UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

Naira Ferreira Anchieta

Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis
produzidos por cultura de células e animais infectados com
Leishmania infantum

Ribeirão Preto - SP

2016

NAIRA FERREIRA ANCHIETA

Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos por cultura de células e animais infectados com *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr^a Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos

Ribeirão Preto - SP

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

Anchieta, Naira Ferreira

Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos por cultura de células e animais infectados com *Leishmania infantum*; Orientadora: Prof.^a Dr.^a Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos – Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

75 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, 2016

1. Compostos Orgânicos Voláteis. 2. *Leishmania infantum*. 3. *Lutzomyia longipalpis*.

Nome: **Naira Ferreira Anchieta**

Título: Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos por cultura de células e animais infectados com *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto – USP para
obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS:

A Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida. Sei que sem tua presença, teria sido impossível continuar e chegar aonde cheguei. Agradeço a ti pelas provocações, pois através delas pude amadurecer; pelas lágrimas derramadas, pois elas me tornaram mais fortes; pela ausência das pessoas que amo, pois através dela pude ver o quanto são importantes na minha vida. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, Gicelda e Márcio, amores da minha vida, que fazem de tudo pela minha felicidade, realizando todos os meus sonhos. Só tenho a agradecer a Deus todos os dias por ter vocês como pais. Obrigada pela compreensão, em suportar pacientemente a distância durante esse tempo. Vocês são a razão de tudo isso, e é a vocês que ofereço esta conquista. Amo vocês.

A minha irmã Naiane, pela paciência com a minha “falta de tempo” e por sempre me dar forças para enfrentar meus desafios.

Ao meu namorado, Davi, pela paciência, pelas palavras de incentivo, gestos de compreensão, atitudes de segurança e força, mesmo nos períodos de desânimo. Obrigada por caminhar ao meu lado. Obrigada pelo amor, amizade, e pelo companheirismo.

A minha orientadora, Dra. Isabel K. F.M Santos, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo e por me impulsionar ao caminho da ciência. Sua “fome” por conhecimento sempre será lembrada.

Ao Dr. André Sarria, um ser de luz que apareceu em meu caminho e me ensinou muito de ciência, mas também de como ser uma pessoa melhor. Obrigada André pelo exemplo, pela compreensão, dedicação e por sempre me ajudar em qualquer momento.

Ao Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por compartilhar seu laboratório e seus conhecimentos.

Ao Dr. Eduardo José Crevelin, pela ajuda com o CG/EM, pela paciência e por sempre ajudar com minhas dúvidas.

Aos companheiros de laboratório, Gustavo Garcia, Thiago Malardo, Priscila Fonseca, Rafael Cazarotti, Luiz Gustavo Almeida e Ana Milan. A Amanda Zangiloro pela amizade e pelas palavras de apoio e amor. A Josiane Carvalho, por ser minha dupla, meu Robin, meu Xororó, meu Bino.

A técnica Dorlei Santos, a mamãe, pelo amor, amizade e cuidado que sempre teve comigo. Ao técnico Carlos Alberto Vieira pelo apoio e ajuda no laboratório.

Aos meus amigos do coração Pedro Sampaio, Amanda Goulart, Karoline Biffi, Rafaela Felício, Ítala Silva, Leandro Ávila, Luna Lacerda, Bruna Bertol e Rômulo Oliveira, pelo apoio, risadas e amizade. Ter vocês ao meu lado com certeza deixou tudo mais leve.

Aos técnicos Wander, Mara, Aninha, Wendy e Iza pela ajuda nos experimentos, discussões científicas, amizade e momentos alegres.

As amigas de Alfenas, Natália, Priscila e Marina. Mesmo distantes nossa amizade nunca se apagou.

A secretária da pós-graduação Ana Cristine pela sua eficiência e auxílio durante minha jornada de mestranda.

À banca avaliadora pela participação e pela disponibilidade.

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho, meus sinceros agradecimentos.

*“Embora ninguém possa voltar
atrás e fazer um novo começo,
qualquer um pode começar
agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

ANCHIETA, N. F. **Caracterização do perfil de compostos orgânicos voláteis produzidos por cultura de células e animais infectados com *Leishmania infantum***. 2016. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Alguns parasitas modificam o perfil de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) de seus hospedeiros na tentativa de atrair/dispersar seus vetores, assegurando a propagação do parasita e a manutenção do ciclo da doença. É sabido que o mosquito *Lutzomyia longipalpis*, vetor da Leishmaniose Visceral (LV) são mais atraídos por cães infectados que não infectados. Este trabalho tem como objetivo identificar e caracterizar os Compostos Orgânicos Voláteis emitidos por culturas de células e hamsters infectados *Mesocricetus auratus* com *Leishmania infantum* (MHOM/74/PP75). Células aderentes mononucleares de baço de hamsters foram separadas com Ficoll e distribuídas em placas de 24 poços com 2×10^6 células por poço. Após 42 horas, as células foram infectadas e os COVs foram coletados por “headspace” por 18 horas. Os COVs foram determinados por comparação com as placas controle: controle células aderentes mononucleares, controle *L. infantum*, e controle meio RPMI 1640.40 Hamsters foram subdivididos em 2 grupos: 20 animais foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. infantum* selecionadas com aglutinina de amendoim (PNA) por via intracardíaca com 1×10^7 parasitas. Os animais foram acompanhados por 4 meses pós infecção e as amostras foram coletadas colocando os animais em sacos de poliéster conectados com um tubo de metal recheado com Tenax TA acoplado a uma bomba de sucção automática por 10 minutos. Todas as amostras foram analisadas por dessorção térmica via Cromatografia gasosa/ Espectrometria de Massas (CG-EM). Nas culturas de células, 2 compostos estão presentes apenas nas culturas infectadas: 1,2-difenil-ciclobutano e (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido. O 2,4-dimetil-benzaldeído estava presente na placa controle contendo meio RPMI 1640. Por outro lado, em ambas as placas infectadas e controle com células aderentes mononucleares, o 3-metileno-heptano estava presente. Outros compostos contendo os grupos químicos aldeídos ou álcoois ou hidrocarbonetos aromáticos foram detectados em todas as placas, mas com diferentes áreas de pico (quantidade). Quando comparamos os COVs emitidos por hamsters infectados e controles, nenhuma diferença foi encontrada. Os compostos emitidos por culturas de células infectadas mostram que a infecção com *L. infantum* é capaz de modificar o perfil de COVs em culturas de células. Outros compostos

encontrados em todas as placas, mas com diferentes áreas de pico podem indicar que a infecção aumenta a liberação de algumas substâncias que são possíveis atrativos para vetores.

Palavras-chave: *Leishmania infantum*; Compostos Orgânicos Voláteis; *Lutzomyia longipalpis*; Células Aderentes Mononucleares.

ANCHIETA, N. F. **Characterization of the profile of volatile organic compounds produced by cell cultures and animals infected with *Leishmania infantum***. 2016. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Some parasites can modify their hosts Volatile Organic Compounds (VOCs) profile in order to attract / disperse their vectors, ensuring spreading of the parasite and maintenance of the disease cycle. It is already known that *Lutzomyia longipalpis* sandflies, the vectors of Visceral Leishmaniasis (VL), are more attracted to infected than to non-infected dogs. This work aims to identify and characterize the VOCs emitted by cell cultures and hamsters *Mesocricetus auratus* infected with *Leishmania infantum* (MHOM/74/PP75). Spleen adherent mononuclear cells of hamsters were separated with Ficoll and distributed in flat-bottomed 24-well plates at 2×10^6 cells per well. After 42 hours, the cells were infected and VOCs were collected from the "headspace" for 18 hours. The VOCs were determined in comparison with the controls plates: control mononuclear adherent cells, control *L. infantum* and control medium RPMI 1640. 40 Hamsters were subdivided in two groups: 20 animals were used as a control group and 20 animals were infected with metacyclic form of *L. infantum* selected by peanut agglutinin (PNA) by intracardiac route with 1×10^7 parasites. The animals were followed up for 4 months post-infection and the samples were collected by introducing the hamsters in a polyester bag connected with a metal tube filled with the Tenax TA adsorbent coupled to an automatic suction pump for 10 minutes. All samples were analyzed by thermal desorption via Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC-MS). In cell cultures, two compounds were present only in infected cultures: 1, 2-diphenyl cyclobutane, and trans-[(2, 3-Diphenylcyclopropyl) methyl] phenyl sulfoxide. 2, 4-dimethyl benzaldehyde was present in the control well containing RPMI 1640 medium. On the other hand, in both infected and control wells with mononuclear adherent cells, 3-methylene heptane was present. Other compounds containing either aldehydes or alcohols or aromatic hydrocarbon chemical groups were detected in all plates, but with different peak areas (i.e., amounts). When comparing the VOCs emitted by infected and control hamsters, no difference was found. The compounds emitted only by infected cell cultures show that the infection with *L. infantum* is able to modify the profile of VOCs in cell cultures. The other compounds found in all plates but with

different peak areas may indicate that infection may increase the release of some substances that are possible attractants for vectors.

Keywords: *Leishmania infantum*; Volatile Organic Compounds; *Lutzomyia longipalpis*; spleen adherent mononuclear cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida assexuado dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> . Retirado e adaptado de (Kaye and Scott, 2011).....	22
Figura 2 - Cápsula de vidro usada para coleta de COVs em placas de cultura de células	37
Figura 3 - Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles	43
Figura 4 - <i>Heat map</i> dos compostos orgânicos voláteis emitidos por cultura de células infectadas <i>in vitro</i> comparado com os grupos controle	44
Figura 5 - Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles	45
Figura 6 - Espectros de massas e estruturas dos COVs detectados em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles	46
Figura 7 - Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.	47
Figura 8 - Espectro de massas e estrutura do COV detectado em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.	47
Figura 9 - Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.....	49
Figura 10 - Espectros de massas e estruturas do COVs detectados em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.	50
Figura 11 - Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.....	51
Figura 12 - Espectros de massas e estruturas do COVs detectados em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles..	51
Figura 13 - Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.....	53
Figura 14 - Espectros de massas e estruturas do COVs detectados em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.	54

Figura 15 - ; Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles.....	55
Figura 16 - Espectro de massas e estrutura do COV detectado em <i>headspace</i> de cultura de células infectadas <i>in vitro</i> e seus controles..	55
Figura 17 - Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados a partir de amostras de DNA de baço de hamsters infectados.....	56
Figura 18 - Cromatograma comparativo dos COVs coletados no <i>headspace</i> de hamsters infectados com <i>L. infantum</i> e controles	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de cPCR.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.aegypti- *Aedes aegypti*

A.gambiae- *Anopheles gambiae*-

CG- Cromatografia Gasosa

CG/EM- Cromatografia Gasosa acoplada á Espectrometria de Massas

CI- cultura com células mononucleares infectadas com *L. infantum*

CL- cultura de *L. infantum*/ *chagasi* (PP75)

CLM- cultura de leucócitos mononucleares

COVs- Compostos Orgânicos Voláteis

G. morsitans- *Glossina morsitans*

IFN- γ - Interferon-gama

IgG- Imunoglobulina G

IL-10- Interleucina 10

IL-12- Interleucina 12

IL-2- Interleucina 2

IL-4- Interleucina 4

L. infantum- *Leishmania infantum*

L. longipalpis- *Lutzomyia longipalpis*

LCD -leishmaniose cutânea difusa

LMC - leishmaniose mucocutânea

LV- leishmaniose visceral

M. auratus- *Mesocricetus auratus*

M- placa contendo somente meio de cultura RPMI 1640 completo

MHC- Genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade

N. neivai- *Nyssomyia neivai*

ORN's- neurônios receptores olfativos

P. chabaudi- *Plasmodium chabaudi*

PNA- Lectina de Amendoim

TD- Dessorção térmica

TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta

Th1- Linfócito T *helper* tipo I

Th2- Linfócito T *helper* tipo II

TNF- α - Fator de necrose tumoral do tipo alfa

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	20
1.1 As Leishmanioses	20
1.2 O parasita e ciclo biológico	21
1.3 O vetor e mecanismos envolvidos na busca por alimento: importância dos compostos orgânicos voláteis	24
1.4 Dessorção térmica e cromatografia	28
2.0 HIPÓTESE DO TRABALHO	32
3.0 OBJETIVOS	34
4.0 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Animais	36
4.2 Parasitos	36
4.3 Infecção de células <i>in vitro</i> e coleta de voláteis	36
4.3.1 Obtenção de leucócitos mononucleares a partir do baço de hamsters	36
4.3.2 Infecção <i>in vitro</i>	37
4.3.3 Coleta de voláteis	37
4.4 Infecção de hamsters e coleta de voláteis	38
4.4.1 Infecção experimental	38
4.4.2 Coleta de voláteis dos hamsters	38
4.4.3 Confirmação da infecção dos hamsters	39
4.4.3.1 Extração de DNA das amostras de baço	39
4.4.3.2 Reação em Cadeira da Polimerase-PCR	40
4.5 Análises por CG/EM	40
4.6 Análise de dados	41
5.0 RESULTADOS	43
5.1 Perfil de voláteis produzidos por culturas de leucócitos mononucleares aderentes de hamster infectados <i>in vitro</i> com <i>L. infantum</i>	43

5.1.1 COVs encontrados somente no <i>headspace</i> de culturas infectadas com <i>L. infantum</i>	44
5.1.2 COV encontrado em somente duas condições experimentais	46
5.1.3 COVs encontrados em todas as condições experimentais	47
5.1.3.1 Álcoois	48
5.1.3.2 Aldeídos	50
5.1.3.3 Compostos aromáticos	52
5.1.4 COV presente somente na amostra meio RPMI 1640	54
5.2 Perfil de voláteis de hamsters infectados com <i>L. infantum</i>	55
6.0 DISCUSSÃO	59
7.0 CONCLUSÃO	65
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

Introdução:

1.0. INTRODUÇÃO:

1.1. As leishmanioses:

As Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas (Hotez et al., 2004) causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Tripanossomatidae e ao gênero *Leishmania*. Este gênero possui inúmeras espécies de protozoários flagelados unicelulares que são agentes causadores de enfermidades em diversos hospedeiros em ciclos zoonóticos, antroponóticos e até em ciclos antroponóticos (Hotez et al., 2004; Lainson and Shaw, 1978; Tesh, 1995). O gênero é dividido em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania* baseado no local onde a forma promastigota se desenvolve no vetor (Lainson et al., 1977).

As leishmanioses representam mundialmente um grave problema de saúde pública, sendo a segunda infecção mais importante causada por protozoários, sendo superada somente pela malária (WHO, 2014). A Organização Mundial de Saúde indica uma prevalência de 900 mil a 1,3 milhões de casos ao redor do mundo, com uma taxa de mortalidade anual de 20 30 mil pessoas e incidência em mais de 98 países, sendo que 310 milhões de pessoas estão sob risco de infecção e doença

A doença pode apresentar-se em 4 diferentes formas: lesões ulcerativas na pele desenvolvidas no local na picada do mosquito (leishmaniose cutânea localizada-LC), múltiplos nódulos não-ulcerativos (leishmaniose cutânea difusa-LCD); inflamação destrutiva da mucosa (leishmaniose mucocutânea-LMC) e infecção visceral disseminada (leishmaniose visceral-LV) (Reithinger et al., 2007).

A LV é a forma mais grave das leishmanioses, representando um sério problema em vários países, sendo que 90% dos casos ocorrem em 6 países : Bangladesh,, Brasil, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2010). O continente americano possui três das quatro formas típicas da doença: a cutânea, a visceral e a mucocutânea (Bern et al., 2008; PAHO/WHO, 2016). Na América, o principal reservatório da *Leishmania infantum*, o agente etiológico da LV (Kuhls et al., 2011), é o cão, embora raposas e outros animais não domesticados também desempenham um papel de reservatórios em ambientes silvestres (Romero and Boelaert, 2010).

No Brasil, a LV atinge 20 estados, com elevação no número de casos aproximadamente a cada cinco anos. No ano de 2014 o número de casos confirmados de

Leishmaniose Visceral foi de 3453, com 239 casos de óbito, sendo as regiões Nordeste e Sudeste com maior prevalência da parasitose (Ministério da Saúde, 2014).

As orientações contidas no Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (Ministério da Saúde, 2006) são usadas para o controle da LV no país, sendo em linhas gerais: o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos; vigilância, monitoramento e controle do vetor e trabalhos de conscientização da população e dos profissionais de saúde.

Esses dados revelam um cenário desfavorável para a saúde pública no país, tendo em vista a necessidade dos órgãos de saúde expandirem suas áreas de atuação na prevenção e controle das leishmanioses. Nesse contexto, o presente trabalho busca abordar elementos da interação hospedeiro-parasito-vetor e investigar aspectos capazes de influenciar esta relação.

1.2. O parasita e ciclo biológico:

O parasito *Leishmania* encontra-se em 2 formas: amastigota e promastigota. A forma amastigota é intracelular, esférica ou fusiforme, medindo até 5 µm de diâmetro, contém um núcleo simples, um cinetoplasto e uma bolsa flagelar contendo um flagelo rudimentar. Esta forma é encontrada nos monócitos e macrófagos dos hospedeiros vertebrados infectados. A forma promastigota, extracelular, encontrada no interior do intestino do vetor flebotomíneo, é alongada, com um núcleo central, cinetoplasto em posição terminal e um flagelo bem desenvolvido. Ambas as formas se reproduzem por fissão binária longitudinal. Sendo assim, o parasita tem um ciclo de vida digenético, alternando entre o hospedeiro vertebrado e o vetor (Ashford, 2000; Bates, 2007; Killick-Kendrick, 1999; Lainson and Shaw, 1978).

O ciclo inicia-se quando o flebotomíneo fêmea ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. A alteração das condições do hospedeiro vertebrado para o intestino médio do vetor, tais como diminuição da temperatura e aumento de pH provocam alteração morfológica e desenvolvimento do parasita (Bates and Rogers, 2004; Kamhawi, 2006). Amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, que são as primeiras formas replicativas que proliferam logo após o repasto sanguíneo e são

separadas para o intestino médio por uma matriz peritrófica do tipo I. Após aproximadamente uma semana as formas diferenciadas promastigotas metacíclicas infectantes migram para a probóscide do mosquito e são inoculadas quando o mesmo realizar sua próxima refeição sanguínea no hospedeiro vertebrado (Kamhawi, 2006; Rogers et al., 2002; Theodos et al., 1991).

Figura 1 : Ciclo de vida assexuado dos parasitos do gênero *Leishmania*. Retirado e adaptado de (Kaye and Scott, 2011).

As formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos quando inoculadas no hospedeiro vertebrado e, conseqüentemente, o parasita se transforma para a forma amastigota. O parasita multiplica dentro dos macrófagos, lisando-os, e o ciclo continua com outros fagócitos do hospedeiro sendo infectados (Getachew, T et al., 2006). Nos casos de LV, todos os órgãos que contêm macrófagos e fagócitos podem ser infectados, especialmente os gânglios linfáticos, baço, fígado, e medula óssea (Hide et al., 2007).

Com relação a sintomatologia, a LV constitui uma forma severa devido à gravidade das manifestações clínicas e à alta letalidade a ela associada na ausência de tratamento. É caracterizada por apresentar febre irregular, indisposição, perda de peso, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e anemia (Arias, 1996; Badaro et al., 1986; Desjeux, 1992). Ainda são descritos sintomas como hemorragia, dor de cabeça, anemia, diarreia, falta de apetite, náusea, vômito, dor muscular, tosse, palidez, epistaxe, edema, pele ressecada e retardamento do crescimento em crianças (Maltezou et al., 2000; Silva et al., 2001).

As consequências, evolução e severidade da doença dependem da resposta imunológica expressa pelo hospedeiro, especialmente dos tipos de citocinas predominantes (Barral-Netto et al., 1992). O perfil dessas proteínas varia de acordo com fatores nutricionais, genéticos e aspectos inerentes ao parasita, como espécie, cepa e tamanho do inóculo (Grimaldi and Tesh, 1993). Nos períodos iniciais pós-infecção, ocorre modificação nas populações de linfócitos T, já tendo sido demonstrado que há uma relação entre o padrão de citocinas produzido e a manifestação de sinais clínicos (Pinelli et al., 1994). Esta associação é resultado da maior intensidade de carga parasitária, quando há uma menor produção de citocinas do tipo Th1 (Linfócito T *helper* tipo I) nos diversos órgãos.

Hospedeiros que produzem resposta do tipo Th1 desenvolvem imunidade do tipo celular contra o parasita, resultando em resistência à infecção (Pinelli et al., 1994), ocorrendo uma predominância de liberação de IFN- γ , TNF- α e IL-12, que entre outras coisas, promovem a produção e ativação de macrófagos, produção de óxido nítrico e apoptose celular (Carrillo and Moreno, 2009). Hospedeiros resistentes são caracterizados por baixas cargas parasitárias nos diversos órgãos (Manna et al., 2009) e não desenvolvem sinais clínicos (Pinelli et al., 1994).

Já na resposta imunológica do tipo Th2 (Linfócito T *helper* tipo II), são caracterizados por uma resposta imunológica do tipo humoral e consequente susceptibilidade à infecção. (Pinelli et al., 1994). Há uma predominância de IL-4, IL-10 e TGF- β , que inibem a produção de IFN- γ , IL-2 e a resposta do tipo celular (Menezes-Souza et al., 2011; Sato et al., 2000). Os anticorpos produzidos pela resposta humoral são incapazes de debelar a infecção, resultando em altas cargas parasitárias e aparecimentos de sinais clínicos da doença.

1.3. O vetor e mecanismos envolvidos na busca por alimento: importância dos compostos orgânicos voláteis:

A infecção por *L. infantum* provém de picadas de dípteros flebotomíneos infectados pertencentes à família *Psychodidae* e subfamília *Phlebotominae*, sendo a espécie vetora principal no Brasil *Lutzomyia longipalpis*. A distribuição do vetor coincide com os casos da doença na América Latina, sendo encontrados no domicílio e peridomicílio, onde as fêmeas podem alimentar-se de sangue de animais domésticos e silvestres (Lainson et al., 1990; Lane, 1986; Vexenat et al., 1994; Ximenes et al., 1999).

Esses insetos flebotomíneos medem aproximadamente de 2 a 3 mm, tem o corpo piloso, coloração clara (castanho claro ou amarelado) e são facilmente reconhecidos por seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (Rangel and Lainson, 2003)

O vetor alimenta-se regularmente de fontes naturais de açúcares, como seiva de plantas (Schlein and Warburg, 1986). Após a fecundação, a fêmea precisa de ao menos uma refeição sanguínea para que ocorra o amadurecimento dos folículos ovarianos. A fêmea deposita os ovos em um ambiente rico em matéria orgânica, que oferece abrigo, nutrição e umidade para as larvas. Os ovos possuem 0,3 a 0,5 mm de comprimento, cor branca e com o passar do tempo adquirem tonalidade marrom escura a preto. A forma larval surge em 12 a 19 dias, atingindo a fase adulta de 35 a 69 dias após a deposição dos ovos (Volf and Volfova, 2011).

A ação destes flebotomíneos é crepuscular noturna. A distribuição no ambiente é determinada por barreiras físicas, vegetação, luminosidade, precipitação pluviométrica e presença de hospedeiros vertebrados (Arias et al., 1985). Fatores físicos influenciam na busca pelo hospedeiro pelas fêmeas, como gradientes de umidade e temperatura (Nigam and Ward, 1991). O vetor *L. longipalpis* possui olhos com uma sensibilidade espectral semelhante a outros Dípteros, como a mosca *Glossina morsitans* (tsé-tsé) e o mosquito *Aedes aegypti*, que são conhecidos por usar a visão para guiar-se em direção ao hospedeiro (Mellor et al., 1996).

Além disso, a quantidade de flebotomíneos próximos as habitações humanas é influenciada pela presença de animais, aumentando os riscos de transmissão do parasita

para o homem (Ximenes et al., 1999). A literatura tem demonstrado que a aglomeração de flebotomíneos no peridomicílio está associada com a liberação de cairomônios pelos hospedeiros e feromônios pelos insetos (Dougherty et al., 1999). Os cairomônios podem ser emanções da pele (Hamilton and Ramsoondar, 1994), de fezes (Dougherty et al., 1995), dióxido de carbono (CO_2) e talvez secreções de glândulas especializadas, como a glândula uropigial de galinhas (Nigam and Ward, 1991). Os feromônios, como os hormônios sexuais da classe dos terpenos, por sua vez são liberados pelos machos, que atraem as fêmeas da mesma espécie (Hamilton and Ramsoondar, 1994; Hamilton and Ward, 1991; Lane et al., 1985). Quando entram em ação em conjunto, feromônios e cairomônios podem ter uma interação aditiva e a atração das fêmeas é aumentada (Bray and Hamilton, 2007; Nigam and Ward, 1991).

Estes cairomônios ou substâncias interespecíficas são compostos orgânicos, ou seja, substâncias químicas produzidas por hospedeiros e, quando liberadas, podem ser detectadas por receptores e antenas dos flebotomíneos durante o processo de procura e localização da fonte alimentar (Kelly et al., 1997). Essas moléculas são captadas por órgãos olfativos e são substâncias voláteis que se dispersam no ambiente formando plumas de odores (Andrade et al., 2008).

Os animais produzem numerosos compostos voláteis que são exalados pela pele, respiração, urina e fezes. A capacidade de detecção dessas substâncias depende da quantidade em que são produzidas e dispersadas/liberadas no ambiente, da distância entre o inseto e o hospedeiro, da velocidade do vento, turbulência e do contraste dos níveis emitidos e os níveis já presentes no ar (Knols and Meijerink, 1997).

A capacidade de certos compostos de agir na orientação de vários insetos já foi demonstrada em alguns estudos. O tetradecano, por exemplo, é um dos principais compostos liberados por galinhas, sendo capaz de atrair o *Culex annulirostris*, que transmite diversos vírus causadores de doenças humanas, como os vírus de “Ross River”, de “Barmah Forest”, de “Kunjin” e da encefalite do “Murray Valley” (Williams et al., 2003). O extrato aquoso das glândulas produtoras de odor anal e caudal de raposas da espécie *Vulpes vulpes*, bem como os compostos isolados desse extrato e também compostos sintéticos foram testados sobre o *L. longipalpis*, separadamente ou em conjunto, simulando o odor liberado pela raposa. Tanto o odor original quanto o sintético foram atrativos para o vetor e isoladamente, somente os compostos

benzaldeído, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona e 4-metil-2-pentanona foram capazes de estimular o mesmo efeito (Dougherty et al., 1999).

Compostos com potencial atrativo são os álcoois primários, que são liberados por plantas (Yajima et al., 1985), respiração de mamíferos e humanos (Xue et al., 2008), além do suor deste (Bernier et al., 2000). Os vetores *L. longipalpis* (da leishmaniose), *Glossina pallidipes* e *G. morsitans* (moscas tsé-tsé, vetores da tripanosomíase africana) são atraídos por 1-octen-3-ol, 1-nonanol e 1-heptanol (Hall et al., 1984; Magalhães-Junior et al., 2014a). Além disso, o vetor da leishmaniose cutânea na América do Sul, *Nyssomyia neivai*, foi mais atraído pelos álcoois hexanol e octanol em testes em túneis de vento (Machado et al., 2015).

Odores da mão de diferentes indivíduos, extraídos com solventes orgânicos não voláteis colocados em contato com o vetor *L. longipalpis* geram diferentes respostas atrativas, mostrando a significativa variação de atração entre os diferentes indivíduos (Rebollar-Tellez et al., 1999). O ácido L-lático, componente encontrado em abundância em humanos, foi atrativo para o mosquito da febre amarela, *A. aegypti* (Acree et al., 1968).

Além disso, fatores como gravidez e consumo de álcool podem induzir um aumento na atração de vetores. Mulheres grávidas são mais atrativas para o mosquito *Anopheles gambiae*, vetor da malária, fato que contribui para uma maior vulnerabilidade destas para a infecção com malária (Ansell et al., 2002). Além disso, o consumo de álcool por voluntários demonstrou um aumento na atração do mesmo vetor quando comparados a voluntários que consumiram água, sendo então o consumo de cerveja um fator de risco para malária (Lefèvre et al., 2010).

A capacidade de detectar e discriminar uma infinidade de produtos químicos originários de vários sítios é característico de insetos e é feito por meio da antena e palpos maxilares, que possuem neurônios receptores olfativos (ORN's). O uso de nonanal para atração de mosquitos do gênero *Culex* demonstrou ser um potente estímulo aos ORN's (Syed and Leal, 2009).

Além disso, a microbiota é um fator importante que atua na modificação dos odores do corpo humano (Shelley et al., 1953). As bactérias da pele podem converter compostos excretados, como sebo e suor, em compostos voláteis odoríferos. Sendo

assim, as bactérias podem participar da interação entre vetores das doenças (carrapatos, ácaros, mosquitos, triatomíneos) e os hospedeiros vertebrados, inclusive humanos. Além disso, o perfil de odores do corpo humano pode ser influenciado por fatores genéticos. Genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês *Major Histocompatibility Complex*) tem mostrado influência no odor corporal (Penn and Potts, 1998a; Yamazaki et al., 1976). Um estudo mostrou que os produtos voláteis produzidos pelas bactérias da pele humana quando cultivadas em placas de ágar *in vitro* são atraentes para *A. gambiae* (Verhulst et al., 2009). No entanto, ainda não é claro se as bactérias isoladas a partir de indivíduos menos atraentes produzem estes produtos voláteis e se outros substratos podem melhorar a produção de compostos voláteis ou se a produção destes produtos voláteis é específica para espécies de bactérias presentes apenas na pele humana. Estas questões merecem ser abordadas em estudos futuros em relação à atração de humanos para os vetores das leishmanioses.

Várias doenças de diversas etiologias podem modificar os odores exalados pelos pacientes (Penn and Potts, 1998b). Alterações nos compostos exalados na respiração e/ou alterações na microflora epidérmica do paciente podem ocorrer em virtude da presença de infecções (Braks et al., 1999; Smith et al., 1998). Como exemplo, fezes de pacientes com cólera (*Vibrio cholerae*) possuem um cheiro adocicado, quando comparado as fezes de pacientes saudáveis (Garner et al., 2009). Pacientes infectados com o vírus da febre amarela possuem um cheiro semelhante ao de um açougue (Liddell, K, 1976). Sendo assim, técnicas de detecção e identificação de compostos voláteis têm sido desenvolvidas para servirem como diagnóstico, com a vantagem de serem menos invasivas e indolores. A aplicação destas técnicas tem se mostrado útil na detecção de diversas patologias, tais como câncer de mama (Phillips et al., 2003), câncer pulmonar (Di Natale et al., 2003) e diabetes (Dalton et al., 2004).

Infecções parasitárias também podem induzir modificações fenotípicas no hospedeiro, fato que tem atraído a atenção de parasitologistas e ecologistas comportamentais (Thomas et al., 2005), tendo importância tanto para a ecologia como para a saúde humana. Um desses mecanismos pode ser o aumento da propagação do parasita, por meio da modificação do comportamento do vetor ou ainda alterar características no hospedeiro de forma a obter uma maior atração do vetor e consequente dispersão do vetor infectado (De Moraes et al., 2014).

Uma das modificações causadas no hospedeiro pode ser a liberação de um perfil diferenciado de voláteis emitidos pelo hospedeiro, também chamados de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs). Estes COVs ao serem liberados no ambiente podem exercer efeitos atrativos no vetor, garantindo assim a disseminação do parasito e a manutenção do ciclo da doença.

De Moraes e colaboradores (2014) mostraram uma clara diferença na emissão de voláteis entre os camundongos infectados e não infectados com malária. Além disso, ocorreu maior atração de *Anopheles stephensi* por camundongos infectados. Crianças infectadas com *Plasmodium falciparum* na fase gametocítica atraíram mais *A. gambiae* que crianças não infectadas ou infectadas com o estágio não infectante do parasita (Lacroix et al., 2005).

No caso da leishmaniose visceral canina, os vetores são mais atraídos para cães infectados por *L. infantum* do que em cães não infectados, sendo que esta preferência pode estar relacionada a diferentes odores exalados pelos animais infectados (Knols and Meijerink, 1997). Seis compostos foram encontrados em cães infectados que podem servir como biomarcadores para diagnóstico de LV (Magalhães-Junior et al., 2014b). Em hamsters *Mesocricetus auratus* observou-se que o vetor foi mais atraído por espécimes infectados por *L. infantum* e a análise por cromatografia gasosa dos odores exalados pelos hamsters revelou a presença de 10 picos de detecção de substâncias nos animais infectados que não foram detectados nos animais sadios (O'Shea et al., 2002). Portanto, a presença do parasita pode estar modificando o perfil de voláteis emitidos pelo hospedeiro, de modo a aumentar sua disseminação.

Neste contexto, a identificação das alterações na emissão de COVs pelo hospedeiro é de grande valia na identificação de fatores relacionados à atração de vetores por este hospedeiro, no sentido de impedir a disseminação da doença. Sendo assim, uma das técnicas amplamente utilizadas na identificação de COVs é a cromatografia gasosa, que por meio da análise do cromatograma se detecta voláteis emitidos por hospedeiros infectados.

1.4. Dessorção térmica e cromatografia:

A análise de compostos orgânicos voláteis por Cromatografia Gasosa (CG) têm sido relatada em diferentes trabalhos, como monitoramento do ar (Watson et al., 2011),

embalagens de alimentos (Freire et al., 2008), novos métodos de diagnóstico (Deoliveira et al., 2008) e busca de repelentes para insetos (de Oliveira Filho et al., 2016).

Em geral, a cromatografia é um método físico-químico de separação. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Degani and Vieira, 1998).

A cromatografia gasosa faz parte de um importante grupo de métodos de separação, que nos permite separar, isolar identificar e quantificar substâncias, mesmo em misturas muito complexas. A cromatografia gasosa é uma das técnicas mais empregadas em análises qualitativas e quantitativas. Colunas capilares são utilizadas em determinações por cromatografia gasosa a temperaturas que excedem 400°C. Aplicações a essas altas temperaturas requerem fases estacionárias especiais e tubos que não se decompõem (Skoog et al., 2006).

Na cromatografia gasosa, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar-se uma separação por cromatografia gasosa, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito; sua única função é transportar o analito através da coluna (Collins, 1997).

Uma maneira para coletar voláteis de amostras complexas é o método de “headspace” dinâmico também chamado de “purge and trap” ou aeração. Esse método é muito utilizado para coletar voláteis emitidos por insetos. As diversas técnicas deste método envolvem um fluxo de ar que purga as substâncias voláteis, emitidas pela amostra, a um adsorvente contido dentro de um tubo (Sant’Ana e Stein, 2001). Uma vez a aderidos aos adsorventes, existem duas maneiras de extrair os compostos orgânicos acumulados no adsorvente e transferi-los para o equipamento: a dessorção térmica (TD, do inglês *thermal desorption*) e extração por solvente. A dessorção térmica, usada

neste trabalho consiste num processo de extração a gás oferecendo uma concentração significativa de compostos e transferência de 100% dos compostos desorvidos para a coluna do CG. Além disso, uso do TD é totalmente automatizado pela análise sequencial dos tubos contendo os adsorventes. Em contraste, a extração por solvente consiste em extração/diluição dos compostos em alguns microlitros de solvente, que são injetados no equipamento. De um modo geral, o método tem uma redução de 1000 vezes na sensibilidade com relação ao uso do TD (Woolfenden, 2010).

A principal característica do headspace é a possibilidade da determinação de componentes voláteis da amostra a ser estudada de forma direta. Além disso, o headspace torna-se insubstituível e muito eficiente, pois possibilita a introdução da amostra sem pré-tratamento no cromatógrafo a gás. Isto se torna mais crítico principalmente devido à baixa detectabilidade dos detectores cromatográficos e a indesejável contaminação da coluna por resíduos não voláteis.

Hipótese:

2.0 HIPÓTESE:

Animais infectados com o protozoário *L. infantum* tem seu padrão de voláteis emitidos alterado devido à presença do parasita, atraindo então mais flebotomíneos a picarem e se infectarem, disseminando então a doença.

Objetivos:

3.0 OBJETIVOS:

Os objetivos principais são:

- Extrair compostos voláteis de culturas de células infectadas ou não *in vitro* e de hamsters machos, infectados e não infectados com *L. infantum* utilizando técnica de headspace dinâmico;
- Realizar análises desses compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e identificar substâncias que podem estar presentes e após, realizar um comparativo entre as duas extremidades (infectados e não infectados) para propor a classe de compostos que estão sendo produzidos ou consumidos.

Materiais e Métodos:

4.0 ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Animais:

Para realização deste estudo, foram utilizados hamsters (*M. auratus*) machos, com idade variando de 4-6 semanas. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente (22 a 25°C) e alojados em grupos de cinco animais em caixas forradas com maravalha, sendo oferecidos água e ração comercial *ad libitum*, diariamente. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com o Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, SP (protocolo número 225/2014).

4.2 Parasitos:

Formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/74/PP75) foram mantidas a 26°C em meio Schneider (Sigma-Co, Saint Louis, EUA) suplementado com soro bovino fetal a 20% (Cultilab, Campinas, SP-Brasil), 2% de urina humana masculina e 5% de penicilina e estreptomicina (Sigma-Co, Saint Louis, EUA), em garrafas de cultura estéreis (Corning Incorporated, Corning, NY-EUA) e passadas serialmente em hamsters para manutenção da virulência.

4.3 Infecção de células *in vitro* e coleta de voláteis:

4.3.1 Obtenção de leucócitos mononucleares a partir do baço de hamsters:

Hamsters machos (N = 8) foram sacrificados e seus baços foram cuidadosamente removidos, macerados em ambiente estéril e posteriormente colocados em contato com Ficoll Histopaque® (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) e centrifugados por 30 minutos a 1800 rpm/ 25°C. Foi coletado o anel de mononucleares e novamente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos adicionando-se então RPMI (LONZA- Basileia, Suíça) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de penicilina e estreptomicina . As células foram diluídas em Azul de Tripán para quantificação e análise de viabilidade com auxílio da câmara de Neubauer.

Os mononucleares foram adicionados num total de 2×10^6 células/poço /500 μ L por poço em placas de 24 poços de fundo chato (Sarstedt, Numbrecht, Alemanha) e mantidas em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ por 42h para fixação das células aderentes.

Após esse período os poços foram lavados com RPMI incompleto para a retirada das células não aderentes e novamente foi adicionado o RPMI completo para posterior infecção.

4.3.2 Infecção *in vitro*:

As células foram infectadas com formas promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* (6 parasitos: 1 célula) e mantidas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 18h. Após esse período os poços foram lavados com PBS 1% para retirada dos parasitos não fagocitados.

4.3.3 Coleta de voláteis:

A coleta de voláteis foi feita em quatro placas: cultura de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum* (CI); cultura de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); cultura de *L. infantum/ chagasi* (PP75) e meio RPMI completo (CL) e uma placa contendo somente o meio RPMI 1640 completo (M).

Figura 2: Cápsula de vidro usada para coleta de COVs em placas de cultura de células.

As placas sem a tampa foram colocadas individualmente dentro de uma cápsula de vidro e tubos de metal recheados com o adsorvente Tenax TA (Supelco/Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) foram colocados sobre as placas para que ocorra a absorção. A cápsula foi lacrada e colocada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 18h. Após esse período, a cápsula foi aberta e os tubos retirados, tampados e armazenados em geladeira até a análise por CG/EM. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

4.4 Infecção de hamsters e coleta de voláteis:

4.4.1 Infecção experimental:

Para a infecção dos hamsters foram selecionadas formas promastigotas metacíclicas (PNA⁻) de *L. infantum* (MHOM/74/PP75) de culturas em fase estacionária de crescimento (Sacks and Melby, 2001).

Para isso, os parasitas foram contados e lavados com PBS 1% estéril e centrifugados a 3000g por 10 minutos por 3 vezes. Na última lavagem, foram adicionados 5mL de PBS 1% e PNA (Lectina de Amendoim) (Sigma- Aldrich, Saint Louis, EUA) na concentração de 500mg/mL e deixado em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Após esse período os parasitas foram centrifugados a 200g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante contendo as formas promastigotas PNA⁻ foram coletadas. Os parasitas selecionados foram novamente lavados e centrifugados por 4 vezes com PBS 1% e contados para posterior infecção.

40 hamsters machos com 5 semanas de idade foram infectados por via intracardíaca (IC) com 1×10^7 formas promastigotas metacíclicas (PNA⁻) de *L. infantum/chagasi*.

4.4.2 Coleta de voláteis dos hamsters:

Para a análise de compostos orgânicos voláteis emitidos pelos hamsters, foram usados 10 animais por mês durante 4 meses, sendo 5 animais controle (não infectados- somente com o veículo PBS 1%) e 5 infectados.

Cada animal foi colocado em um saco de poliéster de 41x33cm (WYDA, São Paulo-BR) e sua extremidade foi fechada e foi inserido o tubo de metal recheado com o adsorvente Tenax TA acoplado a uma bomba automática de sucção Escort Elf® (Zefon, Ocala-Flórida) a um fluxo de 0,5 litros por minuto (LPM) durante 10 minutos. Os tubos foram retirados, tampados e armazenados em geladeira até a análise por CG/EM.

4.4.3 Confirmação da infecção dos hamsters:

Após a coleta dos COVs, os procedimentos de eutanásia e necropsia dos hamsters foi realizada com a administração de anestésico (tiopental sódico 2,5%) na dose de 30 mg/kg via intraperitoneal. Atingido o plano anestésico adequado foi então administrado a dose letal (120 mg/kg). Imediatamente após a comprovação da morte do animal, os mesmos foram necropsiados mensalmente, no período de 4 meses.. Os hamsters foram colocados em decúbito dorsal e a cavidade abdominal aberta com auxílio de uma tesoura cirúrgica. O baço foi removido de forma asséptica, analisado macroscopicamente e subdividido em fragmentos de aproximadamente 20mg, sendo estes destinados para extração de DNA e posterior avaliação da expressão gênica por cPCR.

4.4.3.1 Extração de DNA das amostras de baço:

A extração do DNA foi realizada a partir de fragmentos de tecido do baço. Para obtenção do DNA das amostras um *kit* de extração Wizard™ Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) foi utilizado. Foram utilizados fragmentos de tecidos com peso de 20mg, macerados e foram seguidas as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram armazenadas em geladeira a -20°C até o momento da análise da qualidade do DNA extraído e o início da reação de cPCR.

4.4.3.2 Reação em Cadeira da Polimerase-PCR:

Para a reação, foi utilizado DNA de *L. infantum* (200ng/μL). A reação constituiu de: 22,5 μL de PCR SuperMix (Invitrogen Corporation-Carlsbad, EUA), 0,5 μL (10μM) de *primers* (+) e (-), 1,04μL de DNA e H₂O Milli Q totalizando um volume de 25μL por reação.

As condições utilizadas na reação de cPCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações ocorreram com uso do termociclador Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O produto final da reação foi aplicado em um gel de agarose 2% (Invitrogen por Life Technologies, EUA), para comprovar o resultado da amplificação pela visualização da banda de interesse (153 pb). Os *primers* e sequências utilizados durante a reação de cPCR encontram-se listados na **Tabela 1**.

Tabela1: Sequência dos *primers* utilizados nas reações de cPCR.

Gene (Accession number)	Sequência (+)	Sequência (-)
rRNA 45 (CC144545)	CCTACCATGCCGTGTCCTTCTA	AACGACCCCTGCAGCAATAC

4.5 Análises por CG/EM:

As análises foram feitas por CG/EM. O material foi analisado em um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2010) acoplado ao detector de espectrometria de massas com fonte de ionização por elétrons (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus), equipado com injetor de dessorção térmica (TD-20, Shimadzu). A coluna usada foi uma RTX-5MS de sílica fundida (30 m x 0,25 milímetros, espessura de filme 0,25 μm), com uma temperatura do forno mantida em 40°C durante 5 min e programado a 5°C/min até 250°C e mantida durante 5 min. O gás de arraste usado foi o hélio a um fluxo de 1.01 mL/min. Os espectros de massas foram obtidos por ionização por impacto eletrônico de 70 eV.

4.6 Análise de dados:

A identificação dos picos foi feita por comparação dos espectros com os bancos de dados de espectrometria de massa (NIST, 2005) e por comparação do tempo de retenção dos compostos com uma mistura de n-alcanos C7-C30 (Índice de Kovats).

Os resultados estão representados como média $\pm$ desvio padrão (DP). Diferenças estatísticas foram determinadas utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA) seguidas pelo pós-teste de Bonferroni para amostras com distribuições normais. As análises foram feitas com auxílio do GraphPad-Prism (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA) e foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentaram valores de P igual ou menor a 0,05.

Resultados:

5.0 RESULTADOS:

5.1 Perfil de voláteis produzidos por culturas de leucócitos mononucleares aderentes de hamster infectados *in vitro* com *L. infantum*:

Após as análises por CG/EM da composição de COVs dos *headspaces* das culturas de leucócitos mononucleares aderentes de hamster infectadas *in vitro* com *L. infantum* e os controles relevantes (i.e., culturas de leucócitos mononucleares aderentes não infectadas, de *Leishmania* e de meio de cultura), foi possível identificar aproximadamente 75 picos cromatográficos nesses *headspaces* (Figura 3). Dentre os compostos identificados foram selecionados algumas substâncias já descritas na literatura e divididos conforme a cultura de origem em: (1) compostos gerados por somente culturas de leucócitos mononucleares infectadas; (2) compostos gerados por culturas de leucócitos mononucleares infectadas e por culturas de leucócitos mononucleares não infectados; (3) compostos detectados em todas as condições experimentais, mas com diferentes valores de área e, portanto, de concentração. Para facilitar a visualização desses compostos, um *Heat Map* foi feito usando os valores de áreas de pico dos cromatogramas referentes a cada composto encontrado (Figura 4).

Figura 3: Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Cromatograma em preto: cultura de leucócitos mononucleares aderentes infectados *in vitro* com *L. infantum* (CI); em rosa: cultura de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M).

5.1.1 COVs encontrados somente no *headspace* de culturas infectadas com *L. infantum*:

Entre os compostos detectados nos *headspaces* das diferentes condições experimentais, dois foram encontrados somente nas culturas de leucócitos mononucleares de hamsters infectados *in vitro* com *L. infantum*, quais sejam, o 1,2-difenil-ciclobutano, no tempo de retenção 34.23 minutos (Figura 5A) e o (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido, no tempo de 48.88 minutos (Figura 5B).

O composto 1,2-difenil-ciclobutano é um hidrocarboneto aromático de fórmula $C_{16}H_{16}$ e em sua molécula possui 2 anéis benzênicos (Figura 6 A e B). Já o composto (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido também é um hidrocarboneto aromático mas com estrutura mais complexa, com 3 anéis benzênicos, um átomo de enxofre e fórmula $C_{22}H_{20}OS$ (Figura 6 C e D).

Figura 4: Heat map dos compostos orgânicos voláteis emitidos por cultura de células infectadas *in vitro* comparado com os grupos controle. O mesmo experimento foi realizado em quadruplicata. Cultura de células infectadas *in vitro* com *L. infantum* (CI); Cultura de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); Cultura *L. infantum* (PCL) e meio de cultivo (RPMI 1640; M). Cálculo logarítmico foi feito em cada área dos picos para normalizar os valores.

Figura 5: Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. As setas apontam a presença das moléculas 1,2-difenil-ciclobutano (Figura 5A) e (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido (Figura 5B), presentes somente nas culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro*. Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M).

Figura 6: Espectros de massas e estruturas dos COVs detectados em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Espectro de massas (A) e estrutura molecular (B) do composto 1,2-difenil-ciclobutano. C e D demonstrando o espectro de massas e a estrutura molecular do composto (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido.

5.1.2 COV encontrado em somente duas condições experimentais:

Um dos picos encontrados é o referente ao 3-metileno-heptano, identificado no tempo de retenção 6.13 minutos, somente nas culturas de leucócitos mononucleares infectados (CI) e culturas de leucócitos mononucleares (CLM) (Figura 7). O composto é um hidrocarboneto de fórmula molecular C_8H_{16} e estrutura demonstrada na Figura 8 A e 8B.

Figura 7: Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. . A seta aponta a presença da molécula 3-metileno-heptano, presente somente no headspace das culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* e nas culturas de leucócitos mononucleares aderentes. Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M).

Figura 8: Espectro de massas e estrutura do COV detectado em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Espectro de massas (A) e estrutura da molécula(B) 3-metileno-heptano.

5.1.3 COVs encontrados em todas as condições experimentais:

Alguns compostos foram encontrados em todas as condições experimentais, mas com áreas diferentes e, portanto, quantidades diferentes. Os compostos identificados foram álcoois, aldeídos e hidrocarbonetos aromáticos e estão descritas nos tópicos abaixo.

5.1.3.1 Álcoois:

Entre os diferentes COVs encontrados em todas as amostras, três são álcoois: 1-nonanol ($C_9H_{20}O$), 2-etil-hexanol ($C_8H_{18}O$) e 1-dodecanol ($C_{12}H_{26}O$). Eles foram detectados nos tempos de retenção 19.44, 14.89 e 27.67 minutos, respectivamente (Figura 9 A, 9 C e 9E).

O composto 1-nonanol foi o álcool de maior interesse porque estava presente em quantidades significativamente maiores (CI=12,10 $\pm$ 0,36; CLM=11,32 $\pm$ 0,36; CL= 11,83 $\pm$ 0,35 e PCM= 11,16 $\pm$ 0,35; F (3,15) = 150,8) em culturas de leucócitos mononucleares de hamster infectados com *L. infantum in vitro* (CI) quando comparadas com os controles sendo, portanto, um potencial marcador da infecção com *L. infantum* (Figuras 9A e 9B). Seu espectro de massas e estrutura está demonstrado na Figura 10A e 10B.

Os demais álcoois presentes em quantidades e condições experimentais diferentes não faziam essa discriminação. O composto 2-etil-hexanol apresentou-se em quantidade maior na cultura de leucócitos mononucleares infectados, mas este valor não é significativo (-PI=15,09 $\pm$ 0,33; PCC=14,95 $\pm$ 0,32; PCL= 14,79 $\pm$ 0,32 e PCM= 14,78 $\pm$ 0,31; F(3,11)= 194,4) (Figuras 9 C e D).

O COV 1-dodecanol estava presente em maiores quantidades na cultura de leucócitos mononucleares (CLM) (PI=12,84 $\pm$ 0,67; PCC=13,49 $\pm$ 0,65; PCL= 11,87 $\pm$ 0,63 e PCM= 12,81 $\pm$ 0,88; F(3,15)= 42,99) (Figuras 9 E e 9F), quando comparado as outras condições experimentais. As estruturas e espectros de massas de ambos compostos 2-etil-hexanol e 1-dodecanol estão demonstrados na Figura 10 C e 10D, 10E e 10F, respectivamente.

Figura 9: Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. As setas apontam a presença das moléculas de 1-nonanol (A), que apresenta maior área de pico nas culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectadas com *L. infantum in vitro* (B), e 2-etil hexanol (C) e 1-dodecanol (E), que estão presentes com maiores áreas de pico nas culturas infectadas e não infectadas (D e F). Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; ns: diferença não significativa.

Figura 10: Espectros de massas e estruturas do COVs detectados em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles Espectro de massas e estrutura molecular do composto 1-nonanol (A e B), 2-etil hexanol (C e D) e 1-dodecanol (E e F).

5.1.3.2 Aldeídos:

Dois dos compostos encontrados são aldeídos: o 2-nonenal ($C_9H_{16}O$) e o decanal ($C_{10}H_{20}O$). Desses, o decanal discriminou de forma significativa a cultura de leucócitos mononucleares infectados com *L. infantum* (CI) das demais condições experimentais. Ele se apresenta com maiores áreas de pico nas amostras contendo meio RPMI 1640 completo (M), sendo que não existe diferença estatística ente as placas infectadas, controle-célula e controle *Leishmania* ($PI=13,61 \pm 0,65$; $PCC=13,89 \pm 0,47$; $PCL=13,75 \pm 0,48$ e $PCM=14,22 \pm 0,40$; $F(3,15) = 180,00$) (Figuras 11A e 11B). Seu espectro de massas e estrutura estão apresentados nas Figuras 12A e 12B, respectivamente, e foi encontrado no tempo de retenção de 20.42 minutos.

O 2-nonenal possui tempo de retenção 19.23 minutos e exibe maiores áreas de pico nas culturas de leucócitos mononucleares infectados, mas o valor não é significativo quando comparado as demais condições experimentais ($PI=13,73 \pm 0,21$; $PCC=13,53 \pm 0,19$; $PCL=13,33 \pm 0,22$ e $PCM=12,94 \pm 0,12$; $F(3,15) = 4,34$) (Figura 11 C e 1D). Seu espectro de massas bem como sua fórmula estrutural se encontra na Figura 12 C e 12D.

Figura 11: Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. As setas apontam a presença das moléculas de decanal (A) que apresenta maiores áreas de pico nas amostras contendo meio RPMI 1640 completo(B); e 2-nonenal (C), que apresenta maiores áreas de pico nas culturas de leucócitos mononucleares infectados *in vitro* com *L. infantum* (ns) (D). Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Figura 12: Espectros de massas e estruturas dos COVs detectados em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Espectro de massas e estrutura molecular dos compostos decanal (A e B) e 2-nonenal (C e D).

5.1.3.3 Compostos aromáticos:

Dois compostos aromáticos foram encontrados nas amostras: o etilbenzeno e o 1,2-dimetilbenzeno, nos tempos de retenção 8.72 e 9.02 minutos, respectivamente (Figura 13A). Tanto o etilbenzeno ($PI=16,97 \pm 0,16$; $PCC=16,85 \pm 0,23$; $PCL= 16,14 \pm 0,14$ e $PCM= 16,32 \pm 0,16$; $F(3,15) = 10,84$) quanto o 1,2-dimetil benzeno ($PI=16,80 \pm 0,14$; $PCC=16,61 \pm 0,18$; $PCL= 15,94 \pm 0,15$ e $PCM= 16,10 \pm 0,18$; $F(3,15)= 6,18$) apresentaram maiores áreas de pico nas culturas de leucócitos mononucleares infectados em relação à todas as condições experimentais, mas os valores não são significativos (Figuras 13 B e C). Eles são isômeros e possuem mesma fórmula molecular (C_8H_{10}), diferenciando-se apenas na posição e nos substituintes, ou seja, duas metilas (orto substituída) para o 1,2-dimetil benzeno (Figuras 14C e 14D) e uma etila mono substituída para o etilbenzeno (Figuras 14A e 14B).

Figura 13: Cromatogramas comparativos das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. As setas apontam a presença das moléculas de etilbenzeno e 1,2-Dimetil benzeno (A) que apresentam maiores áreas de pico nas culturas de leucócitos mononucleares infectados com *L. infantum in vitro* (B e C). Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$.

Figura 14: Espectros de massas e estruturas dos COVs detectados em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Espectro de massas e estrutura molecular dos compostos etilbenzeno (A e B) e 1,2-dimetil benzeno (C e D).

5.1.4 COV presente somente na amostra meio RPMI 1640:

Um composto encontrado em somente uma condição experimental é o 2,4-dimetilbenzaldeído, um aldeído identificado nas amostras meio de cultura empregado, RPMI1640 completo (M), no tempo de retenção de 20.82 minutos (Figura 15) e possuindo fórmula molecular $C_9H_{10}O$ (Figura 16 A e B). Esse composto foi consumido durante o cultivo de leucócitos mononucleares, infectados ou não, e de *L. infantum*.

Figura 15: Cromatograma comparativo das diferentes amostras encontradas na coleta de COVs no *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. A seta aponta a presença da molécula 2,4-dimetil-benzaldeído, presente somente no headspace do controle do meio, RPMI 1640 completo. Cromatograma em preto: culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum in vitro* (CI); em rosa: culturas de leucócitos mononucleares aderentes (CLM); em azul: culturas de *L. infantum* (CL); em marrom: meio de cultivo (RPMI 1640; M).

Figura 16: Espectro de massas e estrutura do COV detectado em *headspace* de cultura de células infectadas *in vitro* e seus controles. Espectro de massas (A) e estrutura da molécula (B) 2,4-dimetil-benzaldeído.

5.2 Perfil de voláteis de hamsters infectados com *L. infantum*:

Foram utilizados 40 hamsters machos para coleta de COVs, sendo divididos em 4 grupos de 10 animais, contendo 5 infectados e 5 controles. A infecção dos hamsters foi confirmada por cPCR, conforme demonstrado na Figura 17.

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 2% dos produtos amplificados a partir de amostras de DNA de baço de hamsters infectados. Canaleta 1: MPM: 100bp ladder, 2,5 μ L; canaletas de 2 a 21: produto de PCR de amostras de DNA(3 μ L) extraídas de baço de hamsters infectados com *L. infantum*, canaletas 2-6: hamsters com 1 mês de infecção; 7-11: hamsters com 2 meses de infecção; 12-16: hamsters com 3 meses de infecção; 17-21: hamsters com 4 meses de infecção; 22: controle negativo.

Cada grupo foi analisado mensalmente para verificar o perfil dos compostos orgânicos voláteis emitidos por esses animais dia CG/EM.

Com relação aos COVs emitidos quando comparados os animais controles e infectados em cada mês, durante os 4 meses avaliados, não foi possível verificar diferenças entre os 2 grupos, tanto com relação a compostos diferentes produzidos por cada grupo ou por compostos iguais produzidos mas com diferentes valores de áreas (Figura 18).

Figura 18: Cromatograma comparativo dos COVs coletados no *headspace* de hamsters infectados com *L. infantum* e controles. Cores para perfis de COVs para hamsters infectados com *L. infantum*: preto, rosa, azul e marrom; cores para perfis de COVs para hamsters não infectados: verde, azul escuro, verde musgo e cinza.

Discussão:

6.0 Discussão:

No presente trabalho caracterizamos os diferentes compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados por culturas de leucócitos mononucleares aderentes infectados com *L. infantum*. Um total de 75 COVs foram liberados ou consumidos em uma ou outra condição experimental ou em todas, porém em diferentes quantidades, conforme a condição. Entre esses compostos, esta discussão focalizará sobre aqueles que discriminaram as culturas de leucócitos infectadas das demais condições experimentais devido ao seu potencial para identificar indivíduos infectados com *L. infantum* em estudos futuros. Desses compostos, dois foram produzidos somente em culturas de leucócitos infectadas com *L. infantum*, i.e., 1,2-difenil-ciclobutano e (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido. Ainda, a produção de um álcool, 1-nonanol, aumentou significativamente e a de um aldeído, decanal, diminuiu significativamente nessa mesma condição experimental em comparação às demais condições. Também serão abordados os COVs que sabidamente afetam o comportamento de vetores e que estavam presentes em alguma das condições experimentais.

Os COVs produzidos por patógenos, durante as interações patógeno-hospedeiro e as respectivas vias bioquímicas têm gerado grande interesse no meio científico. A modificação das substâncias exaladas foi demonstrada em vários tipos de câncer (Haick et al., 2014; Phillips et al., 2006; Sun et al., 2016) e transplantes (Phillips et al., 2004) em humanos, bem como em infecções por diferentes patógenos, como o *Mycobacterium bovis* em bovinos (Ellis et al., 2014), *Plasmodium chabaudi*, um dos causadores da malária em camundongos (De Moraes et al., 2014) e *L. infantum* em cachorros (Magalhães-Junior et al., 2014b), parasita usado neste trabalho.

Na cultura de leucócitos mononucleares infectados foram detectados 2 compostos que não estavam presentes em nenhuma das condições experimentais, o 1,2-difenil-ciclobutano e o (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido, mostrando que a infecção pelo parasita provoca uma alteração no perfil de voláteis exalados. O (E)-(2,3-Difenil Ciclopropil)-metil-fenilsulfóxido já foi descrito como volátil emitido pela bactéria *Pseudomonas putida* (Sheoran et al., 2015), já o COV 1,2-difenil-ciclobutano não há relatos na literatura sobre sua liberação como volátil. A alteração dos COVs com a infecção por *L. infantum* já foi demonstrada em cães (Deoliveira et al., 2008), no qual foi possível diferenciar animais saudáveis e infectados a partir dos diferentes compostos

liberados dos pelos dos cães, os quais pertenciam à mesma classe dos dois compostos encontrados nas placas infectadas, descritos acima. Tais resultados mostram a importância do estudo da alteração no perfil de COVs como possível método a ser utilizado no diagnóstico e identificação de hospedeiros vertebrados infectados pelo parasita.

Dentre os COVs descritos em emanções de vertebrados, os aldeídos têm sido identificados consistentemente como sendo componentes do perfil de voláteis da pele humana (Dormont et al., 2013) e são capazes de estimular diferentes vetores, como o vetor da filariose humana, o *Culex quinquefasciatus* (Puri et al., 2006) e o *Culex pipiens*, também vetor da filariose e doenças ocasionadas por arbovírus (Otienoburu et al., 2012). Um dos aldeídos encontrados neste estudo é o 2,4-dimetil-benzaldeído, que foi detectado somente na amostra contendo o meio RPMI completo (M). Este é um aldeído, componente do meio que, ao entrar em contato com outros componentes, é degradado ou consumido. Em culturas de células epiteliais de carcinoma cervical (Nozoe et al., 2015) e células de câncer de pulmão (Filipiak et al., 2008) o mesmo acontece, ou seja, os aldeídos estão presentes nas placas controles que contêm somente meio de cultura. Outro aldeído identificado no nosso trabalho foi o decanal. Diferentemente do 2,4-dimetil-benzaldeído, o decanal foi detectado em todas condições experimentais, porém com maior área de pico nas amostras controle RPMI 1640 completo(M), não havendo diferença estatística entre as culturas infectadas, cultura de leucócitos mononucleares e cultura de *Leishmania*, indicando que, assim como o 2,4-dimetil-benzaldeído, ele pode ter sido consumido ou degradado. Uma possível explicação para a ausência ou redução na quantidade destes aldeídos nas placas que contêm macrófagos e/ou o parasito, seria o fato de que a enzima aldeído desidrogenase, que já foi encontrada em células de câncer, como o de mama (Balicki, 2007) e na linhagem de células de câncer de pulmão A549 (Chang et al., 2001), esteja degradando os aldeídos presentes no meio. Além disso, a aldeído desidrogenase está presente em macrófagos (Szabó et al., 1994) e o gene precursor da enzima foi identificado na mitocôndria de *Leishmania pifanoi* (Alcolea et al., 2016a) e *Leishmania amazonensis* (Alcolea et al., 2016b), mostrando que outras espécies de *Leishmania* possuem a enzima, o que pode explicar a ausência ou queda da quantidade dos aldeídos identificados nas amostras infectadas e as demais condições experimentais, nas quais macrófagos ou o parasito estavam presentes. Por outro lado, o 2-nonenal foi encontrado

com maior área de pico nas culturas infectadas quando comparada as outras amostras, fato que indica que a infecção pode aumentar a liberação desse composto no meio, sendo um dos possíveis COVs que podem influenciar no processo de atração de vetores e na disseminação da doença.

Assim como os aldeídos, os compostos aromáticos também fazem parte dos voláteis emitidos pela pele humana (Bernier et al., 2000; Dormont et al., 2013) e também são reconhecidos por diferentes vetores, como o *A. gambiae* que, por meio de seus neurônios receptores olfatórios (ORN's), podem detectar esses compostos no meio ambiente e responder a eles (Carey et al., 2010). Estes compostos aromáticos também são capazes de estimular o vetor da febre amarela e dengue *A. aegypti* (Logan et al., 2008). Há também a presença destes compostos em camundongos infectados com *P. chabaudi*, causador da malária, na fase crônica da infecção, quando comparado ao animal saudável (De Moraes et al., 2014). No presente estudo, os compostos aromáticos etilbenzeno e 1,2-dimetil benzeno foram encontrados com maiores áreas de pico nas culturas infectadas, corroborando com os dados da literatura de que a infecção altera o perfil de emissão de compostos orgânicos aromáticos de hospedeiros relacionados a outras doenças parasitárias. É importante salientar que este é o primeiro estudo a mostrar que a infecção por *Leishmania* em cultura de células aumenta a liberação de COVs de natureza aromática.

Vários trabalhos destacam também o papel dos álcoois como atrativos para vetores, como 1-octen-3-ol, um cairomônio componente da respiração bovina (Hall et al., 1984) e humana (Bernier et al., 2000) que possui um grande potencial atrativo para moscas tsé-tsé *G. morsitans* (Hall et al., 1984) e alguns mosquitos (Van Essen et al., 1994) e o 1-nonanol para o vetor da LV, o *L. longipalpis* (Magalhães-Junior et al., 2014a). Neste trabalho, foram encontrados maiores áreas de pico para o 1-nonanol e 2-etil-hexanol nas culturas infectadas. Este resultado sugere que a infecção por *Leishmania* induz uma maior produção destes compostos, que por sua vez podem atuar no aumento da atração dos vetores. Já o 1-dodecanol foi encontrado com maior área de pico, e portanto com maiores quantidades, nas amostras cultura de leucócitos mononucleares (CLM). Os resultados sugerem que a infecção não induz um aumento da produção desse composto, que é produzido naturalmente pela célula. Interessantemente, o 1-dodecanol é capaz de atrair a fêmea do mosquito *A. gambiae*, vetor da malária (Mweresa et al., 2016). Portanto, é possível supor que esse composto também possa atuar em conjunto com

outros na atração de vetores, tais como o da *Leishmania*, apesar desse parasito não aumentar a sua produção durante a infecção.

Outro composto com perfil semelhante ao 1-dodecanol e pertencente à classe dos hidrocarbonetos é o 3-metileno heptano, sendo encontrado em maior quantidade nas culturas de leucócitos infectadas ou não. Este resultado mostra que a infecção não altera a liberação deste composto e que sua fonte provável são as células mononucleares. Entretanto, não é possível dizer se esse composto atua ou não na atração de vetores devido à ausência de estudos sobre ele na literatura. Porém, não podemos descartar a sua participação neste processo, uma vez que compostos produzidos naturalmente pela célula podem aumentar a atração de vetores, como é o caso do 1-dodecanol, discutido anteriormente.

O uso do hamster *M. auratus* como modelo animal vem do fato deste ser considerado susceptível à infecção por *Leishmania* e por apresentar sinais clínicos patológicos semelhantes ao da infecção humana, além do aumento progressivo na carga parasitária tecidual (baço e fígado), caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia, hipergamaglobulinemia e consequente morte em uma infecção sistêmica do animal com amastigotas de *Leishmania donovani* (Melby et al., 2001; Pearson e Roberts, 1990), dentre outros fatores. Além disso, em um estudo avaliando hamsters infectados com *L. infantum* (PP75) durante 9 meses, percebeu-se a presença de sinais clínicos no 9º mês de infecção, juntamente com aumento do peso do fígado e baço. O aumento da carga parasitária e IgG foram detectadas após o 6º mês de infecção (Nádia das Dores Moreira, Tese de Doutorado, 2012). Em outro estudo no qual também foi utilizado o mesmo modelo de infecção por *Leishmania*, foram encontrados 10 picos de compostos em animais infectados que não foram encontrados nos animais controle (não infectados). Interessantemente, esta alteração no perfil de voláteis se deu ao redor de 6 meses após a infecção, que coincide com o período de aumento da carga parasitária e de IgG nos animais infectados. No mesmo período após a infecção constatou-se que, em ensaios com tubo “Y”, 67% dos flebotomíneos *L. longipalpis*, submetidos a um fluxo de ar, foram atraídos pelos hamsters infectados (O’Shea et al., 2002). Tais resultados mostram que a infecção por *Leishmania* altera o perfil de voláteis e que essa alteração ocorre antes mesmo da fase clínica da doença (9º mês após a infecção). Além disso, os dados indicam que a mudança na emissão dos compostos voláteis pode levar a um aumento da disseminação da doença pela maior atração de vetores pelo animal infectado.

No presente estudo foram coletadas amostras de voláteis de hamsters do 1º ao 4º mês após a infecção com o intuito de verificar se há uma modificação no perfil de emissão desses compostos nos períodos iniciais da doença. Nossos resultados mostram que não existe qualquer diferença no perfil de COVs entre animais infectados e controles no período analisado. Tomados em conjunto com os dados encontrados na literatura, sugere-se que a mudança no perfil de COVs aconteça juntamente com o aumento da carga parasitária que se estabelece ao redor do 6º mês de infecção, porém ainda anteriormente à fase clínica da doença, que se dá por volta do 9º mês após a infecção (Nádia das Dores Moreira, Tese de Doutorado 2012; O'Shea et al., 2002).

Como observado nos resultados, em culturas de células é possível detectar uma alteração na emissão de COVs nas placas em até 18 horas após adicionar o parasita *L. infantum* à cultura de células mononucleares. Entretanto, a literatura mostra que a infecção modifica o perfil de COVs somente ao redor do 6º mês em hamsters. Uma possível explicação para o fato seria a carga parasitária, que como descrito anteriormente, aumenta a partir do 6º mês de infecção (Nádia das Dores Moreira, Tese de Doutorado, 2012). Inicialmente a presença de poucos parasitas no organismo pode ser acompanhada de reduzida produção destes compostos, sendo impossível detectá-la na superfície corporal. Outro fator que pode influenciar no perfil de COVs seria a microbiota de pele. Muitos dos compostos para os quais os vetores respondem são de origem bacteriana, fato comprovado quando se lava os pés de voluntários com sabão e o vetor da malária, a fêmea *A. gambiae* altera o local no organismo para se alimentar (De Jong e Knols, 1995). Como a infecção em hamsters ocorre de maneira progressiva, a microbiota de pele do animal inicialmente poderia de alguma maneira influenciar no metabolismo desses compostos impedindo-os de serem liberados para o meio. À medida que a doença progride ocorreria uma maior produção desses compostos, devido ao aumento da carga parasitária, podendo então ser detectados na superfície corporal.

Sendo assim os resultados do presente trabalho nos mostram que existe uma alteração no perfil de COVs em cultura de células infectadas por *L. infantum*. Entretanto o perfil de COVs não foi modificado pela infecção em um período de 4 meses após a inoculação do parasito em hamsters.

Conclusão:

7.0 Conclusão:

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que a infecção de culturas de leucócitos mononucleares de baço de hamster com o parasita *L.infantum* gera uma alteração no perfil de compostos liberados, além de induzir uma maior produção de compostos relacionados à atração de vetores.

Em hamsters infectados com o parasita no período de tempo avaliada (4 meses), não foi encontrada nenhuma alteração no perfil de COVs liberados pelos animais quando comparados aos controles.

Referências Bibliográficas:

8.0 Referências Bibliográficas:

- Acree, F., Turner, R.B., Gouck, H.K., Beroza, M., and Smith, N. (1968). L-Lactic Acid: A Mosquito Attractant Isolated from Humans. *Science* 161, 1346–1347.
- Alcolea, P.J., Alonso, A., García-Tabares, F., Mena, M. del C., Ciordia, S., and Larraga, V. (2016a). Proteome profiling of the growth phases of *Leishmania pifanoi* promastigotes in axenic culture reveals differential abundance of immunostimulatory proteins. *Acta Trop.* 158, 240–247.
- Alcolea, P.J., Alonso, A., García-Tabares, F., Mena, M.C., Ciordia, S., and Larraga, V. (2016b). Increased Abundance of Proteins Involved in Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress at the Last Stages of Growth and Development of *Leishmania amazonensis* Promastigotes Revealed by Proteome Analysis. *PLOS ONE* 11, e0164344.
- Andrade, A.J., Andrade, M.R., Dias, E.S., Pinto, M.C., and Eiras, A.E. (2008). Are light traps baited with kairomones effective in the capture of *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia intermedia*? An evaluation of synthetic human odor as an attractant for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 337–343.
- Ansell, J., Hamilton, K.A., Pinder, M., Walraven, G.E.L., and Lindsay, S.W. (2002). Short-range attractiveness of pregnant women to *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 113–116.
- Arias, J. (1996). The Reemergence of Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 2, 145–146.
- Arias, J.R., Miles, M.A., Naiff, R.D., Pova, M.M., de Freitas, R.A., Biancardi, C.B., and Castellon, E.G. (1985). Flagellate infections of Brazilian sand flies (Diptera: Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 1098–1108.
- Ashford, R.W. (2000). The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 30, 1269–1281.
- Badaro, R., Jones, T.C., Carvalho, E.M., Sampaio, D., Reed, S.G., Barral, A., Teixeira, R., and Johnson, W.D. (1986). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 154, 1003–1011.
- Balicki, D. (2007). Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. *Cell Stem Cell* 1, 485–487.
- Barral-Netto, M., Barral, A., Brownell, C.E., Skeiky, Y.A., Ellingsworth, L.R., Twardzik, D.R., and Reed, S.G. (1992). Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257, 545–548.
- Bates, P.A. (2007). Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int. J. Parasitol.* 37, 1097–1106.
- Bates, P.A., and Rogers, M.E. (2004). New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr. Mol. Med.* 4, 601–609.

- Bernier, U.R., Kline, D.L., Barnard, D.R., Schreck, C.E., and Yost, R.A. (2000). Analysis of human skin emanations by gas chromatography/mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Anal. Chem.* *72*, 747–756.
- Braks, M.A., Anderson, R.A., and Knols, B.G. (1999). Infochemicals in mosquito host selection: human skin microflora and *Plasmodium* parasites. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* *15*, 409–413.
- Bray, D.P., and Hamilton, J.G.C. (2007). Host Odor Synergizes Attraction of Virgin Female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* *44*, 779–787.
- Carey, A.F., Wang, G., Su, C.-Y., Zwiebel, L.J., and Carlson, J.R. (2010). Odorant reception in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Nature* *464*, 66–71.
- Carrillo, E., and Moreno, J. (2009). Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* *128*, 67–70.
- Chang, J.W., Jeon, H.B., Lee, J.H., Yoo, J.S., Chun, J.S., Kim, J.H., and Yoo, Y.J. (2001). Augmented Expression of Peroxiredoxin I in Lung Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *289*, 507–512.
- Collins, C.H. (1997). *Introdução a métodos cromatográficos*. (Campinas: Editora da UNICAMP).
- Dalton, P., Gelperin, A., and Preti, G. (2004). Volatile metabolic monitoring of glycemic status in diabetes using electronic olfaction. *Diabetes Technol. Ther.* *6*, 534–544.
- De Jong, R., and Knols, B.G. (1995). Selection of biting sites on man by two malaria mosquito species. *Experientia* *51*, 80–84.
- De Moraes, C.M., Stanczyk, N.M., Betz, H.S., Pulido, H., Sim, D.G., Read, A.F., and Mescher, M.C. (2014). Malaria-induced changes in host odors enhance mosquito attraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 11079–11084.
- Degani, Q.B.C.A.L., and Vieira, P.C. (1998). *Cromatografia: um breve ensaio*. Química Nova Na Escola 21–25.
- Deoliveira, L., Rodrigues, F., Deoliveira, F., Mesquita, P., Leal, D., Alcantara, A., Souza, B., Franke, C., Pereira, P., and Deandrade, J. (2008). Headspace solid phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry combined to chemometric analysis for volatile organic compounds determination in canine hair: A new tool to detect dog contamination by visceral leishmaniasis. *Journal of Chromatography B* *875*, 392–398.
- Desjeux, P. (1992). Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat Q* *45*, 267–275.
- Di Natale, C., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R., D’Arcangelo, G., Roscioni, C., Finazzi-Agrò, A., and D’Amico, A. (2003). Lung cancer identification by the

analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron* 18, 1209–1218.

Dormont, L., Bessière, J.-M., and Cohuet, A. (2013). Human Skin Volatiles: A Review. *Journal of Chemical Ecology* 39, 569–578.

Dougherty, M.J., Guerin, P.M., and Ward, R.D. (1995). Identification of oviposition attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in volatiles of faeces from vertebrates. *Physiological Entomology* 20, 23–32.

Dougherty, M.J., Guerin, P.M., Ward, R.D., and Hamilton, J.G.C. (1999). Behavioural and electrophysiological responses of the phlebotomine sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) when exposed to canid host odour kairomones. *Physiological Entomology* 24, 251–262.

Ellis, C.K., Stahl, R.S., Nol, P., Waters, W.R., Palmer, M.V., Rhyan, J.C., VerCauteren, K.C., McCollum, M., and Salman, M.D. (2014). A Pilot Study Exploring the Use of Breath Analysis to Differentiate Healthy Cattle from Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *PLoS ONE* 9, e89280.

Filipiak, W., Sponring, A., Mikoviny, T., Ager, C., Schubert, J., Miekisch, W., Amann, A., and Troppmair, J. (2008). Release of volatile organic compounds (VOCs) from the lung cancer cell line CALU-1 in vitro. *Cancer Cell International* 8, 17.

Freire, M.T. de A., Bottoli, C.B.G., Fabris, S., and Reyes, F.G.R. (2008). Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. *Química Nova* 31, 1522–1532.

Garner, C.E., Smith, S., Bardhan, P.K., Ratcliffe, N.M., and Probert, C.S.J. (2009). A pilot study of faecal volatile organic compounds in faeces from cholera patients in Bangladesh to determine their utility in disease diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1171–1173.

Getachew, T., TADESSE, A, Y.M., and ZENEBE, A, A., B. (2006). Internal medicine lecture notes for health officers, ethiopian in collaboration with the ethiopia public health training initiative. The Carter Center, the Ethiopia Ministry of Health, and the Ethiopia Ministry of Education 56–63.

Grimaldi, G., and Tesh, R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230–250.

Haick, H., Broza, Y.Y., Mochalski, P., Ruzsanyi, V., and Amann, A. (2014). Assessment, origin, and implementation of breath volatile cancer markers. *Chem. Soc. Rev.* 43, 1423–1449.

Hall, D.R., Beevor, P.S., Cork, A., Nesbitt, B.F., and Vale, G.A. (1984). 1-Octen-3-ol. A potent olfactory stimulant and attractant for tsetse isolated from cattle odours. *International Journal of Tropical Insect Science* 5, 335–339.

Hamilton, J.G., and Ward, R.D. (1991). Gas-chromatographic analysis of *Lutzomyia longipalpis* tergal pheromone gland extract. *Parassitologia* 33 *Suppl*, 283–289.

- Hamilton, J.G.C., and Ramsoondar, T.M.C. (1994). Attraction of *Lutzomyia longipalpis* to human skin odours. *Medical and Veterinary Entomology* 8, 375–380.
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, S., Bras-Goncalves, R., Sundar, S., Lemesre, J.-L., and Bauls, A.-L. (2007). Understanding Human Leishmaniasis: The Need for an Integrated Approach. In *Encyclopedia of Infectious Diseases*, M. Tibayrenc, ed. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), pp. 87–123.
- Hotez, P.J., Remme, J.H.F., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C., Breman, G., Buss, P., Morel, C., Breman, J.G., Hotez, P.J., et al. (2004). Diseases : Combating Tropical Infectious Priorities Disease Report in Developing Countries Project. 38, 871–878.
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol.* 22, 439–445.
- Kaye, P., and Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 604–615.
- Kelly, D.W., Mustafa, Z., and Dye, C. (1997). Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med. Vet. Entomol.* 11, 13–24.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* 17, 279–289.
- Knols, B.G.J., and Meijerink, J. (1997). Odors influence mosquito behavior. *Science & Medicine* 4, 56–63.
- Kuhls, K., Alam, M.Z., Cupolillo, E., Ferreira, G.E.M., Mauricio, I.L., Oddone, R., Feliciangeli, M.D., Wirth, T., Miles, M.A., and Schönián, G. (2011). Comparative microsatellite typing of new world leishmania infantum reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e1155.
- Lacroix, R., Mukabana, W.R., Gouagna, L.C., and Koella, J.C. (2005). Malaria infection increases attractiveness of humans to mosquitoes. *PLoS Biol.* 3, e298.
- Lainson, R., and Shaw, J.J. (1978). Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature* 273, 595–600.
- Lainson, R., Ward, R.D., and Shaw, J.J. (1977). *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 199, 309–320.
- Lainson, R., Dye, C., Shaw, J.J., Macdonald, D.W., Courtenay, O., Souza, A.A., and Silveira, F.T. (1990). Amazonian visceral leishmaniasis--distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 85, 135–137.
- Lane, R.P. (1986). Chicken house reservoirs of sandflies. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* 2, 248–249.

- Lane, R., Phillips, A., Molyneux, D.H., Procter, G., and Ward, R.D. (1985). Chemical analysis of the abdominal glands of two forms of *Lutzomyia longipalpis*: site of a possible sex pheromone? *Ann Trop Med Parasitol* 79, 225–229.
- Lefèvre, T., Gouagna, L.-C., Dabiré, K.R., Elguero, E., Fontenille, D., Renaud, F., Costantini, C., and Thomas, F. (2010). Beer consumption increases human attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS ONE* 5, e9546.
- Liddell, K (1976). Smell as a diagnostic marker. *Postgraduate Medical Journal* 52, 136–138.
- Logan, J.G., Birkett, M.A., Clark, S.J., Powers, S., Seal, N.J., Wadhams, L.J., Mordue (Luntz), A.J., and Pickett, J.A. (2008). Identification of Human-Derived Volatile Chemicals that Interfere with Attraction of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology* 34, 308–322.
- Machado, V.E., Corrêa, A.G., Goulart, T.M., Silva, F.B. da R., Ortiz, D.G.S., and Pinto, M.C. (2015). Attraction of the sand fly *Nyssomyia neivai* (Diptera: Psychodidae) to chemical compounds in a wind tunnel. *Parasit Vectors* 8, 147.
- Magalhães-Junior, J.T., Barrouin-Melo, S.M., Corrêa, A.G., da Rocha Silva, F.B., Machado, V.E., Govone, J.S., and Pinto, M.C. (2014a). A laboratory evaluation of alcohols as attractants for the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera:Psychodidae). *Parasit Vectors* 7, 60.
- Magalhães-Junior, J.T., Mesquita, P.R.R., Oliveira, W.F. dos S., Oliveira, F.S., Franke, C.R., Rodrigues, F. de M., de Andrade, J.B., and Barrouin-Melo, S.M. (2014b). Identification of biomarkers in the hair of dogs: new diagnostic possibilities in the study and control of visceral leishmaniasis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406, 6691–6700.
- Maltezou, H.C., Siafas, C., Mavrikou, M., Spyridis, P., Stavrinnadis, C., Karpathios, T., and Kafetzis, D.A. (2000). Visceral Leishmaniasis during Childhood in Southern Greece. *Clinical Infectious Diseases* 31, 1139–1143.
- Manna, L., Reale, S., Vitale, F., and Gravino, A.E. (2009). Evidence for a relationship between *Leishmania* load and clinical manifestations. *Res. Vet. Sci.* 87, 76–78.
- Melby, P.C., Chandrasekar, B., Zhao, W., and Coe, J.E. (2001). The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J. Immunol.* 166, 1912–1920.
- Mellor, H.E., Hamilton, J.G., and Anderson, M. (1996). Spectral sensitivity in the eyes of male and female *Lutzomyia longipalpis* sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 10, 371–374.
- Menezes-Souza, D., Corrêa-Oliveira, R., Guerra-Sá, R., Giunchetti, R.C., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Oliveira, G.C., and Reis, A.B. (2011). Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. *Vet. Parasitol.* 177, 39–49.

- Ministério da Saúde (2006). Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.
- Ministério da Saúde (2014). <http://portalsaude.saude.gov.br>.
- Mweresa, C.K., Mukabana, W.R., Omusula, P., Otieno, B., Van Loon, J.J.A., and Takken, W. (2016). Enhancing Attraction of African Malaria Vectors to a Synthetic Odor Blend. *Journal of Chemical Ecology* 42, 508–516.
- Nádia das Dores Moreira, T. de D. (2012). HISTÓRIA NATURAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM HAMSTER “*Mesocricetus auratus*” EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS POR DUAS CEPAS DE *Leishmania infantum* COM PERFIS DISTINTOS DE VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE.
- Nigam, Y., and Ward, R.D. (1991). The effect of male sandfly pheromone and host factors as attractants for female *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Physiological Entomology* 16, 305–312.
- Nozoe, T., Goda, S., Selyanchyn, R., Wang, T., Nakazawa, K., Hirano, T., Matsui, H., and Lee, S.-W. (2015). In vitro detection of small molecule metabolites excreted from cancer cells using a Tenax TA thin-film microextraction device. *Journal of Chromatography B* 991, 99–107.
- de Oliveira Filho, J.G., Sarria, A.L.F., Ferreira, L.L., Caulfield, J.C., Powers, S.J., Pickett, J.A., de León, A.A.P., Birkett, M.A., and Borges, L.M.F. (2016). Quantification of brown dog tick repellents, 2-hexanone and benzaldehyde, and release from tick-resistant beagles, *Canis lupus familiaris*. *Journal of Chromatography B* 1022, 64–69.
- O’Shea, B., Rebollar-Tellez, E., Ward, R.D., Hamilton, J.G.C., el Naiem, D., and Polwart, A. (2002). Enhanced sandfly attraction to *Leishmania*-infected hosts. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96, 117–118.
- Otienoburu, P.E., Ebrahimi, B., Phelan, P.L., and Foster, W.A. (2012). Analysis and Optimization of a Synthetic Milkweed Floral Attractant for Mosquitoes. *Journal of Chemical Ecology* 38, 873–881.
- Pearson, R.D., and Roberts, D. (1990). Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 263–265.
- Penn, D., and Potts, W. (1998a). How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? *Adv. Immunol.* 69, 411–436.
- Penn, D., and Potts, W.K. (1998b). Chemical signals and parasite-mediated sexual selection. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 13, 391–396.
- Phillips, M., Cataneo, R.N., Ditkoff, B.A., Fisher, P., Greenberg, J., Gunawardena, R., Kwon, C.S., Rahbari-Oskoui, F., and Wong, C. (2003). Volatile markers of breast cancer in the breath. *Breast J* 9, 184–191.
- Phillips, M., Boehmer, J.P., Cataneo, R.N., Cheema, T., Eisen, H.J., Fallon, J.T., Fisher, P.E., Gass, A., Greenberg, J., Kobashigawa, J., et al. (2004). Heart allograft rejection: detection with breath alkanes in low levels (the HARDBALL study). *J. Heart Lung Transplant.* 23, 701–708.

Phillips, M., Cataneo, R.N., Ditkoff, B.A., Fisher, P., Greenberg, J., Gunawardena, R., Kwon, C.S., Tietje, O., and Wong, C. (2006). Prediction of breast cancer using volatile biomarkers in the breath. *Breast Cancer Research and Treatment* 99, 19–21.

Pinelli, E., Killick-Kendrick, R., Wagenaar, J., Bernadina, W., del Real, G., and Ruitenbergh, J. (1994). Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. *Infect. Immun.* 62, 229–235.

Puri, S.N., Mendki, M.J., Sukumaran, D., Ganesan, K., Prakash, S., and Sekhar, K. (2006). Electroantennogram and behavioral responses of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) females to chemicals found in human skin emanations. *J. Med. Entomol.* 43, 207–213.

Rangel, E.F., and Lainson, R. (2003). Flebotomíneos do Brasil.

Rebollar-Tellez, E.A., Hamilton, J.G.C., and Ward, R.D. (1999). Response of female *Lutzomyia longipalpis* to host odour kairomones from human skin. *Physiological Entomology* 24, 220–226.

Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., and Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7, 581–596.

Rogers, M.E., Chance, M.L., and Bates, P.A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology* 124, 495–507.

Romero, G.A.S., and Boelaert, M. (2010). Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e584.

Sacks, D.L., and Melby, P.C. (2001). Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol Chapter 19*, Unit 19.2.

Sato, N., Ahuja, S.K., Quinones, M., Kostecky, V., Reddick, R.L., Melby, P.C., Kuziel, W.A., and Ahuja, S.S. (2000). CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania* major-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokines, b cell outgrowth, and sustained neutrophilic inflammation. *J. Exp. Med.* 192, 205–218.

Schlein, Y., and Warburg, A. (1986). Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J. Med. Entomol.* 23, 11–15.

Shelley, W.B., Hurley, H.J., and Nichols, A.C. (1953). Axillary odor; experimental study of the role of bacteria, apocrine sweat, and deodorants. *AMA Arch Derm Syphilol* 68, 430–446.

Sheoran, N., Valiya Nadakkakath, A., Munjal, V., Kundu, A., Subaharan, K., Venugopal, V., Rajamma, S., Eapen, S.J., and Kumar, A. (2015). Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiol. Res.* 173, 66–78.

- Silva, E.S., Gontijo, C.M., Pacheco, R.S., Fiuza, V.O., and Brazil, R.P. (2001). Visceral leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 285–291.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., and Grassi, M.T. (2006). *Fundamentos de química analítica* (São Paulo: Pioneira Thomson Learning).
- Smith, D., Spanel, P., Thompson, J.M., Rajan, B., Cocker, J., and Rolfe, P. (1998). The Selected Ion Flow Tube Method for Workplace Analyses of Trace Gases in Air and Breath: Its Scope, Validation, and Applications. *Applied Occupational and Environmental Hygiene* 13, 817–823.
- Sun, X., Shao, K., and Wang, T. (2016). Detection of volatile organic compounds (VOCs) from exhaled breath as noninvasive methods for cancer diagnosis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 2759–2780.
- Syed, Z., and Leal, W.S. (2009). Acute olfactory response of *Culex* mosquitoes to a human- and bird-derived attractant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18803–18808.
- Szabó, C., Southan, G.J., Thiernemann, C., and Vane, J.R. (1994). The mechanism of the inhibitory effect of polyamines on the induction of nitric oxide synthase: role of aldehyde metabolites. *Br. J. Pharmacol.* 113, 757–766.
- Tesh, R.B. (1995). Control of zoonotic visceral leishmaniasis: is it time to change strategies? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 287–292.
- Theodos, C.M., Ribeiro, J.M., and Titus, R.G. (1991). Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. *Infect. Immun.* 59, 1592–1598.
- Thomas, F., Adamo, S., and Moore, J. (2005). Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav. Processes* 68, 185–199.
- Van Essen, P.H., Kemme, J.A., Ritchie, S.A., and Kay, B.H. (1994). Differential responses of *Aedes* and *Culex* mosquitoes to octenol or light in combination with carbon dioxide in Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* 8, 63–67.
- Verhulst, N.O., Beijleveld, H., Knols, B.G., Takken, W., Schraa, G., Bouwmeester, H.J., and Smallegange, R.C. (2009). Cultured skin microbiota attracts malaria mosquitoes. *Malar. J.* 8, 302.
- Vexenat, J.A., de Castro, J.A., Cavalcante, R., Tavares, J.P., da Silva, M.R., Batista, W.H., Campos, J.H., Howard, M.K., Frame, I., and McNerney, R. (1994). Visceral leishmaniasis in Teresina, State of Piauí, Brazil: preliminary observations on the detection and transmissibility of canine and sandfly infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 89, 131–135.
- Volf, P., and Volfova, V. (2011). Establishment and maintenance of sand fly colonies. *J. Vector Ecol.* 36 Suppl 1, S1-9.
- Watson, N., Davies, S., and Wevill, D. (2011). Air Monitoring: New Advances in Sampling and Detection. *The Scientific World JOURNAL* 11, 2582–2598.

WHO (2014). <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.

Williams, C.R., Kokkinn, M.J., and Smith, B.P. (2003). Intraspecific variation in odor-mediated host preference of the mosquito *Culex annulirostris*. *J. Chem. Ecol.* 29, 1889–1903.

Woolfenden, E. (2010). Sorbent-based sampling methods for volatile and semi-volatile organic compounds in air. *Journal of Chromatography A* 1217, 2674–2684.

Ximenes, M.F., Souza, M.F., and Castellón, E.G. (1999). Density of sand flies (Diptera: psychodidae) in domestic and wild animal shelters in an area of visceral Leishmaniasis in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 427–432.

Xue, R., Dong, L., Zhang, S., Deng, C., Liu, T., Wang, J., and Shen, X. (2008). Investigation of volatile biomarkers in liver cancer blood using solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 1181–1186.

Yajima, I., Sakakibara, H., Ide, J., Yanai, T., and Kazuo, H. (1985). Volatile Flavor Components of Watermelon (*Citrullus vulgaris*). *Agricultural and Biological Chemistry* 49, 3145–3150.

Yamazaki, K., Boyse, E.A., Miké, V., Thaler, H.T., Mathieson, B.J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z.A., and Thomas, L. (1976). Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *J. Exp. Med.* 144, 1324–1335.