *Leishmania amazonensis* (Bruzual et al. 2008; Peloi et al. 2011) e *Leishmania major* (Soliman 2006). Aslan et al. (2013) utilizaram o vetor *Lutzomyia longipalpis* na transmissão de *L. infantum* em infecção experimental de hamsters.

Existem diversos métodos parasitológicos utilizados para demonstrar os parasitos em diferentes órgãos e tecidos, estes incluem: avaliação citológica de esfregaços ou impressões em lâminas fixadas e coradas, que podem ser realizadas a partir de materiais biológicos como pele, aspirados de medula óssea, baço e linfonodos utilizando microscópio óptico à procura de amastigotas; inoculação em animais de laboratório, principalmente em hamsters (*Mesocricetus auratus*); culturas “in vitro” de aspirados e fragmentos de órgãos em meio de cultura bifásicos que são mantidas sob condições controladas de temperatura para o desenvolvimento de promastigotas; e análise histopatológica de lâminas devidamente preparadas e coradas à procura de

amastigotas bem como avaliação de processos patológicos em diversos tecidos utilizando microscópio óptico (Alvar et al. 2004; Tafuri et al. 2001; Saridomichelakis et al. 2005; Reithinger & Dujardin 2007; Maia & Campino 2008).

A técnica de imuno-histoquímica descrita por Tafuri et al. 2004 utilizando soro hiperimune de cão naturalmente infectado com *L. infantum* como anticorpo primário, tornou a mesma mais aplicável, de menor custo e mais rápida, quando comparado com as que usam anticorpos monoclonais ou policlonais anti-*Leishmania*. A detecção é feita utilizando anticorpo secundário biotinilado de cabra anti-camundongo e anti-coelho. Além da vantagem de permitir uma análise quantitativa, a técnica tem aumentado a sensibilidade e especificidade do diagnóstico, podendo ser utilizada para o acompanhamento da evolução da doença e do tratamento (Tafuri et al. 2004).

O diagnóstico molecular é outro tipo de método parasitológico e é baseado na detecção de sequências de DNA específicas do parasito. A principal técnica utilizada é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Pode ser aplicada em diversas amostras biológicas como tecidos com lesão, medula óssea, linfonodos, baço, pele, conjuntiva e sangue periférico (Manna et al. 2004; Strauss-Ayali et al. 2004; Maia & Campino 2008).

Schönian et al. (2003) estabeleceram um método de diagnóstico utilizando a técnica de PCR-RFLP da região ITS1 do DNAr para identificação da espécie do parasito utilizando a enzima de restrição *HaeIII*, combinando uma elevada sensibilidade para detectar *Leishmania* diretamente em amostras clínicas e a capacidade de identificar todos os grupos de espécies de importância médica.

O ensaio de PCR-RFLP ITS1 utilizando a enzima *HaeIII* é recomendado para a caracterização confiável de diferentes espécies de *Leishmania*, principalmente em áreas endêmicas onde existe a sobreposição de espécies, exigindo correta identificação. Esta técnica é capaz de detectar a presença de infecção mista em uma mesma amostra analisada (Monroy-Ostria 2014).

Dessa forma observa-se que no Brasil áreas de sobreposição entre diferentes formas clínicas e agentes etiológicos das leishmanioses são frequentes, tornando bastante provável a possibilidade de infecções mistas, o que poderia influenciar no curso clínico da doença, na epidemiologia e no controle. A descrição do curso clínico de infecções mistas e a avaliação de métodos para sua detecção são alguns dos pontos importantes para melhor entendimento desse tipo de infecção, e que serão abordados no presente trabalho.

2. Justificativa

A diversidade clínica exibida pelos hospedeiros nas infecções por *L. infantum* ou *L. amazonensis*, sugere que tanto fatores do parasito quanto do hospedeiro podem estar envolvidos na variabilidade clínica da doença. Assim, devido à importância e diversidade clínico-epidemiológica em nosso país, essas espécies parecem constituir excelentes modelos de estudo.

Os trabalhos existentes sobre a visceralização de espécies como a *L. amazonensis* que causam mais frequentemente a forma cutânea da doença e uma possível coinfeção com outras espécies de *Leishmania* especialmente com *L. infantum*, levantam uma série de questões em relação às espécies causadoras da LV e LT, principalmente em áreas de sobreposição da ocorrência de *L. infantum* e de *L. amazonensis*, que são espécies com ampla distribuição geográfica no Brasil. Isso nos levou a procurar descrever o curso clínico da doença, em caso de coinfeção com essas espécies, qual espécie ou infecção que prevaleceria, se as duas espécies poderiam ser encontradas em um mesmo órgão e se a cepa utilizada de *L. amazonensis* poderia causar visceralização no modelo experimental. Outra questão importante é entender se ambas forem cultivadas em um mesmo meio de cultura, se uma poderia inibir o crescimento da outra, já que a cepa IFLA/BR/1967/**PH8** de *L. amazonensis* tem maior crescimento quando comparado a MCAN/BR/2002/**BH401** de *L. infantum*, podendo mascarar a detecção de uma infecção mista.

Para avançar no entendimento dessas questões, realizamos uma coinfeção experimental com duas espécies de *Leishmania* em um modelo suscetível a ambas para produzirmos informações sobre o desenvolvimento deste tipo de infecção, pois, pode ocorrer na natureza e não ser detectado pelos métodos de diagnóstico empregados, podendo dificultar o tratamento, além de que, na literatura não existe nenhum trabalho sobre coinfeção experimental em hamster (*Mesocricetus auratus*) utilizando duas espécies de *Leishmania* que causam formas clínicas distintas.

3. Objetivos

3.1- Objetivo geral

Caracterizar a infecção experimental por *Leishmania amazonensis*, *Leishmania infantum* e coinfeção no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*).

3.2- Objetivos específicos

- Descrever o curso clínico da infecção experimental por *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**), *L. infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) e da coinfeção em hamsters;
- Avaliar a presença do parasito na pele, baço e fígado na infecção experimental por *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**), *L. infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) e da coinfeção em hamsters;
- Descrever as alterações histopatológicas da pele, baço e fígado na infecção experimental por *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**), *L. infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) e da coinfeção em hamsters.
- Identificar a espécie de *Leishmania* encontrada na pele, baço e fígado na coinfeção experimental em hamsters;

4. Materiais e métodos

4.1- Parasitos

Duas espécies de *Leishmania* foram utilizadas para a infecção experimental, *L. amazonensis*, cepa IFLA/BR/1967/**PH8** isolada de flebotomíneo da espécie *Lutzomyia flaviscutellata* e *L. infantum*, cepa MCAN/BR/2002/**BH401** isolada em Belo Horizonte-MG de um caso canino. Ambas são mantidas no Laboratório de Leishmanioses em meio de cultura, criopreservadas e em hamsters no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Os parasitos na forma promastigota foram produzidos a partir de formas amastigotas obtidas de hamsters em fase crônica da infecção, sendo que *L. amazonensis* foi isolada de lesão no focinho e *L. infantum* de fragmento do baço. Foram cultivados em meio NNN (Novy, McNeal e Nicolle) com *Schneider's* (SIGMA®) completo, suplementado com 2% de urina, 1% de solução de vitaminas (BME Vitamins 100X – SIGMA®), 1% de L-glutamina (200 mM), 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®).

Foram realizados repiques semanais somente em meio *Schneider's* completo. A curva de crescimento foi feita para determinar a fase logarítmica e estacionária de cada espécie, e os parasitos utilizados para a infecção estavam na fase estacionária de crescimento, que é quando se encontra uma maior taxa de formas infectantes. Para manter a virulência do parasito, a cepa de *L. infantum* inoculada estava na 2ª passagem e a cepa de *L. amazonensis* estava na 3ª passagem em meio de cultura. A contagem dos parasitos foi feita utilizando a câmara de *Neubauer* para a obtenção de 10^7 promastigotas de cada espécie por animal, as culturas foram ressuspendidas em PBS estéril e ficaram com volume final suficiente para inocular 500 µL pela via intraperitoneal e 20 µL pela via subcutânea de cada uma das espécies por animal.

4.2- Animais e Grupos experimentais

Para a realização dos experimentos, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG) em 20/08/2013 com protocolo nº 129/2013 (Anexo). Um total de 60 hamsters da espécie *Mesocricetus auratus*, do

mesmo sexo e idade foram utilizados. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG e alocados em grupos experimentais.

Os animais foram divididos em grupos de acordo com a via de inoculação, a espécie de parasito inoculada e o tipo de infecção, se com uma espécie ou duas. Todos os animais foram infectados com a mesma quantidade de promastigotas (10^7 por animal), sendo que os grupos de infecção mista tiveram o dobro de parasitos (10^7 de cada espécie por animal).

Os grupos da via subcutânea tiveram inóculos com volume final de 20 μ L e via intraperitoneal tiveram inóculos com volume final de 500 μ L. No grupo não infectado utilizado como controle, inoculou-se salina estéril pelas duas vias, 20 μ L pela via subcutânea e 500 μ L pela via intraperitoneal. A divisão dos grupos experimentais está representada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos grupos experimentais de acordo com via e local da inoculação e espécie utilizada.

GRUPO	VIA / LOCAL	INÓCULO
1 (n=9)	Subcutânea / pata traseira esquerda	<i>L. infantum</i>
2 (n=9)	Subcutânea / pata traseira direita	<i>L. amazonensis</i>
3 (n=9)	Subcutânea / pata traseira esquerda pata traseira direita	<i>L. infantum</i> <i>L. amazonensis</i>
4 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. infantum</i>
5 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. amazonensis</i>
6 (n=9)	Intraperitoneal	<i>L. infantum</i> + <i>L. amazonensis</i>
7 (n=6)	Subcutânea/ Intraperitoneal	Salina

4.3- Avaliações Clínicas

O curso da infecção foi avaliado a cada 30 dias (dia 0, 30, 60 e 90) através da pesagem de todos os animais individualmente, medição das patas traseiras dos animais pertencentes aos grupos inoculados pela via subcutânea e grupo controle e um monitoramento clínico, levando em consideração o comportamento geral, irritabilidade,

movimentação, respiração, alterações na pelagem, dermatites, aparecimento de lesão na pele, alopecia, lesões oculares, presença de ascite, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, epistaxe, diarréia ou qualquer alteração pertinente, assim como a ocorrência de óbito.

4.4- Avaliações Parasitológicas

Amostras de pele, baço e fígado foram coletadas de forma estéril aos 30, 60 e 90 dias após a infecção (DAI) para avaliar a presença do parasito nesses tecidos utilizando as técnicas parasitológicas descritas a seguir. Ressaltando que a coleta aos 60 DAI foi realizada somente nos grupos infectados por via SC.

4.4-1. Microscopia

Foram feitos esfregaços por aposição de amostras de pele, baço e fígado em lâminas de microscopia. As lâminas foram coradas utilizando o Panótico Rápido (Laborclin) de acordo com as instruções do fabricante: após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, foram feitas cinco imersões em fixador, corante básico e corante ácido. As lâminas foram lavadas com água destilada, secadas em temperatura ambiente e examinadas em microscópio óptico com objetiva de imersão (100X) para a observação de formas amastigotas.

4.4-2. Isolamento em meio de cultura

Fragmentos de pele, baço e fígado foram coletados para o isolamento em tubos de ensaio com meio de cultura NNN e *Schneider's* completo. As culturas foram mantidas em estufa (BOD-Fanem) a 23°C, e após 7 dias do isolamento, as culturas foram analisadas em microscópio óptico para a observação de formas promastigotas. Nas amostras negativas foi colocado mais meio de cultura e estas foram analisadas novamente após 5 dias e assim sucessivamente até 30 dias, quando eram descartadas caso não fossem observadas formas promastigotas. Nas amostras positivas foi feito um repique em garrafas de cultura com meio *Schneider's* completo. Após cerca de 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 lavado 3 vezes com PBS 1X estéril. Após as lavagens o pellet foi congelado em freezer -80°C para posterior extração de DNA.

4.4-3. PCR-RFLP

Amostras de parasitos isolados em cultura e de fragmentos de pele, baço e fígado foram submetidas à extração de DNA utilizando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções do fabricante. Em todas as amostras, incluindo as de culturas, o DNA foi quantificado utilizando o espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). Foi realizada a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em todas as amostras de DNA extraídas para confirmação da presença de DNA de *Leishmania* associada à técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição) para identificação da espécie.

A técnica de PCR-RFLP foi realizada de acordo com Schönián et al. (2003) com algumas modificações. Para a PCR foi utilizado um par de iniciadores (IDT®) que amplificam a região do ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) do DNA ribossomal de *Leishmania*, separando os genes codificadores para SSU RNAr e 5.8S RNAr. Os iniciadores utilizados foram: **LITSR** 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e **L5.8S** 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3' que geram um produto de 300-350 pares de bases dependendo da espécie.

Controles positivos com DNA extraído de cultura de *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/**PH8**) e *L. infantum* (MCAN/BR/2002/**BH401**) foram utilizados, assim como controles negativos sem DNA. As reações foram feitas com volume final de 20 µL, sendo 0,2 mM de dNTPs, 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmol de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase Platinum® e 1 µL (50ng) de DNA por reação. Estas foram colocadas no Termociclador (PTC-100™) utilizando o programa ITS1: passo 1 – desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; passo 2 – 95°C por 20 segundos; passo 3 – anelamento a 53°C por 30 segundos; passo 4 – extensão a 72°C por 1 minuto; passo 5 – repetição dos passos 2, 3 e 4 por 32 vezes; passo 6 – extensão final a 72°C por 6 minutos; passo 7 – 8°C que é a temperatura de armazenamento.

Foi acrescentado ao produto amplificado da PCR um tampão da amostra (Green Gotaq™ 2X) e em seguida foi feita a eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo a 1,0µg/µL, diferença de potencial de 70V em tampão TBE (Tris borato EDTA) 1X. Um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 100 pb

(pares de base) (Promega) foi utilizado. Os resultados foram observados e fotografados utilizando um transiluminador.

Para a RFLP das amostras positivas na PCR foi utilizada 2U da enzima de restrição *HaeIII* (Promega) em 10µL do produto amplificado, que foram incubados a 37°C durante 2h30 e em seguida a 80°C por 20 minutos. Com a utilização desta enzima, as diferentes espécies de *Leishmania* apresentam perfis distintos, por exemplo, *L. infantum* apresenta fragmentos de aproximadamente 184, 72 e 55 pb e *L. amazonensis* 186 e 142 pb aproximadamente, portanto, diferencia claramente as duas espécies utilizadas nos experimentos.

A eletroforese das amostras digeridas foi feita em gel de poliacrilamida a 6%, corrida a 60V em tampão TBE 1X. Um marcador de peso molecular com fragmentos múltiplos de 50 pb (Biolabs) foi utilizado. Para a observação dos resultados foi seguido o protocolo de coloração do gel pela prata rápida: 1- solução fixadora (etanol P.A., ácido acético glacial e água destilada) por no mínimo 3 minutos; 2- acrescentou-se solução de nitrato de prata a 10% por 3 minutos; 3- a solução de nitrato de prata foi descartada e o gel foi lavado duas vezes com água destilada; 4- solução reveladora (hidróxido de sódio e água destilada) com formaldeído acrescentado no momento do uso até o aparecimento das bandas. Durante o procedimento de coloração o gel estava em agitação constante. Após a coloração, a solução reveladora foi descartada e o gel colocado novamente em solução fixadora. Os géis foram escaneados para observação dos resultados utilizando o programa LabScan™.

4.5- Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

Após a eutanásia dos animais aos 30, 60 e 90 DAI, amostras de pele, baço e fígado foram coletadas e colocadas em solução de formalina tamponada a 10%. Lâminas contendo cortes parafinados destes órgãos foram coradas pela técnica da Hematoxilina & Eosina (H&E) e analisadas por microscopia óptica. Brevemente, as lâminas foram inicialmente desparafinadas em xilol I e II por 15 minutos cada, hidratadas em soluções decrescentes de álcoois 3 minutos cada, e a seguir, lavadas em água corrente. Posteriormente foram coradas em hematoxilina (3 mergulhos) e, após lavagem em água corrente por 10 minutos, coradas em eosina por 1 minuto. Posteriormente, foram desidratadas em soluções crescentes de álcoois, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®.

As alterações histopatológicas avaliadas na pele foram: ulceração, necrose, acantose, hiperkeratose, parakeratose, inflamação e degeneração. No baço: espessamento e inflamação da cápsula, hipertrofia e hiperplasia da polpa branca e da polpa vermelha, congestão sinusoidal e deposição de hemossiderina. No fígado: inflamação da cápsula, inflamação portal, presença de granuloma, fenômenos degenerativos (hidrópica e esteatose), hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer, congestão sinusoidal e deposição de hemossiderina.

Estas avaliações foram realizadas de forma semi-quantitativa, levando em consideração a extensão das alterações em todo o corte histológico e classificadas da seguinte forma: 1- ausência de alteração; 2- alteração discreta (20-30%); 3- alteração moderada (>30-60%) e 4- alteração intensa (> 60%).

Foi realizada também a técnica de imuno-histoquímica com os cortes histológicos da pele, baço e fígado dos animais. Lâminas contendo cortes parafinados destes órgãos foram hidratadas e submetidas aos banhos em PBS (Tampão Salina Fosfato). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (30 volumes) a 4% (30 minutos em temperatura ambiente). Reações inespecíficas foram bloqueadas com leite em pó (caseína) a 6% em PBS em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente, com lavagem em PBS. Os cortes foram incubados com soro primário hiperimune de cão na diluição de 1:100 por 24 h em câmara úmida a 4 °C segundo Tafuri et al. (2004). No dia seguinte o anticorpo secundário biotilado (kit DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675) foi adicionado por 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara úmida. Posteriormente, o complexo estreptavidina peroxidase (kit DAKO - LSAB 2 System, Peroxidase – K0675) foi adicionado por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. A revelação foi feita com a adição da solução reveladora *Diaminobenzidina* (DAB) a 0,024%, acrescida da solução de peróxido de hidrogênio por 5 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água corrente, contra coradas com Hematoxilina de Harris, lavadas novamente, desidratadas em álcoois com concentrações crescentes (70°, 80°, 90° e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e montadas com Entellan[®].

A avaliação da marcação das formas amastigotas de *Leishmania* foi feita através da análise de 20 campos com a utilização de microscópio óptico e o parasitismo foi classificado de forma semi-quantitativa sendo: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (> 60%).

5. Resultados

5.1- Avaliações clínicas

Em todos os animais dos grupos inoculados pela via subcutânea (SC) foram realizadas observações, pesagem e medições das patas inoculadas, não inoculadas e inoculadas com salina dos animais do grupo controle em 0, 30, 60 e 90 dias após infecção (DAI) e a eutanásia ocorreu aos 30, 60 e 90 DAI. Nos grupos inoculados pela via intraperitoneal (IP) também foram realizadas observações e pesagem dos animais em 0, 30, 60 e 90 DAI e a eutanásia ocorreu aos 30 e 90 DAI.

5.1-1. Infecção por *L. infantum* (Via SC e IP)

Nos animais inoculados via SC com *L. infantum* (GRUPO 1) não foram observadas lesões nas patas e não houve diferença significativa na espessura (Figura 1). Outras observações também foram feitas e não houve nenhuma alteração aparente digna de nota. Também não foram registradas alterações significativas no peso dos animais deste grupo (Tabela 2). Alterações foram observadas após eutanásia somente aos 90 DAI, em que 3/3 (100%) dos animais estavam com esplenomegalia; 2/3 (66,7%) com ascite moderada e 1/3 (33,3%) com órgãos friáveis.

Os animais inoculados via IP com *L. infantum* (GRUPO 4) não apresentaram nenhuma alteração aparente durante os 90 dias de observações que seja digna de nota e também não houve alteração significativa no peso (Tabela 2). Neste grupo, as alterações após eutanásia também foram observadas aos 90 DAI, com hepatoesplenomegalia em 100% dos animais (6/6); ascite moderada e órgãos friáveis em 50% (3/6).

As alterações clínicas observadas nos animais dos grupos inoculados com *L. infantum* pelas duas vias estão na Tabela 3.

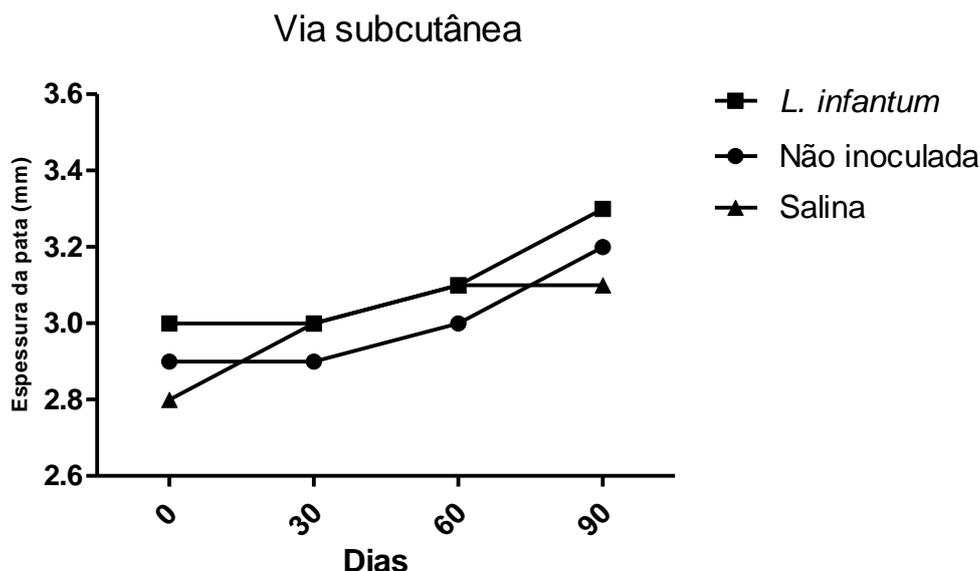


Figura 1: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 1 inoculadas com *L. infantum* (■), não inoculadas (●) e do grupo controle inoculadas com salina (▲), não apresentando diferença significativa entre elas durante os 90 dias de observações.

5.1-2. Infecção por *L. amazonensis* (Via SC e IP)

Após 30, 60 e 90 dias de infecção, nos animais inoculados via SC com *L. amazonensis* (GRUPO 2) observou-se todas as patas inoculadas (9/9) com lesões (Figura 2) e aumento significativo na espessura ($p < 0.05$) quando comparadas a patas não inoculadas e inoculadas com salina (Figura 3). Aos 90 DAI, 1/3 dos animais além de apresentar lesão na pata inoculada, estava com pequenas lesões nas outras patas, dianteiras e traseiras. Durante os 90 dias de observação os animais não apresentaram alterações de peso significativas (Tabela 2). Esplenomegalia e ascite moderada foram observadas somente aos 90 DAI em 2/3 (66,7%) dos animais (Tabela 3).

Nos animais inoculados com *L. amazonensis* via IP (GRUPO 5) foram observadas lesões nos animais aos 90 DAI, quando 50% (3/6) apresentaram lesão na bolsa escrotal, (3/6) estavam com pequena lesão no abdômen e (1/6) com pequenas lesões nas patas dianteiras e perna (Figura 4). Com relação ao peso dos animais não houve alteração significativa (Tabela 2). Após a eutanásia aos 90 DAI, foram encontradas alterações em 3/6 dos animais, esplenomegalia e ascite moderada (Tabela 3).

Via subcutânea

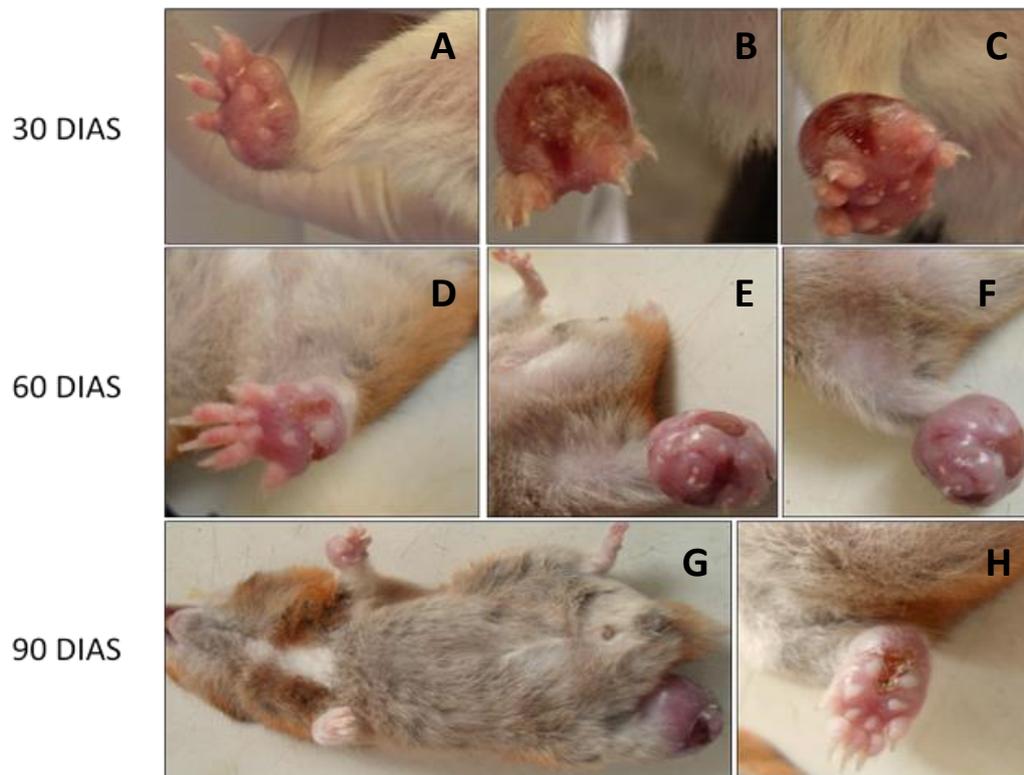


Figura 2: Imagens representativas das lesões nas patas inoculadas com *L. amazonensis* nos animais do GRUPO 2 (via SC) aos 30, 60 e 90 DAI. Aos 90 DAI observa-se um animal (G) com uma lesão também na pata dianteira (não inoculada).

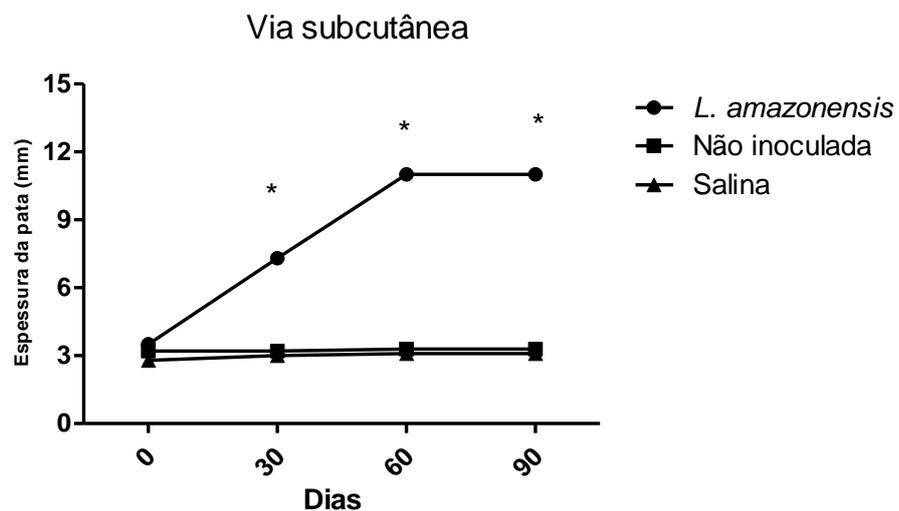


Figura 3: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 2 inoculadas com *L. amazonensis* (●), não inoculadas (■) e do grupo controle inoculadas com salina (▲), apresentando diferença significativa (*p<0.05) a partir de 30 DAI.

Via intraperitoneal – 90 dai

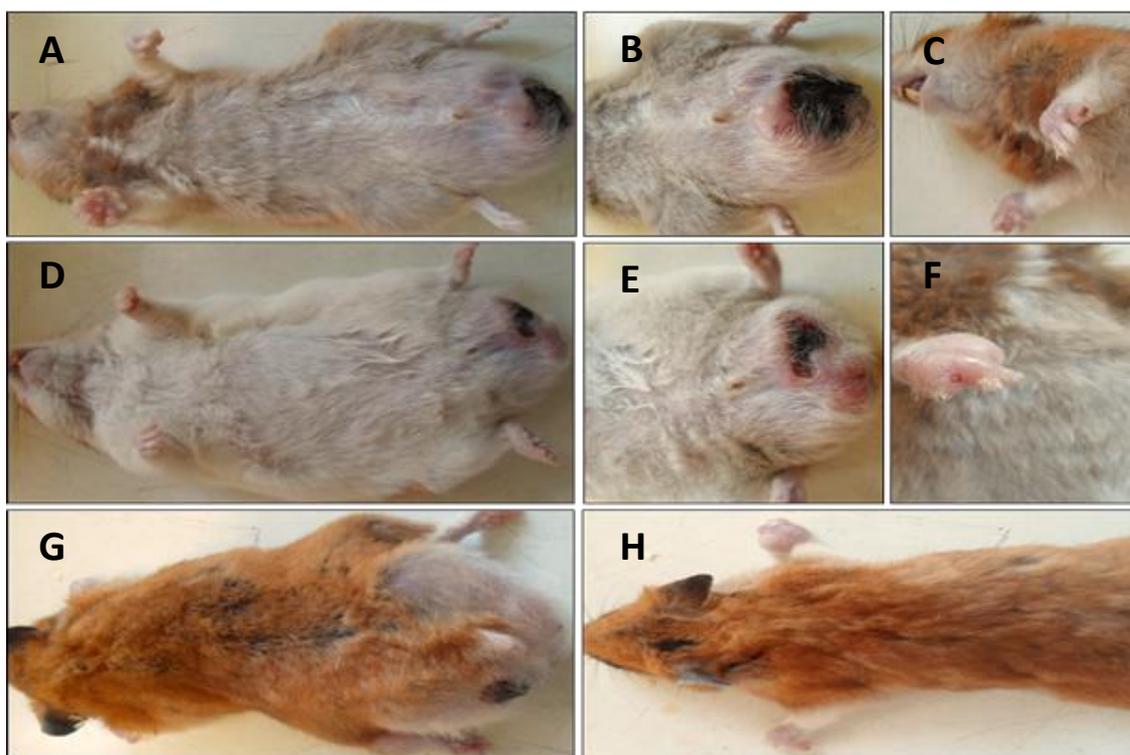


Figura 4: Imagens representativas das lesões e inchaço na bolsa escrotal (A, B, D, E, G) e nas patas (C, F, H) dos animais do GRUPO 5 (*L. amazonensis* via IP) observadas aos 90 DAI.

5.1-3. Coinfecção (Via SC e IP)

Todos os animais (9/9) inoculados com as duas espécies via SC (GRUPO 3) apresentaram lesão na pata inoculada com *L. amazonensis* a partir de 30 DAI (Figura 5) com diferença significativa ($p < 0.05$) na espessura quando comparado com as patas dos animais do mesmo grupo inoculadas com *L. infantum* e com salina do grupo controle (Figura 6). Aos 90 DAI, 1/3 dos animais além de apresentar lesão na pata inoculada com *L. amazonensis*, estava com lesão na pata inoculada com *L. infantum* e pequena lesão na pata dianteira; e 1/3 além da lesão na pata inoculada com *L. amazonensis* estava com uma lesão na perna. Com relação ao peso, os animais não apresentaram alteração significativa (Tabela 2). Alterações em órgãos internos foram observadas aos 60 DAI, em que 3/3 dos animais estavam com esplenomegalia e aos 90 DAI 3/3 estavam com esplenomegalia e 1/3 com ascite (Tabela 3).

Nos animais inoculados com as duas espécies pela via IP (GRUPO 6), lesões de pele foram observadas em todos aos 90 DAI. Ocorreram lesões na bolsa escrotal em 100% dos animais (6/6) e lesões nas patas dianteiras em 33,3% (2/6) deles (Figura 7). Este grupo não apresentou alterações de peso significativas (Tabela 2). Alterações viscerais foram encontradas aos 90 DAI, sendo hepatoesplenomegalia a alteração mais frequente observada em 100% (6/6) dos animais e ascite moderada e órgãos friáveis observados em 50% (3/6) dos animais (Tabela 3).

Quando foram comparadas as espessuras das patas inoculadas com *L. infantum* do GRUPO 1 (*L. infantum*) e do GRUPO 3 (coinfecção), não houve diferença significativa entre elas, apesar da espessura maior nos animais com coinfecção aos 90 DAI. Foi comparada também a medida das patas inoculadas com *L. amazonensis* do GRUPO 2 (*L. amazonensis*) e do GRUPO 3 (coinfecção), e aos 90 DAI observou-se diferença significativa ($p < 0.05$) com aumento maior nos animais com coinfecção (Figura 8).

Via subcutânea

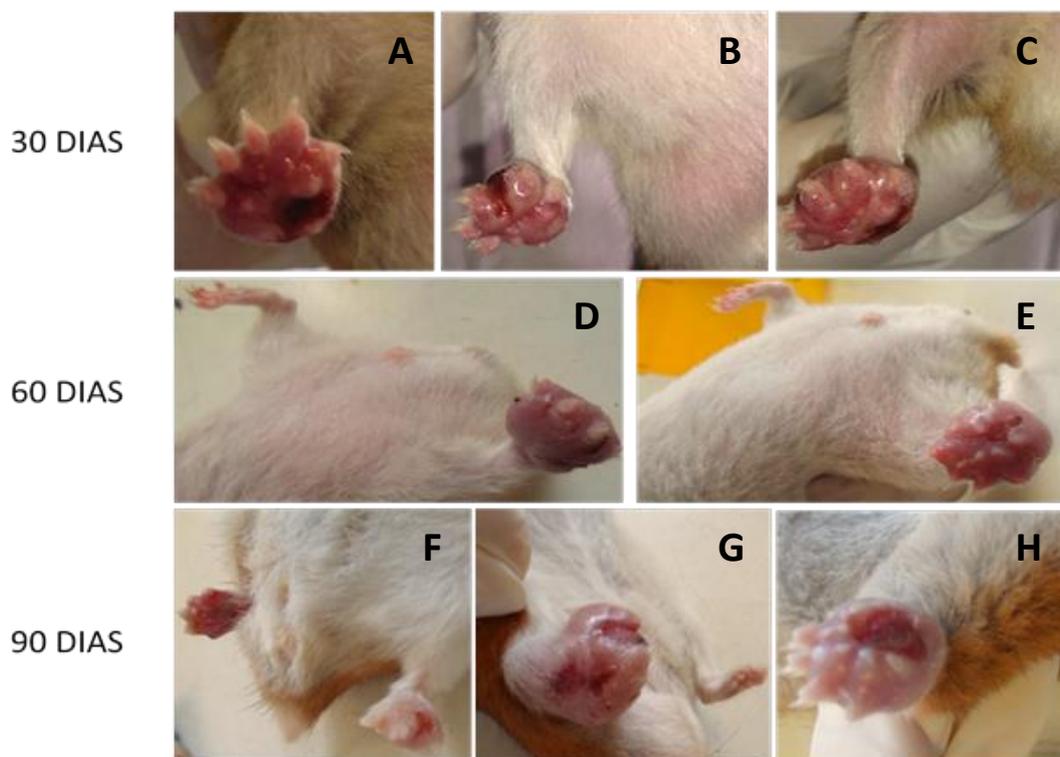


Figura 5: Imagens representativas das lesões nas patas inoculadas com *L. amazonensis* nos animais do GRUPO 3 (coinfecção) aos 30, 60 e 90 DAI. Aos 90 DAI observa-se um animal com uma lesão também na pata esquerda inoculada com *L. infantum* (F).

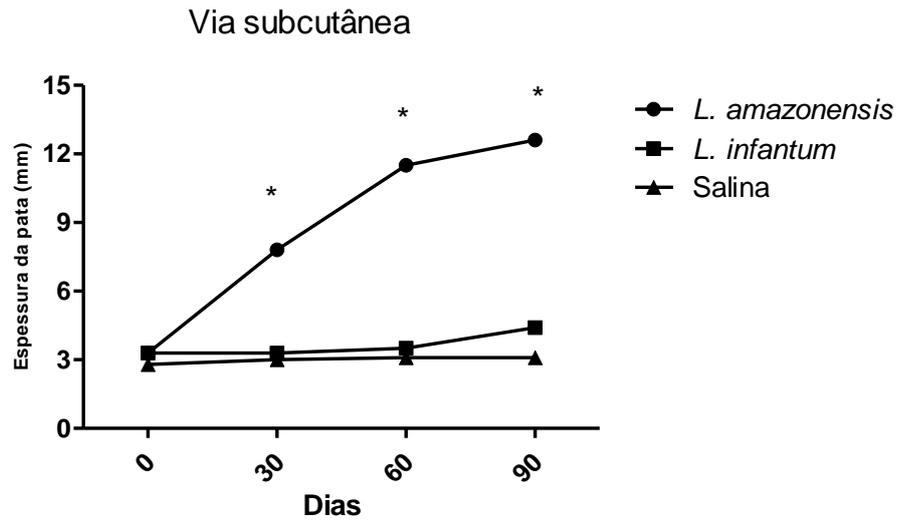


Figura 6: Média da espessura das patas dos animais do GRUPO 3 (coinfecção) inoculadas com *L. amazonensis* (●), *L. infantum* (■) e do grupo controle com salina (▲). Patas inoculadas com *L. amazonensis* apresentando diferença significativa (* $p < 0.05$) a partir de 30 DAI.

Via intraperitoneal – 90 dai

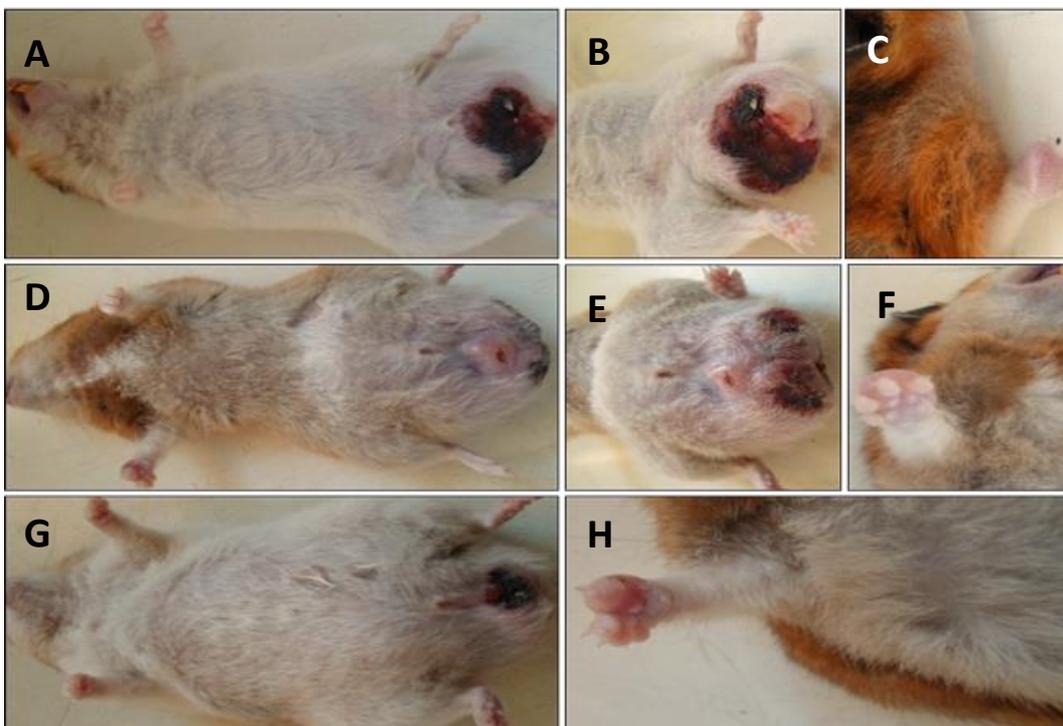


Figura 7: Imagens representativas das lesões e inchaço na bolsa escrotal (A, B, D, E, G) e nas patas (C, F, H) dos animais do GRUPO 6 (coinfecção) observadas aos 90 DAI.

Tabela 2: Média de peso dos animais inoculados com *L. infantum*, *L. amazonensis*, coinfeção e controle com salina pelas vias SC e IP. Durante os 90 dias de observações os animais não apresentaram alterações significativas de peso.

Média de peso (g)				
Infecção	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Dia 90
<i>L. infantum</i> (SC)	116	129	135	139
<i>L. infantum</i> (IP)	129	144	144	143
<i>L. amazonensis</i> (SC)	115	117	129	127
<i>L. amazonensis</i> (IP)	124	134	142	146,2
Coinfeção (SC)	110	130	135	127
Coinfeção (IP)	128,5	139	150	152
Controle	123	138	142,5	143

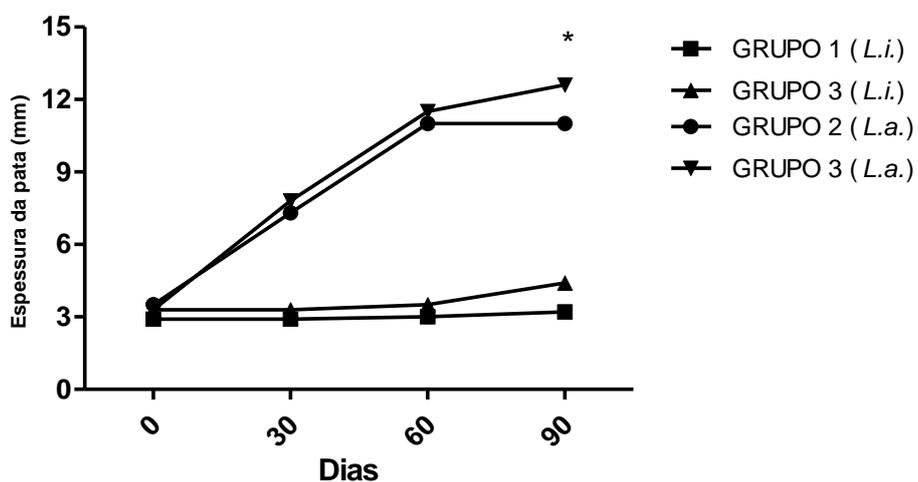


Figura 8: Média da espessura das patas inoculadas com *L. infantum* do GRUPO 1 (■) e GRUPO 3 (coinfeção ▲); e média da espessura das patas inoculadas com *L. amazonensis* do GRUPO 2 (●) e GRUPO 3 (coinfeção ▼). (* $p < 0.05$).

Tabela 3: Alterações clínicas observadas nos animais inoculados com *L. infantum*, *L. amazonensis* e coinfeção pela via subcutânea (SC) aos 30, 60 e 90 DAI e via intraperitoneal (IP) aos 30 e 90 DAI. *L.a.* = *L. amazonensis*; *L.i.* = *L. infantum*; NO = não observado; NR = não realizado.

		30 DIAS	60 DIAS		90 DIAS					
Espécie	Via	Lesão no local do inóculo	Esplenomegalia	Lesão no local do inóculo	Hepatomegalia	Esplenomegalia	Ascite moderada	Órgãos friáveis	Lesão no local do inóculo	Outras lesões
<i>L. infantum</i>	SC	NO	NO	NO	NO	3/3 (100%)	2/3 (66,7%)	1/3 (33,3%)	NO	NO
	IP	NO	NR	NR	6/6 (100%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	NO	NO
<i>L. amazonensis</i>	SC	9/9 (100%)	NO	6/6 (100%)	NO	2/3 (66,7%)	2/3 (66,7%)	NO	3/3 (100%)	1/3 (33,3%)
	IP	NO	NR	NR	NO	3/6 (50%)	3/6 (50%)	NO	3/6 (50%)	3/6 (50%)
Coinfeção	SC	9/9 (100%) – <i>L.a.</i>	3/3 (100%)	6/6 (100%) – <i>L.a.</i>	NO	3/3(100%)	1/3(33,3%)	NO	3/3 (100%) – <i>L.a.</i> 1/3(33,3%) – <i>L.i.</i>	2/3(66,7%)
	IP	NO	NR	NR	6/6 (100%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)	3/6 (50%)	NO	6/6 (100%)

Durante os 90 dias de observações, os animais inoculados com salina pelas duas vias (SC e IP) utilizados como grupo controle não apresentaram nenhum tipo de alteração permanecendo saudáveis até o fim das observações (Figura 9). A média da espessura das patas inoculadas com salina está nas Figuras 1, 3 e 6 e média de peso do grupo na Tabela 2.



Figura 9: Animal não infectado, inoculado com salina pelas duas vias, subcutânea e intraperitoneal, apresentando-se sadio, sem nenhuma lesão ou alteração.

5.2- Avaliações parasitológicas e histopatológicas

5.2-1. Pele

I. Infecção por *L. infantum* (Via SC e IP)

As amostras de biópsia de pele utilizadas nas avaliações parasitológicas na infecção por *L. infantum* foram coletadas do local do inóculo, sendo pata traseira esquerda no GRUPO 1 (via SC) coletadas aos 30, 60 e 90 DAI e abdômen no GRUPO 4 (via IP) coletadas aos 30 e 90 DAI.

a) Microscopia

Não foram encontradas amastigotas nas lâminas de esfregaço por aposição da pele em nenhum dos dois grupos inoculados com *L. infantum* em nenhum dos tempos avaliados (Figura 15A).

b) Isolamento em meio de cultura

Não foi observado o crescimento de promastigotas nas culturas de pele dos grupos inoculados com *L. infantum* em nenhum dos tempos (Figura 15B).

c) PCR

No GRUPO 1 (via SC) observou-se amostras positivas em todos os tempos avaliados. Sendo 100% (3/3) aos 30 DAI, 66,7% (2/3) aos 60 DAI e apenas 33,3% (1/3) aos 90 DAI. No GRUPO 4 (via IP) também foram observadas amostras positivas em todos os tempos, sendo que aos 30 DAI apenas 1/3 (33,3%) das amostras foi positiva e aos 90 DAI 50% (3/6) (Figura 15C). Todas as amostras de cultura em que se observou crescimento de promastigotas foram positivas na PCR.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

No GRUPO 1 aos 30, 60 e 90 DAI observou-se acantose, hiperkeratose e degeneração hidrópica discretas e parakeratose moderada. Aos 30 DAI presença intensa de pérolas córneas. Nos animais do GRUPO 4 observou-se alterações como acantose, hiperkeratose e degeneração hidrópica discretas. Inflamação discreta e focal aos 90 DAI (Figura 10). Sem a presença de parasitos nos dois grupos (Figura 15D).

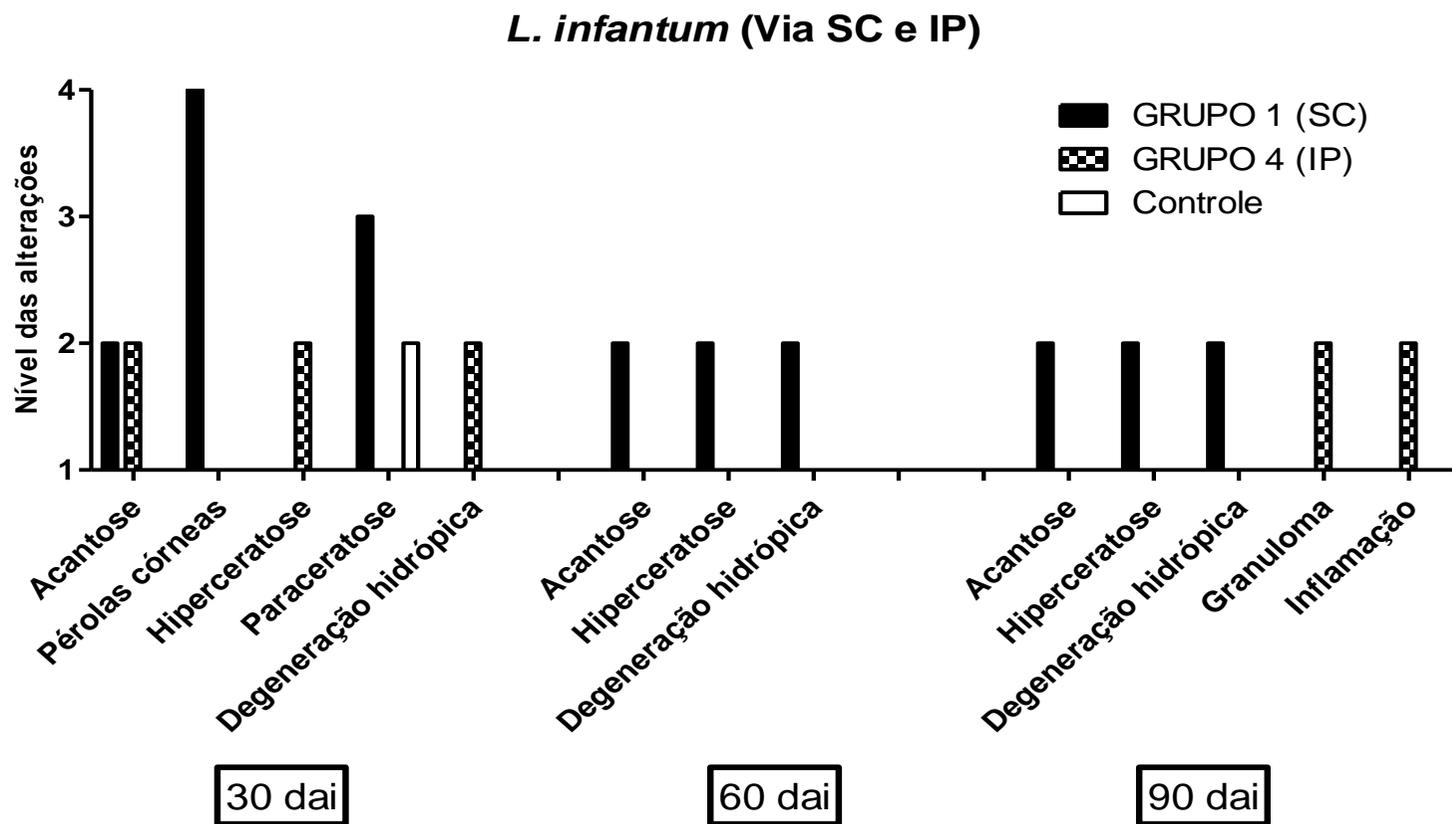


Figura 10: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

II. Infecção por *L. amazonensis* (Via SC e IP)

As amostras de biópsia de pele utilizadas nas avaliações parasitológicas foram coletadas do local do inóculo em todos os animais (9/9) do GRUPO 2 (via SC - pata traseira direita) aos 30, 60 e 90 DAI. No GRUPO 5 (via IP) a pele foi coletada do local do inóculo (abdômem) em todos os animais (3/3) aos 30 DAI e aos 90 DAI a coleta foi realizada nos locais em que surgiram lesões (abdômen e bolsa escrotal).

a) Microscopia

Amastigotas foram observadas em 100% (9/9) das lâminas de biópsia de pele do GRUPO 2 (via SC) em todos os tempos avaliados. Nas lâminas de pele do GRUPO 5 (via IP) foram observadas amastigotas em 100% (6/6) das lâminas analisadas (3 de abdômen e 3 de bolsa escrotal) aos 90 DAI.

b) Isolamento em meio de cultura

Foi observado o crescimento de promastigotas em 100% das culturas de pele do GRUPO 2 em todos os tempos e em 100% das culturas do GRUPO 5 aos 90 DAI.

c) PCR

No GRUPO 2 foi observado 100% de amostras de biópsia de pele positivas aos 30, 60 e 90 DAI, sendo que aos 90 DAI uma amostra de pele foi coletada da pata dianteira (não inoculada) lesionada. No GRUPO 5 (via IP) também observou-se 100% de amostras positivas aos 30 DAI e aos 90 DAI. Nas amostras de cultura em que se observou o crescimento de promastigotas realizou-se a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

No GRUPO 2 (via SC) observou-se ulceração e pérolas córneas intensa aos 30 DAI, necrose, acantose, hiperkeratose, parakeratose e degeneração hidrópica variando de discreto a moderado, inflamação intensa e difusa com presença de polimorfonucleares e mononucleares e parasitos durante os 90 dias de observações. No GRUPO 5 (via IP) a pele apresentou intensa ulceração e necrose aos 90 DAI, acantose, degeneração hidrópica e hiperkeratose, discretos a moderados. Aos 90 DAI houve

inflamação intensa difusa atingindo derme profunda com predomínio de mononucleares e presença de parasitos.

As alterações e parasitismo do G2 e G5 estão representados na Figura 11 e 15.

***L. amazonensis* (Via SC e IP)**

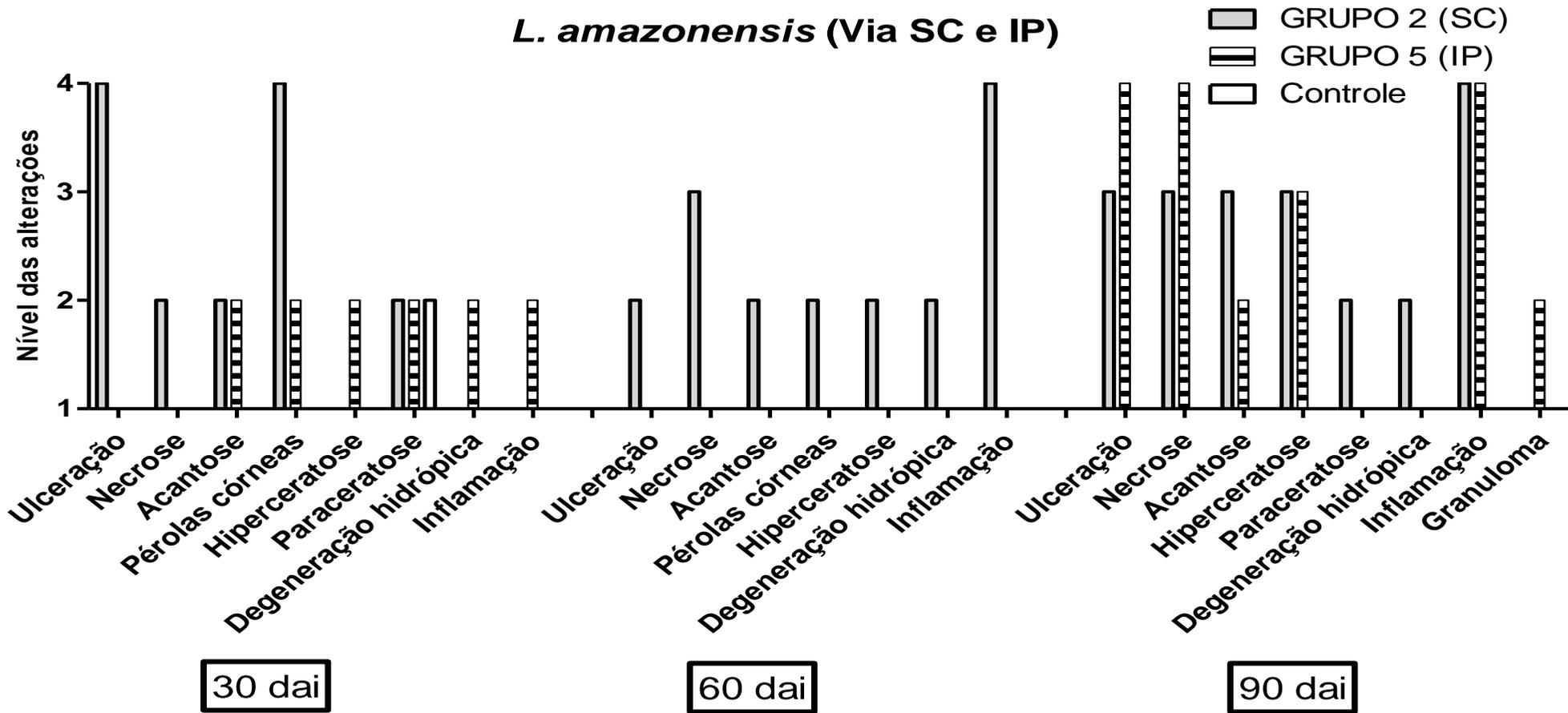


Figura 11: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

III. Coinfecção (Via SC e IP)

As amostras de biópsia de pele utilizadas nas avaliações parasitológicas nos animais com coinfecção foram obtidas dos locais dos inóculos aos 30, 60 e 90 DAI no GRUPO 3 (via SC), sendo que na pata traseira esquerda foi inoculada a espécie *L. infantum* e na pata traseira direita foi inoculada *L. amazonensis*. No GRUPO 6 (via IP) aos 30 DAI as amostras de pele foram coletadas do local do inóculo (abdômen) e aos 90 DAI foram coletadas pele da bolsa escrotal.

a) Microscopia

Amastigotas foram observadas em 66,7% das lâminas de pele do GRUPO 3 (via SC), sendo 3/3 da pata inoculada com *L. amazonensis* e 1/3 da pata com *L. infantum* aos 30 DAI. Aos 60 e 90 DAI, 100% das lâminas foram positivas das duas patas. No GRUPO 6 (via IP) foram observadas amastigotas em 100% (6/6) das lâminas analisadas aos 90 DAI.

Na Figura 12 observam-se amastigotas encontradas em duas lâminas de microscopia de biópsia de pele dos grupos de coinfecção.

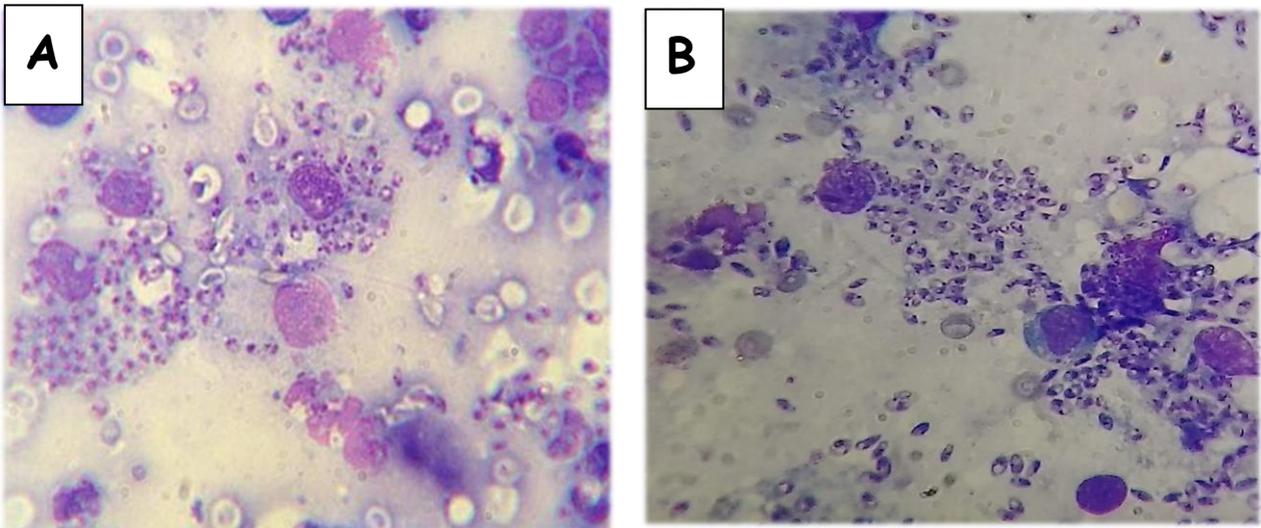


Figura 12: Imagens representativas de amastigotas de *Leishmania* em lâminas de microscopia de biópsia de pele da pata inoculada com *L. amazonensis* do G3 (coinfecção) pela via SC (A) e pele da bolsa escrotal do G6 (coinfecção) pela via IP (B) aos 90 DAI. Aumento 100X.

b) Isolamento em meio de cultura

No GRUPO 3 observou-se o crescimento de promastigotas em 66,7% das culturas de pele analisadas, 3/3 da pata inoculada com *L. amazonensis* e 1/3 da pata com *L. infantum* aos 30 DAI. Aos 60 e 90 DAI, 100% das culturas de pele das duas patas foram positivas. No GRUPO 6 observou-se o crescimento de promastigotas apenas aos 90 DAI, quando 100% (6/6) das culturas foram positivas.

c) PCR

Foi observado no GRUPO 3 um total de 66,7% de amostras positivas de pele, sendo 3/3 da pata inoculada com *L. amazonensis* e 1/3 da pata com *L. infantum* aos 30 DAI. Aos 60 DAI observou-se 83,3% de amostras positivas, sendo 3/3 da pata inoculada com *L. amazonensis* e 2/3 da pata com *L. infantum* e aos 90 DAI 100% das amostras das duas patas foram positivas, e uma amostra de pele da pata dianteira (não inoculada) lesionada também foi positiva.

No GRUPO 6 foi observado 100% de amostras positivas aos 30 e 90 DAI. Nas amostras de cultura em que se observou o crescimento do parasito foi realizada a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica (IHQ)

No GRUPO 3 (via SC) a pele das patas inoculadas com as diferentes espécies apresentaram alterações distintas. Na pata inoculada com *L. infantum*, observou-se acantose, hiperqueratose, parakeratose e degeneração hidrópica, discretos a moderados. Inflamação intensa e difusa com predomínio de mononucleares aos 90 DAI e presença de parasitos aos 30, 60 e 90 DAI. Na pata inoculada com *L. amazonensis*, observou-se intensa ulceração, necrose e pérolas córneas aos 30 DAI, acantose, hiperqueratose e degeneração hidrópica variando de discreto a moderado. Inflamação intensa e difusa com a presença de polimorfonucleares e mononucleares e o encontro de parasitos aos 30, 60 e 90 DAI (Figura 13).

No GRUPO 6 via IP a pele apresentou ulceração e necrose intensa, acantose, hiperqueratose e degeneração hidrópica discretos, inflamação intensa e difusa com predomínio de mononucleares e presença de parasitos aos 90 DAI (Figura 13).

Cortes histológicos da pele mostrando as alterações e parasitos nas infecções por *L. infantum*, *L. amazonensis* e coinfecção estão na Figura 14.

A Figura 15 representa a porcentagem de amostras de pele positivas em cada tipo de infecção (espécie e via de inoculação) de acordo com o método utilizado: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e em (D) a intensidade do parasitismo segundo IHQ.

Coinfecção (Via SC e IP)

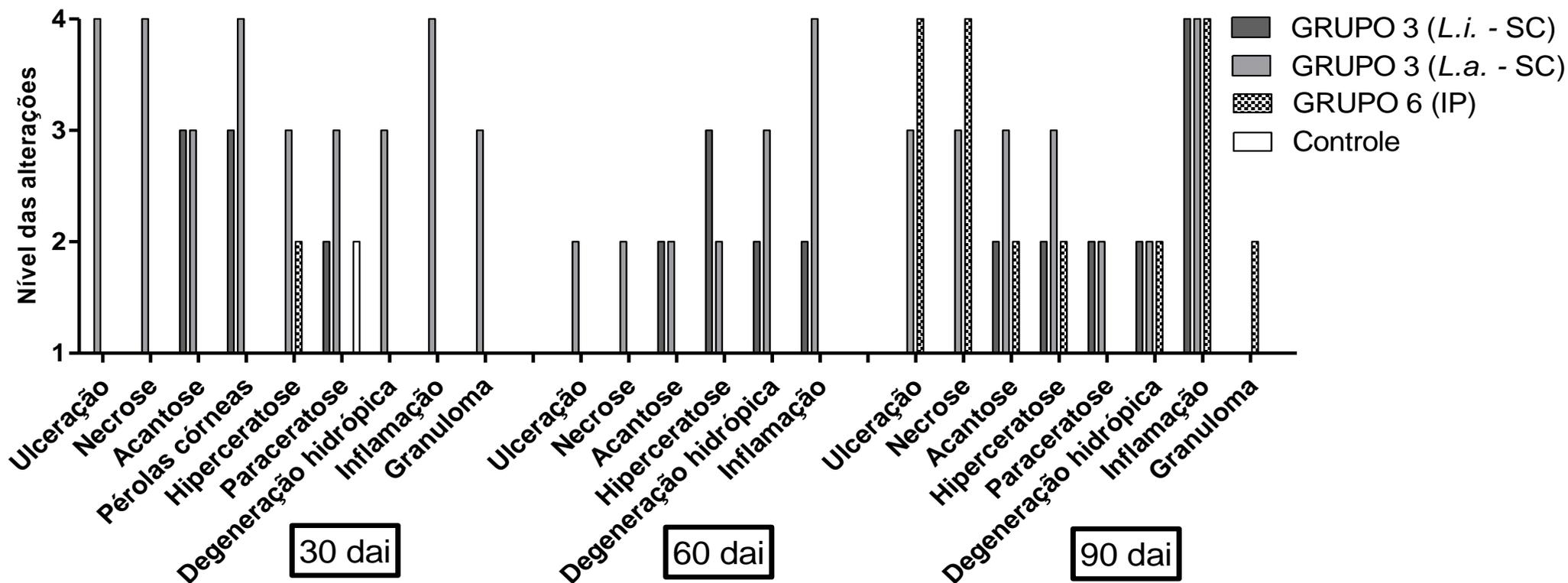


Figura 13: Alterações histopatológicas observadas na pele dos animais com coinfecção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. No G3 foram avaliadas separadamente a pata inoculada com *L. infantum* e inoculada com *L. amazonensis*. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

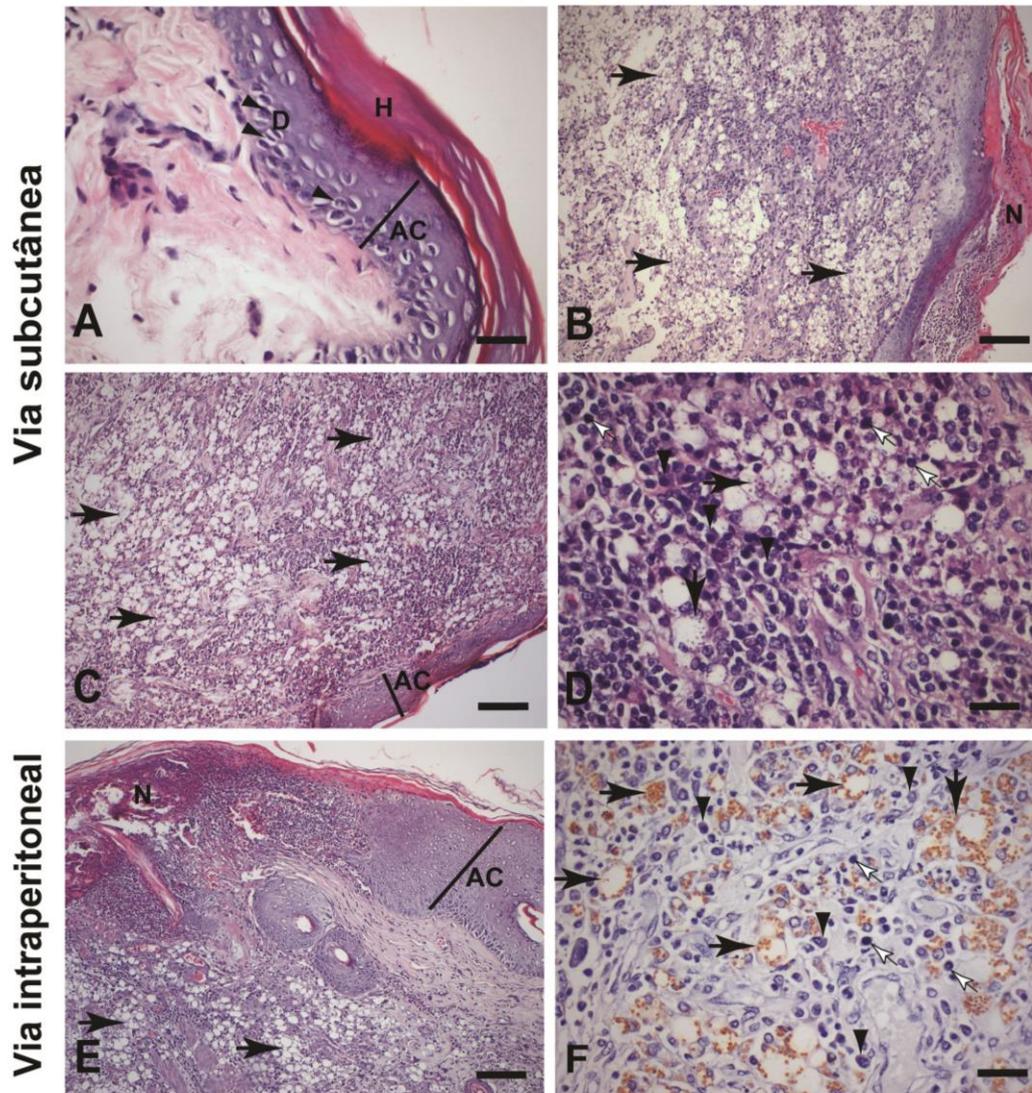


Figura 14: Corte histológico de pele de hamsters infectados por *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfeção pelas vias SC e IP. Figuras A - D imagens representativas da infecção via subcutânea, E - F via intraperitoneal. (A) Observar alterações do epitélio comuns a todos os grupos: Acanthose (AC), Hiperceratose (H), Degeneração (D) e sem a presença de inflamação comum ao grupo G1 e G4. Em (B e C) observar inflamação intensa e difusa (setas pretas) com áreas de necrose (N) em (B) comum ao grupo G2 e G3 inoculado com *L. amazonensis* e sem em (C) com áreas de acantose (AC) comum ao grupo G3 inoculado com *L. infantum*. Em (D) detalhe do infiltrado inflamatório com predomínio de mononucleares linfócitos (setas brancas), plasmócitos (cabeça de setas pretas) e macrófagos vacuolizados (setas pretas) repletos de formas amastigotas. Em (E) observar inflamação intensa e difusa (setas pretas) com áreas de necrose (N), acantose (AC) e em (F) macrófagos vacuolizados (setas pretas) repletos de formas amastigotas marrons imunomarcadas, comum ao grupo G5 e G6. (A - E) coloração pela H&E e em (F) imuno-histoquímica. (A, D, F) 16 μm (400x), (B, C, E) = 32 μm (200x).

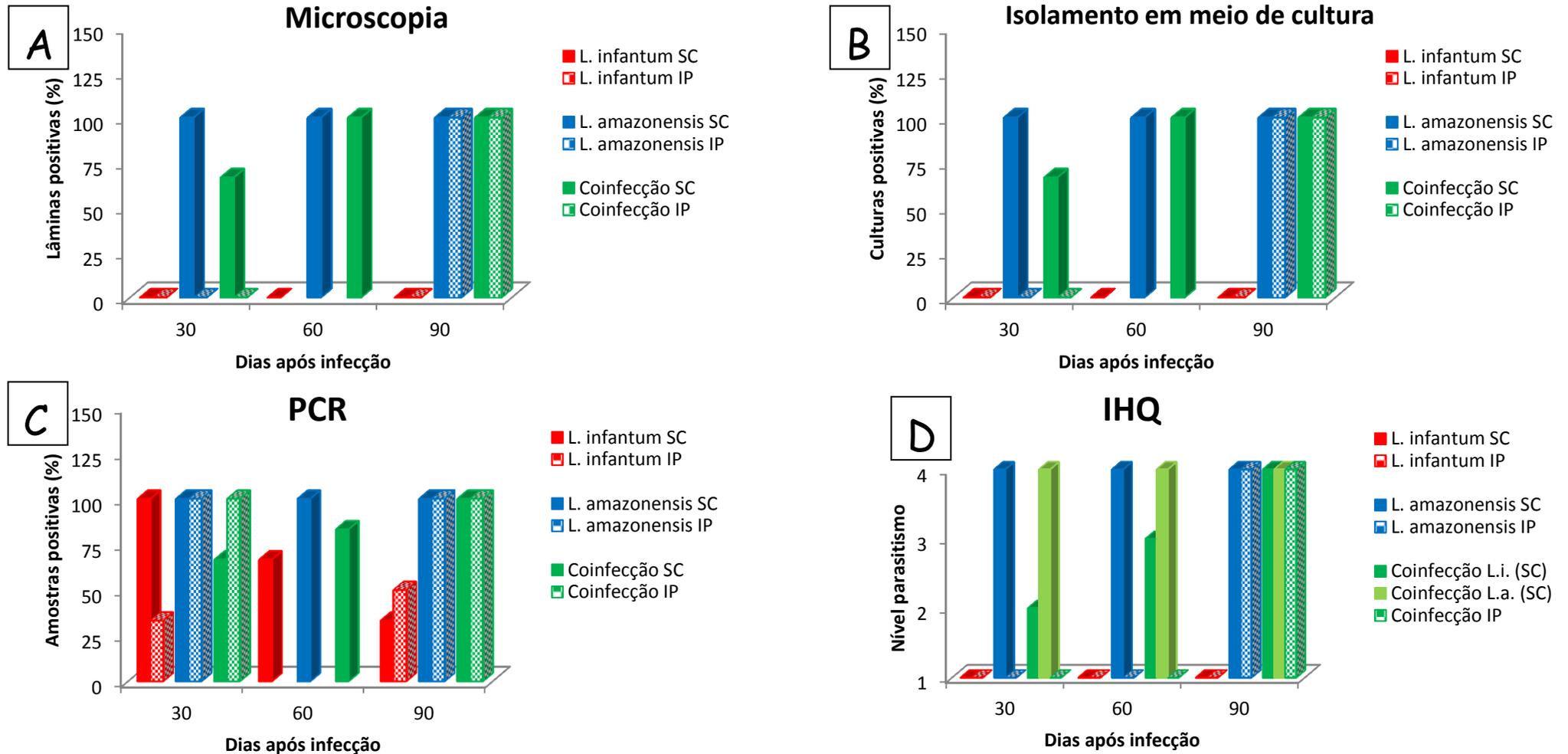


Figura 15: Porcentagem de amostras de biópsia de pele positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfecção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.

5.2-2. Baço

Todas as amostras de baço foram coletadas dos animais dos grupos inoculados pela via SC aos 30, 60 e 90 DAI e dos grupos inoculados pela via IP aos 30 e 90 DAI.

I. Infecção por *L. infantum* (Via SC e IP)

a) Microscopia

No GRUPO 1 (via SC) foram observadas amastigotas no baço apenas aos 90 DAI em 33,3% (1/3) das lâminas analisadas. No GRUPO 4 (via IP) observou-se lâminas positivas também aos 90 DAI em 83,3% (5/6).

b) Isolamento em meio de cultura

Promastigotas foram observadas em 33,3% (1/3) das culturas de baço analisadas no GRUPO 1 e em 83,3% (5/6) das culturas do GRUPO 4, ambas apenas aos 90 DAI.

c) PCR

Amostras positivas foram observadas no GRUPO 1 aos 30 e 60 DAI em 33,3% (1/3) e aos 90 DAI em 66,7% (2/3). No GRUPO 4 aos 30 DAI foi observado 66,7% (2/3) de amostras positivas e aos 90 DAI 83,3% (5/6) das amostras analisadas foram positivas. Nas amostras de cultura em que foi observado o crescimento de promastigotas foi realizada análise através da técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

As alterações histopatológicas estão mostradas na Figura 16. No GRUPO 1 (via SC) observou-se o baço com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa branca, inflamação capsular e congestão, discreto durante os 90 dias e hiperplasia de polpa vermelha moderada aos 90 DAI. Sem presença de parasitos. No GRUPO 4 (via IP) observou-se o órgão com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa branca, perda da arquitetura com linfócitos dispersos e congestão, discreto aos 30 e 90 DAI, hiperplasia de polpa vermelha e inflamação capsular moderada e presença de parasitos aos 90 DAI.

A Figura 20 representa a porcentagem de amostras de baço positivas em cada tipo de infecção de acordo com o método utilizado: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e em (D) a intensidade do parasitismo segundo IHQ.

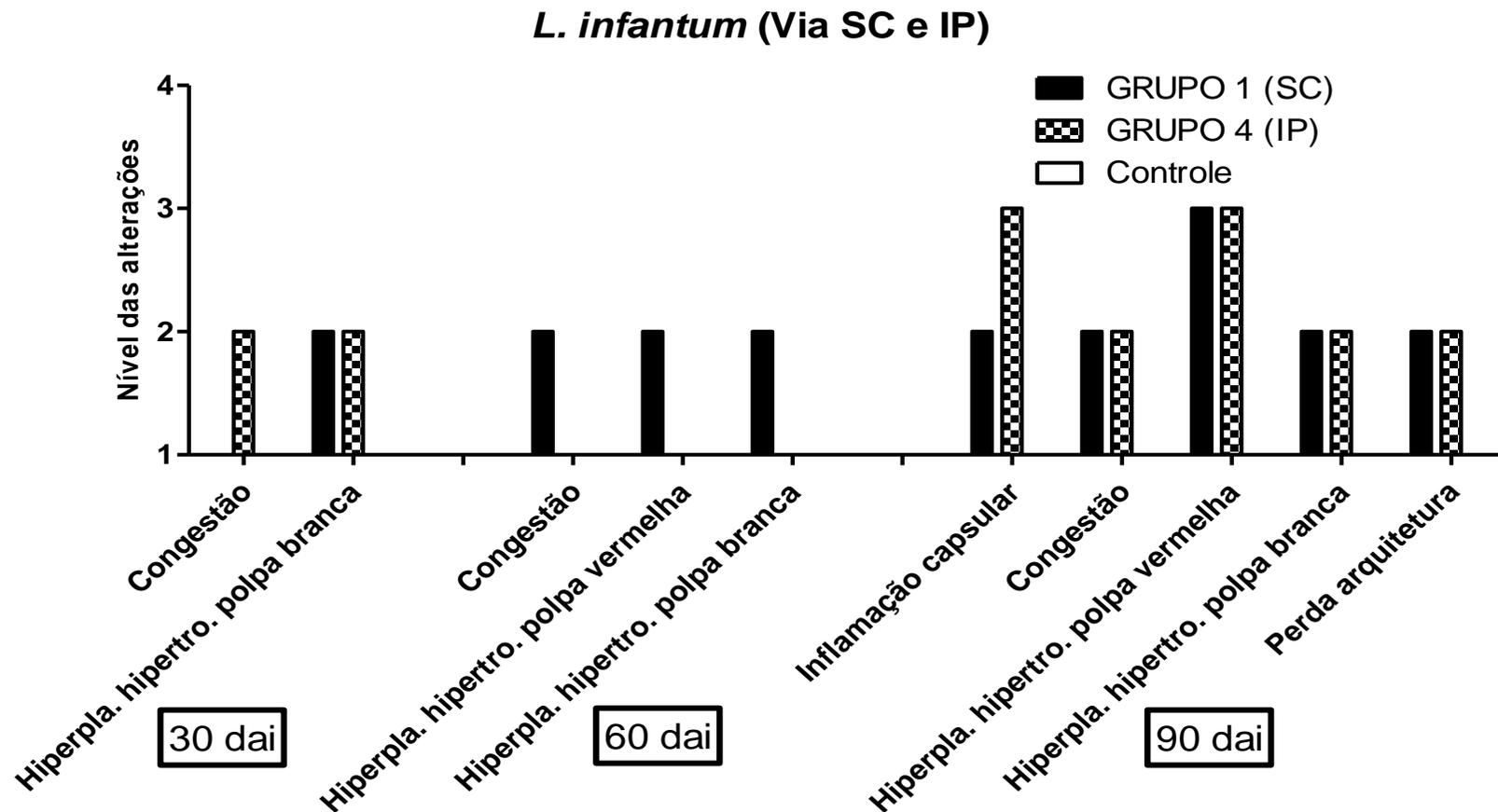


Figura 16: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

II. Infecção por *L. amazonensis* (Via SC e IP)

a) Microscopia

Lâminas positivas do baço foram observadas no GRUPO 2 (via SC) apenas aos 60 DAI em 66,7% (2/3). No GRUPO 5 (via IP) amastigotas foram observadas em 100% (3/3) das lâminas aos 30 DAI e em 66,7% (4/6) aos 90 DAI (Figura 20A).

b) Isolamento em meio de cultura

Promastigotas foram observadas em 66,7% (2/3) das culturas analisadas do GRUPO 2 aos 60 DAI. No GRUPO 5, 100% (3/3) das culturas foram positivas aos 30 DAI e 66,7% (4/6) aos 90 DAI (Figura 20B).

c) PCR

Amostras positivas foram observadas no GRUPO 2 em apenas 33,3% (1/3) aos 30, 60 e 90 DAI. No GRUPO 5 observou-se 66,7% de amostras positivas aos 30 (2/3) e 90 (4/6) DAI (Figura 20C). Nas amostras de cultura em que se observou crescimento de promastigotas também se realizou a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

No GRUPO 2 (via SC) observou-se o órgão com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa vermelha e branca, inflamação capsular e congestão, variando de discreto a moderado. No GRUPO 5 (via IP) observou-se baço com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa branca, inflamação capsular e órgão congesto, discreto durante os 90 dias de observações, hiperplasia de polpa vermelha moderada aos 90 DAI (Figura 17). Em nenhum dos dois grupos foi observada a presença de parasitos pela IHQ (Figura 20D).

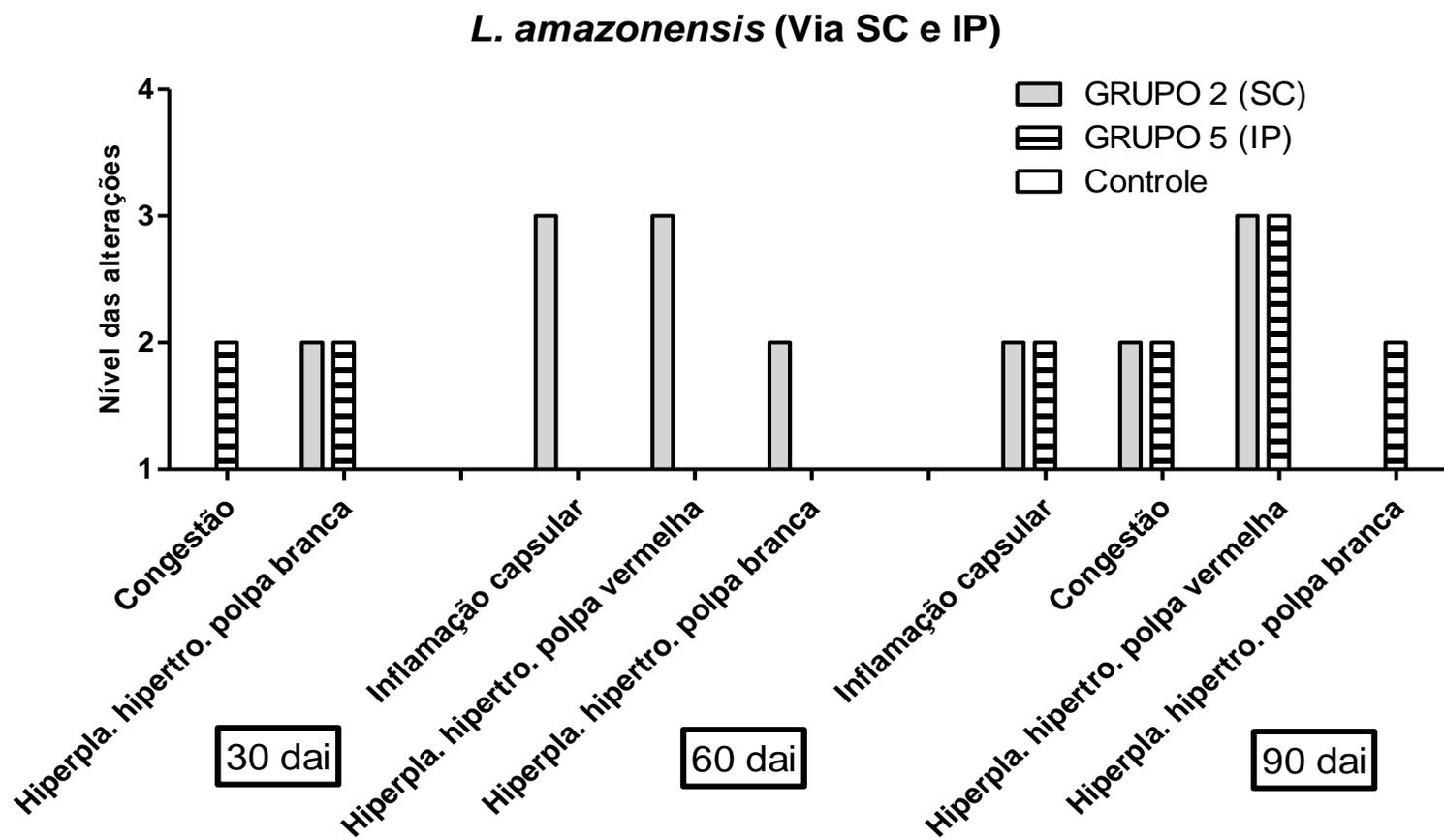


Figura 17: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

III. Coinfecção (Via SC e IP)

a) Microscopia

No GRUPO 3 (via SC) foram observadas amastigotas em 33,3% (1/3) das lâminas analisadas aos 30 e 90 DAI, e em 100% (3/3) aos 60 DAI. No GRUPO 6 (via IP), 66,7% (2/3) das lâminas foram positivas aos 30 DAI e 100% (6/6) aos 90 DAI (Figura 20A).

b) Isolamento em meio de cultura

Promastigotas foram observadas no GRUPO 3 em 33,3% (1/3) das culturas analisadas aos 30 e 90 DAI, e em 100% (3/3) aos 60 DAI. No GRUPO 6 observou-se crescimento do parasito aos 30 DAI em 66,7% (2/3) e aos 90 DAI em 100% (6/6) das culturas analisadas (Figura 20B).

c) PCR

No GRUPO 3 aos 30 e 60 DAI, 2/3 (66,7%) das amostras de baço foram positivas, e aos 90 DAI, 100% (3/3). No GRUPO 6 aos 30 DAI, 33,3% (1/3) das amostras foram positivas e aos 90 DAI, 100% (6/6) (Figura 20C). Com as amostras de cultura em que foram observadas promastigotas também realizou-se a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

Observou-se no GRUPO 3 (via SC) o baço com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa branca, inflamação capsular e congestão, discreto durante os 90 dias e hiperplasia de polpa vermelha moderada aos 90 DAI (Figura 18). Parasitismo aos 60 DAI (Figura 20D). No GRUPO 6 (via IP) observou-se órgão com polpa branca reativa e hiperplasia de polpa branca e congestão, discreto durante os 90 dias, inflamação capsular e hiperplasia da polpa vermelha moderada aos 90 DAI (Figura 18). Presença do parasito aos 90 DAI (Figura 20D).

Cortes histológicos do baço com as alterações e parasitos nas infecções por *L. infantum*, *L. amazonensis* e coinfecção estão na Figura 19.

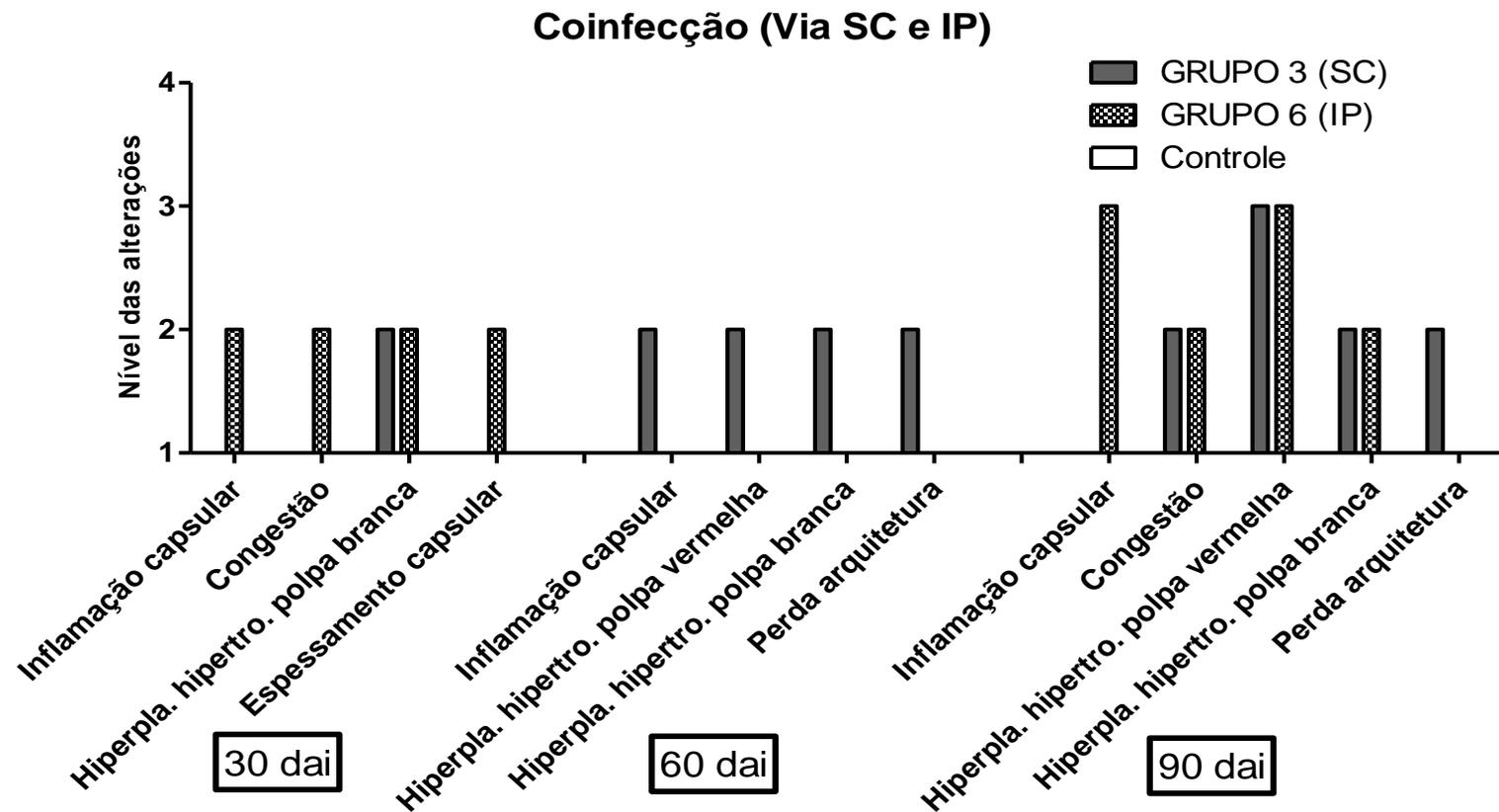


Figura 18: Alterações histopatológicas observadas no baço dos animais com coinfecção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

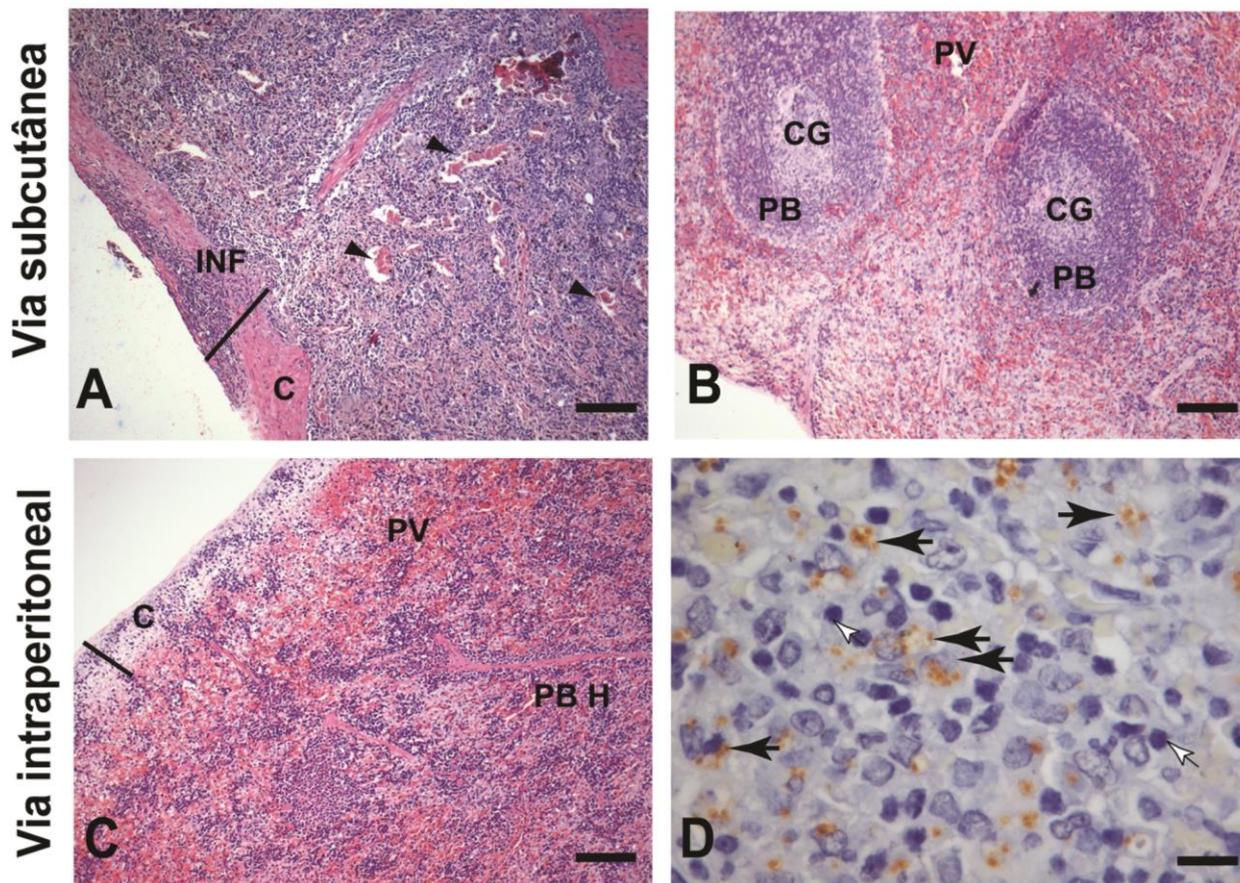


Figura 19: Corte histológico de baço de hamsters infectados por *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfeção. Figuras A - B imagens representativas da infecção via subcutânea, C - D via intraperitoneal. (A) observar inflamação (INF), espessamento capsular e órgão congesto (cabeça preta de setas) comuns aos grupos G1 – G3. Em (B) observar polpa vermelha (PV) congesta e polpa branca (PB) reativa com evidência de centros germinativos (CG) comuns aos grupos G1 – G3, G5 e G6. (C) Inflamação e espessamento capsular, comum a todos os grupos, polpa vermelha (PV) congesta e perda da arquitetura da polpa branca (PBH) comum ao grupo G4. (D) detalhe de macrófagos (setas pretas) repletos de formas amastigotas marrons imunomarcadas e linfócitos (setas brancas) comuns aos grupos G3, G4 e G6. (A - C) coloração pela H&E e em (D) imuno-histoquímica. (A - C) = 32 μ m (200x) e (D) 8 μ m (1000x).

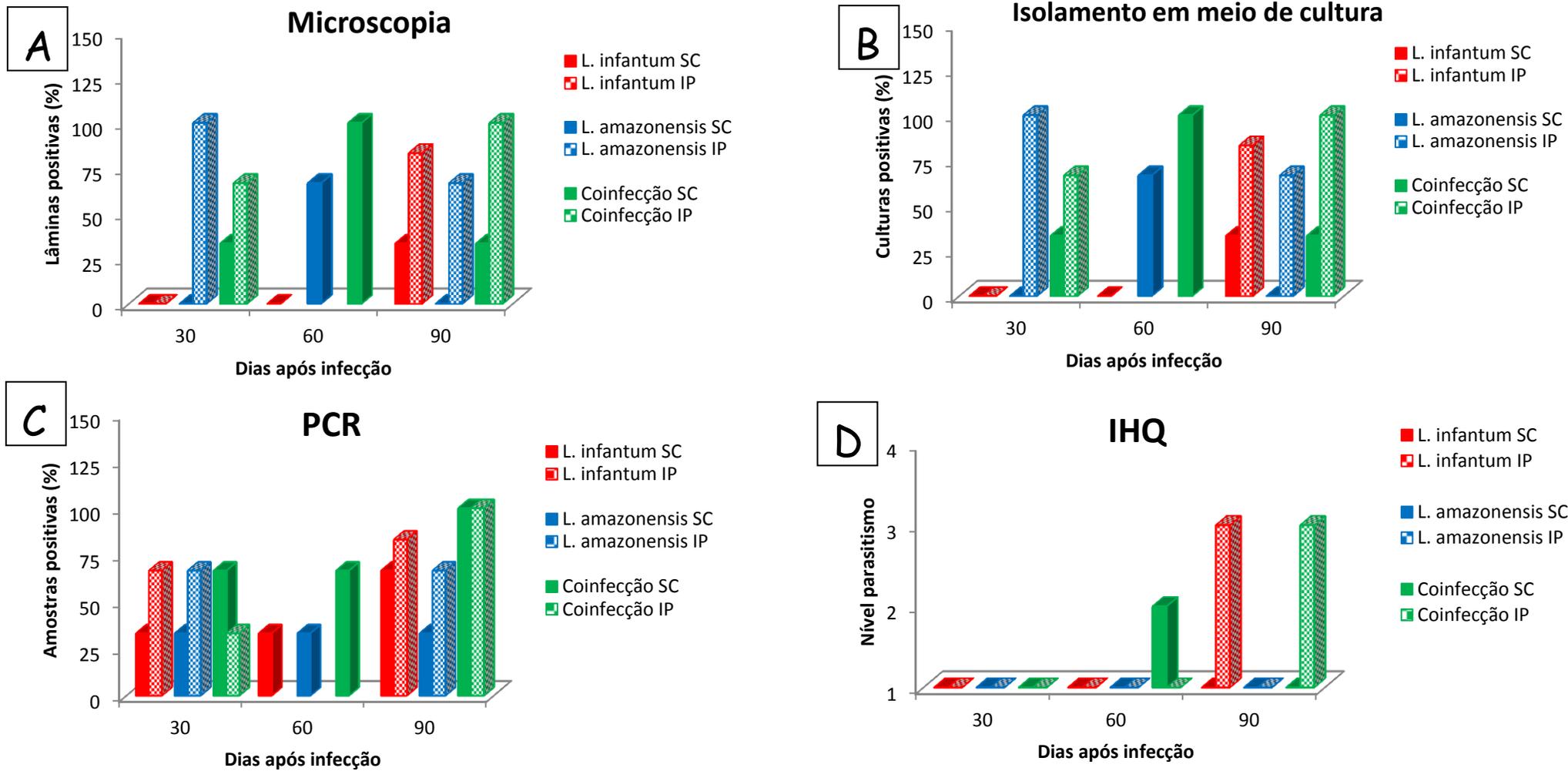


Figura 20: Porcentagem de amostras de baço positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfecção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.

5.2-3. Fígado

Todas as amostras de fígado foram coletadas dos animais dos grupos inoculados pela via SC aos 30, 60 e 90 DAI e dos grupos inoculados pela via IP aos 30 e 90 DAI.

I. Infecção por *L. infantum* (Via SC e IP)

a) Microscopia

No GRUPO 1 (via SC) não foi observado a presença de amastigotas nas lâminas analisadas em nenhum dos tempos. No GRUPO 4 (via IP), em 50% (3/6) das lâminas foram observadas amastigotas apenas aos 90 DAI.

b) Isolamento em meio de cultura

Não foi observado o crescimento de promastigotas nas amostras de cultura do fígado no GRUPO 1. No GRUPO 4 aos 90 DAI, 50% (3/6) das culturas analisadas foram positivas.

c) PCR

No GRUPO 1 observou-se 100% (3/3) de amostras positivas aos 30 DAI e 66,7% (2/3) aos 60 DAI. No GRUPO 4 foram observadas amostras positivas aos 30 DAI em 66,7% (2/3) e aos 90 DAI em 83,3% (5/6). Nas culturas em que se observou o crescimento do parasito foi realizada a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

As alterações estão mostradas na Figura 21. No GRUPO 1 (via SC) observou-se o fígado congesto e com a presença de degenerações, variando de moderada a intensa. Inflamação portal e granulomatosa, discreta a moderada com granulomas formados em sua maioria por linfócitos e sem a presença de parasito. No GRUPO 4 (via IP) observou-se órgão congesto e degenerações, intensa aos 30 DAI. Inflamação portal e granulomatosa discreta a moderada com pequenos e médios granulomas formados em sua maioria por linfócitos. Células gigantes e presença de parasitos aos 90 DAI.

A Figura 25 representa a porcentagem de amostras de fígado positivas em cada tipo de infecção de acordo com o método utilizado: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e em (D) a intensidade do parasitismo segundo IHQ.

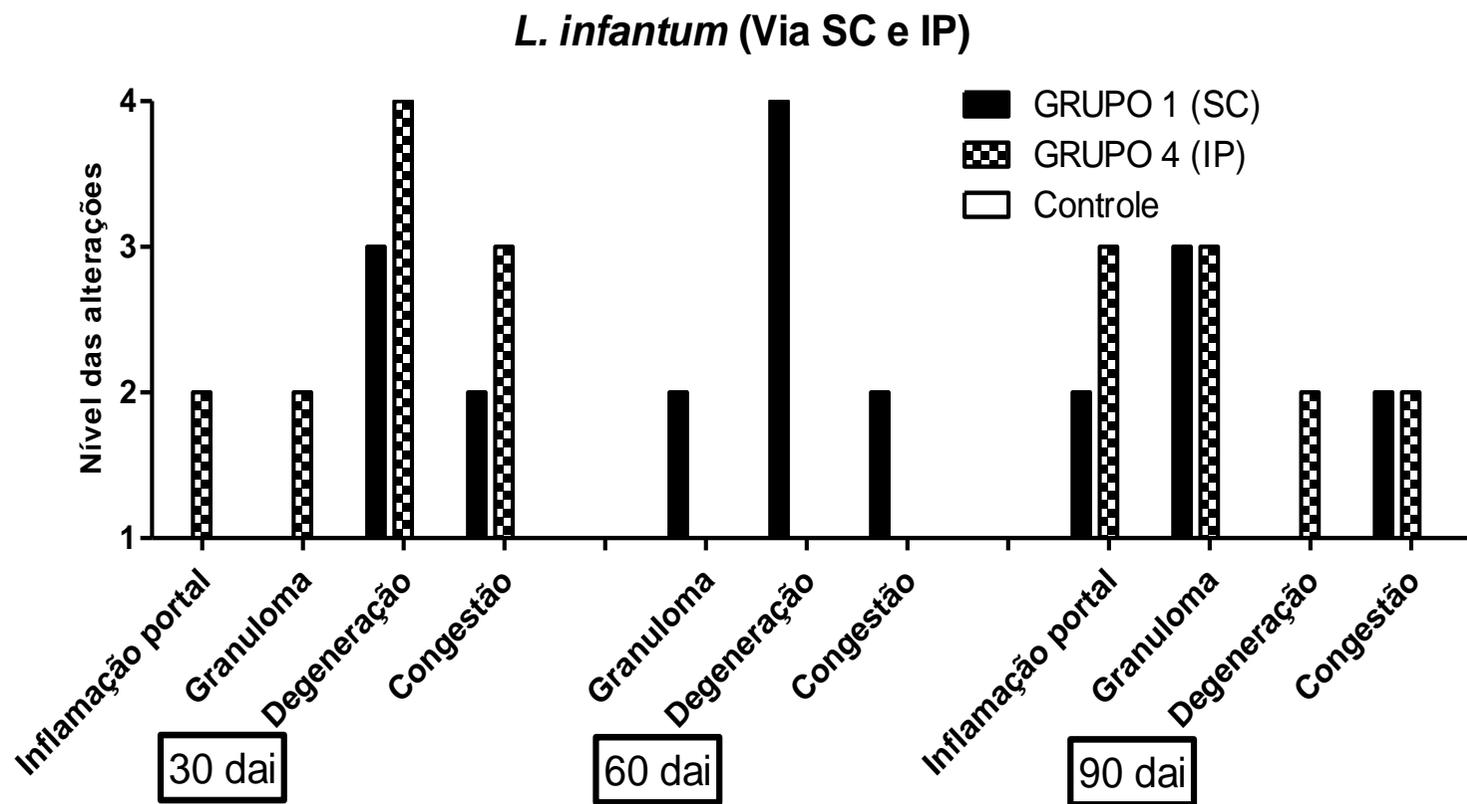


Figura 21: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais inoculados com *L. infantum* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

II. Infecção por *L. amazonensis* (Via SC e IP)

a) Microscopia

Amastigotas foram observadas em 33,3% (1/3) das lâminas de esfregaço do fígado analisadas do GRUPO 2 (via SC) aos 60 e 90 DAI. No GRUPO 5 (via IP), 50% (3/6) das lâminas foram positivas aos 90 DAI (Figura 25A).

b) Isolamento em meio de cultura

No GRUPO 2 observou-se o crescimento de promastigotas aos 60 e 90 DAI em 33,3% (1/3) das culturas analisadas. No GRUPO 5 aos 90 DAI, 50% (3/6) das culturas foram positivas (Figura 25B).

c) PCR

No GRUPO 2 foi observado 66,7% (2/3) de amostras positivas aos 30 DAI e 100% (3/3) aos 60 e 90 DAI. No GRUPO 5 observou-se aos 30 DAI 66,7% (2/3) e aos 90 DAI 50% (3/6) de amostras positivas (Figura 25C). Nas amostras de cultura em que foi observado o crescimento de promastigotas realizou-se também a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

Observou-se no GRUPO 2 (via SC) inflamação portal e granulomatosa discreta durante os 90 dias, com granulomas formados principalmente por linfócitos e macrófagos. Órgão congesto e degenerações, moderado aos 30 DAI. A presença do parasito foi observada apenas aos 60 DAI (Figura 25D). No GRUPO 5 (via IP) observou-se alterações discretas, como fígado congesto, inflamação portal e granulomatosa com pequenos granulomas formados em sua maioria por linfócitos e aos 30 DAI degenerações moderadas (Figura 22). Sem parasitismo.

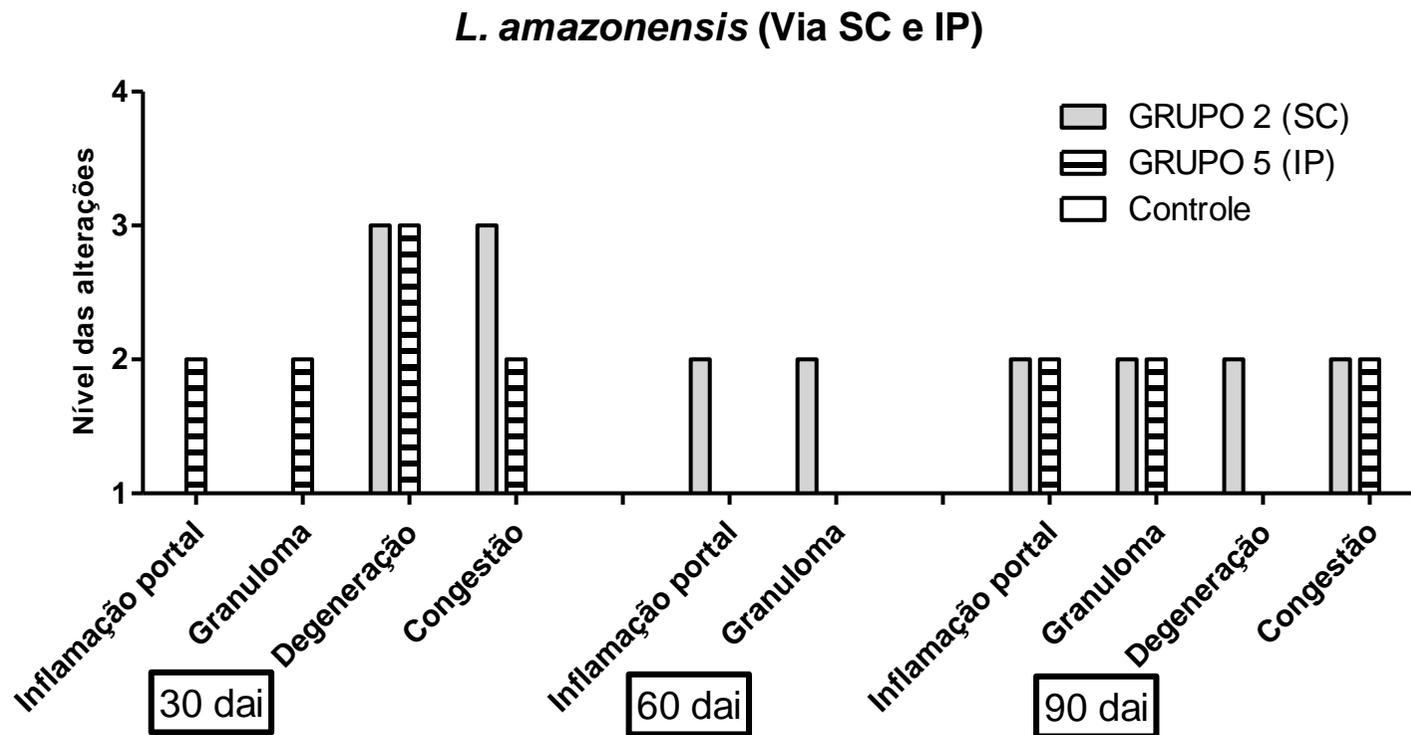


Figura 22: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais inoculados com *L. amazonensis* pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

III. Coinfecção (Via SC e IP)

a) Microscopia

No GRUPO 3 (via SC) foram observadas amastigotas apenas aos 60 DAI em 100% (3/3) das lâminas de fígado analisadas. No GRUPO 6 (via IP) aos 30 DAI observou-se 33,3% (1/3) de lâminas positivas, e aos 90 DAI, 100% (6/6).

b) Isolamento em meio de cultura

Promastigotas foram observadas aos 60 DAI em 100% (3/3) das culturas do GRUPO 3. No GRUPO 6 observou-se 33,3% (1/3) de culturas positivas aos 30 DAI e 100% (6/6) aos 90 DAI.

c) PCR

No GRUPO 3 aos 30 e 60 DAI foram observadas 100% (3/3) de amostras positivas de fígado e aos 90 DAI, 66,7% (2/3). No GRUPO 6 aos 30 DAI observou-se 100% (3/3) de amostras positivas e aos 90 DAI, 83,3% (5/6). Nas amostras de cultura em que se observou promastigotas foi realizada a técnica de PCR e todas foram positivas.

d) Avaliação Histopatológica e Imuno-histoquímica

As alterações estão mostradas na Figura 23. No GRUPO 3 (via SC) observou-se o fígado congesto e com degenerações, discreto durante os 90 dias. Inflamação portal e granulomatosa moderada e encontro de células gigantes aos 90 DAI. Sem parasitismo. No GRUPO 6 (via IP) observou-se órgão congesto, degenerações moderadas aos 30 DAI. Aos 90 DAI, inflamação portal e granulomatosa moderada, com granulomas pequenos a médios, encontro de células gigantes e parasitos.

Cortes histológicos do fígado com as alterações e parasitos nas infecções por *L. infantum*, *L. amazonensis* e coinfecção são mostrados na Figura 24. A Figura 25 representa a porcentagem de amostras de fígado positivas em cada tipo de infecção de acordo com o método utilizado: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e em (D) a intensidade do parasitismo segundo IHQ.

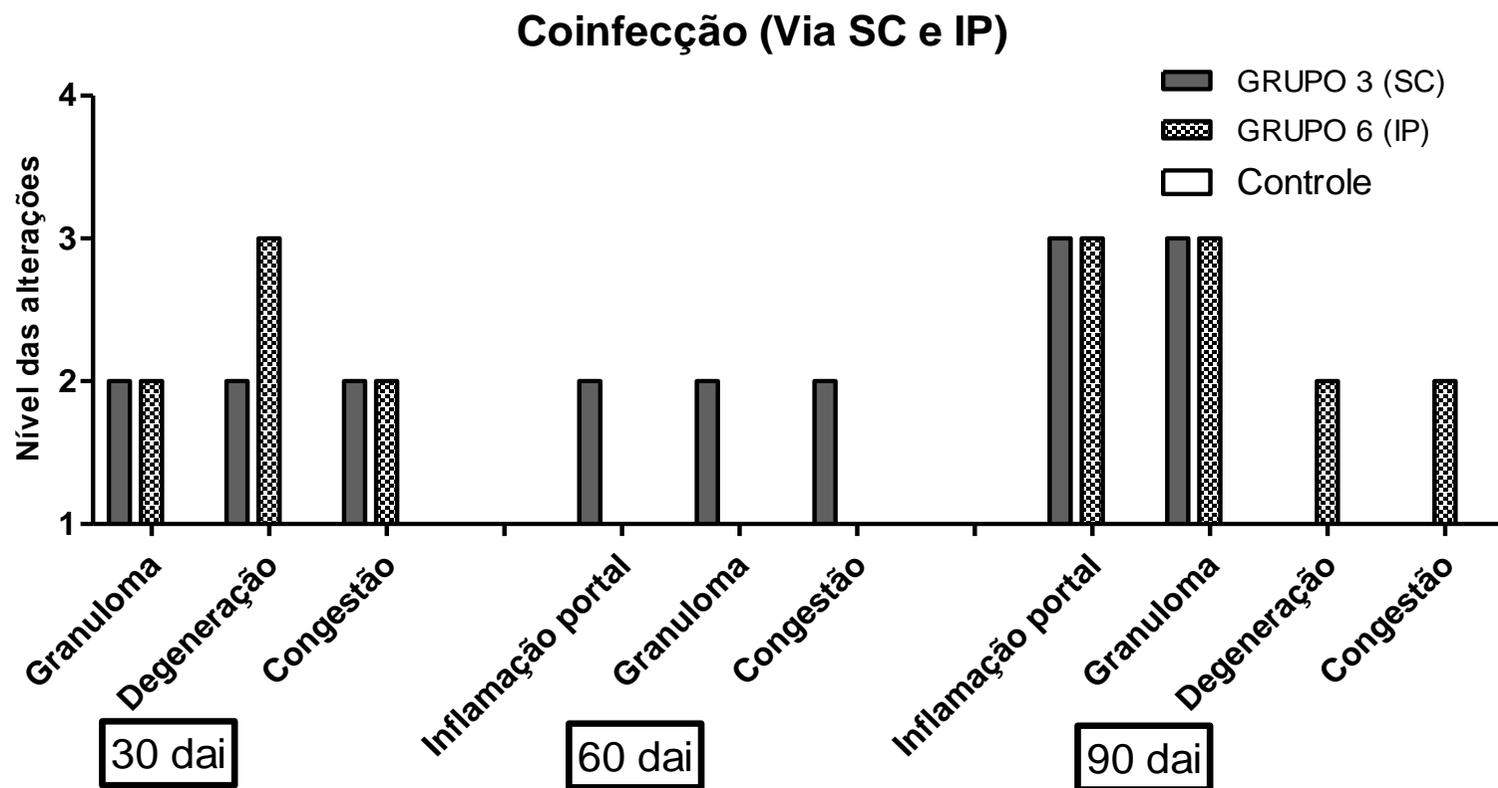


Figura 23: Alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais com coinfecção pelas vias SC e IP durante os 90 dias de observações. Aos 60 DAI o grupo IP não foi avaliado. As análises das alterações foram realizadas de forma semi-quantitativa e classificadas da seguinte forma: 1- ausente; 2- discreto (20-30%); 3- moderado (>30-60%) e 4- intenso (>60%).

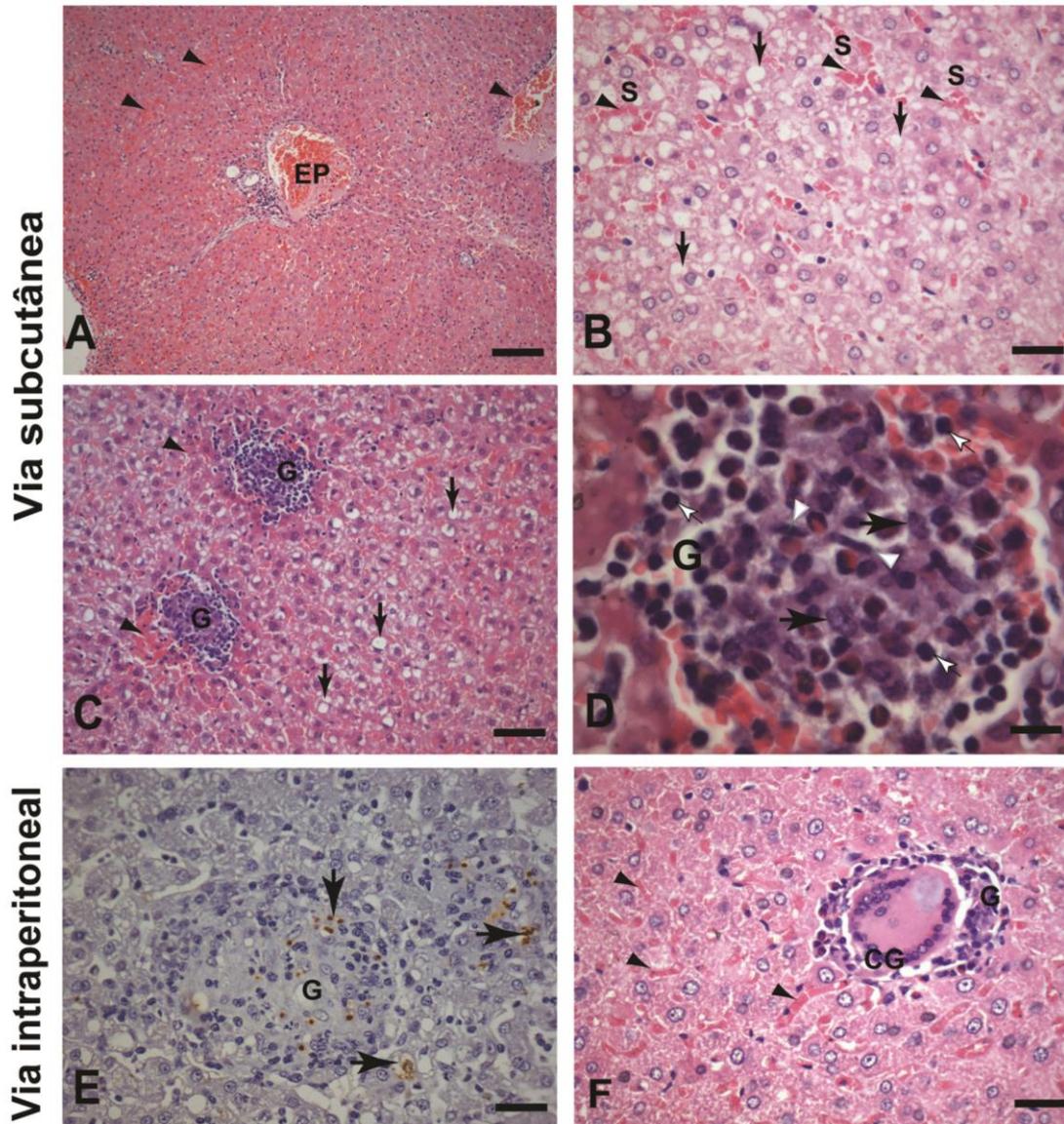


Figura 24: Corte histológico de fígado de hamsters infectados com *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* e coinfeção. Figuras A - D imagens representativas da infecção via subcutânea, E - F via intraperitoneal. (A, B e C) Observar órgão com capilares sinusoides (S) congestos (cabeça de setas pretas) e inflamação portal (EP). Em (B) degeneração (setas pretas pequenas), em (C) observar inflamação granulomatosa, granulomas (G) comuns a todos os grupos. (D) Detalhe do granuloma, formado por linfócitos (setas brancas), macrófagos (setas pretas grandes) e células epitelióides (cabeça de setas brancas). Em (E) detalhe de macrófagos com amastigotas marrons imunomarcadas (setas pretas grandes) comuns aos grupos G2, G4 e G6. (F) Detalhe de granuloma com célula gigante (CG) comum aos grupos G3, G4 e G6. (A - D e F) coloração pela H&E e em (E) imuno-histoquímica. (A, C) = 32 μm (200x), (B, D, E) = 16 μm (400x) e (F) = 8 μm (1000x).

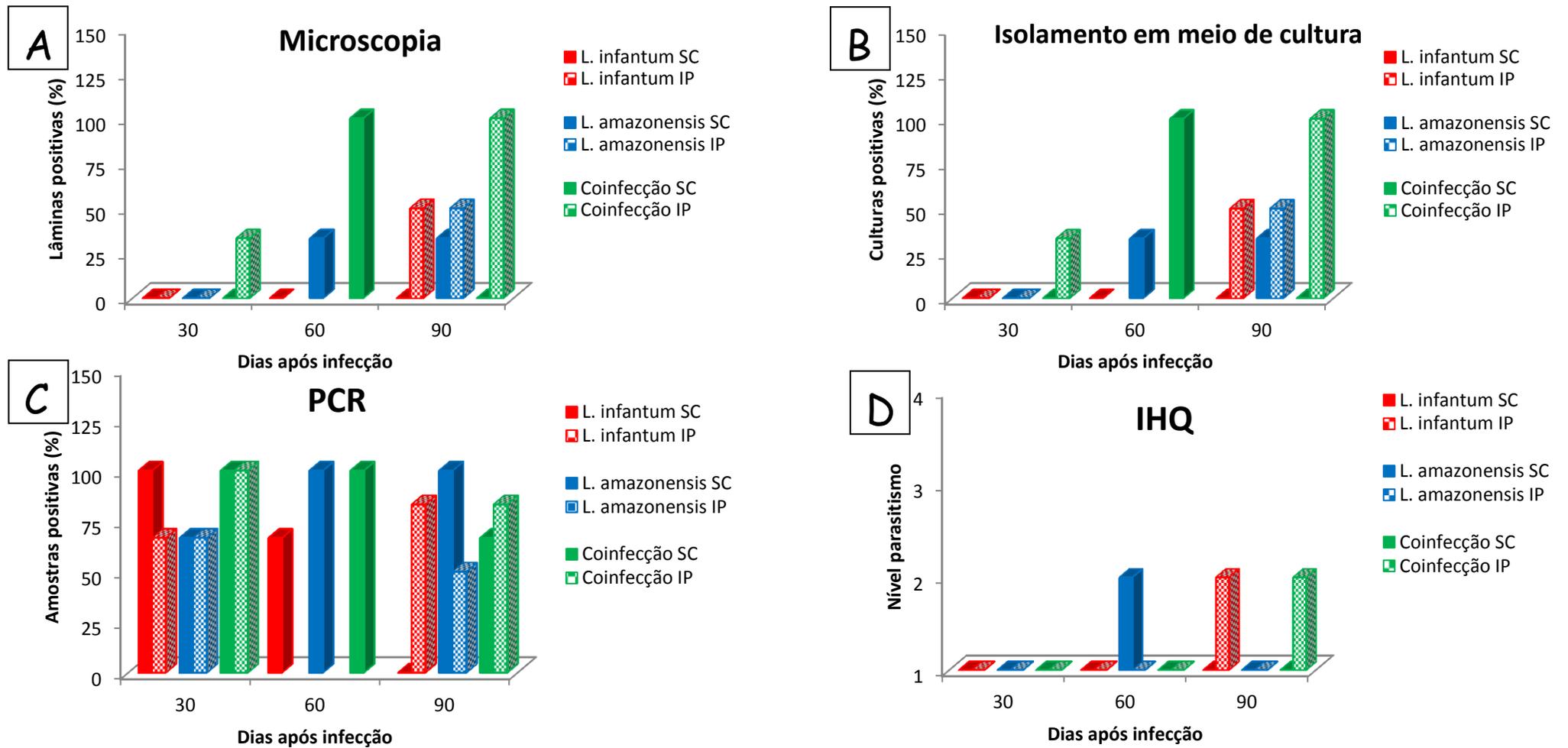


Figura 25: Porcentagem de amostras de fígado positivas pelos métodos parasitológicos de: microscopia (A), cultura (B) e PCR (C) e intensidade do parasitismo por IHQ (D) nos grupos infectados por *L. infantum* via SC e IP (vermelho); *L. amazonensis* via SC e IP (azul) e coinfecção via SC e IP (verde). Os grupos da via SC foram avaliados aos 30, 60 e 90 DAI e da via IP aos 30 e 90.

A Figura 26 representa a visualização da reação de PCR, em um gel representativo de agarose a 1,5%, corado por brometo de etídio, mostrando algumas amostras de pele, baço e fígado em cada tipo de infecção (espécie e via de inoculação). O amplicon de cerca de 300 pb é esperado na presença de DNA de *Leishmania* spp.

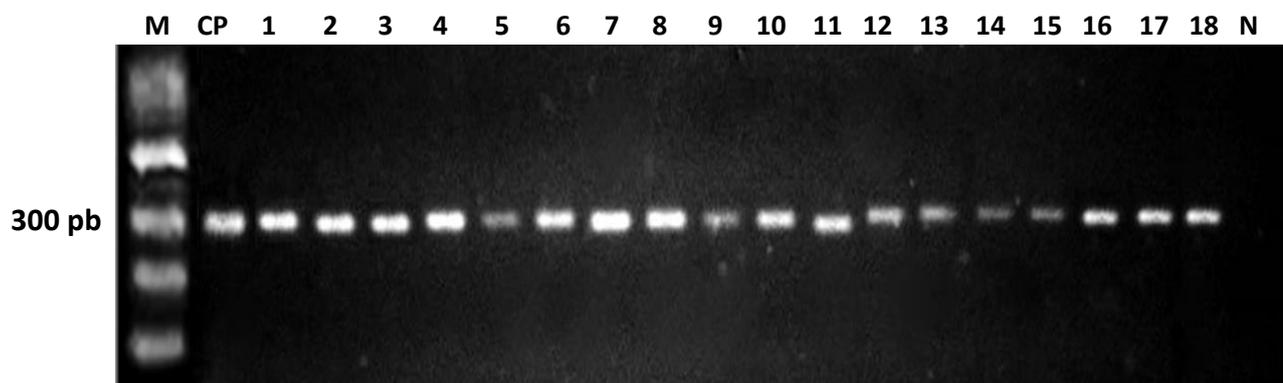


Figura 26: Gel de agarose 1,5% corado por brometo de etídio com amostras positivas de pele, baço e fígado dos animais dos grupos inoculados via SC e IP apresentando fragmento de aproximadamente 300 pb. Marcador molecular (M); controle positivo (CP); amostras 1 a 6 (pele do G1 a G6); amostras 7 a 12 (baço do G1 a G6); amostras 13 a 18 (fígado do G1 a G6); controle negativo (N).

5.2-4. PCR-RFLP

I. Infecção por *L. infantum* (Via SC e IP)

Nos grupos em que os inóculos foram com a espécie *L. infantum*, a técnica de RFLP confirmou a presença de tal espécie em todas as amostras de fragmentos de órgãos e de culturas positivas de pele, baço e fígado do GRUPO 1 (via subcutânea) e GRUPO 4 (via intraperitoneal) que foram positivas na PCR.

II. Infecção por *L. amazonensis* (Via SC e IP)

Nos grupos em que os inóculos foram com a espécie *L. amazonensis*, a RFLP confirmou a presença desta espécie em todas as amostras de fragmentos de órgãos e de

culturas positivas de pele, baço e fígado do GRUPO 2 (via subcutânea) e GRUPO 5 (via intraperitoneal) que foram positivas na PCR.

Um gel representativo (Figura 27) de poliacrilamida 6% mostra algumas amostras com o perfil de *L. infantum* e *L. amazonensis*.

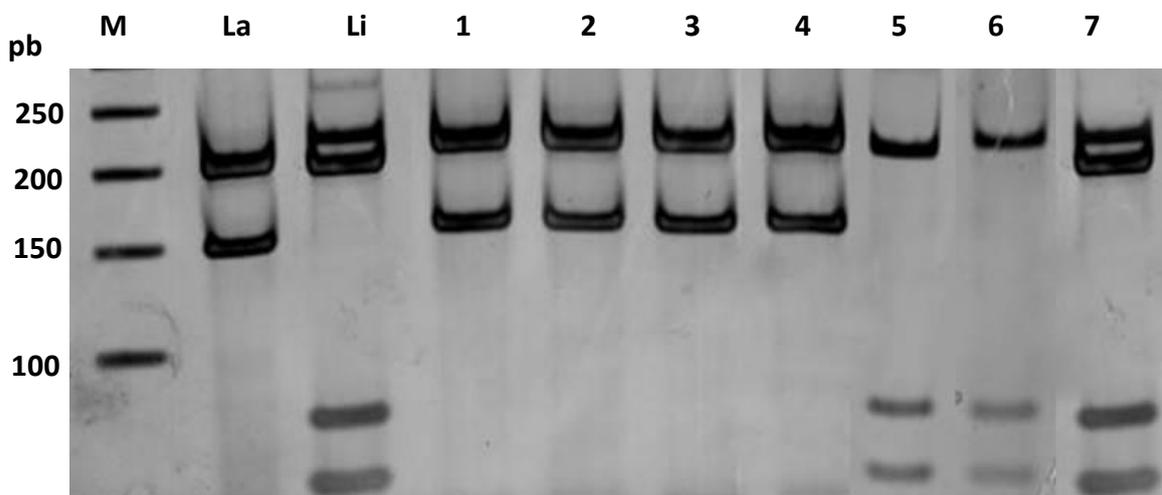


Figura 27: Gel de poliacrilamida 6% corado por prata mostrando o perfil de algumas amostras dos grupos de infecção única por *L. infantum* e *L. amazonensis* após a técnica de RFLP. Peso molecular (M); padrão *L. amazonensis* (La); padrão *L. infantum* (Li); amostras 1 a 4 (perfil *L. amazonensis*) apresentando fragmentos de aproximadamente 186 e 142 pb; amostras 5 a 7 (perfil *L. infantum*) com aproximadamente 184, 72 e 55 pb.

III. Coinfecção (Via SC e IP)

Nos grupos inoculados com as duas espécies de *Leishmania* simultaneamente, GRUPO 3 (via subcutânea) e GRUPO 6 (via intraperitoneal) observou-se diferentes perfis nas diferentes amostras de pele, baço e fígado analisadas, seja de fragmentos de órgãos ou de culturas positivas. Os dois grupos apresentaram amostras com os 3 perfis: *L. infantum*, *L. amazonensis* e misto.

Assim, no G3 100% das amostras de biópsia de pele da pata inoculada com *L. amazonensis* apresentaram perfil de *L. amazonensis* aos 30, 60 e 90 DAI e o mesmo resultado foi observado nas amostras de cultura. Nas amostras de biópsia da pele da pata

inoculada com *L. infantum*, 100% apresentaram perfil de *L. amazonensis* aos 30 e 90 DAI, e 50% perfil de *L. amazonensis* e 50% com perfil misto aos 60 DAI; nas amostras de cultura 100% apresentaram perfil de *L. amazonensis* aos 30 DAI, no entanto, aos 60 DAI, 33,3% com perfil *L. amazonensis* e 66,7% com perfil misto, e aos 90 DAI 100% com perfil *L. amazonensis*. Em uma amostra de biópsia de lesão da pata dianteira (não inoculada) com 90 DAI foi observado o perfil *L. amazonensis*.

Nas amostras de biópsia de pele do G6 foi observado apenas um perfil. Nas amostras de pele do abdômen aos 30 DAI 100% apresentaram perfil de *L. amazonensis* e aos 90 DAI 100% das amostras analisadas de pele da bolsa escrotal também apresentaram perfil *L. amazonensis*; apenas aos 90 DAI observou-se cultura positiva e o perfil encontrado foi 100% de *L. amazonensis*. Em duas amostras de biópsia de lesão da pata dianteira (não inoculada) com 90 DAI esta espécie também foi observada.

Nas amostras de fragmento do baço do G3 foi observado aos 30 DAI 100% com perfil de *L. amazonensis*, aos 60 DAI 50% *L. amazonensis* e 50% com perfil misto, aos 90 DAI 33,3% *L. amazonensis* e 66,7% *L. infantum*; nas amostras de cultura 100% apresentaram perfil de *L. amazonensis* aos 30 e 60 DAI e 100% de perfil misto aos 90 DAI. Nas amostras de fragmento do baço do G6, aos 30 DAI 100% apresentaram perfil *L. amazonensis*, enquanto aos 90 DAI 100% *L. infantum*; nas amostras de cultura com 30 DAI 100% apresentaram perfil *L. amazonensis* e com 90 DAI 33,3% com perfil *L. amazonensis* e 66,7% com perfil misto.

Nas amostras de fragmento do fígado do G3, 100% das amostras apresentaram perfil de *L. amazonensis* aos 30 e 60 DAI enquanto aos 90 DAI 50% *L. amazonensis* e 50% perfil misto; foi observada cultura positiva apenas aos 60 DAI e o perfil encontrado foi 66,7% *L. amazonensis* e 33,3% misto. As amostras de fragmento do fígado do G6 apresentaram 100% de perfil *L. amazonensis* aos 30 DAI, enquanto aos 90 DAI, 60% com perfil *L. infantum* e 40% misto; nas amostras de cultura 100% apresentaram perfil *L. amazonensis* aos 30 DAI e 100% perfil misto aos 90 DAI.

As Figuras 28 e 29 mostram a porcentagem de cada espécie de acordo com o órgão (A) e em culturas positivas (B) nos GRUPOS 3 e 6.

PCR-RFLP- Via subcutânea

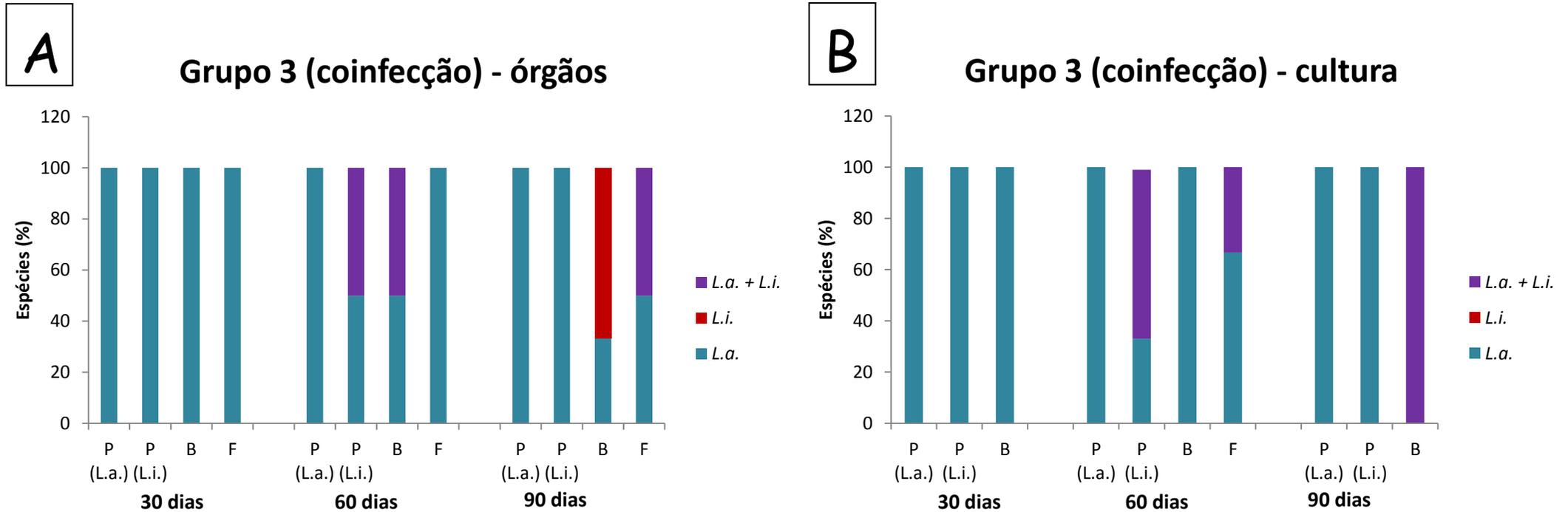


Figura 28: PCR-RFLP - Espécies de *Leishmania* encontradas nos órgãos (A) e nas culturas positivas (B) do GRUPO 3 (coinfecção via SC) nas amostras de pele da pata direita inoculada com *L. amazonensis* = P (L.a.), pele da pata esquerda com *L. infantum* = P (L.i.), baço = B e fígado = F durante os 90 dias de infecção. Aos 30 e 90 DAI não se observou cultura positiva do fígado. Perfil misto (*L.a.* + *L.i.*); perfil *L. infantum* (*L.i.*) e perfil *L. amazonensis* (*L.a.*).

PCR-RFLP- Via intraperitoneal

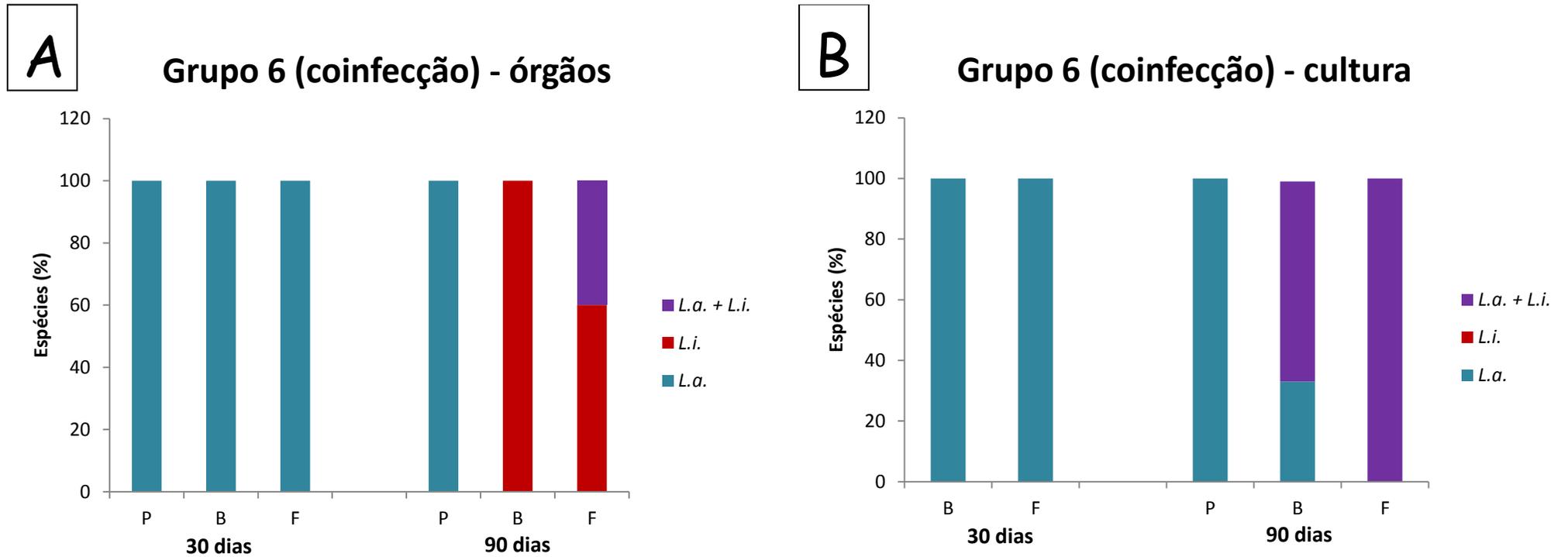


Figura 29: PCR-RFLP- Espécies de *Leishmania* encontradas nos órgãos (A) e nas culturas positivas (B) do GRUPO 6 (coinfecção via IP) nas amostras de pele = P, baço = B e fígado = F durante os 90 dias de infecção. Aos 30 DAI não se observou cultura positiva de pele. Perfil misto (*L.a.* + *L.i.*); perfil *L. infantum* (*L.i.*) e perfil *L. amazonensis* (*L.a.*).

Géis de poliacrilamida 6% (Figura 30) representativos dos 3 perfis encontrados nas amostras do GRUPO 3 (A) e GRUPO 6 (B) após a realização da técnica de RFLP.

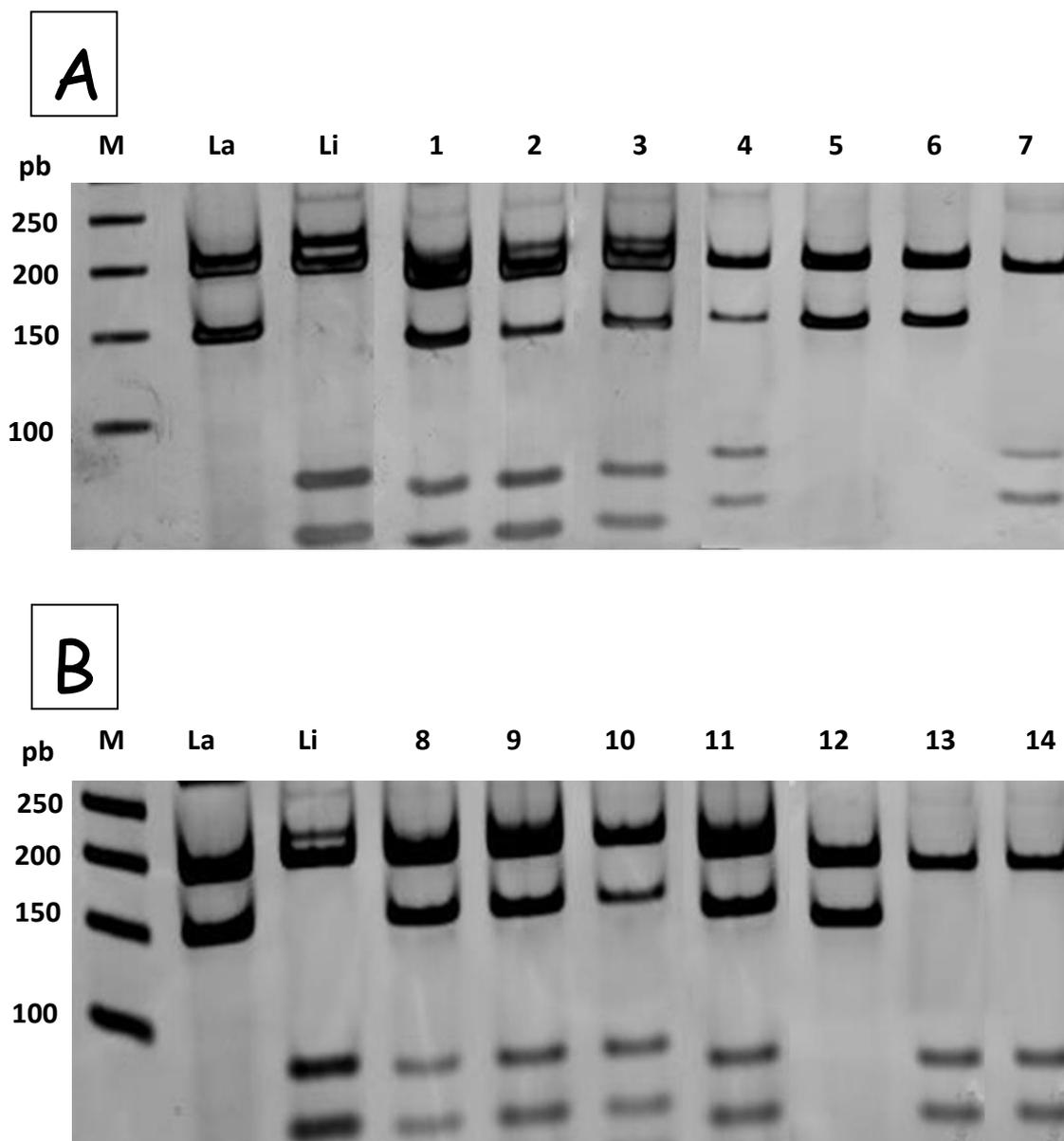


Figura 30: Gel de poliacrilamida 6% corado por prata com amostras dos grupos de coinfeção: GRUPO 3 via SC (A) e GRUPO 6 via IP (B). Peso molecular (M); padrão *L. amazonensis* (La); padrão *L. infantum* (Li); amostras de fígado (órgão e cultura) 1 a 4 e 8 a 11 (perfil misto) apresentando fragmentos de aproximadamente 186, 142, 72 e 55 pb; amostras de pele 5, 6 e 12 (perfil *L. amazonensis*) com aproximadamente 186 e 142 pb; amostras de baço 7, 13 e 14 (perfil *L. infantum*) com aproximadamente 184, 72 e 55 pb.

6. Discussão

Hamsters da espécie *Mesocricetus auratus* são considerados bons modelos experimentais para estudo das leishmanioses, pois são suscetíveis à infecção com diferentes espécies de *Leishmania* e o curso clínico nestes animais se assemelha muito com o observado na doença humana e canina (Evans 1989; Moreira et al. 2012). Esses animais desenvolvem lesões na pele similares às observadas em humanos quando infectados com espécies associadas à forma cutânea da LT (Hommel et al. 1995) e assim como na LV humana, a doença em hamsters causada por cepas viscerotrópicas é caracterizada por evolução progressiva, exibindo sinais clínicos como anemia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, desidratação e podendo levar à morte (Farrell 1976; Rodrigues et al. 1992).

As espécies *Leishmania infantum* e *L. amazonensis* apresentam um grande espectro de manifestações clínicas e tanto fatores do parasito quanto do hospedeiro podem estar envolvidos nesta variabilidade clínica da doença. São espécies encontradas em várias regiões do país e em algumas áreas a ocorrência das espécies se sobrepõe, possibilitando a ocorrência de coinfeção, o que pode dificultar o diagnóstico, o controle e o tratamento. Isso as torna de grande importância clínico-epidemiológica em nosso país, constituindo ótimos modelos de estudo. No presente trabalho utilizamos estas duas espécies em infecções separadas e em coinfeção para avaliarmos a gravidade da doença em cada tipo de infecção e se a infecção mista causa doença mais grave no modelo experimental utilizado.

Para obter sucesso em uma infecção experimental por *Leishmania* em diferentes modelos animais, um grande número de parasitos é utilizado, independente da via de inoculação (Melby et al. 2001). Sabe-se que a quantidade de parasitos inoculados e a via de inoculação possuem grande influência no estabelecimento e evolução da doença em hamsters como modelo experimental (Wilson et al. 1979). Para infecções experimentais com *L. infantum* e *L. amazonensis* em roedores, a carga parasitária de 10^7 promastigotas foi utilizada com sucesso por diversos autores (Lonardoni et al. 2000; Pereira et al. 2005; Nieto et al. 2011; Moreira et al. 2012; Oliveira et al. 2012).

No presente trabalho utilizamos o inóculo de 10^7 promastigotas por animal e nos grupos de coinfeção foi inoculado o dobro de parasitos, sendo 10^7 de cada espécie por animal. A utilização do dobro de parasitos na coinfeção se deve a diversos fatores. Para

a coinfeccção em ambas as vias (SC e IP), cada espécie foi inoculada em um diferente local, e como a resposta à infecção é localizada, utilizar uma quantidade baixa de cada espécie favoreceria o organismo a controlar a infecção. A resposta imunológica inicial provocada por uma infecção pode ser dependente da quantidade de parasitos no local do inóculo, podendo influenciar no estabelecimento da fase crônica. É possível que o aparecimento tardio da lesão e o dano tecidual menos grave observado em animais infectados com menor quantidade de parasitos possa ser explicado por um atraso na capacidade dos parasitos em atingir o limiar de replicação e, conseqüentemente, recrutar menos células inflamatórias para o local da inoculação (Ribeiro-Romão et al. 2014). Além disso, realizamos um experimento piloto e observou-se um sucesso maior da coinfeccção utilizando a quantidade de 10^7 promastigotas de cada espécie. E por fim, não tendo sido localizados relatos na literatura de trabalhos desta natureza, decidiu-se por essa quantidade de parasitos para uma padronização dos experimentos.

Em infecções experimentais em hamster, as vias de inoculação mais utilizadas são a subcutânea com espécies de *Leishmania* dermatrópicas e a intraperitoneal com espécies viscerotrópicas (Evans 1989). Utilizamos estas duas vias de inoculação pelo fato de utilizarmos duas espécies, sendo uma causadora principalmente da forma cutânea e a outra da forma visceral.

Nossos resultados apontam que em relação ao curso clínico das infecções, a via de inoculação, intraperitoneal ou subcutânea, não tem influência significativa para as infecções com *L. infantum*, embora o uso da via IP pareça favorecer a visceralização. Por outro lado, para *L. amazonensis* foi observado que por via SC as lesões no local do inóculo foram observadas aos 30 DAI, enquanto que na via IP as lesões apareceram somente aos 90 DAI. *L. amazonensis* é facilmente detectada na pele, como mostrado pelos resultados de microscopia, cultura e PCR, que foram 100% positivos em todos os tempos avaliados e intenso parasitismo visualizado na IHQ. Quando a inoculação foi por via SC as alterações histopatológicas da pele foram observadas aos 30 DAI e por via IP aos 90 DAI.

Na coinfeccção, a esplenomegalia foi observada mais cedo, aos 60 dias, em 100% dos animais, e a espécie detectada no local foi *L. amazonensis*. Moreira et al. 2012 observaram nas infecções com 10^7 promastigotas de *L. infantum* em hamsters que por via IP houve maior gravidade da doença do que por via ID (intradérmica), parasitos foram encontrados no baço e fígado por microscopia e PCR em tempo real nas infecções por via IP, e por via ID, somente com a técnica de PCR em tempo real,

indicando maior parasitismo por via IP. Oliveira et al. 2011 trabalhando com 18 hamsters experimentalmente infectados com *L. infantum* via IP observaram um tempo médio de mais de 100 dias para início dos sinais clínicos, período semelhante ao observado no presente trabalho. Pouco é encontrado na literatura sobre influência da via de inoculação sobre espécies de *Leishmania*, mas nossos achados sugerem que a via SC pode influenciar na gravidade principalmente no início da infecção mista ou por *L. amazonensis*, porém, não constitui um fator importante para o estabelecimento da infecção.

Nesse trabalho mostramos que *L. amazonensis* é uma espécie viscerotrópica, encontrada antes de *L. infantum*, predominante na pele, baço e fígado aos 30 DAI. O parasitismo no baço por *L. amazonensis* foi detectado aos 30 DAI por todas as técnicas parasitológicas utilizadas, exceto IHQ; e no fígado aos 60 DAI todas as técnicas foram capazes de detectar parasitos. Na infecção por *L. infantum*, o parasitismo no baço e fígado foi observado aos 30 DAI apenas por PCR, enquanto que pelas outras técnicas utilizadas, microscopia, isolamento e IHQ, o parasitismo desses órgãos foi registrado aos 90 DAI. Lesões histopatológicas no baço e fígado dos animais inoculados com *L. amazonensis* foram similares aos inoculados com *L. infantum*. Dessa forma, esses resultados permitem especular que *L. amazonensis* tenha um tropismo por órgãos como o baço e fígado mais precoce do que *L. infantum*, provavelmente porque esta espécie possui multiplicação mais rápida e melhor adaptação às condições intracelulares do hospedeiro. A presença de *L. amazonensis* em órgãos viscerais de roedores infectados experimentalmente foi descrita por outros autores, porém não comparada com *L. infantum* (Abreu-Silva et al. 2004; Bruzual et al. 2008). Abdullah et al. 1998 trabalhando com coinfeção em uma mesma célula humana utilizando diferentes espécies de *Leishmania*, observou alta proporção de infecção mista utilizando *L. amazonensis* e *L. infantum* e maior prevalência de *L. amazonensis* tanto em células coinfectadas quanto em infecção única.

A multiplicação mais rápida de *L. amazonensis* também foi observada em amostras de cultura, e pode ser que uma possível eliminação da outra espécie tenha ocorrido em algumas amostras. Martinez et al. 2002 trabalhando com um paciente com leishmaniose cutânea difusa isolaram *L. amazonensis* e *L. infantum* de uma mesma lesão na pele. As duas espécies foram observadas juntas em cultura primária (NNN/Schneider's), e após o repique apenas *L. amazonensis* permaneceu. Os autores acreditam que a melhor adaptação e crescimento de *L. amazonensis* com relação a *L.*

infantum no meio de cultura utilizado seja provavelmente a razão pela qual esta espécie permaneceu nas culturas após repique. Isto mostra que em um cultivo com mais de uma espécie de *Leishmania*, a espécie dominante, que neste caso foi a *L. amazonensis* tende a inibir o crescimento da outra. Ibrahim et al. 1994 mostraram a capacidade de uma espécie em eliminar a outra em passagens contínuas em meio de cultura. Amostras de aspirado de linfonodos apresentando perfil de *L. donovani* e *L. major*, quando foram mantidas em contínuas passagens em meio de cultura, identificou-se apenas a espécie *L. major*. Mostraram também uma cultura de *L. infantum* que foi contaminada com *L. major* e que após a primeira passagem as duas espécies foram observadas. Depois de alguns meses *L. infantum* foi eliminada da cultura. Casos de culturas mistas com espécies diferentes sugerem que a eliminação de uma espécie provavelmente ocorra porque elas são propensas a apresentar crescimento diferente, ocasionando a seleção rápida. Assim, no momento em que um isolado se adapta à cultura e cresce em quantidade suficiente para permitir a caracterização, uma espécie originalmente presente pode ter sido perdida. Este pode ser um processo rápido, indicando que as infecções mistas naturais podem não ser detectadas devido à seleção em procedimentos de isolamento e caracterização.

Exemplo do que foi discutido acima foi confirmado pela técnica de RFLP nos grupos de coinfeção, pois esta foi eficiente em identificar a presença de infecção mista em uma mesma amostra, seja de fragmentos de órgãos ou de cultura. O perfil misto aparece somente a partir de 60 DAI, indicando que nesta fase a espécie *L. infantum* começa a ter um melhor desenvolvimento, e esta espécie foi detectada sozinha nas amostras de coinfeção somente aos 90 DAI, prevalecendo no baço (ambas as vias) e fígado via IP. Esses dados corroboram a afirmativa que a *L. amazonensis* aparece predominante nas vísceras no início da infecção, depois *L. infantum* se estabelece. Nas amostras de cultura foi encontrado maior porcentagem de perfil misto do que nos órgãos e *L. infantum* é mais observada nos órgãos do que em cultura. Monroy-Ostria et al. (2014) trabalhando com pacientes com a forma cutânea da LT, realizaram a técnica de PCR-ITS1 e a digestão com a enzima *HaeIII* em amostras de cultura de isolados (21 amostras) das lesões cutâneas e em amostras clínicas (116 amostras) destas lesões, e observaram 43% de isolados e 6% de amostras clínicas com perfil de infecção mista.

A coinfeção se estabeleceu de maneira mais rápida do que as infecções únicas e nesta foi observada facilidade de disseminação de *L. amazonensis* na pele, provocando maior espessamento da pata inoculada, lesão mais grave no local do inóculo, presença

em amostras de pata inoculada com *L. infantum* e lesões em outros locais do corpo, como bolsa escrotal. Esta última, curiosamente foi observada em 100% dos animais com coinfeção via IP e em 50% dos animais infectados somente com *L. amazonensis* pela mesma via. Abreu-Silva et al. (2004) observaram que *L. amazonensis* é capaz de produzir um grande espectro de lesões em hospedeiros suscetíveis. Utilizando camundongos inoculados com esta espécie via SC na pata traseira esquerda, observaram além de lesão no local do inóculo, lesões no focinho, perna e disseminação para órgãos como baço, fígado, rins, medula óssea e linfonodos. Bruzual et al. (2008) utilizando hamsters em infecção por *L. amazonensis* via SC na pata traseira direita observaram lesão no local do inóculo e nas outras patas, no focinho, bolsa escrotal e testículos, além de disseminação no baço, fígado e rins. Com relação às lesões na bolsa escrotal, Figueiredo et al. (2009) avaliaram um cão naturalmente infectado que apresentou lesão ulcerada na bolsa escrotal, a espécie presente foi *L. braziliensis* e Manna et al. (2012) observaram a espécie *L. infantum* em lesão na bolsa escrotal de um cão. Aslan et al. (2013) utilizaram *Lutzomyia longipalpis* na transmissão de *L. infantum* em hamsters e observaram lesões na bolsa escrotal, patas e canto da boca, além de alterações viscerais.

As infecções por *L. infantum* só são detectadas na pele por PCR. Sendo que o percentual de amostras PCR positivas é decrescente nos animais inoculados via SC, sendo de 100% aos 30 DAI, 66,7% aos 60 DAI e 33,3% aos 90 DAI. Podemos inferir que *L. infantum* tem um estabelecimento inicial no local da inoculação, e depois migra para uma infecção sistêmica. Por esta espécie nos achados histopatológicos, foram descritas pérolas córneas intensas aos 30 DAI e uma inflamação focal discreta aos 90 DAI. A detecção de *L. infantum* no baço e fígado por PCR, microscopia, cultura e IHQ foi mais precoce e eficiente quando inoculada por via IP. Aos 90 DAI foi observado no baço a perda da arquitetura, inflamação capsular e hiperplasia da polpa vermelha moderada e no fígado observou-se degeneração intensa, inflamação portal e granulomatosa, mais acentuada por via IP que SC, e presença de células gigantes via IP aos 90 DAI. Células gigantes também foram observadas no fígado de animais coinfectados nas duas vias. Nieto et al. (2011) observaram alterações histopatológicas no baço e fígado de hamsters após 3 meses de infecção intracárdica com 10^7 promastigotas de *L. infantum*. Granulomas com células gigantes contendo amastigotas foram observadas no fígado, e no baço descreveram perda da arquitetura, alterações semelhantes às descritas em nossos resultados.

Com estes resultados podemos observar uma maior gravidade na coinfeção quando comparada a infecções únicas por *L. amazonensis* e *L. infantum*. Martinez et al. (2002) observaram coinfeção em uma mesma lesão e consideraram que as características atípicas nas lesões da pele estejam relacionadas com a infecção mista. No trabalho de Barral et al. (1991) em que observaram visceralização em pacientes com *L. amazonensis*, foi questionada a ocorrência de uma possível coinfeção com *L. infantum*, devido às manifestações clínicas típicas da doença visceral, além de ser observada doença mais grave, com ocorrência de casos fatais e múltiplas lesões disseminadas. Acreditamos que a maior gravidade na coinfeção possa estar relacionada a diversos fatores como: o inóculo que foi dobrado, levando a uma exacerbação da doença com comprometimento sistêmico e maior disseminação; a presença de duas cepas virulentas que causam uma diversidade de manifestações clínicas em seus hospedeiros, além de ambas serem espécies viscerotrópicas. Além disso, a presença destas espécies em órgãos como o baço pode ter causado uma imunossupressão no hospedeiro, levando à replicação descontrolada do parasito, comprometendo a função efetora dos macrófagos e tornando a doença mais grave, juntamente com o fato de utilizarmos um modelo experimental altamente susceptível a estas espécies.

Os resultados obtidos no presente trabalho em relação às técnicas para detecção de *Leishmania* na pele, baço e fígado dos animais infectados, mostraram que a PCR foi a técnica mais sensível. De fato, a PCR possui alta sensibilidade e especificidade (até 100%) na detecção de *Leishmania*, com melhor desempenho quando comparado à microscopia ou cultura, particularmente em amostras com baixa carga parasitária (Reithinger & Dujardin 2007). Strauss-Ayali et al. (2004) analisando amostras de aspirados do baço e linfonodos de cães naturalmente infectados, observou um total de 86% de cães positivos utilizando a técnica de PCR-ITS1 e 74% utilizando isolamento em meio de cultura. Rotureau et al. (2006) trabalhando com 40 pacientes com leishmaniose cutânea utilizaram microscopia de esfregaços, isolamento em meio de cultura e PCR-ITS1, ambos de biópsia de lesão da pele, além de PCR dos esfregaços e das culturas. A PCR dos esfregaços e das culturas apresentou baixa sensibilidade, enquanto que a PCR de biópsia da lesão apresentou maior sensibilidade na detecção de *Leishmania* do que cada um dos outros testes diagnósticos. Microscopia e cultura obtiveram sensibilidade de 72,5% e 77,5% respectivamente. No entanto, a PCR de biópsia foi tão sensível quanto microscopia e isolamento combinados (87,5%).

Surpreendentemente no presente trabalho, em algumas amostras de baço, a PCR apresentou menos resultados positivos que a microscopia e cultura, e curiosamente a IHQ não foi positiva nesse órgão nas infecções por *L. amazonensis*. Podemos explicar esse resultado levando em consideração que a PCR é uma reação sensível a inibidores, que compreendem todas as substâncias que tem um efeito negativo sobre a técnica e podem se originar a partir da amostra ou serem introduzidos durante o processamento de amostras ou na extração de DNA. A principal consequência de uma parcial ou total inibição é uma diminuição da sensibilidade ou resultado falso negativo. Inibidores podem ser encontrados em órgãos, fluidos corporais e sangue. Alguns exemplos de inibidores são: sais biliares, ureia, fenol, etanol, melanina, colágeno e hemoglobina (Schrader et al. 2012).

Neste trabalho observamos a IHQ com menor capacidade de detecção de *Leishmania* do que a microscopia nas amostras de baço e fígado. Análises como microscopia, histopatologia e imuno-histoquímica podem produzir resultado falso negativo, pois sua sensibilidade depende da carga parasitária, ou até mesmo falso positivo, pois outros artefatos vistos por microscopia podem ser erroneamente considerados como amastigotas (Baneth & Aroch, 2008; Gomes et al., 2008). Observou-se durante a microscopia uma escassez de amastigotas nas lâminas de baço e fígado, que foram justamente os órgãos que apresentaram menor sensibilidade na IHQ. Os fragmentos utilizados em cada avaliação parasitológica foram diferentes, e sabe-se que um órgão não é uniformemente parasitado, além de que, diferentes observadores realizaram as técnicas de microscopia e IHQ, e estes fatores podem explicar a baixa sensibilidade desta quando comparada a outras técnicas utilizadas.

No presente trabalho, observamos que as avaliações realizadas nos animais e em seus tecidos são concordantes. Os resultados da clínica e histopatologia são complementares, e são confirmados por microscopia e isolamento em meio de cultura, que apresentaram resultados semelhantes. Imuno-histoquímica que foi a técnica com menor sensibilidade e PCR que foi a técnica mais sensível com maior porcentagem de amostras positivas em todos os grupos.

7. Considerações Finais

- A via de inoculação não teve influência nas alterações clínicas das infecções por *L. infantum* ou *L. amazonensis*, porém, *L. infantum* tem estabelecimento mais típico por via IP enquanto *L. amazonensis* por via SC;
- *L. amazonensis* possui capacidade de invadir baço e fígado, sendo mais precoce que *L. infantum* em todas as situações avaliadas;
- A coinfeção foi mais grave, sendo *L. amazonensis* a espécie responsável por esplenomegalia precoce e lesões de pele no local do inóculo e disseminadas;
- Nas infecções mistas, *L. amazonensis* é detectada mais cedo que *L. infantum* nos órgãos e isolados avaliados (pele, baço e fígado), mas *L. infantum* pode prevalecer com o passar do tempo;
- Amostras de cultura apresentaram maior porcentagem de perfil misto do que os órgãos correspondentes, sugerindo que em meio de cultura uma espécie antes não observada pode se desenvolver;
- PCR-RFLP de órgãos e da cultura correspondente são técnicas complementares para diagnóstico de infecções mistas por *L. amazonensis* e *L. infantum*.

8. Referências bibliográficas

- Abdullah SM, Flath B, Presber W 1998. Mixed infection of human U-937 cells by two different species of *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 59(2): 182–188.
- Abreu-Silva AL, Calabrese KS, Cupolilo SMN, Cardoso FO, Souza CSF, Gonçalves da Costa SC 2004. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. *Vet Parasitol* 121: 179-187.
- Almeida MC, Cuba-Cuba CA, Moraes MA, Miles MA 1996. Dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Comp Pathol* 115:311-316.
- al-Diwany LJ, al-Awkati NA, Atia M, Rassam MB 1995. Concomitant natural infection with *L. donovani* and *L. major*: a case report from Iraq. *Soz Praventivmed* 40: 234–238.
- Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57: 1-88.
- Andrade A, Pinto S, Oliveira R 2006. *Animais de Laboratório: Criação e Experimentação*, Rio de Janeiro, Fiocruz, 388p.
- Antoniou M, Doulgerakis C, Pratlong F, Dedet JP, Tselentis Y 2004. Short report: treatment failure due to mixed infection by different strains of the parasite *Leishmania infantum*. *Am J Trop Med Hyg* 71(1): 71–72.
- Ashford RW 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1269-1281.
- Aslan H, Dey R, Meneses C, Castrovinci et al. 2013. A New Model of Progressive Visceral Leishmaniasis in Hamsters by Natural Transmission via Bites of Vector Sand Flies. *J Infec Dis* 207: 1328-1338.
- Babiker AM, Ravagnan S, Fusaro A et al. 2014. Concomitant Infection with *Leishmania donovani* and *L. major* in Single Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Patients from Sudan. *J Trop Med* doi: 10.1155/2014/170859.
- Baneth G, Aroch I 2008. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. *Vet J* 175: 14–15.
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JG, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M, Carvalho EM 1991. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546.

- Berman JD 2005. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 7:33-38.
- Bruzual E, Arcay 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.
- Castellano RL 2005. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Vitae Academia Biomédica Digital*, 25.
- Choi CM, Lerner EA 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 6(3): 175-82.
- Corbett CP, Paes RP, Laurenti MD, Andrade HF, Duarte MS 1992. Histopathology of lymphoid organs in experimental leishmaniasis. *Int J Exp Path* 73: 417-433.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 12–17.
- den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin Microbiol Infect* 17(10):1471-7.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dias ES, Regina-Silva S, França-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araújo SC, Valadão JL, et al. 2011. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban área of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 176: 101-111.
- Dujardin JC 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis: towards integrated monitoring? *Trends Parasitol* 22: 4-6.
- Evans D 1989. Handbook on isolation, characterization and cryopreservation of *Leishmania*, World Health Organization, Geneva, 45 pp.
- Farrell JP 1976. *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral leishmaniasis in the golden hamster. *Exp Parasitol* 40:89–94.
- Figueiredo F, Bonna I, Nasicmento L, Costa T et al. 2009. Avaliação sorológica para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães e gatos no bairro de Santa

- Rita de Cássia, Município de Barra Mansa, Estado do Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(2): 141-145.
- Fonseca AM, Celeste JL, França-Silva JC, et al. 2011. Caracterização das espécies de *Leishmania* em amostras coletadas de cães infectados no município de Porteirinha, Minas Gerais, Brasil. Apresentado na XXVII Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas e XV Reunião de Pesquisa Aplicada em Leishmanioses, 26-28 de outubro de 2011, Uberaba, 273 p.
 - Garg R, Dube A 2006. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 439-454.
 - Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, da-Cruz AM 2013. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779.
 - Gomes Y, Cavalcanti M., Lira R., Abath F, Alves L 2008. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet J* 175: 45–52.
 - Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-1180
 - Hoffmann AR et al. 2012. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil – relato de caso. *Semina: Ciências Agrárias* 33(2): 3265-3270
 - Hofman V, Brousset P, Mougneau E, Marty P, Lamant L, Antoine JC, Glaichenhaus N, Hofman P 2003. Immunostaining of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* using monoclonal antibody (10–11) to the *Leishmania* homologue of receptors for activated C-kinase. *Am J Clin Pathol* 120: 567-574.
 - Hommel M, Jaffe C, Travi B, Milon G 1995. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89:55–73.
 - Ibrahim ME, Smyth AJ, Ali MH, Barker DC, Kharazmi A 1994. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. *Acta Tropica* 57: 327–332.
 - Kaye P, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR 2004. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunological Reviews* 201: 239-253.

- Kobets T, Havelková H, Grekov I, Volkova V, Vojtísková J, et al. 2012. Genetics of host response to *Leishmania tropica* in mice – different control of skin pathology, chemokine reaction, and invasion into spleen and liver. *PLoS Negl Trop Dis* 6(6): e1667. doi:10.1371/journal.pntd.0001667.
- Lainson R, Shaw JJ 1978. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 22; 273: 595-600.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R (eds.), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, 1. Academic Press, London, p. 1-120.
- Laurenti MD, Sotto MN, Corbett CP, Matta VR, Duarte MS 1990. Experimental visceral leishmaniasis: sequential events of granuloma formation at subcutaneous inoculation site. *Int J Exp Path* 71: 791-797.
- Leontides LS, Saridomichelakis MN, Kontos V, Koutinas A et al. 2002. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. *Vet Parasitol* 109: 19-27.
- Lonardon M, Russo M, Jancar S 2000. Essential role of platelet-activating factor in control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Infect Immun* 68: 6355-6361.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TPM, Pacheco RS, Oliveira FS, Pereira SA, et al. 2005. Mixed infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100:442-445.
- Madeira MF, Schubach A, Schubach TMP, Pereira SA, Figueiredo FB, Baptista C, Leal CA, Melo C, Confort EM, Marzochi 2006. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Parasitol* 138: 366–370.
- Magill AJ, Grogl M, Gasser RA, Sun W, Oster CN 1993. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *N Engl J Med* 328:1383-1387.
- Mahmoudzadeh-Niknam H, Kiaei SS, Irvani D 2007. Viscerotropic growth pattern of *Leishmania tropica* in BALB/c mice is suggestive of a murine model for human viscerotropic leishmaniasis. *Korean J Parasitol* 45(4): 247-253.

- Maia C, Campino L 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol* 158: 274-287.
- Manna L, Paciello O, Morte R, Gravino A 2012. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasit Vectors* 5:216.
- Manna L, Vitale F, Reale S, Caracappa S et al. 2004. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol* 125: 251-262.
- Martinez E, Mollinedo S, Torrez M, Muñoz M, Bañuls AL, Le Pont F 2002. Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum/L. chagasi* in a case of diffuse cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 96: 529–532.
- Mebrahtu YB, Lawyer PG, Hendricks LD, Muigai R et al. 1991. Concurrent infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania major* in a Kenyan patient: Clinical description and parasite characterization. *Am J Trop Med Hyg* 45:290-296.
- Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE 2001. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166:1912-1920.
- Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katz S, Barbiéri CL, Uliana SRB 2009. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. *J of Antimicrob Chemotherapy* 63: 365–368.
- Ministério da Saúde 2006. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília, Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde 2007. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília, Ministério da Saúde.
- Ministério da Saúde 2009. Guia de vigilância epidemiológica. Brasília, Ministério da Saúde.
- Monroy-Ostria A, Nasereddin A, Monteon VM, Guzmán-Bracho C, Jaffe CL 2014. ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in

- States of the Mexican Southeast. *Interdiscip Perspect Infect Dis* doi: 10.1155/2014/607287.
- Moreira NdD, Vitoriano-Souza J, Roatt BM, Vieira PMdA, Ker HG, et al. 2012. Parasite burden in hamsters infected with two different strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS ONE* 7(10): e47907. doi:10.1371/journal.pone.0047907.
 - Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561-77.
 - Nieto A, Bernal-Domínguez G, Orden J et al. 2011. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniasis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res* 42:39.
 - Oliveira CI et al. 2004. Animal models for infectious diseases caused by parasites: leishmaniasis. *Drug Discov Today: Disease Models* 1(1): 81-86.
 - Oliveira D, Costa M, Chavez-Fumagalli M, Valadares D et al. 2012. Evaluation of parasitological and immunological parameters of *Leishmania chagasi* infection in BALB/c mice using different doses and routes of inoculation of parasites. *Parasitol Res* 110:1277-1285.
 - Oliveira E, Oshiro ET, Pinto RV, Castro BC, Daniel KB, et al. 2011. Presence of amastigotes in the central nervous system of hamsters infected with *Leishmania* sp. *Rev Bras Parasitol Vet* 20(2): 97-102.
 - Oliveira Neto MP, Marzochi MC, Grimaldi Júnior G, Pacheco RS, Toledo LM, Momen H 1986. Concurrent human infection with *Leishmania donovani* and *Leishmania braziliensis braziliensis*. *Ann Trop Med Parasitol* 80(6): 587-92.
 - Paltrinieri S, et al. 2010. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 236: 1184-1191.
 - Peloi LS, Biondo CEG, Kimura E, Politi MJ, Lonardoní MVC, et al. 2011. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol* 128: 353–356.
 - Pereira W, Lonardoní M, Grespan R et al. 2005. Immunomodulatory effect of Canova medication on experimental *Leishmania amazonensis* infection. *J Infect* 51:157-164.

- Pires MQ, Madeira MF, Bittencourt VP, Pacheco RS 2014. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop* 47(2): 243-246.
- Quaresma PF, Rêgo FD, Botelho HA, Silva SR, Júnior AJM, Neto RGT, Madeira FM et al. 2011. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 105: 579–585.
- Quinnell RJ, Courtenay O 2009. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology* 136: 1915–1934.
- Rangel EF, Lainson R 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7).
- Reis AB, Martins-Filho OA, Teixeira-Carvalho A, Carvalho MG et al. 2006. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci* 81: 68-75.
- Reithinger R, Dujardin JC 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45: 21-25.
- Ribeiro-Romão et al. 2014. A comparative evaluation of lesion development, tissue damage and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania (Viannia) braziliensis* concentrations. *Infect Immun* doi:10.1128/IAI.02083-14.
- Riça-Capela MJ, Cortes S, Leandro C, Peleteiro MC, Santos-Gomes G, Campino L 2003. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitol Res* 89: 163–169.
- Rodrigues V, Santana da Silva J, Campos-Neto A 1992. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol* 14:49–58.

- Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J 2010. *Leishmania* Infection: Laboratory Diagnosing in the Absence of a “Gold Standard”. *Am J Trop Med Hyg* 82(2): 251–256.
- Rotureau B, Ravel C, Couppié P et al. 2006. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol* 44(2): 459–467.
- Saraiva L, Filho JDA, Silva SO, Andrade ASR, Melo MN 2010. The molecular detection of different *Leishmania* species within sand flies from a cutaneous and visceral leishmaniasis sympatric area in Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8): 1033-1039.
- Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides LS, Koutinas AF, Billinis C, Kontos VI 2005. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am J Trop Med Hyg* 73: 82-86.
- Savani EM, Nunes VB, Galati EB, Castilho TM, Zampieri RA, Floeter-Winter LM 2009. The finding of *Lutzomyia almerioi* and *Lutzomyia longipalpis* naturally infected by *Leishmania* spp. in a cutaneous and canine visceral leishmaniases focus in Serra da Bodoquena, Brazil. *Vet Parasitol* 160: 18-24.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol* 113:1014-1026.
- Shirian S, Oryan A, Hatam GR, Daneshbod Y 2012. Mixed Mucosal Leishmaniasis Infection Caused by *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. *J Clin Microbiol* 50(11): 3805-3808.
- 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: 349–358.
- Silva DA, Madeira MF, Teixeira AC, de Souza CM, Figueiredo FB 2011. Laboratory tests performed on *Leishmania* seroreactive dogs euthanized by the leishmaniasis control program. *Vet Parasitol* 179: 257-261.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett C 2004. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the

Disease in Amazonian Brazil – A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(3): 239-251.

- Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Ribeiro RSM 1984. Leishmaniose cutânea na Amazônia. Registro do primeiro caso humano de infecção mista, determinado por duas espécies distintas de *Leishmania*: *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 26(5): 272-275.
- Soares IR, Silva SO, Moreira FM et al. 2013. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus caballus*) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Vet Parasitol* 197: 665-669.
- Soliman MFM 2006. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. *Acta Tropica* 97: 146–150.
- Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G 2004. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. *J Infect Dis* 189: 1729-1733.
- Tafuri WL, Oliveira MR, Melo MN, Tafuri WL 2001. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol* 96: 203-212.
- Tafuri WL, Santos RL, Arantes RME, Gonçalves R, Melo MN, Michalick MSM, Tafuri WL 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods* 292: 17– 23.
- Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araújo MF, Barbosa JA et al. 2007. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 149(3-4):280-4.
- WHO 2014 - World Health Organization. Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em Dezembro de 2014.
- Wilson H, Dieckmann B, Childs B 1979. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infection in golden hamsters. *Exp Parasitol* 47: 270-283.
- Xavier SC, Andrade HM, Jamil S, Monte H, Chiarelli IM, Lima WG, Michalick MSM, Tafuri WL, Tafuri WL 2006. Comparison of paraffin-embedded skin

biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res* 2: 1-7.

9. Anexo

Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do protocolo experimental utilizado.



UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 129 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Hamster como modelo experimental de infecção mista por *L. amazonenses* e *L. infantum*", que tem como responsável Helida Monteiro de Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 20/08/2013. Este certificado espira-se em 20/08/2018.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 129 / 2013, related to the Project entitled "Hamster as an experimental model of mixed infection by *L. amazonensis* and *L. infantum*", under the supervision of Helida Monteiro de Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 20/08/2013. This certificate expires in 20/08/2018.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS

Coordenador(a) da CEUA/UFMG

Belo Horizonte, 20/08/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br