

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

LEISHMANIOSE VISCERAL EM HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS: DOENÇA VENÉREA EM MACHOS COM TRANSMISSÃO SEXUAL.

Amanda Pifano Neto Quintal

Uberlândia

Agosto – 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

LEISHMANIOSE VISCERAL EM HAMSTERS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS: DOENÇA VENÉREA EM MACHOS COM TRANSMISSÃO SEXUAL.

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Discente: Amanda Pifano Neto Quintal

Orientador: Claudio Vieira da Silva

Co-orientador: André Belico de Vasconcelos

Uberlândia

Agosto – 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

Q71  
2015

Quintal, Amanda Pifano Neto  
Leishmaniose visceral em hamsters experimentalmente infectados:  
doença venérea em machos com transmissão sexual / Amanda Pifano  
Neto Quintal. - 2015.

83 f. : il.

Orientador: Claudio Vieira da Silva.

Coorientador: André Belico de Vasconcelos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa  
de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Leishmaniose visceral - Teses. 3. Sêmen -  
Teses. 4. Animais domésticos - Aparelho genital - Doenças - Teses. I.  
Silva, Claudio Vieira da. II. Vasconcelos, André Belico de. III.  
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em  
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

---

CDU: 612.017



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Amanda Pifano Neto Quintal

"Leishmaniose visceral em hamsters experimentalmente infectados: doença venérea em machos com transmissão sexual"

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Doutor(a).

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 5 de agosto de 2015.

Olindo Assis Martins Filho  
Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho  
FIOCRUZ

Prof. Dr. Renato de Lima Santos  
UFMG

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti  
ICBIM/UFU

Profa. Dra. Maria Aparecida de Souza  
ICBIM/UFU

Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva – orientador  
ICBIM/UFU

[www.imunoparasito.ufu.br](http://www.imunoparasito.ufu.br) - E-mail: [coipa@ufu.br](mailto:coipa@ufu.br) - Telefax: (034) 3225-8672  
Av. Amazonas, s/n - Bloco 4C, Sala 4C218 - Campus Umuarama  
Uberlândia, MG, Brasil - CEP: 38.405-320

## DEDICATÓRIA

Ao meu maior experimento, Miguel, filho de doutorado.  
Ao meu marido, André, pela paciência,companheirismo e amor.  
À minha irmã, Aline, pelo incentivo e amizade.  
Aos meus pais João e Cida, pelo apoio.  
À Alice, meu sonho concretizado, pelas viagens.  
A todos que participaram da minha trajetória

Am I wrong for thinking out the box from where I stay?  
Am I wrong for saying that I choose another way?  
I ain't trying to do what everybody else doing  
Just cause everybody doing what they all do  
If one thing I know, I'll fall but I'll grow  
I'm walking down this road of mine, this road that I call home  
So am I wrong? For thinking that we could be something for real?  
Now am I wrong? For trying to reach the things that I can't see?

Niko e Viniz

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção durante as viagens constantes Uberaba-Uberlândia.

À Universidade Federal de Uberlândia, especialmente ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicada;

A CAPES, pela bolsa de estudos durante o doutorado;

Ao Professor Dr. Claudio Vieira da Silva, meu orientador, pela oportunidade de ingressar no Programa, pela singularidadee por permitir que sigamos nossas próprias ideias;

Ao Professor Dr. André Belico de Vasconcelos, meu co-orientador, pelo suporte técnico e estrutural da Universidade de Uberaba, orientado sempre nas dúvidas apresentadas;

Ao Dr. Sidney Magno Silva, Dra. Maria Aparecida de Souza e Dra. Belisa, pelas considerações durante a banca de qualificação;

Ao Laboratório de Tripanossomatídeosea todos os membros da família LATRI, especialmente a Bruna, Paula,Rebecca, Ana Flávia e Marlus que participaram diretamente deste projeto;

Ao Dr. Antônio Mundin e Fernanda Gatti, pelas análises hematológicas;

À Dra. Clara Lúcia Barbieri e a técnica Simone da Universidade Federal de São Paulo, por ceder hamster infectado com *L. infantum*;

Ao Dr. Guilherme da Universidade Federal de Minas Gerais; pelas análises histológicas;

Ao bioterista Luiz, da Universidade de Uberaba, por manter os animais em local reservado e com ótimos cuidados;

Ao Professor Aldo, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, pelo uso de equipamento de microscopia confocal.

A Mariane, técnica do confocal da UFU, pelo auxílio na captação das imagens.

Ao laboratório ANILAB, em Campinas - SP, pelo fornecimento dos hamsters.

A Aline Pifano Neto Quintal e Richard Alex Wessler, por conferirem a parte escrita.

A todos que participaram deste doutorado direta ou indiretamente.

## LISTA DE ABREVIASÕES

- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida  
APC – Células apresentadoras de抗ígenos  
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média  
cm<sup>2</sup> – Centímetros quadrados  
°C/s – Graus Celsius por segundo  
Ct – *Threshold cycle*  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DP – Desvio padrão  
DST – Doença sexualmente transmissível  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima  
g – força gravitacional  
GGT – Gama glutamil transferase  
G/dL – Gramas por decilitro  
GM-CSF – Fator de formação de colônia de granulócitos e macrófagos  
HCM – Hemoglobina Corpuscular Média  
HE – Hematoxilina e Eosina  
HIV – Vírus da imunodeficiência humana  
IL – Interleucina  
IM – Intramuscular  
IFN $\gamma$  – Interferon gama  
IP – Intraperitoneal  
kDNA – Cinetoplasto de DNA  
LIF – Fator inibidor de leucemia  
LV – Leishmaniose visceral  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
MHC – Complexo de histocompatibilidade  
MIF – Fator de inibição de migração de macrófagos  
MIP-1 $\beta$  – Proteína inflamatória de macrófagos 1 $\beta$   
Min – Minutos

$\mu\text{L}$  – Microlitros  
mm – Milímetros  
 $\text{mm}^3$  – Milímetros cúbicos  
mM – Milimolar  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
PAL – Fenilalanina amônioliase  
PB – Pares de base  
PBMC – Célula periférica mononuclear do sangue  
PBS – Tampão fosfato salino  
PCR – Reação em cadeia pela polimerase  
 $\text{Pg}/\text{ml}$  – Picogramas por mililitro  
PGN – Tampão fosfato, contendo 0,25% de gelatina e 0,1% de azida sódica.  
PMN – Polimorfonucleares  
PPD – Parafenilenodiamina  
qPCR – PCR quantitativo em tempo real  
 $R^2$  – Coeficiente de correlação simples  
s – Segundos  
SCF – Fator de células estaminais  
TGF – Factor de crescimento transformante  
TGP – Transaminase glutâmico pirúvica  
Th1 – Linfócito T auxiliar do tipo 1  
Th2 – Linfócito T auxiliar do tipo 2  
TM – Temperatura de melting  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
U – Unidade  
 $\text{U}/\text{L}$  – Unidade por litro  
VCM – Volume corpuscular médio

## **LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1. Confirmação da infecção experimental: área do baço mensurada pelo programa Image J (ANOVA  $p<0.05$ ) (A), imagem representativa de baço não infectado (B) e baço infectado (C)..... 37
- Figura 2. Concentração de proteínas séricas totais (A), albumina (B) e globulinas (C) em hamsters experimentalmente infectados por *L. infantum*, nas diferentes semanas de infecção..... 40
- Figura 3. Análise macroscópica testicular ao longo das semanas de infecção por *L. infantum*: medição de área (A), onde cada ponto no gráfico corresponde a um animal ( $p<0,05$ ); imagem representativa de testículo não infectado (B); testículo com aumento de volume durante a 7<sup>a</sup> semana de infecção (C) e testículo com redução de volume (D)..... 41
- Figura 4. Figura 4. Imagem representativa de testículo em microscopia óptica corados com HE. Testículo não infectado (A) e testículo durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção *L. infantum* com redução do volume testicular (B)..... 42
- Figura 5. Epidídimo durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção em microscopia óptica corados com HE. As setas pretas demonstram a presença sugestiva de *L. infantum* no lúmen do ducto epididimário e na célula prismática da cabeça do epidídimo (A). As setas pretas demonstram os grânulos no lúmen do ducto epididimário, e a seta cinza a presença de plasmócitos..... 43
- Figura 6. Imagem representativa da arquitetura testicular por imunofluorescência em microscopia confocal. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* dentro do túbulo seminífero testicular, com núcleo marcado em vermelho (A e C) e parasito em verde (B e D)..... 44
- Figura 7. Lúmen do túbulo seminífero testicular em contraste de fase por microscopia confocal. O círculo branco determina a posição do núcleo e o cinetoplasto de *L. infantum*

(A) e a seta branca demonstra a forma amastigota de *L. infantum* em verde, juntamente com os espermatozoides (B).....45

Figura 8. Sobreposição de imagens do epidídimo por imunofluorescência em microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* nas células prismáticas e lúmen do ducto epididimário, sendo o núcleo marcado em vermelho e parasito em verde..... 46

Figura 9. Lúmen do ducto epididimário por imunofluorescência em microscópio confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* no lúmen do ducto epididimário, sobrepondo-se aos espermatozoides, sendo o núcleo marcado em vermelho (A e C) e parasito verde (B e D)..... 47

Figura 10. Lúmen do ducto epididimário por imunofluorescência e contraste de fase em microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. Seta branca determina a posição do núcleo do parasito em vermelho (A), forma amastigota de *L. infantum* em verde (B) e sobreposição de imagens (C). Seta preta indica a forma amastigota de *L. infantum* por contraste de fase (D), *L. infantum* em verde (D) e sobreposição de imagens (F)..... 48

Figura 11. Lúmen do ducto epididimário em contraste de fase por microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição do núcleo e a preta o cinetoplasto de *L. infantum* (A); a seta branca demonstra a forma amastigota de *L. infantum* extra-celular em verde, no lúmen do ducto (B)..... 49

Figura 12. Carga parasitária no testículo (A), na cabeça (B) e cauda do epidídimo (C) em hamster experimentalmente infectados por *L. infantum*, demonstrando o número de parasitos em 20 mg de tecido durante as semanas de infecção. ....51

Figura 13. Dosagem de citocinas testiculares em hamster experimentalmente infectados com *L. infantum* ao longo do tempo. IL-1 $\beta$  (A), IFN $\gamma$  (B) e TNF $\alpha$  (C) demonstraram valores elevados na 7<sup>a</sup> semana de infecção e citocina IL-4 (D), com valores elevados na 10<sup>a</sup> semana (p<0.05).....52

Figura 14. Dosagem de citocinas do epidídimo em hamster experimentalmente infectados com *L. infantum* ao longo do tempo. IL-1 $\beta$  (A) demonstrou valor elevado na 13<sup>a</sup> semana de infecção ( $p<0,05$ ). TNF $\alpha$  (B) e IL-4 (C) dos hamsters infectados permaneceram semelhantes ao controle.....53

Figura 15. Área (cm $^2$ ) mensurada pelo programa Image J de útero (A) e baço (B), comparando a Fêmeas acasaladas com machos negativos (Grupo 1) e fêmeas acasaladas com machos positivos durante a 13<sup>a</sup> semana para *L. (L.) infantum* (Grupo 02). Imagens representativas de útero e baço de fêmeas do Grupo 1 (C) e Grupo 2 (D)..... 54

Figura 16. Tráfego de *L. (L.) infantum* no sistema reprodutor masculino. Formas amastigotas fagocitadas por neutrófilos e monócitos chegam ao testículo via hematogênica (A). Com o aumento da carga parasitária e de citocinas pró-inflamatórias, mais macrófagos são atraídos ao local. Parasitos conseguem atravessar a barreira hemato-testicular atravessando as células de Sertoli e atingem o lúmen dos túbulos seminíferos, ocasionando edema e hipertrofia testicular (B). Posteriormente, amastigotas se alojam nos testículos em menor número; o aumento de testosterona pode ser um dos fatores a promover um ambiente mais imunossuprimido, permitindo que os parasitos permaneçam silenciosos e protegidos contra o sistema imune durante a infecção crônica (C). Amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* não fagocitadas atingem o lúmen dos túbulos seminíferos, migram pelo ducto epididimário, onde são captadas pelos estereocícios das células prismáticas permanecendo no epidídimo ou são liberados juntamente com os espermatozoides (D).....56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Grupos experimentais: número de hamsters infectados com formas amastigotas de <i>L.(L.). infantum</i> por animal durante as semanas de infecção.....	32
Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de <i>threshold cycle</i> (CT) da curva padrão de testículo e epidídimos, e temperatura de dissociação ou temperatura de <i>Melting</i> (TM).....	34
Tabela 3. Valores hematológicos de referência para hamster (PESSOA, 2007), seguidos pela média e desvio padrão dos grupos controle e infectados ao longo do tempo.....	38
Tabela 4. Contagem sérica de enzimas hepáticas de referência para hamster (PESSOA, 2007), seguidos pela média e desvio padrão dos grupos controle e infectados ao longo do tempo.....	38
Tabela 5. PCR das fêmeas acasaladas com machos positivos para <i>L. infantum</i> , sendo detectáveis (+) ou não detectáveis (-) para o órgão analisado.....	55

## SUMÁRIO

<b>Resumo na língua vernácula.....</b>	<b>15</b>
<b>Resumo em inglês (Abstract) .....</b>	<b>16</b>
<b>1. Introdução/justificativa.....</b>	<b>17</b>
1.1 Histórico da Leishmaniose Visceral .....	17
1.2 Características gerais da LV .....	18
1.3 Modelo experimental.....	21
1.4 Aspectos do aparelho reprodutor masculino .....	23
1.5 Relação Parasito-hospedeiro.....	25
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>30</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1 Aspectos éticos .....	31
3.2 Manutenção e recuperação de formas amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	31
3.3 Infecção experimental em hamster dourado por <i>L. (L.) infantum</i> .....	31
3.4 Coleta de amostras e análise macroscópica .....	32
3.5 Aspectos laboratoriais .....	32
3.6 PCR convencional .....	33
3.7 Determinação da carga parasitária.....	33
3.8 Análise histológica .....	34
3.9 Reação de imunofluorescência .....	35
3.10 Dosagem de citocinas .....	35
3.11 Avaliação da taxa de transmissão sexual.....	36
3.12 Análise estatística .....	36
<b>4. Resultados .....</b>	<b>37</b>
4.1 Análise macroscópica do baço e confirmação da infecção experimental .....	37
4.2 Aspectos laboratoriais .....	37
4.3 Análise anátomo-histológica testicular.....	41
4.4 Reação de imunofluorescência .....	44

4.4 Determinação da Carga Parasitária.....	50
4.5 Dosagem de citocinas .....	52
4.6 Avaliação da taxa de transmissão sexual.....	54
<b>5. Discussão .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>64</b>
<b>7. Referências bibliográficas.....</b>	<b>65</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
Anexo1 - Protocolo do Comitê de Ética e Pesquisa .....	80
Anexo 2 - Protocolo de recuperação da <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .....	81
Anexo 3 - Protocolo de Imunofluorescência .....	82

## **RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA**

A leishmaniose visceral (LV) é uma antropozoonose causada por protozoários pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* e classicamente transmitida por vetores flebótomos hematófagos; no entanto, as transmissões verticais também podem ocorrer. A presença de *Leishmania* no sêmen de animais infectados foi relatada causando danos nos tecidos seguidos por azoospermia e atrofia testicular na fase crônica. O objetivo deste estudo foi caracterizar as lesões no sistema genital masculino de hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), experimentalmente infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*, elucidando o perfil imunológico, histopatológica e carga parasitológica gerado por este animal durante a infecção experimental e implicações na transmissão sexual. A infecção experimental de machos foi confirmada com sucesso. Parâmetros hematológicos foram compatíveis com a infecção por *Leishmania*. Nos testículos, foram observadas alterações anátomo-histológicas e elevada carga parasitária analisada por qPCR no início da infecção, sendo associados com o aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ . Posteriormente, o aumento da produção de IL-4 foi observado com baixa carga parasitária. Fêmeas negativas acasaladas com machos experimentalmente infectados com *L. infantum* foram positivas por PCR para *Leishmania* sp. Este estudo evidenciou a presença de *L. infantum* no testículo e epidídimos de hamsters experimentalmente infectados, demonstrando formas amastigotas do parasito no lúmen dos túbulos seminíferos e ducto epididimário, livre que qualquer fagócito; bem como os mecanismos imunológicos e de carga parasitária necessários para permanência do parasito no sistema reprodutor masculino, causando baixo impacto sobre a fertilidade dos machos. Ainda, verificou-se que *L. infantum* foi sexualmente transmitida neste modelo experimental.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Leishmania infantum*, *Mesocricetus auratus*, qPCR, imunofluorescência, citocinas.

## **RESUMO EM INGLÊS (ABSTRACT)**

Visceral leishmaniasis (VL) is an anthropozoonosis caused by protozoa belonging to the *Leishmania donovani* complex. Hematophagous phlebotomine vectors classically transmit the parasite; however, vertical transmissions of VL also occur. The presence of *Leishmania* has been reported in the semen of infected animals, causing tissue damage leading to azoospermia and testicular atrophy at the chronic stage. The aim of this study was to characterize lesions in the male genital system of golden hamsters (*Mesocricetus auratus*), experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*, elucidating the immunological and histopathological profile and parasite load generated by the animal during experimental infection and the implication of sexual transmission. Male hamster experimental infection confirmed successfully. Hematological parameters were compatible to *Leishmania* infection. Anatomo-histological changes observed in the testis; high parasite load by qPCR in the beginning of infection were compatible with the increase of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ . Subsequently, increased IL-4 production was associated with low parasite load. Negative females mated with *L. infantum* experimentally infected males were positive for *Leishmania* sp. by PCR. The study showed the presence of *L. infantum* in the testis and epididymis of experimentally infected hamsters, showing parasite amastigotes in the seminiferous tubules lumen and epididymal duct, free of any phagocyte. In addition, the immunological profile and parasitic load demonstrated how parasites stay in the male reproductive system, causing low impact on male fertility. Further, it was found that *L. infantum* was sexually transmitted this experimental model.

**KEYWORDS:** *Leishmania infantum*, *Mesocricetus auratus*, qPCR, imunofluorescence, citokines.

## **1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA**

### **1.1 Histórico da Leishmaniose Visceral**

A descoberta do agente causadorda leishmaniose visceral é universalmente aceita, na qual William Leishman e Charles Donovan, relataram, independentemente, a presença do parasita em baçode pacientes com calazar. A forma cutânea, descoberta por David Cunningham (1885), era desconhecida para Leishman e Donovan (COX, 2002).

Em 1900, na Índia, um soldado inglês apresentou invalidez com ataques de febre, anemia e aumento do baço sendo encaminhado ao hospital para investigação e tratamento; dentre os exames realizados, Leishman punctionou o baço e observou um enorme número de corpos ovais nos esplenócitos e nas células sanguíneas. Meses depois, ao examinar o sangue, fígado e baço de um roedor morto de tripanossomíase; corpos idênticos na forma, tamanho e cor foram encontrados semelhantemente ao caso do soldado (BAILEY e BISHOP, 1959).

Em 1903, Leishman publicou seus achados no British Medical Journal e Charles Donovan confirmou suas conclusões em Madras quase que simultaneamente, publicando seus dados na mesma revista (THARAKARAM, 1999). Sir Ronald Ross propôs que os corpos deveriam ser nomeados de corpos de Leishman-Donovan, e o parasita *Leishmania donovani*, sendo esta nomenclatura adotada em todo o mundo (BAILEY e BISHOP, 1959).

O parasito foi encontrado em cães pela primeira vez na Tunísia em 1908, por Nicolle e Comte, sugerindo o possível papel destes animais como reservatório da doença. A coincidência da distribuição da leishmaniose visceral (LV) com o *Phlebotomus argentipes*, apontada por Sinton, foi o suporte para que demonstrassem a transmissão do parasito pela picada do vetor em hamster (ADLER e THEODOR, 1931).

Nas Américas, Migone em 1913 realizou o primeiro relato de LV no Paraguai, onde o paciente faleceu após não responder ao tratamento para a malária e que havia contraído a doença no Estado do Mato Grosso, Brasil. Em necropsia, foi observado formas amastigotas no sangue, cujos sintomas eram altamente indicativos de LV (MICHALIK E GENARO, 2005; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; LAISON, 2010).

Em 1934, Henrique Penna ao necropsiar amostras de fígado de pacientes suspeitos de febre amarela no Brasil, constatou que 41 destes óbitos ocorreram devido a leishmaniose visceral (LAISON e RANGEL, 2005; LAISON 2010). Em 1936, criou-se uma comissão visando continuar os estudos de Penna, chefiada por Evandro Chagas. Mais

casos da doença em humanos e cães foram relatados no Nordeste Brasileiro, nas áreas rurais de Abaetetuba e Moju. Ainda, sugeriu-se que o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, um provável vetor e transmissor da *Leishmania infantum* nas Américas (CHAGAS et al., 1937).

Até o início da década de 1950, apenas 379 casos de leishmaniose visceral foram notificados, distribuídos em 13 Estados; e acreditava-se que a transmissão da leishmaniose visceral fosse exclusivamente rural (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). De 1953 a 1965, a doença foi estudada em diversas regiões do País, demonstrando o seu caráter endêmico e, posteriormente, iniciaram-se as primeiras campanhas governamentais para o controle da LV no Brasil (MICHALIK E GENARO, 2005).

## 1.2 Características gerais da LV

Leishmaniose visceral (LV) inclui um grupo complexo de doenças causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* que infectam macrófagos a partir de vários mamíferos (SOTO et al., 2009). O gênero *Leishmania* compreende grande número de espécies, com 22 causando doenças em humanos; dentre elas, a forma visceral representa uma enfermidade grave e letal, se não tratada (CASTILHO et al., 2008).

O complexo *donovani* possui como principais espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* (Ross, 1903); *Leishmania (Leishmania) infantum* (Nicolle, 1908) e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937), sendo esta última observada no Brasil (ASSIS et al., 2010; LAISON, 2010). Entretanto, a identidade de *L. (L.) chagasi* (no novo mundo), tem sido objetivo de questionamento e muitos autores relatam a semelhança molecular com *L. (L.) infantum* (no velho mundo), classificando ambas as espécies como sinônímia (LAINSON e RANGEL, 2005; LAINSON, 2010). Ainda, incluiu *Leishmania (L.) forattinii*, encontrado no Brasil em gambá, *Didelphis aurita marsupialis*, e roedor, *Proechimys iheringi denigratus* (YOSHIDA et al, 1993).

A incidência da LV foi estimada entre 200.000 a 400.000 casos em todo o mundo, sendo potencialmente fatal com mais de 20.000 mortes por ano (WHO, 2012). Mais de 98 países e territórios são endêmicos para leishmaniose e a grande maioria dos casos de LV ocorre em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (DIAS et al., 2005; KEDZIERSHI e EVANS, 2014), afetando principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, sendo associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação, sistema imunológico fraco e

falta de recursos (WHO, 2012). *L. (L.) donovani* é considerada uma antroponose, predominante na Índia, Nepal e Bangladesh; enquanto que *L. (L.) infantum* é considerada zoonose, encontrada na região do Mar Mediterrâneo, Europa, África, China e Américas (MICHALIK e GENARO, 2005).

No Brasil, a LV acometia indivíduos com condições socioeconômicas reduzidas, residentes em áreas rurais ou semiáridas do nordeste, que contava com cerca de 90% dos casos notificados no País. Com o passar dos anos, os casos que se concentravam principalmente no nordeste passaram a ser notificados com mais frequência nas regiões norte, centro-oeste e sudeste, com expansão da doença em quase todo o território nacional, principalmente nos municípios com crescente urbanização e alto índice de pobreza (MARCONDES E ROSSI, 2013).

A LV tem sido apontada como doença re-emergente, caracterizando nítido processo de transição epidemiológica, com incidência crescente nos últimos anos e expansão geográfica para os estados mais ao sul do País, além de um franco processo de urbanização em cidades localizadas em regiões distintas, como o nordeste e o sudeste (MAIA-ELKHOURY et al, 2008). Enquanto em 1999, 92,9% dos casos de LV estavam concentrados na região nordeste e apenas 2,6% no sudeste, com a expansão territorial da doença em 2011 a distribuição de casos humanos passou a ser de 47,8% e 15% identificados, respectivamente, nas regiões nordeste e sudeste do Brasil (BRASIL, 2013).

O intenso processo migratório, as pressões econômicas ou sociais, a pobreza, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas provocam transformações ambientais e a expansão das áreas endêmicas para LV, com o surgimento de novos focos, levando a redução do espaço ecológico da doença que facilita a ocorrência de epidemias (ALVES et al., 2009). Cidades como: Boa Vista (GUERRA et al., 2004) Santarém e Teresina (COSTA et al., 1990); São Luiz (CALDAS et al., 2001; MENDES et al., 2002), Recife (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006), Fortaleza (REY et al., 2005), Natal (JERONIMO et al., 1994); Montes Claros (MONTEIRO et al., 2005), Belo Horizonte (ALVES e BEVILAQUA, 2004), Araçatuba (CAMARGO-NEVES et al., 2001), São Paulo (CAMARGO-NEVES et al., 2007), Barra de Guaratiba (CABRERA et al., 2003), Rio de Janeiro (MARZOCHI et al., 1985), Santa Maria (POCAI et AL., 1998), Campo Grande (OLIVEIRA et al., 2006) e Cuiabá (ALMEIDA et al., 2010) já vivenciaram ou vivenciam epidemias de LV humana e canina.

Crescem também, o número de casos de infecção concomitante por HIV (vírus da imunodeficiência humana) e *Leishmania*, fazendo com que a co-infecção entre HIV-*Leishmania* seja considerada como doença infecciosa emergente (MICHALIK e GENARO, 2005). As leishmanioses têm ganhado importância como infecção oportunista entre pacientes com infecção por HIV que vivem ou viveram em áreas consideradas endêmicas para essas parasitoses. Mudanças epidemiológicas expressivas vêm ocorrendo nos últimos anos na área onde uma estreita relação entre a LV e AIDS tem sido relatada (ALVAR et al, 2008; JARVIS e LOCKWOOD, 2013). Mudança no padrão de transmissão da LV proveniente da zona rural para as cidades, associada à interiorização da AIDS, levou à co-infecção de *L. (L.) chagasi/HIV* no Brasil (MAIA-ELKHOURY et al, 2008). Ocorrendo, também, o aumento do número de casos na faixa etária de 20 a 49 anos e a letalidade de aproximadamente 23% em maiores de 50 anos, tendo maior exposição da população às duas infecções (WHO, 2012). A infecção por *Leishmania* e por HIV podem potencializar os efeitos uma das outras (JARVIS e LOCKWOOD, 2013); já que o HIV suprime a atividade antiparasitária da resposta imune modulada por Th1, enquanto a presença do parasito pode acelerar a replicação viral (FALEIRO et al., 2014).

Com relação a sua biologia, o parasito apresenta duas formas principais: amastigota e promastigota. A forma promastigota possui dimensão de 16 a 40µm de comprimento por 1,5 a 3µm de largura, sendo caracterizada por um corpo alongado, com extremidades afiladas, presença de flagelo, núcleo e cinetoplasto; esta forma encontra-se no intestino do hospedeiro invertebrado (intermediário). A forma amastigota mede de 3 a 5,5µm de comprimento por 1,5 a 3µm de largura, sendo encontrada nas células do hospedeiro vertebrado (definitivo), com aspecto oval ou esférico, presença de núcleo e cinetoplasto, ausência de flagelo (FORTES, 2004; REY, 2008).

As *Leishmania spp.* têm um ciclo de vida complexo (ALVAREZ-RUEDA et al., 2009). Durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, o febotomíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas que se multiplicam e diferenciam-se no tubo digestório do vetor (BANETH, 2006). No interior do intestino médio, rapidamente ocorre ruptura das células liberando as formas amastigotas que, após divisão binária, se transformam em promastigotas arredondadas e de flagelo curto que se dividem intensamente ou em formas alongadas de flagelo longo, que se multiplicam lentamente (REY, 2008). Quando a matriz peritrófica se rompe, as formas promastigotas migram para o intestino anterior onde são encontradas as formas paramastigotas em

reprodução intensa; promastigotas longas com flagelos longos, multiplicando-se lentamente; e promastigotas curtas de flagelo longo, ágeis na movimentação e que nunca foram vistas em processo de multiplicação, sendo denominadas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (MICHALICK e GENARO, 2005). O ciclo biológico completa-se com a picada do flebotomo infectado e subsequente inoculação de formas promastigotas metacíclicas do parasita na corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado (BANETH, 2006), onde são fagocitadas por macrófagos e internalizadas por outras células, nas quais as formas promastigotas metacíclicas vão se diferenciar em formas amastigotas (REAL et al., 2010).

A transmissão da LV ocorre, principalmente, pela ação hematófaga de insetos vetores pertencentes à subfamília Phlebotominae, particularmente a espécie *Lutzomyia longipalpis* (OLIVEIRA et al., 2012); todavia, tem sido relatada a transmissão de leishmaniose visceral em locais onde não há a presença do vetor biológico. Casos autóctones de LV foram relatados nos Estados Unidos da América e no Reino Unido, (SYMMERS; 1960; ASTE, 2002); transmissão por meio de agulhas contaminadas entre usuários de drogas (PINEDA et al., 2001; BURTON, 2001; CRUZ et al., 2002) e por transfusão de sangue também foram relatados (OWENS et al., 2001; REINE, 2004; FREITAS et al., 2006). A transmissão sexual e vertical foram considerados vias de infecção (DINIZ et al., 2005; ROSYPAL e LINDSEY, 2005; SILVA et al., 2009; TURCHETTI et al., 2014).

Inúmeras espécies de vertebrados podem ser infectadas por *Leishmania* spp., mas o cão é reconhecidamente o reservatório mais importante para a leishmaniose visceral americana (DINIZ et al., 2005; LABAT et al., 2010; KEDZIERSHI e EVANS, 2014). Em áreas silvestres, canídeos silvestres desempenham papel importante semelhante, além de outros animais já encontrados albergando *L. (L.) infantum*, como marsupiais e roedores em áreas rurais e peri-urbanas (SILVA, 2007; QUINTAL et al., 2011).

### 1.3 Modelo experimental

Camundongos não são muito susceptíveis a infecção por *Leishmania infantum* e a doença tende a auto-cura, tornando este um modelo menos adequado; a infecção no fígado é de auto-resolução, enquanto que a infecção no baço é progressiva e encontra-se em estado assintomático. Em contraste, a infecção por *Leishmania infantum* em hamsters

dourados (*Mesocricetus auratus*) está associada com doença sintomática e pode ser fatal (McCALL et al., 2013), sendo esta espécie altamente suscetível à infecção experimental.

Estudos foram realizados em hamster, iniciando-se por Stauber (1966), que descreveu a leishmaniose no hamster dourado e a semelhança com a doença humana em vários aspectos. Adler e Theodor (1931) realizaram o primeiro xenodiagnóstico em hamster, caracterizando a forma de transmissão da doença; Ott (1967) utilizou este modelo como uma ferramenta de diagnóstico para o estudo das leishmanioses, onde se injetava tecido humano ou animal possivelmente infectado em hamster para avaliar o curso de infecção, avaliando baço e fígado para detecção do parasito, sendo dependente da rota de inoculação. Farrel (1976) descreveu o hamster como um modelo experimental para estudos de imunidade adquirida, descrevendo padrões de resistência a leishmaniose visceral. Pearson et al. (1983) relataram como humanos e hamsters desenvolvem semelhantemente febre, hepato-esplenomegalia, hiperglobulinemia, anemia e perda de peso. Evans et al. (1990) determinaram fatores humorais em estado experimental de imunossupressão; Biswas et al. (1992) avaliaram os parâmetros hematológicos durante a anemia experimental; Requena et. al. (2000) associou parâmetros clínicos e imunológicos avaliando抗ígenos e imunocomplexos na infecção por *L. infantum*; Wyllie e Fairlamb (2006) sugeriram o refinamento de técnicas para propagação de *L. donovani* em hamster.

Apesar da gama de estudos realizados neste modelo, houve redução no uso de hamster devido a dificuldades de materiais espécie-específicos, restringindo seu uso para isolamento de novas estirpes e manutenção dos parasitos *in vivo*, para recuperação das formas amastigotas presentes nos tecidos. Entretanto, devido a modernizações de técnicas e kits que promovem reações cruzadas com outras espécies, como camundongos, por exemplo, este modelo pode ser utilizado novamente com mais segurança. Lafuse et al. (2013) relatam alterações na eritropoiese, usando desde técnicas tradicionais de parâmetro hematológicos a análise expressão gênica, mais apuradas e ainda uso de kits para camundongo na dosagem de ferro em modelo hamster.

Em termos reprodutivos, o hamster é um animal muito precoce e há casos em que se reproduziram com apenas um mês de idade, mas, geralmente, a puberdade ocorre aos 28 dias de idade e a maturidade sexual, aos 42 (PESSOA, 2007). O hamster é o mamífero que possui os maiores testículos com relação ao peso corporal (BRACKETT, 2012), com ciclo espermatogênico de 09 dias (SILVERTHORN, 2010).

## **1.4 Aspectos do aparelho reprodutor masculino**

O testículo é um órgão altamente especializado que possui duas funções principais: a geração de gametas masculinos e a produção e liberação controlada de esteróides sexuais (KAUR et al., 2013). Morfologicamente, consiste em dois grandes compartimentos: os túbulos seminíferos (sítio da espermatogênese), onde as células de Sertoli suportam as células germinativas estruturalmente, nutricionalmente e com fatores de crescimento. São rodeadas por camadas de células mióides peritubulares e o interstício (local da esteroidogênese), que cerca os túbulos seminíferos e contém as células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, leucócitos e fibroblastos (HEDGER e MEINHARDT, 2003; KAUR et al., 2013).

A espermatogênese é um processo no qual as células germinativas entram em divisão, diferenciação e meiose para dar origem a espermárides haplóides (O'DONNEL et al., 2001; HEDGER e MEINHARDT, 2003). As espermatogônias indiferenciadas presentes nos túbulos seminíferos são as células germinativas, que se dividem por mitose assegurando a produção de um grande número destas células. A meiose é a segunda etapa da espermatogênese, na qual reduz o número de cromossomos da célula germinal para estado haplóide, formando os espermatócitos primários, secundários e as espermárides. Posteriormente, ocorre a espermogênese, onde espermárides arredondadas sofrem alterações morfológicas significativas, tornando-se espermatozoides com núcleo alongado (HEDGER e MEINHARDT, 2003; BRACKETT, 2012).

Há a liberação gradual dos espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos (espermiação), com auxílio das células peritubulares mesenquimais ou mióides, que contêm elementos contráteis gerando ondas peristálticas ao longo dos túbulos para transportar os espermatozoides imóveis dos testículos para a *rete testis* e epidídimos (HEDGER e MEINHARDT, 2003). Ao atingirem o epidídimos, os espermatozoides se alojam e maturam, em sua grande maioria na cauda do epidídimos (O'DONNEL et al., 2001; SILVERTHORN, 2010). O epidídimos é um tubo único revestido internamente por epitélio pseudo-estratificado, composto por células basais e prismáticas que se apoiam sobre a lámina basal envolto por tecido conjuntivo frioso e de fibras musculares lisas; que ao contraírem-se auxiliam na movimentação dos espermatozoides (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999).

Durante a primeira divisão meiótica da espermatogênese, as células se movem para regiões mais profundas do túbulo seminífero e as junções impermeáveis das células de

Sertoli se formam abaixo dos espermatócitos e se degeneram acima deles, permitindo, portanto, efetivamente que as células transponham a barreira hemato-testicular (BRACKETT, 2012).

As células de Sertoli adjacentes de um túbulo seminífero são unidasumas às outras por junções de oclusão que formam uma barreira adicional entre o lúmen do túbulo e o líquido intersticial que está fora do túbulo. Estas junções de oclusão restringem a transferência de moléculas entre os três compartimentos: o lúmen do túbulo, um compartimento basal na superfície basolateral das células de sertoli e líquido intersticial. Por causa das barreiras entre estes compartimentos, o líquido luminal tem uma composição diferente do espaço intersticial (SILVERTHORN, 2010) reconhecidamente imuno-privilegiado, que protegem as células germinativas de ataques auto-imunes (FIJAK e MEINHARDT, 2006).

Tecidos imunologicamente privilegiados são tecidos cujas respostas imunes locais ocorrem contra抗ígenos endógenos (por exemplo, fetais e gametogênicas) ou exógenos (por exemplo, enxerto e tumorais) sendo ativamente reprimidas. Por conseguinte, o termo "privilegio imunitário" deve ser utilizado para denotar a sobrevivência prolongada das células que expressam抗ígenos que, sob circunstâncias normais, deve provocar uma resposta imune, assim como os mecanismos que contribuem para esta sobrevivência (MEINHARDT e HEDGER 2011).

O testículo, apesar do seu estado imune privilegiado, não é isolado do sistema imunitário; além dos macrófagos residentes, mastócitos são encontrados adjacentes aos vasos sanguíneos subcapsulares. Como na maioria dos outros tecidos, células circulantes do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, também têm acesso relativamente livre para o testículo, e o testículo tem uma drenagem linfática eficiente e eficaz para os linfonodos regionais. Portanto, as citocinas produzidas localmente, bem como aquelas em circulação geral têm o potencial para exercer efeitos no testículo (HEDGER e MEINHARDT, 2003).

Parece que os fatores imunes podem desempenhar um papel direto durante a esteroidogénese testicular e gametogênese, podendo ter uma relação com a infertilidade masculina, sendo que estes fatores implicam nos produtos de leucócitos, macrófagos e mastócitos (MEINHARDT e HEDGER 2011). Citocinas, tais como IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , interleucinas, fator de inibição de leucemia (LIF), fator de células estaminais (SCF), fator

de inibição de migração de macrófagos (MIF), que se ligam a receptores de superfície de células e provocam a proliferação e diferenciação celular (WEINBAUER et al., 2010).

Hedger e Meinhardt (2003) destacam a complexidade das redes de regulação de citocinas no interior do testículo e a sobreposição com as citocinas produzidas por células do sistema imunológico, bem como células somáticas durante as respostas imunitárias e inflamatórias, sendo elas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, TNF $\alpha$ , TGF, IFN $\gamma$  e MIF. A IL-1 e IL-6 produzidas pelas células de Sertoli podem potencialmente agir como fator fisiológico parácrino dos linfócitos e outras células testiculares. Estas citocinas podem também ser necessárias para regular função de linfócitos locais importantes para a proteção imunológica do tecido. Outros produtos leucocitários, como IL-1, IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  regulam (induzir/inibição) a esteroidogénesis das células de Leydig e a secreção de transferrina, responsável pelo transporte de ferro para o meio intratubular, pelas células de Sertoli (HULEIHEL e LUNENFELD, 2004). TNF $\alpha$  e LIF são suspeitos de desempenhar um papel na interação células-germinativas com as células de Sertoli e no controle autócrino da proliferação de células de Sertoli (WEINBAUER et al., 2010).

A resposta imune específica para o antígeno presumivelmente existe para evitar reações auto-imunes no testículo, particularmente àquelas associadas com a espermatogênese, um processo altamente complexo de diferenciação celular, que começa posteriormente ao estabelecimento dos mecanismos normais de tolerância imunológica (MEINHARDT e HEDGER 2011).

## **1.5 Relação Parasito-hospedeiro**

A infecção por *Leishmania infantum* induz respostas imunes tanto do tipo celular (hipersensibilidade retardada) quanto do tipo humorais (produção de anticorpos); mas o grau com que ocorrem estas respostas varia com as diversas formas da doença (REY, 2008). Os aspectos relacionados com a imunidade humana não são claramente definidos e estudos realizados em modelos murinos (*in vivo*) e em culturas de células (*in vitro*) possibilitaram demonstrar alguns mecanismos para evasão e sobrevivência do parasito em seus hospedeiros vertebrados. A infecção por *Leishmania* depende de mecanismos imunes regulatórios, como a capacidade das células de se prevenir contra apoptose, estimular o complexo maior de histocompatibilidade (MHCII), modulando a expressão de citocinas do próprio macrófago e sua ação sobre os linfócitos T. A estimulação da produção de fator de

formação de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) parece ser um dos mecanismos de controle de apoptose (MICHALICK e GENARO, 2005).

Como a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório, macrófagos são indispensáveis para sobrevivência, replicação e diferenciação parasitária sendo capaz de evadir a resposta imune inata do hospedeiro, havendo crescente número de parasitos durante as primeiras semanas de infecção (KANE e MOSSER, 2001). Após infecção inicial, neutrófilos e macrófagos são recrutados para o sítio de infecção e sua interação com o parasito influencia diretamente no desfecho da doença (LIU e UZONNA, 2012).

Estudos sugerem que mais neutrófilos são recrutados no sítio de infecção e estas células são eficientes no controle da infecção, mas como neutrófilos são fagócitos de vida curta, estes atuam como células hospedeiras intermediárias, sendo utilizados como “Cavalo de Tróia” pelos parasitos, a fim de silenciar a entrada nos macrófagos evitando uma intensa ativação celular (MALAFAIA e REZENDE, 2009; LIU e UZONNA, 2012). De fato, interação de neutrófilos leva a um atraso no programa de morte programada seguidos de aumento dos níveis de MIP-1 $\beta$ , atraindo macrófagos ao sítio de infecção. Uma vez recrutados, realizam fagocitose de parasitas livres e de PMN infectados/apoptóticos, e se tornam a célula hospedeira definitiva para replicação parasitária e célula efetora da resposta celular para o controle parasitário (LIU e UZONNA, 2012).

Na modulação da resposta imune, estudos realizados em murinos demonstraram que macrófagos parasitados e outras células apresentadoras de抗ígenos (APCs) apresentam抗ígenos de *Leishmania* aos linfócitos TCD4 $^{+}$ . Estes linfócitos são estimulados a produzir interleucinas e dependendo do perfil estimulado, ocorre o desenvolvimento de duas subpopulações de linfócitos T auxiliares (Th). Th do tipo 1 (Th1) secretam grandes quantidades de IFN $\gamma$  juntamente a produção de citocinas pro-inflamatórias, enquanto que Th do tipo 2 (Th2) produz grande quantidade de IL-4 e de citocinas promotoras de anticorpos, produzidas por linfócitos B. Ainda, resposta do tipo Th1 está associada a capacidade de controlar a infecção e a resposta do tipo Th2 mais relacionada com o processo progressivo da doença (MOUGNEAU et al., 2011; SAPORITO et al., 2013; FALEIRO et al., 2014).

Não se espera na infecção ativa a ausência de resposta pro-inflamatória, mas sim a associação de citocinas tanto de Th1 como também Th2; assim, o paradigma Th1/Th2 não possui uma determinação clara no perfil de resistência/susceptibilidade de *Leishmania* na infecção humana ou de modelos experimentais de LV (KEDZIERSKI e EVANS, 2014).

Quando os modelos experimentais adotados representarem a heterogeneidade genética da população humana, serão observadas respostas imunes mais complexas, mostrando que os vários padrões de resposta imunitária podem ser associados com a mesma resposta clínica; na doença humana, um quadro misto de citocinas Th1 e Th2 é frequentemente observado (SAPORITO et al., 2013).

Resposta mista de Th1 e Th2 é relatada em antígenos estimulados PBMC de cães assintomáticos que desenvolvem resposta com IL-2, IFN $\gamma$  e IL-10; entretanto, IL-2 e IFN $\gamma$  predominam em cães assintomáticos e o desenvolvimento dos sintomas não pode ser associado ao aumento da expressão de IL-10 (BARBIERI, 2006). LV está associada com o aumento da produção de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, pacientes têm níveis elevados níveis de proteína no plasma de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ; sugerindo que os desfechos clínicos desfavoráveis não estão relacionados com Th2, mas de outros mecanismos que contribuem para patogênese desta enfermidade (FALEIRO et al., 2014).

Sabidamente, IL-4 é uma citocina de perfil anti-inflamatório e regulatório, e estudos realizados por McFarlane et al. (2011), comparando receptores de IL-4 em animais nocautes e selvagens, indicaram que IL-13, cujo receptor é compartilhado com IL-4, gera resposta protetora durante infecção por LV, apesar de IL-13 ser mediador aparente de resposta Th2. O aumento de IL-10 em sinergismo com IL-4 parece ser fundamental na progressão da doença, já que ambas são capazes de inibir: a ativação de macrófagos por IFN $\gamma$  produzidos pelas células T CD4 $^{+}$ ; a transcrição do TNF $\alpha$  e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MICHALICK e GENARO, 2005). Poucos estudos têm demonstrado o envolvimento de células de linfócitos T CD8 $^{+}$  na resistência à LV, estes linfócitos são detectados somente em animais assintomáticos, sugerindo lise direta de *L. (L.) infantum* em macrófagos infectados por linfócitos T citotóxicos representam um mecanismo efetor adicional na resistência em cães (BARBIERI et al., 2006). Células T CD8 $^{+}$  participam da resposta imune específica para *Leishmania* através de INF $\gamma$  promovendo atividade citotóxica em macrófagos infectados (SAPORITO et al., 2013).

Ainda, grandes quantidades de IL-4 associados à resposta do tipo Th2 atuam como marcadores da resposta humoral com produção de grande quantidade de anticorpos produzidos por linfócitos B, sendo a LV caracterizada pela grande produção de anticorpos, principalmente IgG; entretanto como a ativação é policlonal, a maioria das imunoglobulinas é inespecífica (MELO et al., 2004). A possível explicação para essas

observações talvez seja que a IgG, que opsoniza parasitos, é mais eficiente na indução da produção da citocina IL-10 por macrófagos estando relacionada à exacerbação da infecção (CORREA, 2011). Tanto em animais experimentalmente infectados como humanos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, a presença de anticorpos de imunocomplexos formados por IgG não confere proteção contra o patógeno, podendo a *Leishmania* ser opsonizada por IgG, o que permite maior facilidade na internalização do parasita, contribuindo para a progressão da doença, com prejuízo ao hospedeiro (MILES et al., 2005).

A marcada hipergamaglobulinemia (elevação da fração IgG) e a ausência de imunidade celular são uma das principais características da infecção por *Leishmania* devido a ativação policlonal dos linfócitos B; sendo descritas em humanos, hamsters e cães (MARCONDES et al., 2006; CORREA, 2011). Acredita-se que essa ativação seja parcialmente responsável por imunocomplexos circulantes e vários fenômenos auto-imunes (CORREA 2011). A hiperglobulinemia é deletéria e não protetora, uma vez que a eliminação da infecção ocorre por ativação da imunidade celular e não humoral. Esse aumento no nível de globulinas séricas ocorre por uma indução de linfócitos T auxiliar do tipo 2 (Th2), com consequente proliferação de linfócitos B e produção exacerbada de anticorpos. Um perigo potencial da regulação de linfócitos T prejudicada e da atividade exuberante de linfócitos B é a geração de uma grande quantidade de imunocomplexos circulantes, causando danos em vários órgãos (MARCONDES et al., 2006). Testes sorológicos têm sido empregados, com considerável importância, no diagnóstico e em inquéritos epidemiológicos dessas enfermidades; além disso, a análise de anticorpos anti-*Leishmania* permite avaliar o curso evolutivo da infecção (SOUZA et al., 2005).

A gravidade das manifestações clínicas depende intrinsecamente do tipo de resposta imunológica expressada pelo indivíduo infectado e conforme a capacidade do indivíduo ou animal montar uma defesa imunológica efetiva a qual está relacionada a fatores ambientais, nutricionais, genéticos e ligados ao próprio parasita, induzindo preferencialmente Th1 ou Th2, a LV poderá expressar-se sobre amplo espectro, sob formas assintomáticas, oligossintomáticas ou sintomáticas (REY, 2008).

A infecção apresenta manifestações clínicas variáveis que vão desde infecções sub-clínica inaparente até uma doença sistêmica, caracterizada por febre, esplenomegalia, linfadenopatia, anemia, pancitopenia, perda de peso, fraqueza, perda de massa muscular, leucopenia, hipergamaglobulinemia policlonal e; na fase crônica, a doença pode causar

lesões genitais em machos e fêmeas (SILVA, et al., 2008; ASSIS, 2010). Surpreendentemente, LV provoca alterações importantes do sistema genital (MCFARLANE, 2011; ASSIS et al, 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Gonzales et al. (1983) observou o depósito de substância amilóide na degeneração testicular e a presença de formas amastigotas teriam relação direta com atrofia testicular, degeneração de células da espermatogênese com graduais alterações inflamatórias e degenerativas, levando a uma completa azoospermia em *hamsters* experimentalmente infectados. Riera e Valladares (1996) isolaram *L. infantum* do sêmen e urina de cães experimentalmente infectados. Cães machos naturalmente infectados, podem desenvolver lesões genitais associadas com a presença de formas amastigotas, principalmente no epidídimo, prepúcio e glande (DINIZ et al., 2005), causando orquite e prostatite (MANNA et al., 2012; MIR et al., 2012), além de lesões específicas nos testículos (AMARA et al., 2009), causando aumento dos defeitos maiores e menores nos espermatozoides dos animais acometidos pelo estágio moderado a severo da doença e em estágios mais avançados da enfermidade, a integridade das membranas acrossomal e plasmática foi afetada negativamente (LABAT et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **Geral**

Caracterizar aspectos histopatológicos, parasitológicos e imunológicos do aparelho reprodutor de hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* e implicação na transmissão sexual da leishmaniose visceral.

### **Específicos**

1. Avaliar as alterações histopatológicas em diferentes compartimentos do aparelho reprodutor masculino em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*;
2. Analisar a carga parasitária no testículo, cabeça e cauda do epidídimos masculino em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*;
3. Caracterizar a cinética de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-4 no testículo e epidídimos em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*;
4. Verificar a ocorrência de transmissão sexual da leishmaniose visceral na infecção experimental de hamsters machos por *L. (L.) infantum*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Aspectos éticos**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) pesando entre 90 e 120g foram obtidos no biotério ANILAB, na Cidade de Paulínia- SP, totalizando 55 animais para manutenção de parasitos e infecção experimental. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba processo CEEA 016004/2014 (ANEXO 01), local onde os animais foram mantidos e realizados os procedimentos *in vivo* de anestesia e coleta de material biológico.

#### **3.2 Manutenção e recuperação de formas amastigotas de *L. (L.) infantum***

A cepa utilizada *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foi caracterizada pelo Dr. J. J. Shaw (Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil) e gentilmente cedida pela Dra. Clara Lucia Barbieri (UNIFESP). Dez hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos de 06 semanas de idade foram infectados com  $1 \times 10^8$  amastigotas por animal, IP, para manutenção dos parasitos *in vivo*. Estes animais foram mantidos em sala isolada no biotério da Universidade de Uberaba, sendo cinco animais por caixa (17x35x40cm), com água e ração *ad libitum*. Após seis semanas de infecção, hamsters foram eutanasiados e as formas amastigotas foram recuperadas. O baço foi removido, macerado em 4mL de PBS 1X e centrifugado duas vezes para remoção de tecido: 20 g por 10 min., 90 g por 5 min., com sobrenadante recuperado em ambas centrifugações. Posteriormente, foi centrifugado a 1400 g por 5 min. para precipitação do parasito, excluindo o sobrenadante. Parasitos foram diluídos na proporção 1:50 e contados em câmara de Neubauer para infecção de novos animais. Protocolo detalhado no ANEXO 02.

#### **3.3 Infecção experimental em hamster dourado por *L. (L.) infantum***

Hamsters machos (N = 45) com 42 dias de idade, maduros sexualmente (PESSOA et al., 2007), foram divididos em seis grupos (Tabela 1), contendo 07 animais por grupo, exceto no grupo controle com 10 indivíduos. Para cada grupo infectado, eram sacrificados 02 animais controle. Estes foram infectados com  $1 \times 10^6$  amastigotas de *L. (L.) infantum* por animal, IP e acompanhados ao longo de 7, 10, 13, 16 e 19 semanas de infecção. Três ou quatro hamsters machos foram alojados por caixa, com água e ração *ad libitum*, com controle de temperatura a 25°C, uso de telas nas gaiolas e nas janelas da sala e, por fim, inseticida piretróide com citronela, afim de evitar aproximação de insetos aos animais.

Tabela 1. Grupos experimentais: número de hamsters infectados com amastigotas de *L. (L.). infantum* por animal durante as semanas de infecção.

<b>Grupos</b>	<b>N de animais</b>	<b>N de amastigotas/animal</b>	<b>Semanas de infecção</b>
1	7	1 x 10 <sup>6</sup>	07
2	7	1 x 10 <sup>6</sup>	10
3	7	1 x 10 <sup>6</sup>	13
4	7	1 x 10 <sup>6</sup>	16
5	7	1 x 10 <sup>6</sup>	19
6	10	--	Não infectado

### 3.4 Coleta de amostras e análise macroscópica

Hamsters foram anestesiados com ketamina e xilazina, na dosagem de 100 e 10 mg/kg IM, respectivamente (PESSOA, 2007), permitindo o manuseio para coleta de sangue. Amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca (seringa de 5ml e agulha 25x7) e o sangue foi adicionado em tubo com anticoagulante EDTA e outra alíquota sem anticoagulante foi centrifugada (800 g por 10 min.) para recuperar soro. Baço, fígado, testículos e epidídimo foram removidos e examinados macroscopicamente verificando a integridade do tecido, cor e tamanho, com imagens adquiridas (Nikon Câmara) para posterior análise de medição de área com o programa Image J (Image J Software), comparando os animais infectados e o grupo controle. Fígado e baço foram seccionados e congelados a -80°C para posterior extração de DNA, para confirmação da infecção experimental por PCR. Para análises de testículos e epidídimos, o lado direito foi fixado em formaldeído para análise histológica e o esquerdo foi dividido em duas partes, sendo submetido ao congelamento (-80°C) para extração de DNA e em solução de inibidor de protease (Complete) para posterior dosagem de citocinas.

### 3.5 Aspectos laboratoriais

As amostras de sangue foram divididas em duas frações: uma em tubos estéreis contendo 0,1 mL de solução a 10 % de EDTA (tripotassic EDTA) para a realização dos hemogramas e outra em tubos a vácuo sem anticoagulante para realização das provas bioquímicas. O sangue dos tubos sem anticoagulante foi centrifugado a 720g por 10 min. para a obtenção do soro sanguíneo que foram acondicionados em microtubos e conservados sob congelamento (-20°C), por um período não superior a 48 horas, até o momento das análises bioquímicas. O hemograma, completo foi realizado em analisador automático de hematologia para uso veterinário (pocH – 100iVDiff®), previamente aferido com sangue controle. A contagem diferencial ou específica de leucócitos foi realizada em

lâminas com esfregaços sanguíneos corados pelo método de May-Grunwald-Giemsa (FERREIRA NETO et al., 1982). Foram determinadas em cada amostra de soro as concentrações de proteínas totais (método Biureto), albumina (método verde de bromocresol), alanina aminotransferase (método cinético UV IFCC), fosfatase alcalina (método Cinético optimizado) e gama glutamiltransferase (método Szasz modificado) em analisador automático Chemwell, previamente calibrado (Calibra H) e aferido com soro controle (Qualitrol), utilizando kits comerciais Labtest Diagnóstica. Os parâmetros hematológicos e bioquímicos foram comparados com os valores de referência (PESSOA, 2007; MCKEON et al., 2011).

### **3.6 PCR convencional**

Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores 13A (5' - GGG GTG GAG TCT GGG CGT - 3') e 13B (5' - ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT - 3'), descritos por Rodgers et al. (1990) que resultam na amplificação de fragmento de 120 pares de base de cinetoplasto de *Leishmania* spp. (kDNA). A reação foi realizada em tubos de polipropileno de 0,2mL contendo 10mMTris-HCl, 200 µM de desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP), 1,5MgCl<sub>2</sub>, 10µM de cada primer, 1U Taq DNA polimerase e 2µL de DNA (aproximadamente 50-80 ng), com volume final de 25µL. As amostras foram amplificadas em aparelho termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com desnaturação inicial de 95°C por 5 min., 34 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 63°C por 45s para anelamento, 72°C por 30s para extensão e 72°C por 5 min. para extensão final. As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 2%.

### **3.7 Determinação da carga parasitária**

Para formar a curva padrão, foram realizadas diluições seriadas, de base 10, das formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* ( $10^6$ - $10^0$  parasitas/mL) mantidos em cultura, em um volume total de 100 µL. Em cada tubo desta diluição, foram adicionados 20 mg de tecido (testículo ou epidídimo) de um animal controle negativo.

A extração de DNA foi realizada com QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) para tecido, de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram amplificadas em termociclador Applied Biosystems usando placas Axygen Scientific, contendo 10 µM dos mesmos oligonucleotídeos iniciadores descritos por Rodgers et al. (1990), somados à

6,25 $\mu$ L domáster mix - Syber Green Rox Plus (Applied Biosystems) e 2 $\mu$ L de amostras de DNA (aproximadamente 50-80 ng), para um volume final de 12,5  $\mu$ L, em triplicata.

Os ciclos de temperatura foram de 95°C por 5 min. para desnaturação inicial, 40 ciclos de 95°C por 30s para desnaturação, 63°C por 45s para anelamento, 72°C por 30s para extensão e 72°C por 5 min. para extensão final. Após o alongamento final qPCR, as amostras foram submetidas à uma variação de temperatura de 50 a 95°C, com um aumento gradual de 0,5°C/s para determinação da temperatura de dissociação e possíveis produtos inespecíficos (QUINTAL et. al., 2011).

Foi realizado o gel de agarose para verificar se a concentração de DNA era decrescente, tanto no testículo, quanto no epidídimos e, posteriormente, estas mesmas amostras foram submetidas ao tempo real. A média e o desvio padrão dos valores de CT (*threshold cycle*) da curva padrão do testículo e epidídimos foram calculados, analisando a replicabilidade entre os ensaios, sendo determinados por uma diferença de aproximadamente três ciclos entre cada ponto da curva, com média de  $r^2$  de 0,99 e 0,97 e valor do grau de inclinação da curva (*slope*) de -3,3 e -3,1 para testículo e epidídimos, respectivamente. Foram calculados, também, a média e desvio padrão da temperatura de dissociação, determinando especificidade da reação (Tabela 2).

Tabela 2. Média e desvio padrão dos valores de *threshold cycle* (CT) da curva padrão de testículo e epidídimos, e temperatura de dissociação ou temperatura de *Melting* (TM).

Tecido	Curva padrão (valor de CT)					TM °C
	1.0e+005	1.0e+004	1.0e+003	1.0e+002	1.0e+001	
Testículo	18,2 ± 0,3	21,5 ± 0,2	24,5 ± 0,2	27,9 ± 0,2	30,1 ± 0,2	79,7 ± 0,3
Epidídimos	16,8 ± 0,5	20 ± 0,1	23,6 ± 0,7	26,8 ± 0,3	29,8 ± 0,2	79,8 ± 0,6

### 3.8 Análise histológica

Os testículos e epidídimos foram removidos da cavidade escrotal, fixados em formaldeído 4% e foi realizado corte transversal do testículo e posteriormente as amostras foram alojadas em *casssetes* em álcool 70%. As amostras foram incluídas com a parafina. Para as etapas de inclusão, seguiu a desidratação, retirando água dos tecidos e a sua substituição por álcool; diafanização, substituição do álcool, presente nos tecidos, por xanol e por fim impregnação, onde o xanol foi substituído por parafina fundida a 60°C e incluídos em pequenos blocos. Posteriormente, foi realizado a microtomia, na qual foram realizados cortes sucessivos de 5 micrômetros de espessura, que foram transferidos para um banho-

maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidos. Após a distensão, os cortes foram separados individualmente, utilizando lâminas de vidro previamente limpas, onde foram inseridos os cortes de tecido parafinizados, totalizando nove cortes aleatórios por amostra. As lâminas com os cortes foram transferidas para um suporte inclinado e finalmente, os cortes foram depositados em uma estufa a 60°C para secagem por 24 horas. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e vermelho congo, com posterior visualização em microscopia óptica (BEHMER, 1976).

Foram observadas lesões histológicas, como depósito de substâncias proteicas na membrana basal e no espaço intersticial; degeneração de células tubulares; infiltrado inflamatório; presença de *Leishmania* e alteração nas células de Leydig (GONZALEZ et al., 1983). Verificou-se, ainda, se a espermatogênese fora mantida, com a presença de espermatozoides.

### **3.9 Reação de imunofluorescência**

Após realização dos cortes histológicos em parafina, as lâminas foram submetidas a sucessivos tratamentos para inibir a auto-fluorescência do testículo e epidídimos fixados em formol. Iniciou-se o processo de remoção da parafina, com xanol e álcool; seguidos por tratamento com cloreto de amônio 50mM por 1 hora; bloqueio com ovo-albumina por 20 min. e posteriormente com leite desnatado em pó *overnight*. Procedeu-se a marcação de anticorpo primário anti-*Leishmania infantum* (soro proveniente de camundongo com 30 dias de infecção), na proporção de 1:100 diluídos em PGN-saponina *overnight*; e, por fim, marcação do anticorpo secundário anti-mouse Alexa flúor 488 em verde na proporção de 1:200 para marcação do parasita e TO-PRO-3 em vermelho (TO-PRO-3, Life Technologies, T3605) na proporção 1:500 diluídos em PGN-saponina para marcação de núcleo. Adicionou-se PPD, lamínulas e estas foram vedadas com esmalte. O protocolo completo está descrito no ANEXO 03.

### **3.10 Dosagem de citocinas**

Testículo e epidídimos foram coletados, macerado se posteriormente armazenados a -80°C com solução de inibidor de protease na proporção 1:20 (Complete). INF $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-4 foram mensuradas por ELISA sanduíche, de acordo com as instruções do fabricante (OpTEIA, BD Bioscience). As concentrações de citocinas nas amostras de tecidos foram calculadas a partir da curva padrão, em triplicata. Limiar de detecção do

ELISA foi de 31,3 pg/mL (IFN $\gamma$ ), 15,6 pg/mL (TNF $\alpha$ ), 31,3 pg/mL (IL-1 $\beta$ ) e 7,8 pg/mL (IL-4). O coeficiente de variação foi inferior a 10%.

### **3.11 Avaliação da taxa de transmissão sexual**

Após determinar quando os machos poderiam disseminar o parasita pelo sêmen (momento em que os parasitas passaram pela cauda do epidídimos), 10 fêmeas não infectadas, previamente testadas negativamente por PCR em amostras de sangue, foram divididas em dois grupos: o grupo 01, fêmeas que foram acasaladas com machos negativos e grupo 2, fêmeas que foram acasaladas com machos de 13 semanas de infecção por *L.(L.) infantum*. Um casal foi mantido por caixa, com água e ração *ad libitum*, durante duas semanas a fim de acasalar e a cópula foi verificada com a presença de um tampão vaginal (dia 1 de gestação). As fêmeas foram sacrificadas após o desmame (período de cinco semanas) e útero, fígado e baço foram removidos para análise anátomo-histológica e extração de DNA para verificação da presença do parasito por qPCR, de acordo com os métodos previamente descritos.

### **3.12 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Pad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc). Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) dos sete animais por grupo (Não infectado, 7, 10, 13, 16, 19 semanas de infecção). O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso, comparando dados entre os grupos por ANOVA, seguida do teste de Tukey para análise de comparação múltipla. Foi realizado teste de correlação entre carga parasitária e dosagem de citocinas.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ , demonstrada em gráficos pelos asteriscos gerados pelo programa Graph Pad Prism, sendo extremamente alta (\*\*\*\*), alta (\*\*\*)\*, moderada (\*\*) e baixa (\*) significância.

O teste T não pareado foi utilizado para comparar dois grupos: fêmeas negativas que foram acasaladas com machos negativos (grupo 1) e fêmeas negativas que foram acasaladas com machos infectados por *L. (L.) infantum* (grupo 2). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise macroscópica do baço e confirmação da infecção experimental

Na 7<sup>a</sup> semana de infecção, foi observado aumento de volume do baço progressivo até a 16<sup>a</sup> semana de infecção, com coloração rubra, seguido por decréscimo da área do baço durante a 19<sup>a</sup> semana (Figura 1). Todas as amostras de DNA de baço e fígado foram positivas para kDNA de *Leishmania* spp., confirmando a infecção experimental por PCR.

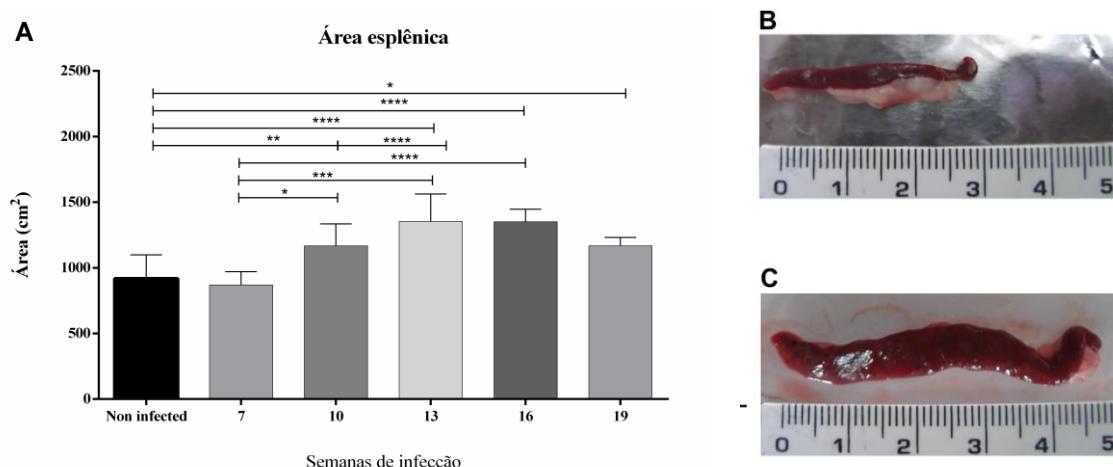


Figura 1. Confirmação da infecção experimental: área do baço mensurada pelo programa Image J (ANOVA  $p<0.05$ ) (A), imagem representativa de baço não infectado (B) e baço infectado (C). Eletroforese em gel de agarose a 2% da amostra de DNA de baço e fígado durante a 7<sup>a</sup> semana de infecção (D).

### 4.2 Aspectos laboratoriais

O hematócrito decresceu gradativamente ao longo da 16<sup>a</sup> a 19<sup>a</sup> semana ( $p<0,05$ ), quando comparadas ao grupo controle. Os valores de hemoglobina e consequentemente HCM estão abaixo dos valores de referência na 16<sup>a</sup> e 19<sup>a</sup> semana, caracterizando anemia absoluta do tipo normocítica normocrômica durante última semana de infecção. No leucograma, foi observada leucopenia ao longo de toda a infecção quando comparados ao controle ( $p<0,05$ ), entretanto, dentro dos valores de referência, apesar da imensa amplitude. Durante a 7<sup>a</sup> semana, além da leucopenia com discreta linfopenia (Tabela 3).

Com relação às enzimas hepáticas, valores de GGT estão aumentados na 16<sup>a</sup> e 19<sup>a</sup> semanas ( $p<0,05$ ); já TGP observou-se aumento na 10<sup>a</sup> semana com redução progressiva até a 19<sup>a</sup> semana; e PAL, cujos valores de referência possuem grande amplitude, com as amostras dentro do intervalo e sem alteração (Tabela 4).

Tabela 3. Valores hematológicos de referência para hamster (PESSOA, 2007), seguidos pela média e desvio padrão dos grupos controle e infectados ao longo do tempo.

PARÂMETROS	Valores de Referência	Semanas de infecção					
		Controle	7	10	13	16	19
Proteínas séricas	4,5 a 7,5	7 ± 0,6	8,3 ± 0,4	6,8 ± 0,6	8,5 ± 0,6	8,2 ± 0,3	8,7 ± 0,7
Eritrócito ( $10^6/\text{mm}^3$ )	5 a 10	9,9 ± 0,4	9 ± 0,4	9,2 ± 0,4	9,4 ± 0,4	9,4 ± 0,4	8,7 ± 0,3*
Hemoglobina (g/dL)	16,6 a 18,6	17,9 ± 1,5	17,4 ± 0,4	17,8 ± 0,4	16,4 ± 0,4*	15,6 ± 0,4*	14,1 ± 0,5*
Hematócrito (%)	45a50	50,7 ± 1,6	49,1 ± 2	48,5 ± 1,7	48,8 ± 1,7	45 ± 1,7	37,4 ± 0,8*
VCM (fL)	50 a 90	51 ± 0,0	55,2 ± 0,8	51,8 ± 0,8	52,5 ± 1,4	51,7 ± 1,7	52,7 ± 0,8
HCM (pg)	18,6 a 33,2	18 ± 0,8	20,5 ± 0,6	19,3 ± 0,6	17,5 ± 0,3*	16,6 ± 0,5*	16,2 ± 0,3*
CHCM (g/dL)	30 a 40	35,3 ± 1,8	37,1 ± 0,7	37,2 ± 0,9	33,2 ± 0,3	32,1 ± 0,7	30,7 ± 0,4
Leucócitos ( $10^6/\text{mm}^3$ )	3 a 11	7,8 ± 1,6	2,2 ± 0,7*	4,2 ± 0,7*	4,3 ± 0,4*	3,1 ± 0,9*	3,4 ± 0,3*
Mielócitos (%)	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Metamielócitos (%)	0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Neutrófilos (%)	10 a 42	15,5 ± 1	27,5 ± 1*	12 ± 1	13 ± 1	12,3 ± 1,9	18 ± 3,6
Eosinófilos (%)	0 a 4,5	2 ± 0,01	0 ± 0	1 ± 0,01	1 ± 0,01	1,5 ± 0,8	1 ± 0,7
Basófilos (%)	0 a 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Monócitos (%)	0 a 3	3 ± 0,1	4 ± 0,1*	2,2 ± 0,01	2,8 ± 0,1	2,6 ± 0,5	2,4 ± 0,5
Linfócitos (%)	56 a 80	76 ± 0,15	67,7 ± 0,1*	84 ± 0,1	81,8 ± 0,1	81,2 ± 3,7	81 ± 5,1
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	300 a 570	393,2 ± 57,5	630,6 ± 42,4	519 ± 35,3	486,4 ± 32,1	505,7 ± 39,7	713,7 ± 57,4

\*Análise estatística, p<0,05, quando comparadas com o controle.

Tabela 4. Contagem sérica de enzimas hepáticas de referência para hamster (PESSOA, 2007), seguidos pela média e desvio padrão dos grupos controle e infectados ao longo do tempo.

ENZIMAS HEPÁTICAS	Valores de Referência	Semanas de infecção					
		Controle	7	10	13	16	19
Gama Glutamil Transferase (U/L)	0 a 07	4,5 ± 2,6	9,4 ± 3,1	8,2 ± 4,9	7,1 ± 6,1	14 ± 2,8*	19 ± 2,9*
Transaminase Glutâmica Pirúvica (U/L)	21 a 50	47 ± 14	40 ± 15	116±16*	86 ± 6	59 ± 7	15,4 ± 7*
Fenilalanina Amonioliase (U/L)	08 a 187	68 ± 55	17 ± 8,4	91 ± 31	131 ± 43	135 ± 14	115 ± 16

\*Análise estatística (p<0,05), quando comparadas com o controle

A quantidade de proteínas séricas totais foi elevada quando comparado o grupo controle (referência 4,5 a 7,5 g/dL) aos demais grupos infectados ( $p<0,05$ ), exceto na 10<sup>a</sup> semana de infecção, que se manteve inalterada. A quantidade de albumina permaneceu em volumes normais (referência de 2,6 a 4,1), exceto no grupo de 13 semanas, que teve uma redução moderada ( $p<0,05$ ). Por outro lado, houve aumento no número de globulinas em todos os grupos infectados quando comparados ao grupo controle (referência de 2,7 a 4,2), exceto no grupo de 10 semanas (Figura 2), justificando o aumento das proteínas totais.

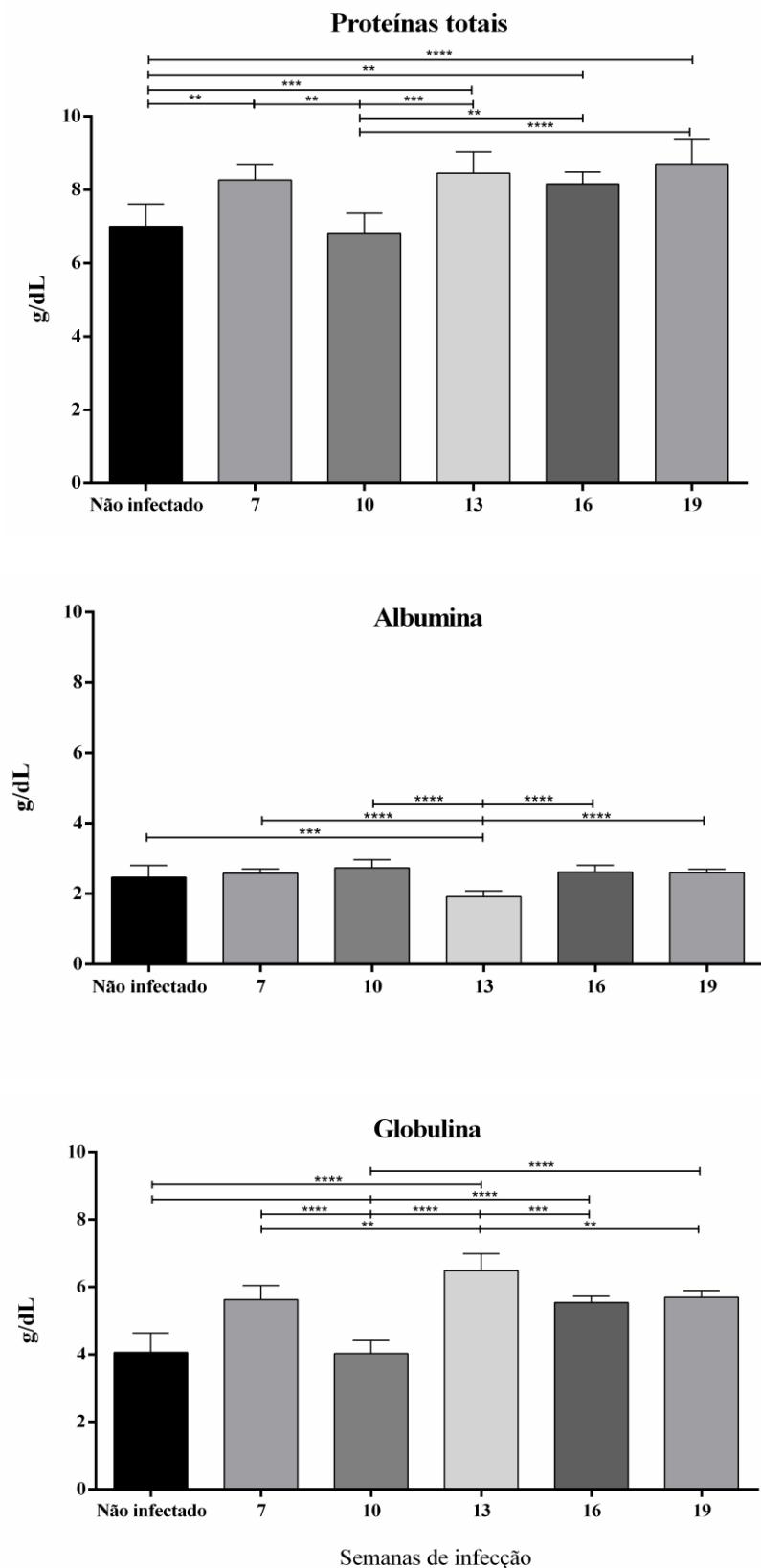


Figura 2. Concentração de proteínas séricas totais (A), albumina (B) e globulinas (C) em hamsters experimentalmente infectados por *L. infantum*, nas diferentes semanas de infecção.

#### 4.3 Análise anátomo-histológica testicular

Um animal de cada grupo infectado 10, 13 e 16 semanas de infecção demonstrou redução de volume testicular bilateral, totalizando 8,6% (03/35) de todos os animais infectados; enquanto que 91,4% (32/35) não foram observadas alterações macroscópicas evidentes. Após mensuração de área pelo programa Image J, no grupo de 07 semanas foi observada aumento de volume testicular ( $p<0,05$ ), não havendo diferença estatística entre o controle e os demais grupos infectados por *L. infantum* ao longo do tempo (Figura 3).

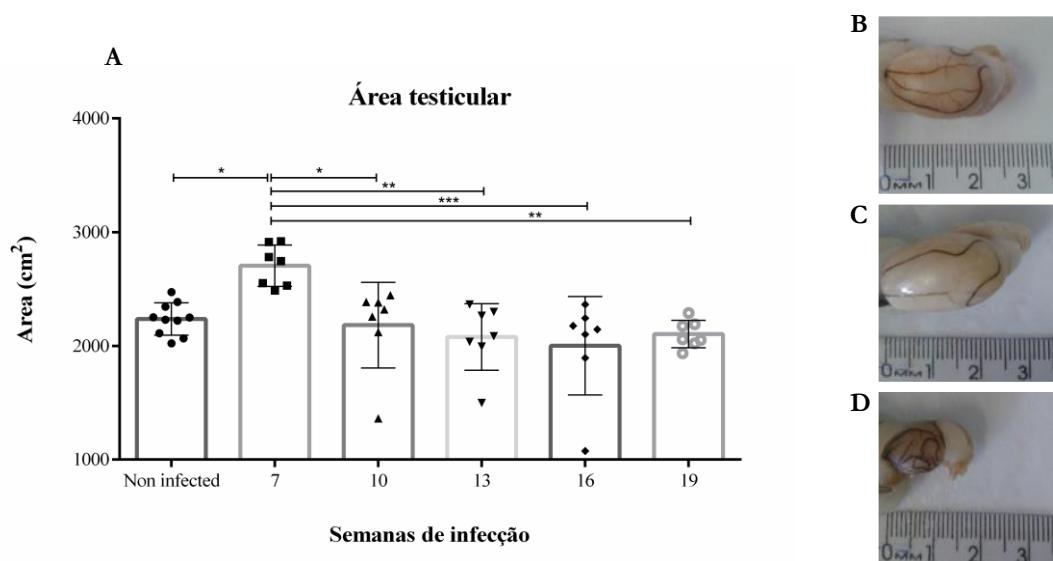


Figura 3. Análise macroscópica testicular ao longo das semanas de infecção por *L. infantum*: medição de área (A), onde cada ponto no gráfico corresponde a um animal ( $p<0,05$ ); imagem representativa de testículo não infectado (B); testículo com aumento de volume durante a 7<sup>a</sup> semana de infecção (C) e testículo com redução de volume (D).

Em análises histológicas (Figura 4), não foram verificadas diferenças microscópicas no tecido avaliado comparando-se todas as semanas de infecção; os grupos avaliados ao longo do tempo se comportaram semelhantemente ao controle, com função de espermatogênese preservada, apesar da presença do parasito.

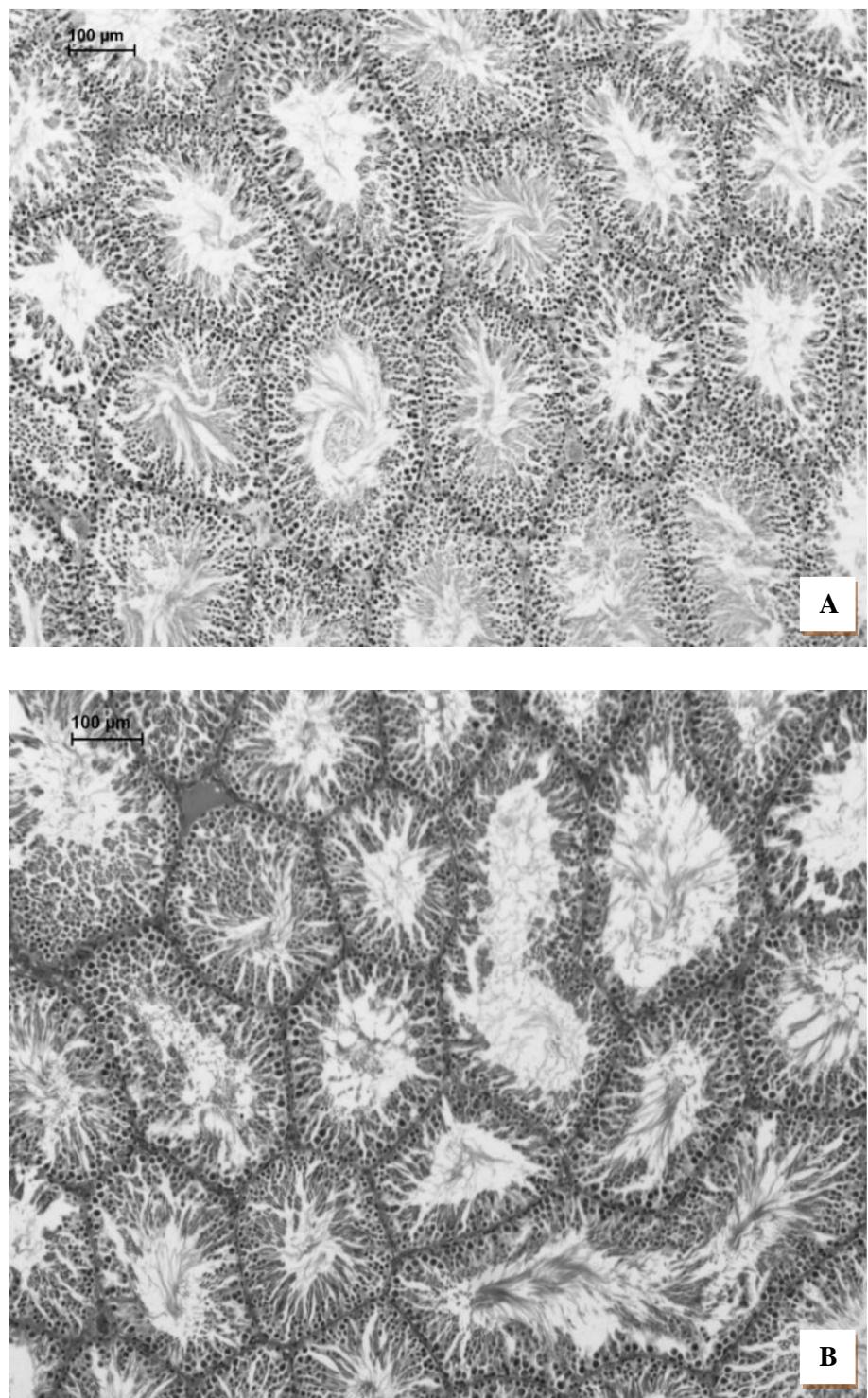


Figura 4. Imagem representativa de testículo em microscopia óptica corados com HE. Testículo não infectado (A) e testículo durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção *L. infantum* com redução do volume testicular (B).

No epidídimo, foi observada a presença sugestiva do parasito tanto nas células prismáticas quanto no lúmen do ducto epididimário, juntamente com os espermatozoides (Figura 5A). Durante a 13<sup>a</sup> semana, visualizou-se a presença de plasmócitos, células germinativas adjacentes e um grande volume de grânulos lúmen em alguns ductos (Figura 5B). Estes grânulos possuem tamanho compatível com as formas amastigotas de *L. infantum*; bem como com corpos residuais, artefatos ou corte transversal da cauda dos espermatozoides. Não foram observadas alterações patológicas evidentes.

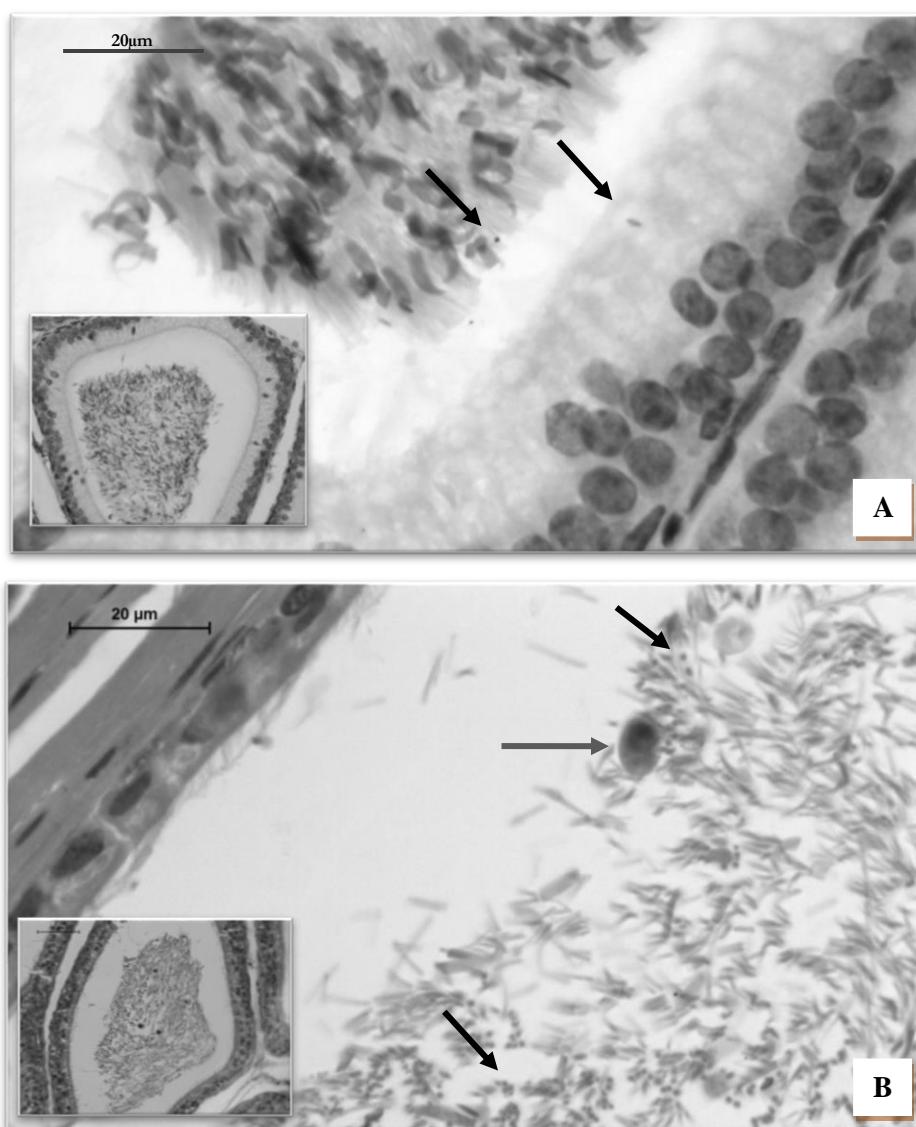


Figura 5. Epidídimo durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção em microscopia óptica corados com HE. As setas pretas demonstram a presença sugestiva de *L. infantum* no lúmen do ducto epididimário e na célula prismática da cabeça do epidídimo (A). As setas pretas demonstram os grânulos no lúmen do ducto epididimário, e a seta cinza a presença de plasmócitos.

#### 4.4 Reação de imunofluorescência

Para aumentar a especificidade e confirmar a presença do parasito no testículo e epidídimos, utilizou-se imunofluorescência. Foi observado o parasito entre as células germinativas testiculares e no lúmen dos túbulos seminíferos. Tem-se exemplo da arquitetura testicular e presença do parasito (Figura 6) e contraste de fase demonstrando o núcleo e o cinetoplasto do parasito (Figura 7).

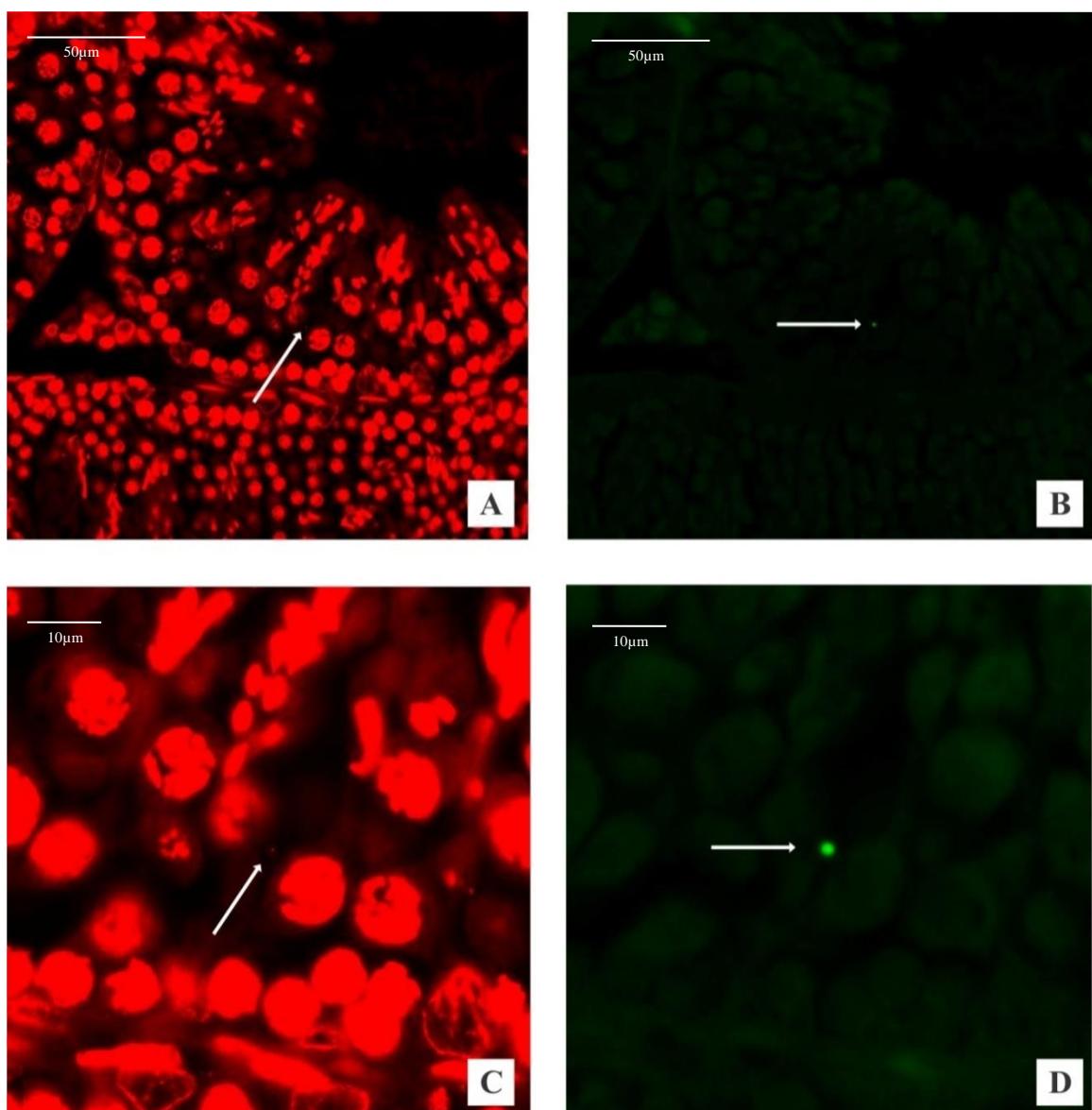


Figura 6. Imagem representativa da arquitetura testicular por imunofluorescência em microscopia confocal. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* dentro do túculo seminífero testicular, com núcleo marcado em vermelho (A e C) e parasito em verde (B e D).

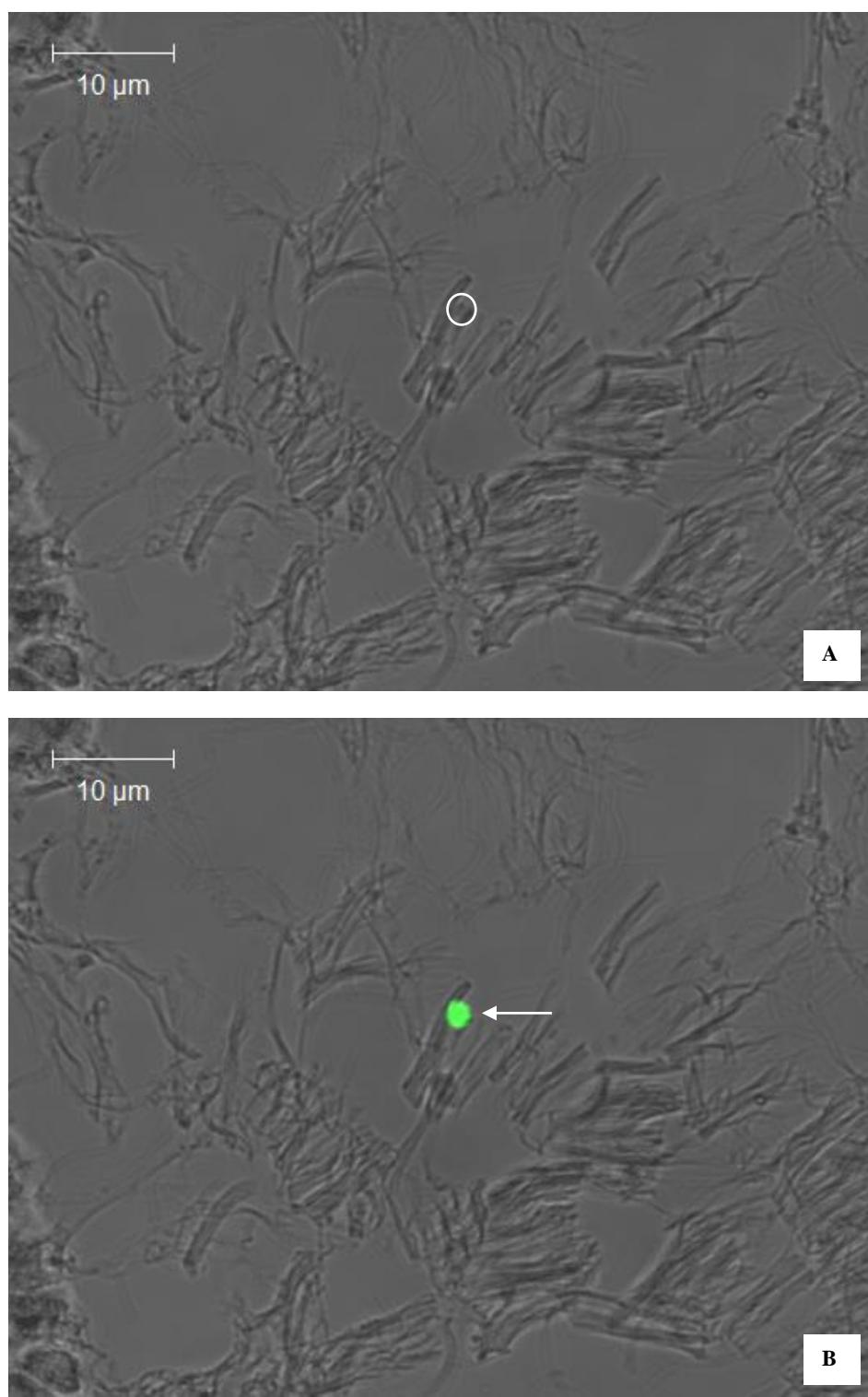


Figura 7. Lúmen do túbulo seminífero testicular em contraste de fase por microscopia confocal. O círculo branco determina a posição do núcleo e o cinetoplasto de *L. infantum* (A) e a seta branca demonstra a forma amastigota de *L. infantum* em verde, juntamente com os espermatozoides (B).

No epidídimo, semelhantemente à coloração HE, foram observados parasitos nas células prismáticas e no lúmen do ducto epididimário juntamente com os espermatozoides (Figura 8), havendo maior dificuldade de observar a marcação do núcleo do parasito em função da grande quantidade de núcleos de espermatozoides (Figura 9). Torna-se claro que o parasito atinge o lúmen do ducto epididimário e que possivelmente seja eliminado juntamente com os espermatozoides.

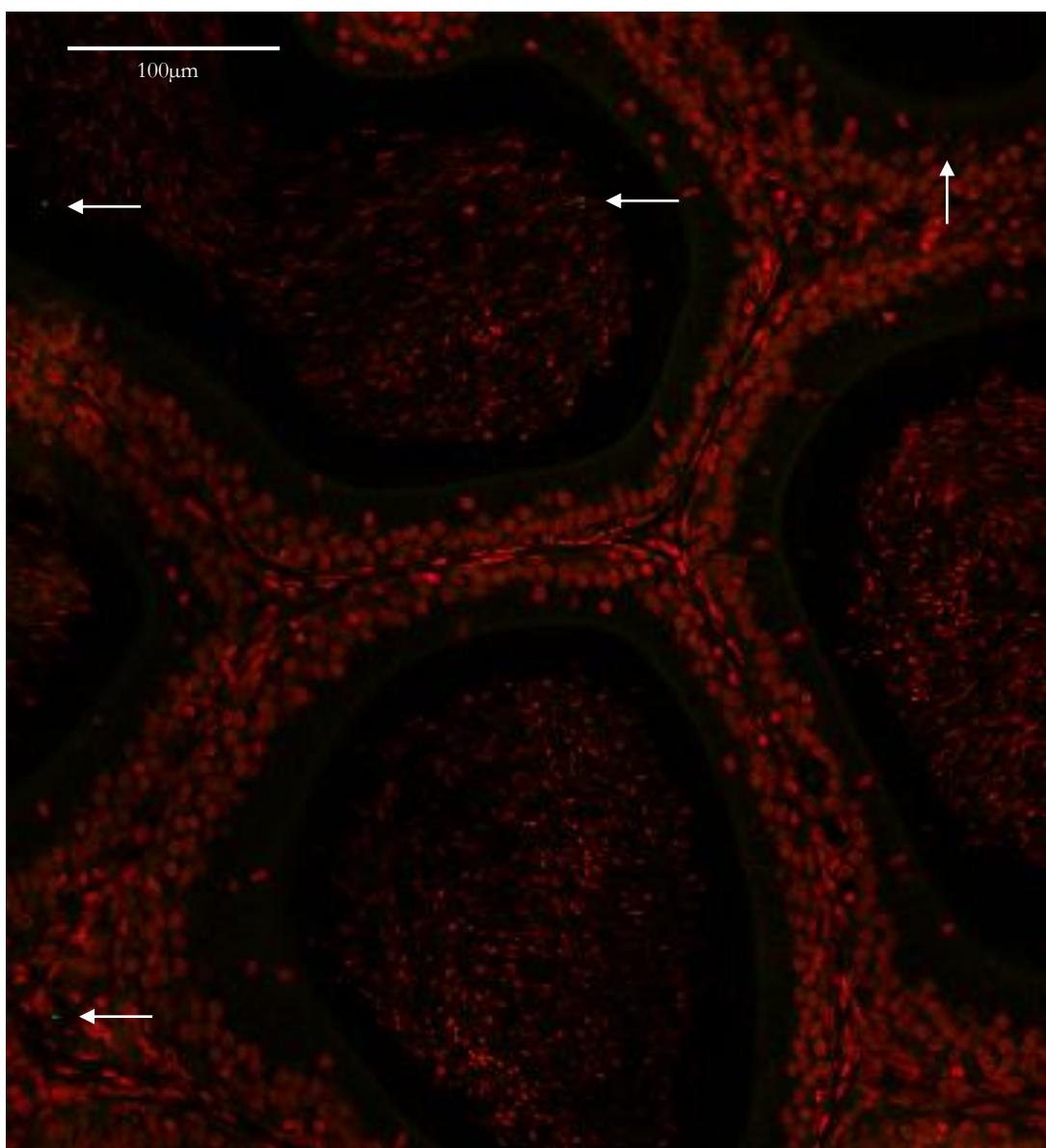


Figura 8. Sobreposição de imagens do epidídimo por imunofluorescência em microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* nas células prismáticas e lúmen do ducto epididimário, sendo o núcleo marcado em vermelho e parasito em verde.

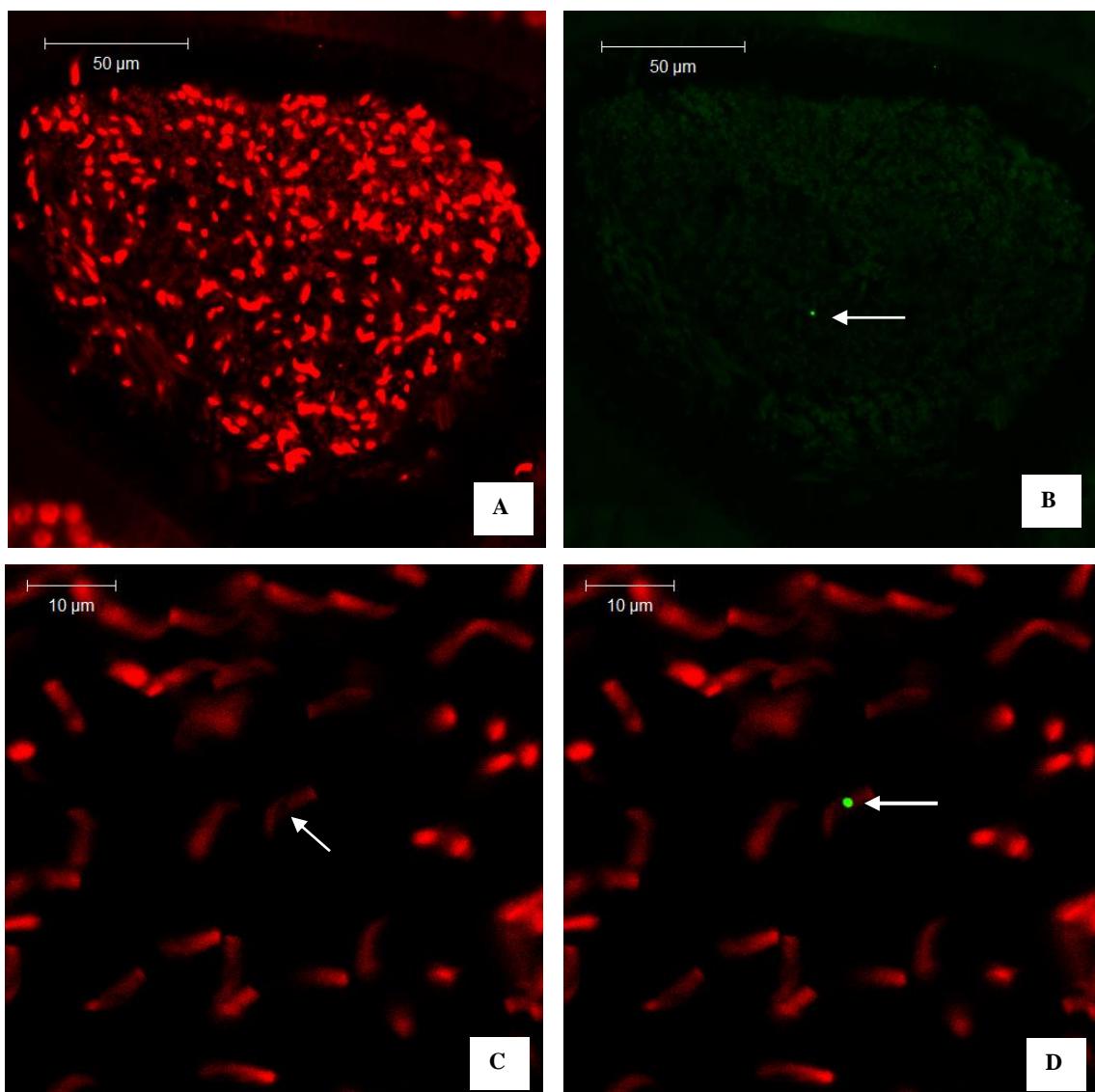


Figura 9. Lúmen do ducto epididimário por imunofluorescência em microscópio confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição da forma amastigota de *L. infantum* no lúmen do ducto epididimário, sobrepondo-se aos espermatozoides, sendo o núcleo marcado em vermelho (A e C) e parasito verde (B e D).

Somados com imunofluorescência, as imagens também foram captadas em contraste de fase, confirmando a presença do parasito extracelular, no lúmen do ducto epididimário. Foi realizado um sequencial de imagens marcando o núcleo, forma amastigota de *L. infantum* e a sobreposição das duas imagens previamente citadas (Figura 10A, B e C); paralelamente, o mesmo sequencial de imagens foi captado por contraste de fase (Figura 10D, E e F). Posteriormente, em maior aumento (5μm), observou-se o núcleo e o cinetoplasto do parasito por contraste de fase (Figura 11).

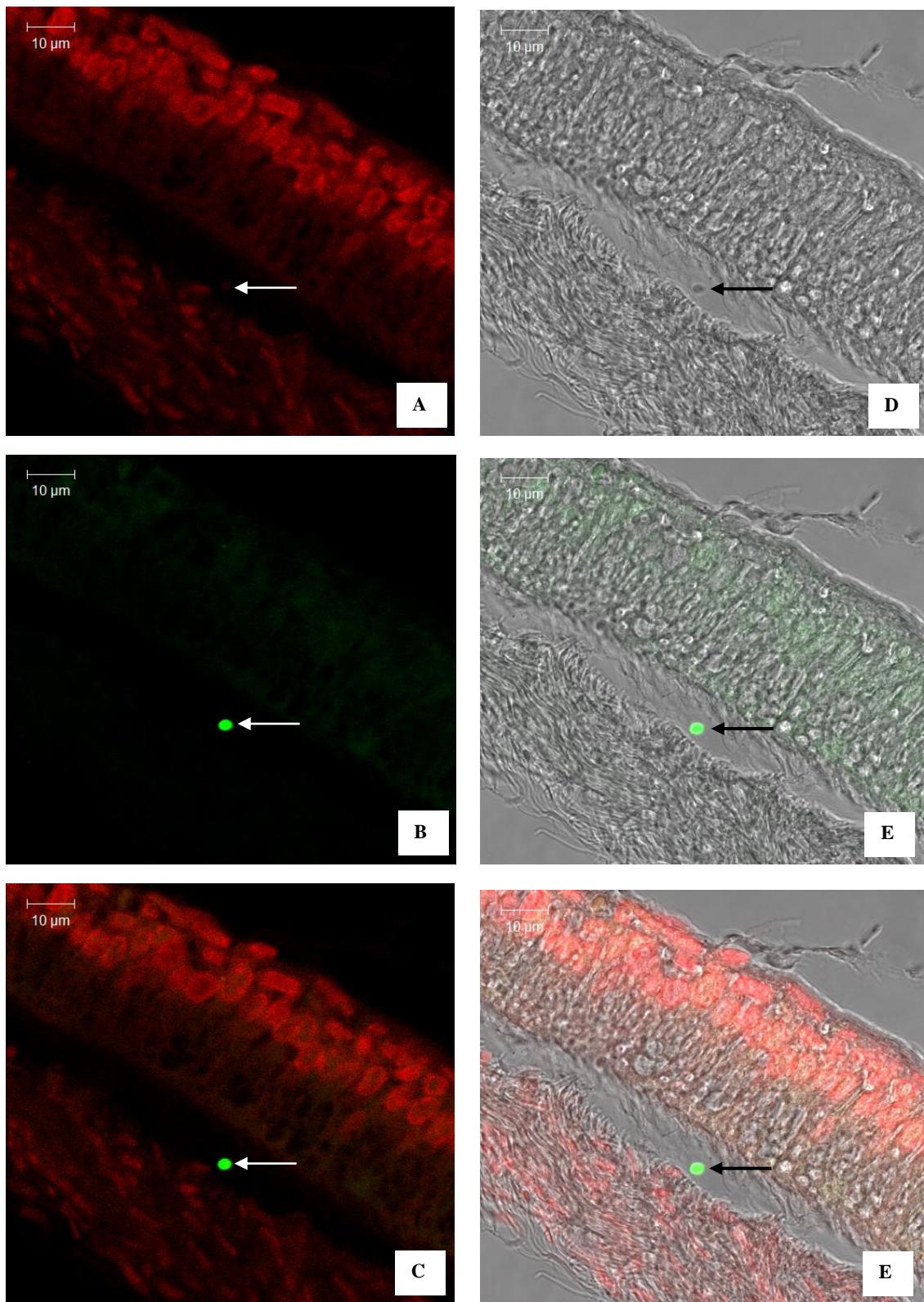


Figura 10. Lúmen do ducto epididimário por imunofluorescência e contraste de fase em microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. Seta branca determina a posição do núcleo do parasito em vermelho (A), forma amastigota de *L. infantum* em verde (B) e sobreposição de imagens (C). Seta preta indica a forma amastigota de *L. infantum* por contraste de fase (D), *L. infantum* em verde (D) e sobreposição de imagens (F).

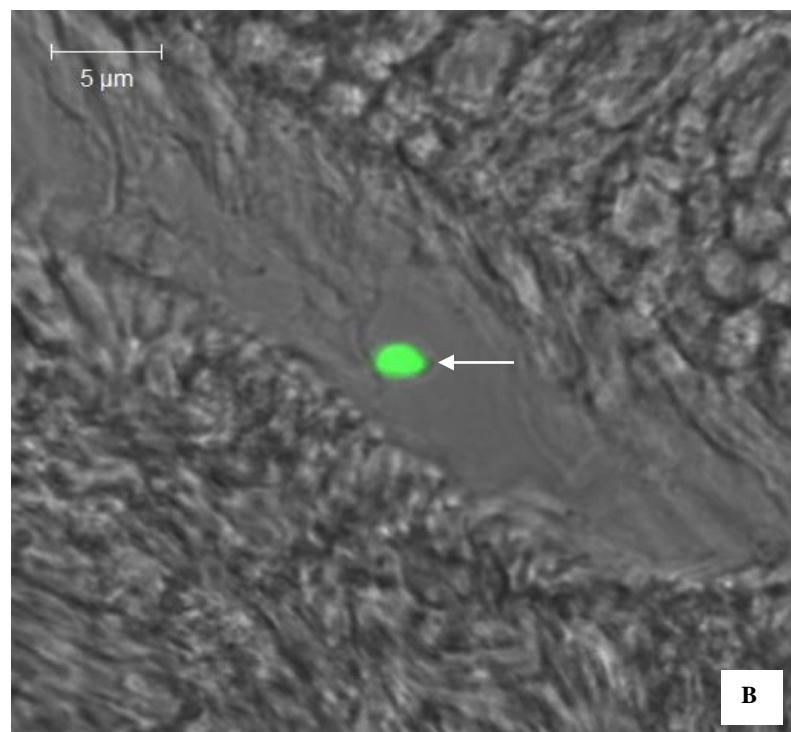
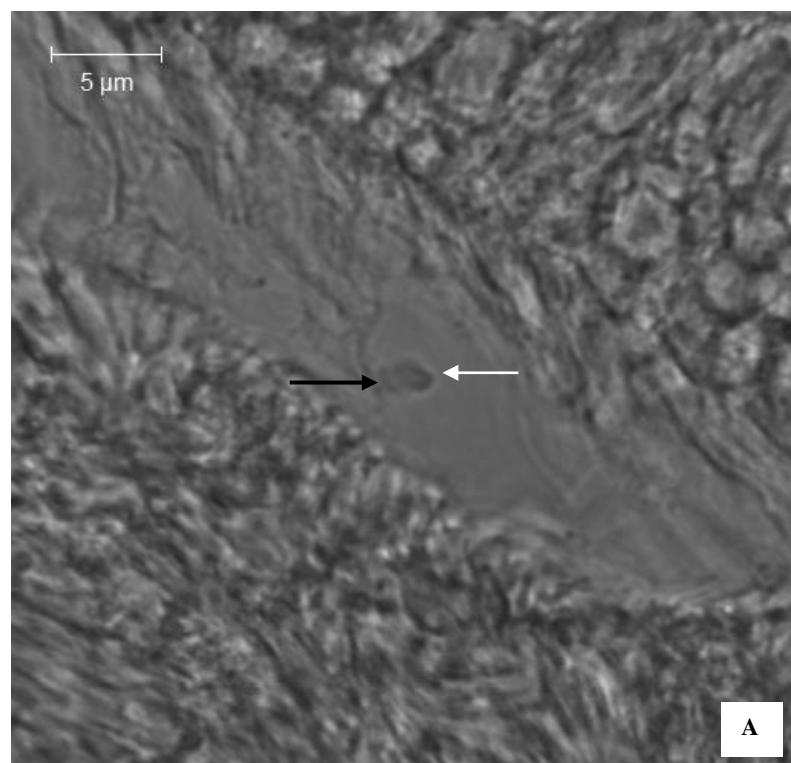


Figura 11. Lúmen do ducto epididimário em contraste de fase por microscopia confocal durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção. A seta branca determina a posição do núcleo e a preta o cinetoplasto de *L. infantum* (A); a seta branca demonstra a forma amastigota de *L. infantum* extracelular em verde, no lúmen do ducto (B).

#### **4.4Determinação da Carga Parasitária**

A maior carga parasitária foi observada no testículo na 7<sup>a</sup> semana de infecção, com positividade na cabeça do epidídimos, mas não detectáveis na cauda do epidídimos. Durante a 10<sup>a</sup> semana, há drástica redução na carga parasitária do testículo, onde já são detectados na cauda do epidídimos, sugerindo um tráfego do testículo para o epidídimos. Na 13<sup>a</sup> semana ocorreu a maior carga parasitária na cauda do epidídimos.

De uma maneira geral, a carga parasitária permaneceu abaixo de 50 parasitos/20mg no tecido testicular (Figura 12A), exceto na 7<sup>a</sup> semana; na cabeça do epidídimos a carga permaneceu mais constante e inferior a 25 parasitos/15mg no tecido (Figura 12B); e na cauda do epidídimos os parasitos ficaram abaixo de 70 parasitos/15mg no tecido (Figura 12C). Não foi observada amplificação nos controles negativos.

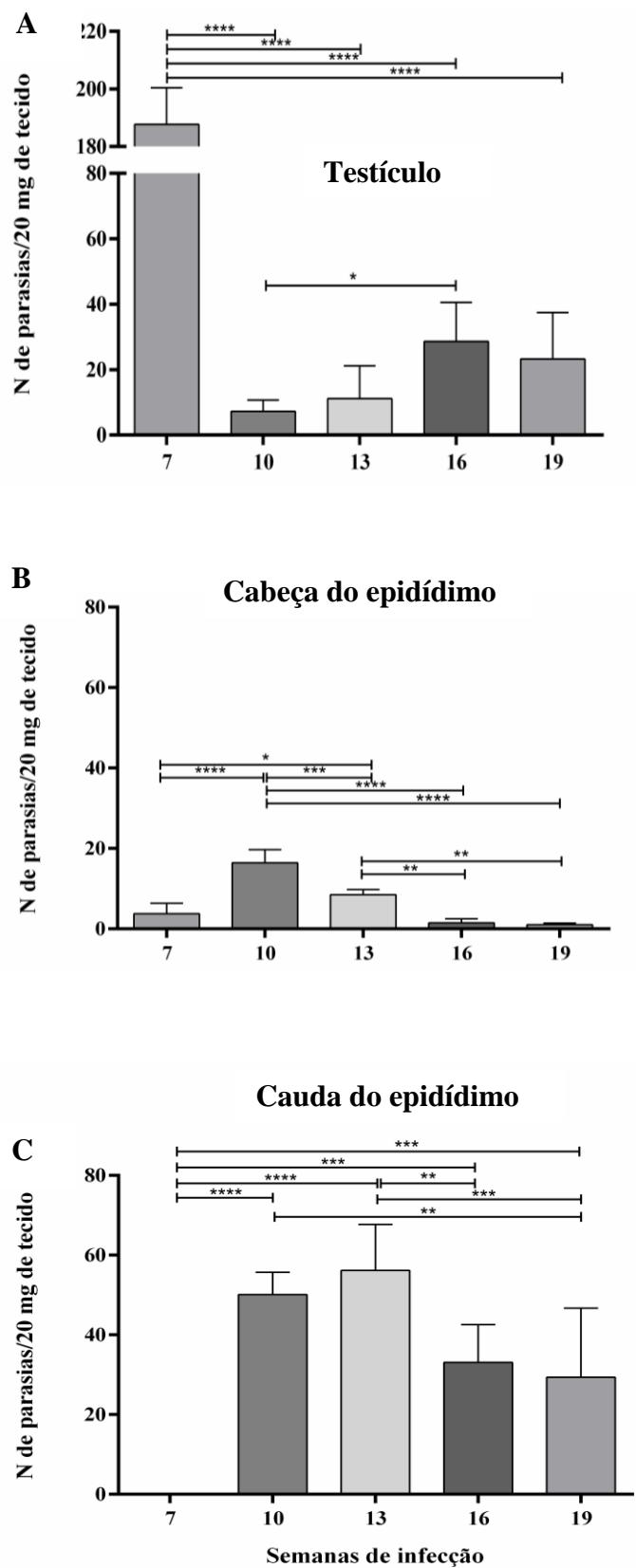


Figura 12. Carga parasitária no testículo (A), na cabeça (B) e cauda do epidídimo (C) em hamster experimentalmente infectados por *L. infantum*, demonstrando o número (N) de parasitos em 20 mg de tecido durante as semanas de infecção.

#### 4.5 Dosagem de citocinas

Foi observado o aumento de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  no testículo durante a 7<sup>a</sup> semana de infecção ( $p<0,05$ ). Na 10<sup>a</sup> semana, a citocina IL-4 obteve valores elevados ( $p<0,05$ ). Citocinas testiculares IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  e IL-4 mantiveram-se sem alteração nos tempos consequentes de infecção (Figura 13).

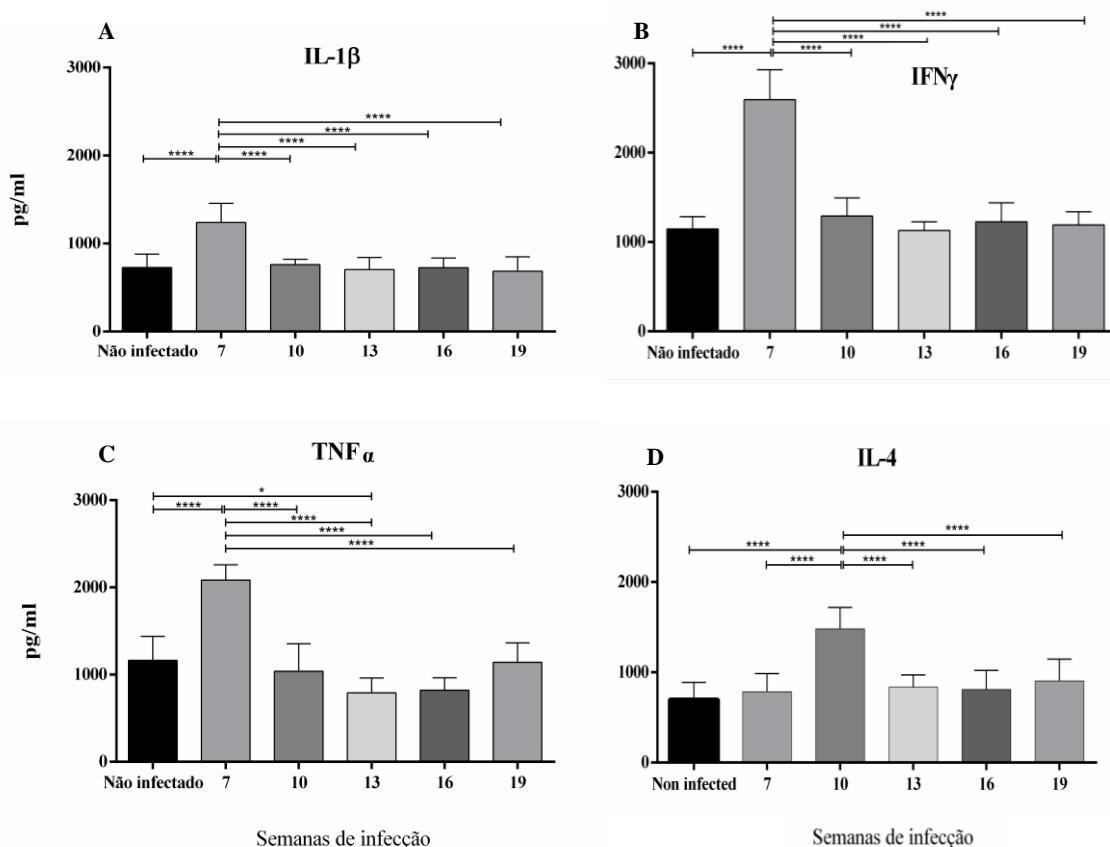


Figura 13. Dosagem de citocinas testiculares em hamster experimentalmente infectados com *L. infantum* ao longo do tempo. IL-1 $\beta$  (A), IFN $\gamma$  (B) e TNF $\alpha$  (C) demonstraram valores elevados na 7<sup>a</sup> semana de infecção e citocina IL-4 (D), com valores elevados na 10<sup>a</sup> semana ( $p<0,05$ ).

Houve correlação entre a carga parasitária e a dosagem de citocinas IL-1 $\beta$  ( $R^2 = 0,96$  e  $p = 0,0028$ ), IFN $\gamma$  ( $R^2 = 0,97$  e  $p = 0,0019$ ) e TNF $\alpha$  ( $R^2 = 0,88$  e  $p = 0,0188$ ) no testículo; entretanto, não houve correlação com IL-4 ( $R^2 = 0,22$  e  $p = 0,4255$ ).

No epidídimos, o macerado do tecido para ELISA não foi dividido entre cabeça, corpo e cauda, mas sim em epidídimos totais com todas as partes. Somente durante 13<sup>a</sup> semana, houve um aumento de citocina IL-1 $\beta$ ; as demais citocinas, TNF $\alpha$  e IL-4 mantiveram-se sem alteração em todos os tempos de infecção (Figura 14).

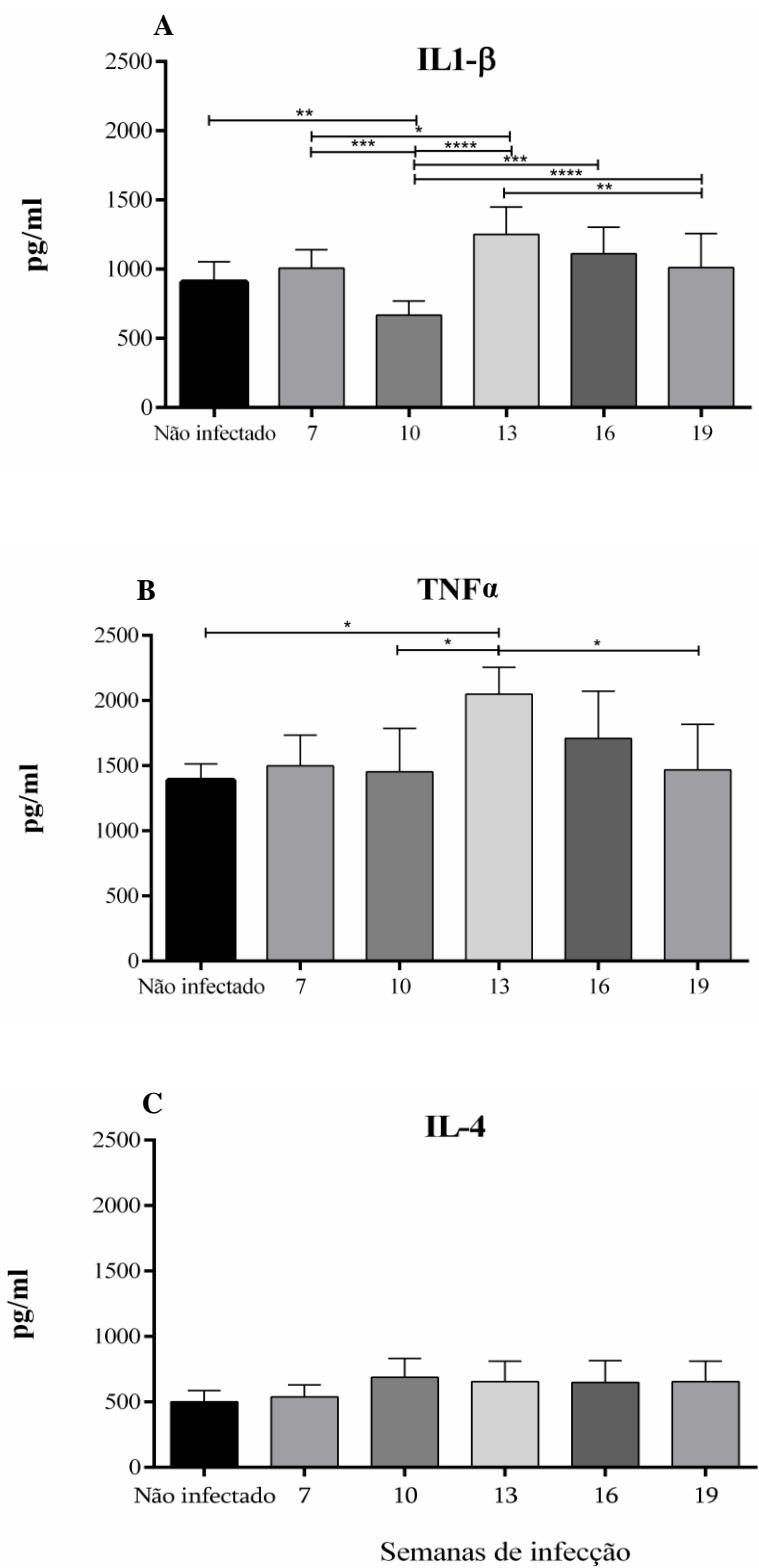


Figura 14. Dosagem de citocinas do epidídimos em hamster experimentalmente infectados com *L. infantum* ao longo do tempo. IL-1 $\beta$  (A) demonstrou valor elevado na 13<sup>a</sup> semana de infecção ( $p<0,05$ ). TNF (B) e IL-4 (C) dos hamsters infectados permaneceram semelhantes ao controle.

#### 4.6 Avaliação da taxa de transmissão sexual

Fêmeas acasaladas com machos negativos (Grupo 1) tiveram filhotes regularmente e sem óbito. Nas fêmeas acasaladas com machos positivos durante a 13<sup>a</sup> semana para *L. (L.) infantum* (Grupo 02), duas fêmeas foram a óbito na primeira e segunda semana após o parto; as demais fêmeas tiverem seus filhotes regularmente, tendo um percentual de sobrevivência de 66,6% (04/06).

Baço e útero das fêmeas acasaladas foram removidos e observou-se aumento de volume em ambos os órgãos, quando comparados grupo 01 ao grupo 02 (Teste T não pareado  $p<0,05$ ); ainda, o útero do Grupo 02 demonstrou maior hiperemia do que no Grupo 1 (Figura 15).

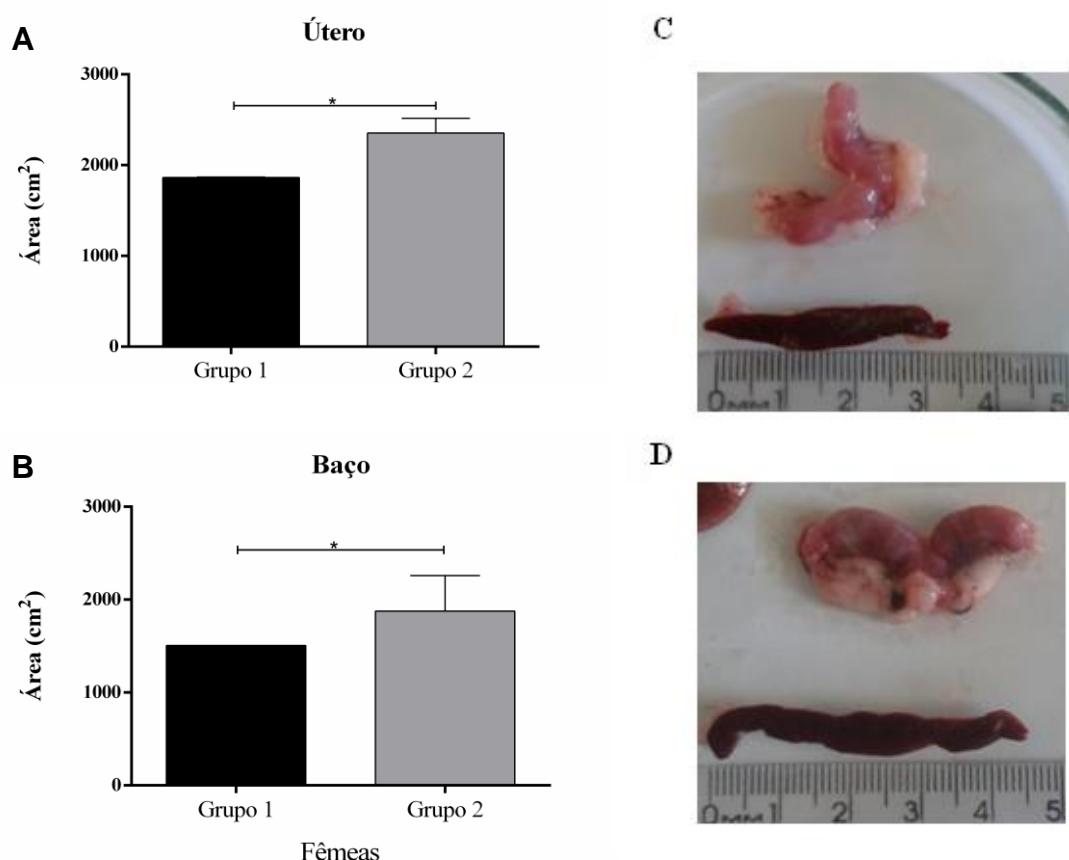


Figura 15. Área (cm<sup>2</sup>) mensurada pelo programa Image J de útero (A) e baço (B), comparando a Fêmeas acasaladas com machos negativos (Grupo 1) e fêmeas acasaladas com machos positivos durante a 13<sup>a</sup> semana para *L. (L.) infantum* (Grupo 02). Imagens representativas de útero e baço de fêmeas do Grupo 1 (C) e Grupo 2 (D).

O PCR de amostras de DNA de baço, fígado e útero, demonstrou positividade em pelo menos um dos órgãos avaliados em todas as fêmeas acasaladas com machos positivos (Grupo 2), onde as duas fêmeas que foram a óbito obtiveram positividade em todos os três órgãos avaliados (Tabela 5). Todas as fêmeas acasaladas com machos negativos (Grupo 1) foram negativas para *Leishmania* spp. por PCR.

Tabela 5. PCR das fêmeas acasaladas com machos positivos para *L. infantum*, sendo detectáveis (+) ou não detectáveis (-) para o órgão avaliado.

FÊMEA	ÓRGÃO AVALIADO		
	Baço	Fígado	Útero
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	-	+
4	+	-	+
5	-	+	+
6	-	+	-

## 5. DISCUSSÃO

Monitorou-se experimentalmente a evolução de *Leishmania (L.) infantum* ao longo do tempo de infecção e como estes parasitas se comporta alterando as funções sistêmicas, específicas do aparelho reprodutivo masculino e suas aplicações na transmissão sexual. Assim, sugere-se o caminho percorrido pelos parasitas no sistema reprodutor masculino (Figura 16), de acordo com os resultados apresentados. Verificou-se ainda, presença de formas amastigotas não fagocitadas dentro dos túbulos seminíferos e do ducto epididimário, juntamente com os espermatozoides, sendo o primeiro relato de formas amastigotas livres em hospedeiro vertebrado (Figura 16C e D).

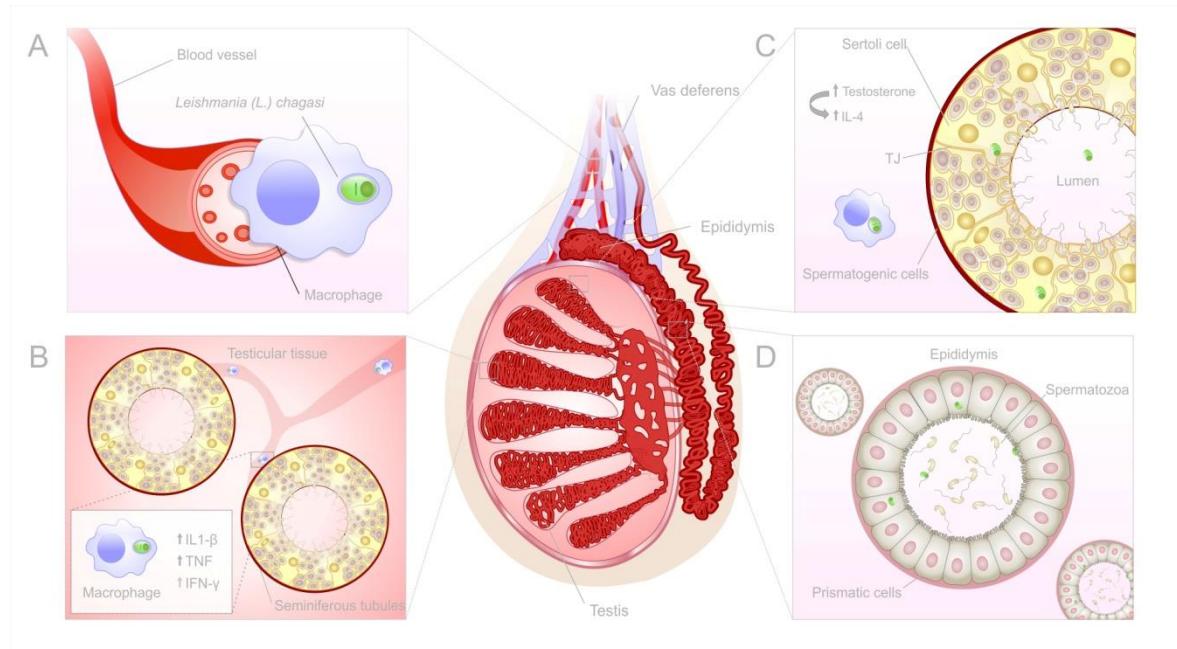


Figura 16. Tráego de *L. (L.) infantum* no sistema reprodutor masculino. Formas amastigotas fagocitadas por neutrófilos e monócitos chegam ao testículo via hematogênica (A). Com o aumento da carga parasitária e de citocinas pró-inflamatórias, mais macrófagos são atraídos ao local. Parasitos conseguem atravessar a barreira hemato-testicular atravessando as células de Sertoli e atingem o lúmen dos túbulos seminíferos, ocasionando edema e hipertrofia testicular (B). Posteriormente, amastigotas se alojam nos testículos em menor número; o aumento de testosterona pode ser um dos fatores a promover um ambiente mais imunossuprimido, permitindo que os parasitos permaneçam silenciosos e protegidos contra o sistema imune durante a infecção crônica (C). Amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* não fagocitadas atingem o lúmen dos túbulos seminíferos, migram pelo ducto epididimário, onde são captadas pelos estereocícios das células prismáticas permanecendo no epidídimo ou são liberados juntamente com os espermatozoides (D).

Durante a infecção experimental, observou-se aumento da área esplênica dos hamsters infectados quando comparados aos hamsters não infectados, como o primeiro indicativo de infecção experimental bem-sucedida; sendo, ainda, confirmado por PCR de baço e fígado. *Leishmania (L.) infantum* é um protozoário intracelular que provoca uma doença potencialmente fatal, em que os macrófagos infectados possuem tropismo por baço, fígado e medula óssea, levando a esplenomegalia (McFARLANE et al., 2011). Ocorre o desenvolvimento do parasita no fígado e mais tarde no baço, aproximadamente 4 a 5 semanas a infecção é resolvida no fígado por uma resposta granulomatosa e o parasita persiste como uma infecção crônica com a destruição gradual da arquitetura esplênica (LAFUSE et al., 2013).

Hemograma completo foi realizado detectando aumento ou redução da série vermelha e branca, em diferentes tempos durante o procedimento experimental, tendo como dificuldade a grande amplitude dos valores de referência para hamster. Alterações hematológicas atuam como ferramentas indispensáveis no acompanhamento da evolução clínica da LV (MOREIRA et al., 2012).

Hematócrito apresentou redução gradual durante a 16<sup>a</sup> semana e valores mais baixos durante a infecção semanas pós a 19<sup>a</sup> semana, mostrando a progressão para a anemia normocítica e normocrômica. A anemia é um achado frequente em indivíduos doentes, sendo geralmente classificada como anemia normocítica e normocrômica em humanos (MICHALICK e GENARO, 2005; MOREIRA et al., 2012), sendo compatível com o nosso estudo. Amastigotas de *Leishmania* são também capazes de explorar ferro de hemina e hemoglobina para fins nutricionais (CARVALHO et al., 2009).

Em hamster dourado, a anemia foi associada com o aumento dos níveis de eritropoietina no soro, o que indica que os hamsters respondem à anemia produzindo eritropoietina (LAFUSE et al., 2013) e foi observada uma queda de cerca de 28% no nível de hemoglobina em comparação com os animais não infectados (BISWAS, et al., 1992). Anemia surge pela combinação de fatores, incluindo sequestro esplênico e destruição de eritrócitos, bloqueio de produção na medula, hemorragia, hemólise, mecanismos imunes (auto anticorpos e imunocomplexos), infecções concomitantes e carência nutricional, por deficiência de ferro, ácido fólico e vitamina B12 (MOREIRA et al., 2012). Este recurso também foi utilizado para cães e seres humanos a fim de avaliar sinal/sintoma clínico da LV (QUEIROZ et al., 2004; PRAZERES et al., 2013; THAKUR et al., 2013).

No leucograma, pode ocorrer linfocitose com leucopenia moderadas a acentuadas; entretanto, cães podem apresentar linfopenia e neutrofilia (SILVA, 2007). Durante a 7<sup>a</sup> semana de infecção, o número de neutrófilos foi aumentado no sangue periférico, sugerindo que o testículo ainda está na fase aguda de infecção. Estudos relataram que mais neutrófilos são recrutados para o local da infecção e estas células são muito eficientes na absorção de parasito e; como neutrófilos são fagócitos de vida curta, teorias propõem que funcionam como células hospedeiras intermediárias atuando como "Cavalos de Tróia", utilizados por parasitos para entrar silenciosamente nos macrófagos, evitando assim a ativação dos mecanismos de defesa das células (MALAFAIA e REZENDE, 2009; LIU e UZONNA, 2012).

A infecção de neutrófilos por *L. major* leva ao atraso significativo na morte programada e secretam níveis elevados de MIP-1 $\beta$ ; que é conhecida por atrair macrófagos para o local da infecção os quais fagocitam parasitas livres e PMNs infectados e/ou apoptóticos (LIU e UZONNA, 2012). Enquanto os neutrófilos são recrutados para o sítio inflamatório dentro de minutos após a infecção, uma entrada massiva de monócitos é visto a partir da segunda semana após a inoculação de *Leishmania* (MOUGNEAU et al., 2011). Monócitos deixam sistema sanguíneo migrando para os tecidos infectados na tentativa de controlar a infecção, justificado pela redução de monócitos durante todas as semanas de infecção, em comparação ao grupo controle. Na contagem diferencial de leucócitos é frequente a ausência de eosinófilos e basófilos, comumente observada em infecções parasitárias, e marcadamente reduzida a presença de neutrófilos, caracterizando leucopenia (MICHALIK e GENARO, 2005).

Rey (2008) relata a que o parasitismo induz, em humanos, a proliferação histiocitos e a multiplicação das leishmanias continuam até que uma infiltração de linfócitos e plasmócitos apareçam no local. Os macrófagos ficam aumentados em número e volume, muito parasitados por formas amastigotas e verifica-se plasmocitose, embora no sangue periférico seja comum haver níveis baixos de linfócitos B (CD19+), pois estas células produtoras de imunoglobulinas encontram-se sequestradas nos órgãos linfoides. É expressiva a plasmocitose podendo-se encontrar linfocitose discreta (MOREIRA et al., 2012); este dado corrobora com resultados desta pesquisa, uma vez que foram visualizados plasmócitos em tecidos específicos do macho, no lúmen do epidídimos.

Um aumento de proteínas séricas totais em hamsters experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum* foi observado, tendo albumina em níveis normais e globulinas

aumentadas, mas em valores flutuantes e não tão marcantes como relatado na espécie canina. A leishmaniose visceral canina determina resposta humoral policlonal que origina disproteinemia, caracterizada por aumento das proteínas séricas totais, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia (LABAT et al., 2010). A hiperglobulinemia é devida principalmente ao aumento dos níveis séricos das  $\beta$  e  $\delta$  globulinas (SOUZA et al., 2005; SILVA et al., 2007; FALEIRO et al., 2014). Labat et al. (2010) observaram hiperproteinemia tanto em cães positivos sintomáticos como os assintomáticos.

No sistema reprodutor masculino, nenhum hamster foi a óbito e apenas 8,6% (03/35) apresentavam atrofia testicular semelhante à relatada por Gonzales (1983), demonstrando que a maioria dos machos infectados permaneceu com testículos assintomáticos e/ou verificando a resistência entre parasito-hospedeiro durante o desenvolvimento da infecção. A degeneração testicular é provavelmente uma consequência do processo inflamatório uma vez que o processo degenerativo pode ser desencadeado em resposta a uma inflamação testicular e já que a degeneração testicular é frequente como inflamação secundária (DINIZ et al., 2005). Cães naturalmente infectados por *L. infantum* apresentam ausência de alterações macroscópicas testiculares, porém histologicamente possuem lesões caracterizadas por processos inflamatórios intersticiais subagudos com atrofia degenerativa do epitélio seminífero (OLIVEIRA et al., 2012). Nos espermatozoides de cães, as anormalidades mais encontradas foram cauda fortemente enrolada (defeito maior) e cauda dobrada (defeito menor); tanto os animais positivos sintomáticos como os assintomáticos apresentam hiperproteinemia do sêmen (LABAT, 2010). Os testículos podem ser importantes na manutenção de formas infectantes no organismo ou na disseminação para os segmentos extra-gonadais (BENITES et al., 2011).

Resistência à infecção por *L. donovani* foi bem caracterizada em camundongos BALB/c e foi associada a resposta do tipo Th1, com aumento de IL-1 $\beta$  e de produção de IFN $\gamma$  e ativação de macrófagos (McFARLANE et al., 2011). Enquanto que um hospedeiro suscetível, como um canino assintomático, possui elevada expressão de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e carga parasitária reduzida, indicando que estas citocinas desempenham um papel protetor contra a infecção. Por conseguinte, o equilíbrio de expressão de IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  (proteção) e IL-10 e TGF $\beta$  (progressão da doença) associados à carga parasitária, podem determinar a expressão clínica em cães naturalmente infectados (ALVES et al., 2009). Nos humanos, a resistência à infecção está associada com uma resposta imunitária do tipo Th1 com a produção das citocinas IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ , enquanto que a susceptibilidade é devido a

respostas de regulação com a produção de IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998; ALVES et al., 2009). A fim de desenvolver a imunidade mais eficaz Th1, Nishida et al. (2013) demonstraram que o IFN $\gamma$  suprime região do gene de IL-4, silenciando Th2, sendo mais eficazes no controle da *Leishmania*. O estudo de respostas de citocinas do sistema imunológico de hamster durante LV tem sido dificultado pela falta de reagentes imunológicos e recentemente, a expressão de citocinas durante LV em hamsters foi estudada medindo as alterações nos níveis de RNAm das citocinas mostrando que a infecção em hamsters avança, apesar de uma forte resposta Th1, caracterizado pela expressão elevada de RNAm de IFN $\gamma$  na medula óssea e baço (LAFUSE et al., 2013).

Quando uma elevada carga parasitária atingiu o testículo durante a 7<sup>a</sup> semana, altos níveis de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  foram detectados nos testículos, levando a uma resposta do tipo Th1 que culminou na produção de um ambiente inflamatório e aumento do volume testicular. Apesar de macrófagos testiculares possuírem a capacidade reduzida na secreção de algumas citocinas como IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  quando comparados com outros tecidos, a expressão destas citocinas demonstram a capacidade de desenvolver uma resposta inflamatória eficiente (WEINBAUER et al., 2010). A IL-1 $\beta$  produzida pelas células de Sertoli é necessária para regular função de linfócitos locais importantes para a proteção imunológica do tecido testicular (HULEIHEL e LUNELNFELD, 2004). Células circulantes do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, também têm acesso relativamente livre para o testículo (HEDGER e MEINHARDT, 2003; MEINHARDT e HEDGER, 2011). A eventual propagação do parasito para os órgãos viscerais pode envolver o movimento de células infectadas (McCALL et al., 2013).

Durante a 10<sup>a</sup> semana de infecção, os parasitas migraram para o epidídimos e, posteriormente, observou-se o aumento de IL-4 testicular, visando regular o controle dos sinais inflamatórios. O aumento de IL-4 pode sugerir um potencial marcador indicando o final da fase aguda testicular. No epidídimos, não houve alterações na concentração das citocinas TNF $\alpha$  e IL-4, permanecendo as formas amastigotas no epidídimos em maior número do que no testículo após a 10<sup>a</sup> semana de infecção e sendo eliminado juntamente com os espermatozoides a partir da 10<sup>a</sup> semana, com pico na 13<sup>a</sup>, quando ocorre aumento de IL-1 $\beta$ . Em cães naturalmente infectados foi verificado que o parasito era intermitentemente eliminado (SILVA et al., 2009).

É evidente que várias citocinas são compartilhadas pelos sistemas imunológicos e reprodutivo masculino, onde a ativação ou a falha do sistema imunitário pode resultar na

perturbação da função testicular, pelo menos parcialmente, através de efeitos mediados por citocinas (HEDGER e MEINHARDT, 2003). Infecção sistêmica e doença inflamatória interrompem a produção de células germinativas e podem comprometer a capacidade reprodutiva, diminuindo os níveis de testosterona e esteroidogênese, sendo mostrado que o TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 diminuem a secreção de testosterona pelas células de Leydig, bem como afetaram a secreção de transferrina pelas células de Sertoli (ELHIJA et al., 2005). Do mesmo modo, a produção de IFN $\gamma$  ou TNF $\alpha$  durante uma infecção poderia suprimir a esteroidogênese, devido aos efeitos destas citocinas nas células de Leydig; consequentemente, a produção excessiva de citocinas dentro do testículo pode ser uma causa importante do comprometimento da espermatogênese e esteroidogênese que geralmente ocorre durante a inflamação, doenças e lesões (HEDGER e MEINHARDT, 2003).

Estudos reprodutivos em LV realizados em cães, o principal reservatório de *L. (L.) infantum* no Brasil, detectaram a presença do parasita na urina, sêmen e órgãos reprodutivos masculinos (GONZALES et al., 1983; RIEIRA e VALADARES, 1996; DINIZ et al., 2005; AMARA et al., 2009; MANNA et al., 2012). Nos testículos e na cauda do epidídimo houve maior número de amastigotas nos cães que apresentavam sinais clínicos da doença (DINIZ et al. 2005). Manna et al. (2012) relatam que quanto maior a carga parasitária na medula óssea, mais os sinais clínicos em cães são exacerbados, e a carga parasitária mais baixa são observadas em animais assintomáticos. A manifestação clínica da leishmaniose está na dependência da carga parasitária, considerando o número de formas para cada 1.000 núcleos de células e isto demonstra, em parte, as diferenças encontradas entre cães com variação na sintomatologia clínica e possivelmente nas distintas regiões do aparelho reprodutivo como observado neste estudo (BENITES et al., 2011). Nos testículos atrofiados, não houve essa relação positiva da carga parasitária e sintomatologia clínica testicular, sugerindo que a autoimunidade e a característica de cada indivíduo pode ser um fator preponderante em órgão imunologicamente privilegiado.

O tropismo do parasita pelo epidídimo, somados pela baixa oscilação de citocinas e a presença de condições favoráveis para os espermatozoides podem ser primordiais para manutenção das formas amastigotas de *L. (L.) infantum*, observadas livremente no ducto epididimário. As células prismáticas do epidídimo fagocitam e digerem fragmentos citoplasmáticos eliminados durante a espermiogênese e que não foram fagocitados pelas células de Sertoli; ainda, elas reabsorvem cerca de 99% do fluido que deixa o testículo e

são secretoras, criando condições favoráveis para a sobrevivência dos espermatozoides (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Na cabeça, corpo e cauda do epidídimos há notadamente migração de células imunocompetentes, que normalmente situam-se na base do epitélio e se deslocam para o lúmen (SILVA et al., 2009). No entanto, fatores que levam ao aumento da prevalência destas células e a resposta imune celular local neste órgão, frente à complexidade da resposta imune sistêmica da LV não são totalmente conhecidos (HEDGER e HALES, 2006). Contudo, formas amastigotas dentro do lúmen do túbulo seminífero e ducto epididimário não foram observados (DINIZ et al., 2005).

Quando o PCR demonstrou maior carga parasitária durante a 13<sup>a</sup> semana de infecção na cauda do epidídimos, machos positivos foram acasalados com fêmeas negativas e foi demonstrada a presença do parasito em todas as fêmeas avaliadas. Ainda, há um indicativo de que o número de cópula não parece ser indicador preditivo do risco de transmissão (SILVA et al., 2009). *L. (L.) infantum*, provenientes de cães da raça *Foxhound* dos EUA e Canadá, foram isolados e infectados experimentalmente camundongos Balb-c a fim de verificar outra via de transmissão; na ausência do inseto vetor e após copula de fêmea positiva com macho negativo, um a cada sete machos foram infectados, verificando o baço por cultura e PCR (ROSYPAL e LINDSEY, 2005). Silva et al. (2009) acasalaram cães machos naturalmente infectados com fêmeas negativas, em ambiente controlado ausente de vetores, detectaram sorologia e PCR positivos nas fêmeas; entretanto, não conseguiram demonstrar a presença do parasito histologicamente no útero.

Em hamster fêmeas acasaladas com machos experimentalmente infectados por *L. infantum*, foi observado infiltrado inflamatório no baço e fígado de fêmeas compatíveis com LV; e apesar da detecção do parasito no útero por PCR, não observamos alterações macro ou microscópicas evidentes. Symmers (1960) relatou a primeira lesão ulcerativa contendo macrófagos parasitados com *Leishmania* na vulva de uma mulher que contraiu a infecção por via venérea, cujo marido era diagnosticamente positivo. Amastigotas de *Leishmania* já foram previamente descritas no útero de cadelas (ROSYPAL, 2005; SILVA, 2007). Em cães, fêmeas foram infectadas após cópula com machos naturalmente infectados e Silva (2007) não verificaram lesões macro e microscópicas evidentes nos ovários, tubas uterinas, cornos uterinos, corpo do útero e cérvix. A alteração histopatológica mais frequente foi uma reação inflamatória cutânea na vulva, de intensidade variável e caracterizada por infiltrado histio-plasmo-linfocitário, principalmente ao redor de folículos

pilosos e de glândulas sebáceas e sudoríparas; entretanto, as mesmas alterações também foram evidenciadas em fêmeas não infectadas.

Como a transmissão clássica de leishmaniose é vetorial, diversos autores preconizam o controle do inseto vetor e de reservatórios (COSTA et al., 2001; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; MARCONDES e ROSSI, 2013; PACE, 2014); entretanto, há outras possíveis vias de transmissão verificada pela presença do parasita em outros vetores como carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2010) e outros dípteros como *Tabanus importunus* (COELHO e BRESCIANI, 2013). Somando, foram relatados casos autóctones de LV em humanos onde não há a presença do inseto vetor (SYMMERS; 1960; ASTE, 2002); transmissão por meio de agulhas contaminadas entre usuários de drogas (PINEDA et al., 2001; BURTON, 2001; CRUZ et al., 2002) e por transfusão de sangue (OWENS et al., 2001; REINE, 2004; FREITAS et al., 2006). Na espécie canina, a transmissão venérea ou vertical foi considerada (DINIZ et al., 2005), sendo confirmadas experimentalmente em cães naturalmente infectados (SILVA et al., 2009; TURCHETTI et al., 2014).

Há, ainda, a necessidade de caracterizar a LV como DST, evidenciados em humanos (SYMMERS, 1960); camundongos Balb-c (ROSYPAL e LINDSEY, 2005) e em hamsters experimentalmente infectados. Estudos envolvendo humanos infectados são necessários para esclarecer melhor este cenário de transmissão; ainda, bancos de sêmen têm sido cada vez mais utilizados e monitoramento dos indivíduos doadores pode ser um passo adicional na prevenção da LV.

Pensando em LV em área endêmica, os programas de controle não consideram a transmissão sexual como fonte de infecção, que pode ter um impacto significante particularmente no Brasil, país em que a maior parte da população canina não é esterilizada (BENITES et al., 2011); portanto as medidas de controle podem e devem vir associadas ao controle populacional nessa espécie. Entretanto, o impacto no controle de população canina infectada na redução da prevalência da LV em humanos em áreas endêmicas tem sido debatido e estas medidas podem ser difíceis de desenvolver e com alto custo (HOLZMULLER et al., 2005).

## **6. CONCLUSÃO**

Este estudo evidenciou a presença de *Leishmania (Leishmania) infantum* no testículo e epidídimos de hamsters (*Mesocricetus auratus*) experimentalmente infectados, demonstrando, por histologia e imunofluorescência, formas amastigotas do parasito no lúmen dos túbulos seminíferos e ducto epididimário, livre que qualquer fagócito; bem como os mecanismos imunológicos e de carga parasitária necessários para permanência do parasito no sistema reprodutor masculino, causando baixo impacto sobre a fertilidade dos machos. Ainda, verificou-se que *L. infantum* foi sexualmente transmitida neste modelo experimental.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, S.; THEODOR, O. Investigations on Mediterranean Kala Azar - *Leishmania infantum*. *The Royal Society*, v. 108, n. 759, p. 453-463, 1931.

ALMEIDA, A.B.P.F.; MENDONÇA, A.J.; SOUSA, V.R.F. Prevalência e epidemiologia da leishmaniose visceral em cães e humanos, na cidade de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. *Ciência Rural*, v.40, n.7, p. 1610-1615, 2010.

ALVAR, J.; APARICIO, P.; ASEFFA, A.; DEN BOER, M.; CANAVATE, C.; DEDET, J. P.; GRADONI, L.; TER HORST, R.; LOPES-VELES, R.; MORENO, J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, p. 334-59, 2008.

ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Caderno de Saúde Pública*, v. 20, n. 1, p. 259-265, 2004.

ALVES, C.F.; DE AMORIM, I. F.G.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M. and MELO, M. N. Expression of IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-10 and TGF $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) chagasi. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 128, p. 349-358, 2009.

ALVAREZ-RUEDA N, BIRON M, LE PAPE P. Infectivity of *Leishmania mexicana* is associated with differential expression of protein kinase C-LikeTriggered during a Cell-Cell Contact. *PLoS ONE*, v. 4, n. 10, p. e7581, 2009.

AMARA, A.; MRAD, I.; MELKI, M. K.; MRAD, M. B.; REJEB, A. Estude histologique des lésions testiculaires chez les chiens leishmaniens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, v. 160, n. 1, p. 54-60, 2009.

ASSIS, V. P.; RIBEIROA, V. M.; RACHIDA, M.A.; CASTROB, A.C.S.; VALLEA, G. R. Dogs with *Leishmania chagasi* infection have semen abnormalities that partially revert during 150 days of Allopurinol and Amphotericin B therapy. *Animal Reproduction Science*, v. 117, p. 183-186, 2010.

ASTE, N; PAU, M.; BIGGIO; P. Leishmaniasis of the prepuce. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 16, p. 93-94, 2002.

BAILEY, H.; BISHOP W. J. Leinhman-donovan bodies and donovaniasis – Sir. William Boog Leishman 1865-1926 and Charles Donovan, 1863-1951. *British Journal of venereal Disease*, v. 35, n.8, 1959.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and the cat. 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p. 685-698.

BARBIERI, C.L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, v. 28, p.329-337, 2006.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; NETO, A. G. F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 1<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1976, p. 57-59.

BENITES, A. P.; FERNANDES, C. E.; BRUM, K. B.; ABDO, M. A. G. S. Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, p. 72-77,2011.

BISWAS, T.; CHAKRABORTY, M.; NASKAR, K.; GHOSH, D. K.; GHOSAL, J. Anemia in Experimental Visceral Leishmaniasis in Hamsters. *The Journal of Parasitology*, v. 78, n. 1, p. 140-142, 1992.

BRACKETT, B. G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: DUKE'S, Fisiologia dos animais domésticos.12<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 623-643.

BRASIL. 2013. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. Site consultado: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>. Acesso em: julho de 2015.

BURTON, A. Sharing needles may produce artificial leishmaniasis cycle. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 1, p.4, 2001.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M.; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 45, n. 2, p. 79-83, 2003.

CALDAS, A. J. M.; SILVA, D. R. C.; PEREIRA, C. C. R.; NUNES, P. M. S.; SILVA, B. P.; SILVA, A. A. M.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. Infecção por *Leishmania Leishmania chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na ilha de São Luiz – MA, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 5, p. 445-451, 2001.

CAMARGO-NEVES, V. L. F.; KATZ, G.; RODAS, L. A. C.; POLETTO, D. W.; LAGE, L. C.; SPÍNOLA, R. M. F.; CRUZ, O. G. Utilização de ferramentas de análise espacial na vigilância epidemiológica de leishmaniose visceral americana – Araçatuba, São Paulo, Brasil, 1998-1999. *Caderno de Saúde Pública*, v. 17, n. 5, p. 1263-1267, 2001.

CAMARGO-NEVES. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual American Visceral Leishmaniasis in the state of São Paulo: current situation. *Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 4, n. 48, p. 12-14, 2007.

CARVALHO, S.; CRUZ, T.; SANTARÉM, N.; CASTRO, H.; COSTA, V.; TOMÁS, A. M. Heme as a source of iron to *Leishmania infantum* amastigotes. *Acta Tropica*, v. 109, p. 131-135, 2009.

CASTILHO, T. M.; CAMARGO, L. M. A.; MCMAHON-PRATT, D.; SHAW, J. J.; FLOETER-WINTER, L. M. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of american leishmania species on the basis of glucose-6-phosphate-dehydrogenase. *Journal of Tropical Medical Hygiene*, v. 78, p. 122-132, 2008.

CHAGAS, E.; CUNHA, A. M.; CASTRO, G. O.; FERREIRA, L. C.; ROMAÑA, C. Leishmaniose visceral Americana. Nova entidade morbida do homem na América do Sul. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 32, n. 3, p. 321-480, 1937.

COELHO, W. M. D.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular and parasitological detection on *Leishmania* sp. in a dipteran of the species *Tabanus importunus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 605-607, 2013.

CORREA, A. P. F. L. Resposta humoral, carga parasitaria e avaliação histopatologica na infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em camundongos BALB/c imunossuprimidos. Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

COSTA, C. H. N., PEREIRA, H. F.; ARAUJO, M. V. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil (1980-1986). *Revista de Saúde Pública*, v. 24, p. 361-372, 1990.

COSTA, C. H. N. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, p. 223-228, 2001.

COX, F. E. G. History of Human Parasitology. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 35, p. 595–612, 2002.

CRUZ, I.; MORALES, M. A.; NOGUER, I.; RODRÍGUEZ, A.; ALVAR, J. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *The Lancet*, v. 359, p. 1124-25, 2002.

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*. Nota prévia. *Hospital*, v. 11, n. 2, p. 3-9, 1937.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p. 352-356, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; LORUSSO, V.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; STANNECK, D.; MENCKE, N., BRANDÃO-FILHO, S. P.; ALVES, L. C.; OTRANTO, D. Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. *Parasitology Research*, v. 106, n. 4, p. 857-860, 2010.

DIAS, S. S.; PINHEIRO, P. H. C.; KATZ, S.; DOS SANTOS, M. R. M.; BARBIÉRI, C. L. A recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) chagasi* suitable for serodiagnosis of american visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 72, n. 2, p. 126–132, 2005.

DINIZ, A.S.; MELO, M.S., BORGES, A.M.; BUENO, R.; REIS, B.P.; TAFURI,W.L.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs. *Veterinarian Pathology*, v. 42, p. 650–658. 2005.

ELHIJA, M. A.;POTASHNIK, H.;LUNENFELD, E.;POTASHNIK, G.;SCHLATT, S.;NIESCHLAG, E.;HULEIHEL, M. Testicular interleukin-6 response to systemic inflammation. *European Cytokine Network*, v. 16, n. 2, p. 167-72, 2005.

EVANS, T. G.; SMITH, D.; PEARSON, R. D. Humoral Factors and Nonspecific Immune Suppression in Syrian Hamsters Infected with *Leishmania donovani*. *The Journal of Parasitology*, v. 76, n. 2, p. 212-217, 1990.

FALEIRO, R. J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.;ENGWERDA, C. R. Immune Regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v. 8, n. 7, p. e2914, 2014.

FARREL, J. P. *Leishmania donovani*: Acquired Resistance to Visceral Leishmaniasis in the Golden Hamster. *Experimental Parasitology*, v.40, p.89-94, 1976.

FERREIRA NETO, J.M., VIANA, E.S., MAGALHAES, L.M. Patologia Clínica Veterinária. 2<sup>a</sup> Edição. Belo Horizonte: Editora Rabelo, 1982, p. 293.

FIJAK, M. AND MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. *Immunological Reviews*, v. 213, p. 66–81, 2006.

FORTES, E, Parasitologia veterinária. 4. ed. Porto Alegre: Sulina, 2004, p. 607.

FREITAS, E.; MELO, M. N.; COSTA-VAL, A. P.; SUZAN, M.; MICHALICK, M. Transmission of *Leishmania infantum* via bloodtransfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, v. 137, p. 159–167, 2006.

GUERRA, J. A. O.; BARROS, M. L. B.; FÉ, N. F.; GUERRA, M. V. F.; CASTELLON, E.; PAES, M. E. G.; SHERLOCK, Í. A. Leishmaniose visceral entre índios no Estado de Roraima, Brasil. Aspecto clínico epidemiológicos de casos observados no período de 1989 a 1993. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 37, n. 4, p. 305-311, 2004.

GONZALES, J. L.; GALLEGOS, E.; CASTAÑO, M. et al. Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with *Leishmania donovani*. *British Journal of Experimental Pathology*, v. 64, p.518-523, 1983.

HEDGER M. P.; MEINHARDT, A. Cytokines and the immune-testicular axis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 58, p. 1-26, 2003.

HEDGER M.P.; HALES D.B. Immunophysiology of the male reproductive tract. In: NEILL, J. D. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3<sup>rd</sup>ed. New York: Elsevier, 2006, p.1195-1286.

HOLZMULLER, P.; CAVALEYRA, M.; MOREAUX, J.; KOVACIC, R.; VINCENDEAU, P.; PAPIEROK, G.; LEMESRE, J. Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania*

infected macrophages produce IFN gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 106, p. 247-257, 2005.

HULEIHEL, M.; LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology*, v. 6, p. 259-268, 2004.

JARVIS, J. N.; LOCKWOOD, D. N. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Current Opinion in Infectious Disease*, v. 26, p.1-9, 2013.

JERONIMO, S. M.; OLIVEIRA, R. M.; MACKAY, S.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, p. 386-8, 1994.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 9<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1999, p. 100-108.

KANE M. M, MOSSER D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *Journal of Immunology*, v. 166, p.1141-1147, 2001.

KAUR, G.; MITAL, P.; DUFOUR, J.M. Testis immune privilege - Assumptions *versus* facts. *Animal Reproduction*, v.10, n.1, p.3-15, 2013.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*, v. 30, p.1-19, 2014.

LABAT, É.; CARREIRA, J. T.; MATSUKUMA, B. H.; MARTINS, M. T. A.; LIMA, V. M. F.; BOMFIM, S. R. M.; PERRI, S. H. V.; KOIVISTO, M. B. Qualidade espermática de sêmen de cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 62, n.3, p.609-614, 2010.

LAFUSE, W. P.; STORY, R.; MAHYLIS, J.; GUPTA, G.; VARIKUTI, S.; STEINKAMP, H.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. *Leishmania donovani* infection induces anemia in

hamsters by differentially altering erythropoiesis in bone marrow and spleen. *PLoS one*, v. 8, n. 3, p. e59509, 2013.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil - A Review. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages, dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 2, n. 83, p. 1-8, 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Caderno de Saúde Pública*, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MALAFIAIA, G.; REZENDE, S. A. The dual role of neutrophils in the infection of parasites of *Leismania* genus: a brief discussion. *Revista de Saúde e Biologia*, v. 4, n.1, p. 38-44, 2009.

MANNA, L.; PACIELLO, O.; MORTE, R. D.; GRAVINO, A. E. Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report. *Parasites and Vectors*, v. 5, n. 216, p. 1-4, 2012.

MARCONDES, J. S.; FEITOSA, F. L. F.; IKEDA-GARCIA, F. A.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. Evaluation of serum proteinogram of dogs naturally infected with *Leishmania chagasi* with and without neurological symptoms. *Revista Brasileira de Clínica Veterinária*, v. 13, n. 1, p. 20-24, 2006.

MARCONDES, M.; ROSSI, C. N. Visceral leishmaniasis in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinarian Research and Animal Science*, v. 50, n. 5, p. 341-352, 2013.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SOUZA, W. J. S.; TOLEDO, L. M.; GRIMALDI JR., G.; MOMEN, H.; PACHECO, R. S.; SABROZA, P. C.; DE SOUZA, M.; RANGEL JR, F. B.; TRAMONTANO, N. C. Canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 349-357, 1985.

MCCALL, L.; ZHANG, W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLOS Pathogens*, v. 1, n. 1, p. e1003053, 2013.

MCFARLANE, E; CARTER, K. C.; MCKENZIE, A. N.; KAYE, P. M.; BROMBACHER, F.; ALEXANDER, J. Endogenous IL-13 Plays a Crucial Role in Liver Granuloma maturation during *Leishmania donovani* infection, independent of IL-4Ra-responsive macrophages and neutrophils. *The Journal of Infectious Diseases*, v.204, p. 36-43, 2011.

MCKEON, G. P.;NAGAMINE, C. M.;RUBY, N. F; LUONG, R. H. Hematologic, Serologic, and Histologic Profile of Aged Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, v. 50, p. 308-316, 2011.

MEINHARDT, A.; HEDGER, M. P. Immunological, paracrine and endocrine aspects of testicular immune privilege. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 335, p. 60–68, 2011.

MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, p. 41-45, 2004.

MENDES, W. S.; DA SILVA, A. A. M.; TROVÃO, J. R.; DA SILVA, A. R.; COSTA, J. M. L. Expansão espacial da leishmaniose visceral americana em São Luis, Maranhão, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 3, p. 227-231,2002.

MICHALICK, M. S. M.; GENARO, O. Leishmaniose visceral Americana. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**. 11<sup>a</sup>. Edição. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 69-82.

MILES, S. A; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M. B.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 201, n. 5, p. 747-754, 2005.

MIR, F.; FONTAINE, E; REYES-GOMEZ, E.; CARLUS, M.; FONTBONNE, A. Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog. *Journal of Small Animal Practice*, v. 53, p. 419-422, 2012.

MONTEIRO, É. M.; DA SILVA, J. C. F.; DA COSTA, R. T.; COSTA, D. C.; BARATA, R. A.; DE PAULA, E. V.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; ROCHA, M. F.; FORTES-DIAS, C. L.; DIAS, E. S. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e a infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n. 2, p. 147-152, 2005.

MOREIRA, N. D. D.; VITORIANO-SOUZA, J.; ROATT, B. M.; VIEIRA P. M. D. A.; KER, H. G.; CARDOSO, J. M. O.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; LANA, M.; REIS, A. B. Parasite Burden in Hamsters Infected with Two Different Strains of *Leishmania (Leishmania) infantum*: “Leishman Donovan Units” versus Real-Time PCR. *PLoS one*, v. 7, n.10, p. e47907, 2012.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunology Review*, v. 240, v. 1, p. 286-96, 2011.

NISHIDA, J.; LI, Y.; ZHUANG, Y.; HUANG, Z.; HUANG, H. IFN- $\gamma$  suppresses permissive chromatin remodeling in the regulatory region of the IL4 gene. *Cytokine*, v. 62, p. 91–95, 2013.

O'DONNEL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, v.22, n.3, p. 289-318, 2001.

OLIVEIRA, A. L. L.; PANIAGO, A. M. M.; DORVAL, M. E. C.; OSHIRO, E. T.; LEAL, C. R.; SANCHES, M.; DA CUNHA, R. V.; BÓIA, M. N. Foco emergente de leishmaniose visceral em Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 5, p. 446-450, 2006.

OLIVEIRA, V.V.G.; ALVES, L.C.; SILVA JUNIOR, V. A. Patologias genitais associadas à leishmaniose visceral canina. *Ciência Rural*, v.42, n.9, p.1614-1620, 2012.

OTT, K. J.; HANSON, W. L.; STAUBER, L. A. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. *The Journal of Parasitology*, v. 53, n. 3, p. 641-645, 1967.

OWENS, S.; OAKLEY, D.; MARRYOTT, K. et al. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English Foxhounds to anemic dogs. *Journal of the American Veterinarian Medical Association*, v. 219, p. 1076-1083, 2001.

PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 122, p. 1-9, 2014.

PEARSON, R. D.; WHEELER, D. A.; HARISSON, L. H.; DAVID KAY, H. The Immunobiology of Leishmaniasis. *Clinical Infectious Disease*, v.5, n.5, p.907-927, 1983.

PESSOA, C. A. Rodentra – Roedores de companhia (hamster, gerbil, cobaia, chinchila, rato). In: CUBAS, Z. S.; SILVA, I. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, 2007, p. 432-474.

PINEDA, J.A.; MACÍAS, J.; MORILLAS, F.; FERNÁNDEZ-OCHOA, J.; CARA, J.; DE LA ROSA, R.; MIRA, J.A.; MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; GONZÁLEZ, M.; DELGADO, J.; ACEDO, C.; LISSEN, E. Evidence of Increased Risk for *Leishmania infantum* infection among HIV-Seronegative intravenous drugusers from southern Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v. 20, p. 354–357, 2001.

POCAI, E. A.; FROZZA, L.; HEADLEY, S. A.; GRAÇA, D. L. Leishmaniose visceral (Calazar). Cinco casos em cães de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

PRAZERES, J. L.; XIMENES, A. M.; DE FREITAS, R. M.; GONÇALVES, R. P. Laboratory investigation of adult patients with visceral leishmaniasis of a public hospital of Fortaleza, in the period 2007-2008. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 12, n. 2, p. 173-179, 2013.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Visceral leishmaniasis: clinical and epidemiological features of children in an endemic area. *Jornal de Pediatria*, v. 80, n. 2, p. 141-146, 2004.

QUINTAL, A. P. N., RIBEIRO, E. S., RODRIGUES, F. P., ROCHA, F.S., FLOETER-WINTER, L.M., NUNES, C. M. *Leishmania* spp. In *Didelphis albiventris* and *Micoureus paraguayanus* (Didelphimorphia: Didelphidae) of Brasil. *Veterinary Parasitology*, v. 176, p. 112-119, 2011.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVICH, M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorus vacuoles: live imaging of co-infected macrophages. *Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 12, p.905-913, 2010.

REINE, N. Infection and Blood Transfusion: A Guide to Donor Screening. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 19, n.2, p. 68-74, 2004.

REQUENA, J. M.; SOTO, M.; DORIA, M. D.; ALONSO, C. Immune and clinical parameters associated with *Leishmania infantum* infection in the golden hamster model. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.76, p. 269-281, 2000.

REY, L. C.; MARTINS, C. V.; RIBEIRO, H. B.; LIMA, A. A. M. Leishmaniose visceral americana (calazar) em crianças hospitalizadas de área endêmica. *Jornal de Pediatria*, v. 81, n. 1, p. 73-78, 2005.

REY, Luís. Parasitologia:parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p. 883.

RIBEIRO-DE-JESUS, R.; ALMEIDA, R.P.; LESSA, H.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 31, n. 1, p. 143-148, 1998.

RIERA, C.; VALLADARES, J.E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. *Parasitology Today*, v. 12, p. 412, 1996.

RODGERS, M.R.; POPPER, S.J.; WIRTH, D.F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology*, v. 71, p. 267-275, 1990.

ROSYPAL, A. C. Characterization of canine leishmaniasis in the United States: pathogenesis, immunological responses, and transmission of an American isolate of *Leishmania infantum*. 2005. Thesis (PhD) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, VA, EUA.

ROSYPAL, A. C.; LINDSAY, D. S. Non-sand fly transmission of a North American isolate of *Leishmania infantum* in experimentally infected BALB/c mice. *Journal of Parasitology*, v. 91, p. 1113-1115, 2005.

SAPORITO, L.; GIAMMANCO, G. M.; DE GRAZIA, S.; COLOMBA, C. Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immune compromised host. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, p. 572-576, 2013.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.1, n. 1, p. 20, 2007.

SILVA, F. L.; RODRIGUES, A. A. M.; REGO, I. O. P.; SANTOS, R. L. H.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital

lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Veterinary Parasitology*, v. 151, p. 86-90, 2008.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M. A.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 160, p. 55-59, 2009.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia Humana – Uma abordagem integrada. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, p. 957.

SOTO, M.; RAMIREZ, L.; PINEDA, M. A.; GONZALEZ, V. M.; ENTRINGER, P. F.; OLIVEIRA, C. I.; NASCIMENTO, I. P.; SOUZA, A. P.; CORVO, L.; ALONSO, C.; BONAY, P. Searching genes encoding *Leishmania* antigens for diagnosis and protection. *Scholarly Research Exchange*, v. 209, p. 1-25, 2009.

SOUZA, M. A. DA SILVA, A. G.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; JUNIOR, S. F.; FERREIRA, M. S. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n.2, p.137-141, 2005.

STAUBER, A. L. Characterization of Strains of *Leishmania donovani*. *Experimental Parasitology*, v. 18, p. 1-11, 1966.

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. *The Lancet*, v. 1,p. 127-132, 1960.

THAKUR,A. K.; BIMAL, S.; SINGH, S. K.; GUPTA, A. K.; DAS, V.N.R.; DAS, P.; NARAYAN, S. Degree of anemia correlates with increased utilization of heme by *Leishmania donovani* parasites in visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, v. 135, p. 595-598, 2013.

THARAKARAM, S. Charles Donovan, MD, Indian medical service. *Liverpool Medical History Science*, p. 56-58, 1999.

TURCHETTI, A. P.; SOUZA, T. D.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *Journal of Infection in Developed Countries*, v. 8, n. 4, p. 403-407, 2014.

WEINBAUER, G. F.; LUETJENS, C. M.; SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. Physiology of testicular function. P. 37-38. In: NIESCHLAG, E.; BEHRE, H. M.; NIESCHLAG, S. Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction, Berlin: 3rd edition, spring editor, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis.** 2012. Disponível em: <[http://new.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en](http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=3835&Itemid=4098&lang=en)>. Acesso em: 6 jun. 2014.

WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Refinement of techniques for the propagation of *Leishmania donovani* in hamsters. *Acta Tropica*, v. 97, p. 364–369, 2006.

YOSHIDA, E. L. A.; CUBA, C. A. C.; PACHECO, R. S.; CUPOLOLLO, E.; TAVARES, C. C.; MACHADO, G. M. C.; MOMEN, H. Description of *Leishmania (Leishmania) forattinii* sp., a new parasite infecting opossums and rodents in Brazil. *Memória do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, n. 3, p. 397-406, 1993.

## 8. ANEXOS

### Anexo1 - Protocolo do Comitê de Ética e Pesquisa



**UNIUBE**  
Educação e Responsabilidade Social

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-016/2014

Uberaba, 20 de março de 2015

Ilmo. Prof.

André Belico de Vasconcelos

**Assunto:** Encaminha processo nº 004/2014, sobre o protocolo de Pesquisa "Leishmaniose visceral em hamsters machos experimentalmente infectados".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 28/04/2014, sendo considerado aprovado.

Atenciosamente,

**Dra. Socorro Siqueira Bittar**

Coordenadora do CEEA-UNIUBE

## **Anexo 2 - Protocolo de recuperação da *Leishmania*(*Leishmania*) *infantum***

1. Após eutanasiado, coloca o animal em decúbito lateral com lado esquerdo voltado para cima.
2. Uso de pinça dentada e tesoura romba para retirar pele/pelos, abrindo a cavidade abdominal.
3. Uso de pinça lisa e tesoura fina para abrir a musculatura e peritônio. Retira o baço e coloca em placa de Petri com PBS. (O mesmo procedimento pode ser realizado com fígado).
4. O baço deve estar aumentado e com coloração rubra (vermelho escuro) e textura borrachuda. Não usar baço com pontos brancos (fibrose) e nem vermelho claro, já que não se consegue recuperar amastigotas.
5. Remove todo o excesso de gordura e picota o tecido em pedaços médios.
6. Macera o tecido do baço na região fosca entre lâminas de vidro, esmagando-os dentro da placa de Petri com PBS.
7. Retira o PBS da placa e coloca em tubo falcon de 15 ml.
8. Centrifuga o tubo falcon a 500rpm por 5 minutos e transfere o sobrenadante para outro falcon. Com isso, consegue eliminar uma parte da sujeira do baço.
9. Centrifuga novamente a 3500rpm por 5 minutos para concentrar mais os parasitas, descartando o sobrenadante.
10. Resuspende em PBS (4ml/baço).
11. Retira uma alíquota do conteúdo resuspendedido, até 1 ml dependendo do volume que se tem e faz-se a diluição em um pequeno volume (1:50) em PBS.
12. Adiciona o mesmo volume de ACK. Para um baço, usa-se volume inferior, para não desperdiçar. ACK melhora o aspecto do sobrenadante causando hemólise e facilitando a contagem das formas amastigotas, entretanto estes perdem a infectividade.
13. Após adicionar o ACK, homogeneizar bem e deixar por 10 minutos à temperatura ambiente.
14. Faz a contagem em Câmara de Newbauer.

## **Anexo 3 - Protocolo de Imunofluorescência**

Após realização dos cortes histológicos em parafina, as lâminas são submetidas aos tratamentos para inibir a auto fluorescência do tecido e posteriormente marcação imune do Parasito.

### **1. Desparafinização**

- a. Xitol 3 por 15 min
- b. Xitol 2por 15 min
- c. Xitol 1por 15 min
- d. Álcool absoluto 3por 1 min
- e. Álcool absoluto 2por 1 min
- f. Álcool absoluto 1por 1 min
- g. Álcool 95% por 1 min
- h. Álcool 85% por 1 min
- i. Álcool 70% por 1 min
- j. Água corrente por 20 min
- k. Água destilada por 5 min
- i. Tirar o excesso de água do carrinho com papel toalha

### **2. Tratamento com Cloreto de Amônia**

- a. Cloreto de amônia a  $50\mu M$  diluído em etanol por 1 hora
  - i. 10% amônia para 95% de etanol

### **3. Bloqueios**

- a. Uma clara de ovo (albumina) em 100mL de água destilado por 15 min
  - i. Fazer 10 lavagens em água
- b. Leite em pó desnatado (Molico)
  - i. 15g de leite em pó diluídos em 90mL de água
  - ii. Deixar overnight
  - iii. Fazer 20 lavagens em água

#### **4. Marcação**

##### **a. Primário**

- i.** Anticorpo *Leishmania donivani* 1:100
- ii.** 500 $\mu$ l cobre 1 lâmina de tecido
  1. 5 $\mu$ l de soro + 495 $\mu$ l de pgn saponina
  2. Deixar overnight em câmara úmida e escura
  3. Fazer 10 lavagens em PBS 1X

##### **b. Secundário**

- i.** Dapi ou Topro 1:500 para marcar núcleo
- ii.** Alexa flúor (verde) 488 – usar 1:200
  1. Para 1 lâmina de tecido
    - a. 1 $\mu$ ldapi + 2,5 $\mu$ l de Alexa + 496,5 $\mu$ l de pgn saponina
  2. Deixar por 2 horas
  3. Fazer 10 lavagens com PBS 1X
  4. Secar o excesso na lâmina com papel toalha

#### **5. Selagem da lâmina**

- a. Colocar PPD
- b. Colocar lamínula por cima e vedar lâmina com esmalte
- c. Armazenar em local escuro e em geladeira até a visualização
  - i. Ideal marcar e já verificar a marcação.