UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO

DAIANE BARROS DIAS MENDONÇA

Análise do microbioma de bactérias de luz intestinal de hamsteres e sua correlação com LPS circulante, decorrente da translocação microbiana na leishmaniose visceral experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Profº Dr. José Angelo Lauletta Lindoso

SÃO PAULO

2017

Ficha catalográfica

Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da
Universidade de São Paulo

© Reprodução autorizada pelo autor

Mendonça, Daiane Barros Dias

Análise do microbioma de bactérias de luz intestinal de hamsteres e sua correlação com LPS circulante, decorrente da translocação microbiana na leishmaniose visceral experimental / Daiane Barros Dias Mendonça. – São Paulo, 2017.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso

Descritores: 1. PARASITOLOGIA. 2. PROTOZOOLOGIA. 3. COMPORTAMENTO ANIMAL. 4. MICROBIOLOGIA. 5. HAMSTERS. 6. INFECÇÃO EXPERIMENTAL.

USP/IMTSP/BIB-22/2017.

Dedico este trabalho aos meus amados pais Silas e Rosa, ao meu esposo e melhor amigo Joelson, a minha irmã Raquel, aos meus sobrinhos, e aos meus avós Possidônio e Maria (*in memorian*), José e Antônia. Família, vocês são meu bem mais precioso. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a vida. Concedeu-me saúde e sabedoria para chegar até aqui. A Ele toda a glória.

A meu esposo, companheiro e melhor amigo, Joelson obrigada por aturar todos meus momentos de desespero, por ser meu ponto de equilíbrio quando me perdia, pelo ombro amigo, por acreditar em mim, e fazer renascer em mim esperança quando achava que não tinha mais jeito. Você é e sempre será minha melhor escolha, meu presente de Deus. Obrigada por tudo, eu amo você.

Aos meus pais Silas e Rosa, é difícil escolher as palavras para agradecê-los. Vocês são meu alicerce, suas palavras de incentivo nunca faltaram nas horas que precisei. Mãe este título também é seu, já que passávamos tantas horas estudando juntas, meu pai, meu maior fã, não foram poucas as vezes que me fez sentir confiança no meu trabalho, nos meus resultados. A minha irmã Raquel, mesmo sendo a mais nova, sempre tem puxões de orelha e bons conselhos a me dar e sem dúvida me vale muito ouvi-la. A minha irmã do coração Eloá, desde que chegou à minha vida, só me enche de carinho e muito amor. Aos meus sobrinhos que me mostram o quanto eu sou capaz de amar, sempre contem comigo para tudo. Eu sou grata a Deus por tê-los na minha vida. Obrigada, vocês são essenciais na minha vida, e eu amo muito vocês.

Ao queridíssimo Professor Dr. José Ângelo, a quem tive a honra de conhecer e ter como orientador e amigo. Obrigada por me iniciar em uma nova área, me ensinando caminhar, mostrando qual era o melhor passo a dar, um de cada vez, com muita paciência e sensibilidade. Obrigada pela amizade, apoio, incentivo, confiança, e principalmente pela sua humildade e exemplo de ética profissional. Sentirei saudades, lembrando sempre de ti com muito carinho.

A minha comadre e amiga, Renata. Obrigada por dividir comigo cada dia árduo dentro do laboratório, só nós duas sabemos o que passamos juntas, e o quanto foi difícil chegar até aqui. Você é minha metade científica, é essencial na minha vida.

A Dra. Lúcia Maria Braz, por ser tão dedicada, por me auxiliar em pequenos detalhes de preparação da defesa, apresentação e correções da dissertação, sua ajuda foi indispensável nesse período de conclusão, além dos inúmeros conselhos.

A profa. Dra. Hiro Goto por acreditar neste projeto e disponibilizar o Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos Funcionários do Instituto Adolfo Lutz, Natalia Fernandes, Juliana Guerra, e Rodrigo Ressio, que contribuíram com dedicação e presteza para o desenvolvimento da parte histológica do trabalho, obrigada. Também aos aprimorandos e alunos, Eduardo, Paloma, Talita, Patrícia e Angélica pela prontidão em colaborar com meus experimentos.

As minhas amigas Elisabete Ourique e Alline Rodrigues, vocês sabem que não foi por acaso que essa amizade nasceu e se tornou tão importante para mim.

As minhas queridas companheiras de grupo Ana Paula Blume, Mirela Alves, e Thais Lima, dividimos tantas agonias, alegrias e cafezinhos, levo comigo a amizade e boas lembranças com muito carinho.

Aos professores, alunos e funcionários do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo: Profa. Thelma Okay, Prof. Paulo Cotrim, Dra. Kelly Kanunfre, Dra. Guita Rubinsky, Dr. Júlio Resende, Wilson Domingues, Dra. Lúcia Yamamoto, Larissa, Beatriz Celeste, Dra. Carmem Sanchez, Dra. Sandra Castro, MS. Christiane Ozaki, Dra. Marina Souza, Dra. Luisa Reis, Dr. Eduardo Sanches, Fernanda, Ariane Leal, Mayumi Fujimori, Marianne Britto, Orlando Sevillano, Bernardina Uscata, Mussya Cisotto, MS Edite Hatsumi. Ao Instituto de Medicina Tropical e ao Instituto Adolfo Lutz pelo espaço concedido.

Aos hamsters utilizados como modelo experimental neste trabalho, contribuindo para a realização da pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem meu convite e contribuírem para a conclusão deste trabalho.

Ao financiamento deste projeto cedido pela CAPES, com bolsa de mestrado (2015-2017).

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

“A persistência é o caminho do êxito. ”

Charles Chaplin

RESUMO

Mendonça, DBD. Análise do microbioma de bactérias de luz intestinal de hamsters e sua correlação com LPS circulante, decorrente da translocação microbiana na leishmaniose visceral experimental (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2017.

A leishmaniose visceral, na sua forma clínica ativa, caracteriza-se por febre de longa duração, hepatoesplenomegalia e caquexia. No Brasil, a letalidade é, em média, de 7% e as principais causas de morte são: hemorragia, comorbidade com doenças imunossupressoras e infecção bacteriana. O mecanismo de aumento de infecção bacteriana na LV não está claro e uma das hipóteses, é que pode haver translocação bacteriana da mucosa intestinal para o lúmen dos vasos sanguíneos e ocasionar uma maior severidade da resposta imuno-inflamatória e com consequente piora clínica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de translocação microbiana em hamsters infectados experimentalmente com *Leishmania (L.) infantum* e correlacionar com as alterações histopatológicas encontradas no intestino dos animais infectados. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram infectados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de *L. (L.) infantum* e eutanasiados após 48, 72 horas e 15, 45 e 90 dias de infecção. Como grupo controle foram utilizados hamsters inoculados intraperitonealmente com meio de cultura RPMI. Foram coletados: sangue, fezes, baço, intestinos grosso e delgado. Para detecção de amastigotas na mucosa intestinal, foi utilizada a técnica de PCR em tempo real (qPCR), imunohistoquímica e análise histopatológica, sendo que nesta técnica também foram avaliadas alterações histológicas no tecido intestinal. O baço foi utilizado para determinar a carga parasitária através da técnica de Stauber. Para detecção da translocação microbiana ou produtos desde, foi realizada a quantificação de lipopolissacarídeo (LPS) em plasma. Para avaliar a possível mudança da flora bacteriana intestinal, foi realizado sequenciamento bacteriano de amostra de fezes de hamsters controles e infectados nos vários tempos de infecção. Observamos aumento da carga parasitária em baço e em intestino com o decorrer da infecção, sendo a diferença significativa aos 90 dias de infecção. Paralelamente, observamos aumento de LPS circulante nos animais infectados em diferentes tempos, 48 horas, 72 horas, 45 dias e 90 dias, com diminuição no período intermediário de 15 dias, porém com diferença

significante somente aos 90 dias após a infecção em relação ao grupo controle. Alterações histopatológicas foram observadas no intestino grosso e delgado, variando de infiltrado inflamatório leve a grave, enterite, histiocitose e ainda presença de amastigotas. As alterações observadas ocorreram a partir de 48 horas de infecção, diferenciando a população do infiltrado inflamatório entre neutrófilos, linfócitos, e ainda eosinófilos em intestino grosso de animais com 90 dias de infecção. O sequenciamento de DNA bacteriano das fezes mostra que houve alteração no microbioma dos animais, porém não há identidade significativa, ou seja, acima de 95% na maioria das bactérias. Concluímos que as alterações de histologia da mucosa, a invasão de amastigotas neste tecido e o aumento do LPS, sugerem que a translocação microbiana é um evento ocorrente durante a infecção por *L. (L.) infantum* neste modelo experimental.

Descritores: Parasitologia. Protozoologia. Comportamento Animal. Microbiologia. Hamsteres. Infecção Experimental.

ABSTRACT

Mendonça, DBD. Microbial analysis of intestinal light bacteria of hamsters and their correlation with circulating LPS, due to microbial translocation in experimental visceral leishmaniasis (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical of São Paulo of Universidade de São Paulo; 2017.

Visceral leishmaniasis, in its active clinical form, is characterized by long-lasting fever, hepatosplenomegaly and cachexia. In Brazil, the lethality is, on average, 7% and the main causes of death are hemorrhage, comorbidity with immunosuppressive diseases and bacterial infection. The mechanism of increased bacterial infection in LV is unclear and one of the hypotheses is that there may be bacterial translocation of the intestinal mucosa to the lumen of the blood vessels and cause a greater severity of the immune-inflammatory response and consequent clinical worsening. The objective of this work was evaluate the occurrence of microbial translocation in *Leishmania (L.) infantum* infected-hamsters and correlate with the histopathological changes found in the gut of infected animals. Hamsters (*Mesocricetus auratus*) were infected intraperitoneally with 2×10^7 amastigotes of *L. (L.) infantum* and euthanized after 48, 72 hours and 15, 45 and 90 days of infection. As a control group, hamsters were inoculated intraperitoneally with RPMI culture medium. Were collected: blood, feces, spleen, large and small intestines. To detection amastigotes in intestinal mucosa, real-time PCR (qPCR), immunohistochemistry and histopathological analysis were used, and histological alterations in intestinal tissue were also evaluated. Spleen was used to determine the parasitic load through the Stauber technique. To detection of microbial translocation or products related, was performed quantification of lipopolysaccharide (LPS) in plasma. In order to evaluate the possible change in intestinal bacterial flora, bacterial sequencing of sample faeces from control and infected hamsters was carried. We observed increased parasite load on spleen and intestine as the infection progressed, the difference being significant at 90 days of infection. At the same time, we observed increased circulating LPS in infected animals at different times, 48 hours, 72 hours, 45 days and 90 days, with decrease in the intermediate period of 15 days, however significant difference was

observed only at 90 days post-infection in relation to control group. Histopathological changes were observed in the large and small intestine, ranging from mild to severe inflammatory infiltrate, enteritis, histiocytosis, and amastigotes. The changes occurred from 48 hours of infection, differentiating the population of the inflammatory infiltrate between neutrophils, lymphocytes, and even eosinophils in the large intestine of animals with 90 days of infection. [Bacterial sequencing shows that there was a change in the microbiome of the animals, but there is no significant identity, ie, above 95% in most bacteria. We conclude that changes in mucosal histology, invasion of amastigotes in this tissue and increase in LPS, suggest that microbial translocation is an event occurring during *L. (L.) infantum* infection in this experimental model.

Descriptors: Parasitology. Protozoology. Animal behavior. Microbiology. Hamsters. Experimental Infection.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1- (A) Formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> ; (B) Formas promastigotas de <i>Leishmania sp.</i>	12
Figura 2- Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> . (1) Flebotomíneo ingere sangue de um indivíduo saudável (inoculando forma promastigota); (2) No hospedeiro vertebrado, promastigotas são fagocitados por macrófagos; (3) Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos; (4) Amastigotas se multiplicam dentro da célula por divisão binária; (5) Flebotomíneo ingere sangue com macrófagos infectados com amastigotas; (6) Ingestão de células parasitadas; (7) Amastigotas se transformam em promastigotas no tubo digestório do flebotomíneo; (8) Promastigotas dividem-se no intestino do flebotomíneo e migram para a faringe do inseto.....	14
Figura 3- Distribuição da microbiota intestinal normal humana (Modificado de JANDHYALA et al., 2015).....	18
Figura 4- Determinação do peso do baço (mg) dos hamsteres controle e infectados com 2×10^7 <i>L. (L.) infantum</i> , nos vários tempos de infecção. Valor p <0,05. GC=grupo controle; G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.....	28
Figura 5- Determinação da carga parasitária, no baço de hamsteres infectados com <i>L. L. infantum</i> , de acordo com o tempo pós-infecção. Para determinação da LDU (<i>Leishmania donovani Unit</i>) utilizou-se o método de Stauber (1958), sendo contadas 1000 células mononucleares ou 1000 parasitos em 10 campos por lâmina. Valor p: <0,05. GC=grupo controle; G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.....	29
Figura 6- Correlação entre o peso do baço e a carga parasitaria de hamsteres infectados intraperitonealmente com 2×10^7 <i>Leishmania (L.) infantum</i> , nos vários tempos	

de infecção (48 hs, 72 hs, 15 dias, 45 dias e 90 dias após a infecção).
Correlação de Pearson. Intervalo de confiança (95%)=0,9496 a 0,9911. Valor
de $p=0,0001 (<0.05)$30

Figura 7- Quantificação de LPS circulante no plasma de hamsteres infectados e não infectados por *L. (L.) infantum*. Valor $p<0,05$. LPS=Lipopolissacárideo; GC=grupo controle; G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.....31

Figura 8- Correlação entre a carga parasitária no baço e níveis plasmáticos de lipopolissarídeos (LPS) de hamsteres controle (sem infecção) e infectados intraperitonealmente com 2×10^7 *Leishmania (L.) infantum*, nos vários tempos de infecção (48 hs, 72 hs, 15 dias, 45 dias e 90 dias após a infecção). Correlação de Pearson. Intervalo de confiança (95%)= 0.04189 a 0.6870. Valor de $p=0,0312 (<0.05)$32

Figura 9- Fotomicrografia de baço de hamsteres com coloração HE. A) GC= animal controle; B) G48HPI (Seta: histiocitose discreta); C) 72HPI (Seta: histiocitose discreta); D) G15DPI (Seta: histiocitose moderada); E) G45DPI (Seta: Hiperplasia de polpa branca); F) G90DPI (Seta: Depleção de polpa branca).....35

Figura 10- Fotomicrografia de intestino grosso de hamsteres com coloração HE. A) Animal controle; B) G48HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); C) G72HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); D) G15DPI (Seta: Infiltrado linfocitário difuso moderado); E) G45DPI (Seta: Congestão moderada); F) G90DPI (Seta: Infiltrado eosinofílico multifocal discreto).....37

Figura 11- Fotomicrografia de intestino delgado de hamsteres com coloração HE. A) Animal controle; B) G48HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); C) G72HPI (Seta: Congestão focal); D) G15DPI (Seta: Infiltrado linfocitário multifocal moderado); E) G45DPI (Seta: Enterite severa); F) G90DPI (Seta: Infiltrado linfocitário multifocal discreto).....39

Figura 12- Fotomicrografia de criptas e vilosidade do intestino delgado de hamsteres com coloração HE. A) Animal controle (Seta: Vilosidade normal, sem alteração histológica e B) G90DPI (Seta: Vilosidade com aplanamento da mucosa, e atrófica vilositária).....	40
Figura 13- Imunomarcção de amastigotas presentes no tecido de intestino grosso de hamster com 90 dias pós-infecção. 11 A. Seta: Serosite extensa. 11 B. Aumento maior da área de serosite, em detalhes amastigotas marcadas.....	41
Figura 14- Curva de detecção de DNA de <i>L. (L.) infantum</i> por PCR em tempo real em intestino grosso de hamsteres: GC, G48HPI, G72HPI, G15DPI, G45DPI e G90DPI.....	42
Figura 15- Curva de detecção de DNA de <i>L. (L.) infantum</i> por PCR em tempo real em intestino delgado de hamsteres: GC, G48HPI, G72HPI, G15DPI, G45DPI e G90DPI.....	43
Figura 16- Eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com GelRed, demonstrando produto de PCR purificado após amplificação do alvo 16S com 1500pb. Poços 1-5 Animais controle; Poços 6-8: Animais do grupo G48HPI; Poços 9-13: Animais do grupo G72HPI; Poços 14-18: Animais do grupo G15DPI; Poços 19-23 animais do grupo G45DPI; Poços 24-29 animais do grupo G90DPI; Poço 31 controle positivo.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPI: Dias pós-infecção

IFN- γ : Interferon - gama

IL1: Interleucina 1

IL6: Interleucina 6

GALT : Tecido linfático associado ao intestino

HE : Hematoxilina-Eosina

HPI: Horas pós-infecção

HIV: Vírus da Imunodeficiência humana

kDNA: DNA do kinetoplasto

LDU: *Leishmania donovani Unit*

LPS: Lipopolissacarídeo

LV: Leishmaniose Visceral

LT: Leishmaniose Tegumentar

MIF: Fator de inibição da migração de macrófagos

PCR: Reação em cadeia de Polimerase

PP: Placas de Peyer

qPCR: Reação em cadeia de Polimerase em tempo real

TGI: Trato gastrointestinal

TM: Translocação Microbiana

TCD4+: Linfócito TCD4 positivo

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição das alterações histopatológicas do baço de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); presença de amastigotas (AMG).

Tabela 2- Descrição histopatológica da mucosa do intestino grosso de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); distribuição (DT); focal (F); difuso (D); multifocal (M); amastigotas (AMG); congestão (CONG).

Tabela 3- Descrição das alterações histopatológicas da mucosa do intestino delgado de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); distribuição (DT); focal (F); difuso (D); multifocal (M); amastigota (AMG); congestão (CONG).

Tabela 4- Bactérias Gram negativas encontradas nas fezes de hamsteres controle e infectados. As sequências que não mostram semelhança significativa com as depositadas em GenBank não foram consideradas.

UNIDADES DE MEDIDA

%: Porcentagem

kb: Kbites

Kg: Kilogramas

µg: Microgramas

mL: Mililitros

mM: Milimolar

mm: Micrometros

mM: Micromolar

ng: Nanogramas

nm: Nanomolar

°C: Graus Celsius

pg: picogramas

pMol: Picomol

U: Unidades

µL: Microlitros

µm: Micrometros

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO GERAL	21
2.1	Objetivos Específicos.....	21
3	METODOLOGIA.....	22
3.1	Animais	22
3.2	Parasitos	22
3.2.1	Obtenção de amastigotas.....	22
3.3	Protocolo experimental	23
3.3.1	Coleta de Amostras	23
3.4	Análise da carga parasitária por microscopia óptica	23
3.5	Quantificação de LPS	24
3.6	Análise Histopatológica	24
3.7	Reação de Imunohistoquímica	24
3.8	Extração e Quantificação de DNA	25
3.9	Deteção de L. (L.) infantum através de qPCR	25
3.10	Extração do DNA de bactérias a partir de amostras fecais	26
3.11	Sequenciamento	26
3.11.1	Amplificação de sequências-alvo.....	26
3.11.2	Purificação de fragmentos.....	27
3.11.3	Reação de Sequenciamento.....	27
3.12	Análise estatística.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1	Análise morfológica do baço	28
4.2	Determinação da Carga Parasitária	29
4.3	Correlação Peso do Baço e Carga Parasitaria	30
4.4	Quantificação dos níveis de LPS circulante.....	31
4.5	Correlação de Carga Parasitaria e Níveis plasmáticos de LPS	32
4.6	Análise histológica.....	33
4.7	Relação Vilosidades / Criptas	40

4.8 Detecção de amastigotas	41
4.8.1 Imunohistoquímica.....	41
4.8.2 Detecção de DNA de <i>L. (L.) infantum</i> em mucosa intestinal por meio da PCR tempo real.....	42
4.9 Amplificação de sequências-alvo pré-sequenciamento	43
4.10 Sequenciamento	44
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO I	61
ANEXO II.....	62

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, divididos nos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*¹. A espécie causadora influencia diretamente o tipo de manifestação clínica, podendo haver leishmaniose tegumentar (LT), ou leishmaniose visceral (LV)². No Brasil, atualmente circulam oito espécies de *Leishmania*, dentre elas sete são responsáveis por causar leishmaniose tegumentar e apenas a uma é causadora da leishmaniose visceral³. No grupo das seis endemias prioritárias no mundo, a leishmaniose é a segunda doença em mortalidade⁴. A doença é endêmica em 98 países, em desenvolvimento e subdesenvolvidos. No Brasil a incidência anual é de 3481 novos casos de LV e 26,008 de LC⁵.

A *Leishmania* apresenta um ciclo heteroxênico com distinção morfológica entre os estágios. No hospedeiro invertebrado, encontram-se formas promastigotas que são alongadas, com flagelos exteriorizados e, que são as formas infectantes, transmitidas ao hospedeiro vertebrado, pelos insetos pertencentes a família *Psychodidae*, gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus* no Novo e Velho Mundo, respectivamente⁶. No hospedeiro vertebrado encontra-se a forma amastigota, arredondada, com flagelo interiorizado, sendo esta a forma patogênica (Figura 1).

Figura 1- (A) Formas amastigotas de *Leishmania* sp.; (B) Formas promastigotas de *Leishmania* sp.

O ciclo biológico inicia-se quando a fêmea do mosquito ao realizar o repasto sanguíneo inocula formas promastigotas de *Leishmania*, no hospedeiro vertebrado. As promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear e no interior da célula, ocorre internalização do seu flagelo, transformando-se em amastigota, havendo replicação no interior da célula hospedeira por divisão binária do parasito, até que ocorra o rompimento da membrana celular e infectando novas células. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, no indivíduo já infectado, o flebotomíneo ingere sangue contendo as células infectadas. Dentro do tubo digestório do inseto, o parasito se diferencia novamente em forma promastigota procíclica, e logo após, ocorre migração para a faringe, se diferenciando em promastigotas metacíclicas (Figura 2), forma infectante desse protozoário que será inoculada num próximo repasto sanguíneo.

No Brasil, a LV é causada pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, do complexo *donovani*. É considerada a forma clínica mais grave das leishmanioses, podendo ser letal, caso não tenha diagnóstico confirmado rapidamente e não tratada adequadamente⁷. Anualmente ocorrem 300.000 casos estimados de LV e mais de 20.000 mortes no mundo. Além disto, há cerca de um bilhão de pessoas vivendo em áreas de risco⁸ e 34 países com registros de casos de coinfeção LV – HIV⁹. Nas Américas de 2001 a 2011 foram registrados 38.808 casos de LV amplamente distribuídos em 12 países, porém o Brasil contribui com cerca de 96% dos casos autóctones¹⁰. No Brasil, em 2015 a letalidade foi de 7,8%, e 7,4% dos casos tinham coinfeção com HIV.

Figura 2- Ciclo biológico de *Leishmania*. (1) Flebotomíneo ingere sangue de um indivíduo saudável (inoculando forma promastigota); (2) No hospedeiro vertebrado, promastigotas são fagocitados por macrófagos; (3) Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos; (4) Amastigotas se multiplicam dentro da célula por divisão binária; (5) Flebotomíneo ingere sangue com macrófagos infectados com amastigotas; (6) Ingestão de células parasitadas; (7) Amastigotas se transformam em promastigotas no tubo digestório do flebotomíneo; (8) Promastigotas dividem-se no intestino do flebotomíneo e migram para a faringe do inseto.

A evolução da doença depende de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro vertebrado, tais como a quantidade de inóculo do parasito e o status imunológico do hospedeiro. Durante a fase ativa da infecção, o parasito multiplica-se nas células do sistema fagocítico mononuclear (baço fígado e medula óssea). O estado imunológico do paciente tem influência direta na forma clínica da LV, sendo elas: assintomática, oligossintomática e clássica^{2,11}. A forma assintomática é caracterizada por ausência de manifestação clínica e sorologia para *Leishmania* ou teste de Montenegro positivo, sendo considerado um polo de resistência. Na forma oligossintomática há presença de discretas manifestações clínicas, como febre, hepato/esplenomegalia discreta, associado à sorologia positiva para leishmaniose, sendo que esta forma pode evoluir para forma

clássica ou forma assintomática, em decorrência de susceptibilidade ou resistência do hospedeiro vertebrado. A forma clássica é a mais grave, com manifestações clínicas exacerbadas, como febre de longa duração, hepatoesplenomegalia, e pode apresentar infecção bacteriana associada^{12; 13}, além de outros sinais de gravidade (icterícia, sangramento), além disto, nesta forma da doença, há imunossupressão antígeno específico e ativação policlonal com produção de citocinas pró-inflamatórias, que são revertidos após a cura clínica¹⁴. Para um melhor entendimento da imunopatogenia da LV, modelos experimentais têm sido utilizados.

A utilização de modelos experimentais para estudos sobre leishmaniose tem revelado aspectos importantes sobre a evolução da doença e a resposta imune. Além disso, também têm sido utilizados para ampliar e sugerir novas estratégias terapêuticas e desenvolvimento de vacinas¹⁵. Hamsteres e cães têm se mostrado excelentes modelos experimentais para LV, especialmente por apresentarem susceptibilidade similar ao homem, além de sinais clínicos clássicos durante a infecção experimental, enquanto o camundongo mostra poucos ou não apresenta tais sinais^{16; 17}. Ainda assim, há dificuldade nesses estudos em obter homogeneidade nos resultados, isto por que a evolução da doença visceral experimental, assim como na infecção natural, é singular para cada indivíduo, dependendo quase exclusivamente do estado imunológico em que se encontra. O hamster *Mesocricetus auratus*, ou hamster dourado como é conhecido, foi selecionado para este estudo por reproduzir aspectos da LV como hipergamaglobulinemia, pancitopenia, leucopenia, caquexia, e diminuição de células T, semelhante ao homem¹⁸.

Diversos fatores são estudados como preditores de gravidade e risco de morte na LV. Belo *et al* (2014)¹⁹, em um estudo de meta-análise, na análise multivariada, observaram que icterícia, trombocitopenia, hemorragia, dispneia, neutropenia severa, infecção por HIV, diarreia e infecção bacteriana são fatores fortemente associados ao óbito por LV. De fato, a infecção bacteriana é um fator de pior prognóstico na LV, visto que se descreve com frequência infecção por Gram negativo associada à LV. Em recentes estudos, há descrição de aumento de LPS em sangue circulante de pacientes com LV e principalmente naqueles coinfectados com HIV²⁰. Ademais, diarreia está não somente associada a desfecho desfavorável (risco de morte), como também é mais frequente em pacientes com infecção pelo HIV²¹. Estes fatos sugerem que possa ocorrer quebra de

barreira gastrointestinal e então translocação microbiana da mucosa intestinal para o lúmen dos vasos sanguíneos.

Berg e Garlington (1980)²² citam a translocação microbiana (TM) como "a passagem de bactérias viáveis através da mucosa epitelial na lâmina própria e, em seguida para os linfonodos mesentéricos e, possivelmente, outros tecidos", este conceito se repetiu ao longo dos anos. Entretanto, atualmente essa definição tornou-se mais ampla e inclui a passagem não fisiológica de microflora viáveis ou não^{23; 24}, além de seus produtos microbianos, após a microbiota intestinal entrar em contato com os gânglios linfáticos ocorre a disseminação para outros órgãos²⁵. O fígado, nestas circunstâncias, torna-se o órgão com maior vulnerabilidade a uma exposição desses produtos bacterianos translocados quando as funções de barreira do epitélio intestinal são interrompidas²⁶.

Os mecanismos pelos quais a TM provoca ativação imune crônica não são bem claros. Um evento patogênico parece ser a ativação constante de imunidade inata via receptores Toll-like e outros receptores de reconhecimento de patógenos. Caso o sistema imunológico do paciente já esteja comprometido, os mecanismos de defesa naturais da lâmina própria do intestino tornam-se falhos, permitindo a saída e até a sobrevivência de bactérias em locais distantes extra-intestinais^{27; 28}. A TM já foi descrita em outras doenças, como na doença inflamatória intestinal²⁹, linfocitopenia CD4 idiopática³⁰ e infecção pelo HIV^{31; 32}. A invasão das mucosas por amastigotas de *Leishmania* e a depleção de linfócitos sistêmicos, observada em pacientes com LV, pode contribuir para a liberação de lipopolissacarídeo (LPS)³³. A TM pode ativar células do sistema imune inato através de receptores Toll, contribuindo assim para um ambiente repetitivo de ativação imunológica e pode associar-se à infecção crônica, o que ocorre em pacientes com HIV, e possivelmente ocorra em também em pacientes com LV^{34;35}.

Luz *et al* (2010)³⁶ demonstraram em pacientes com LV submetidos à endoscopia com biópsia duodenal, presença de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, além do aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias. A infecção por LV tem seu quadro clínico agravado em pacientes adultos e crianças que são acometidos por infecção bacteriana, que pode ser causada pela TM, inclusive sendo a principal causa de óbitos desses pacientes^{37; 38}. Estes achados justificam a hipótese de que a infecção por *Leishmania* acomete a mucosa intestinal e favorece a TM, este sendo um dos principais fatores de gravidade em pacientes com LV. O trato gastrointestinal (TGI) funciona como

uma barreira de contenção da microbiota no interior do lúmen intestinal, estímulos fisiológicos e patológicos podem causar alteração na permeabilidade desta barreira³⁹, que participa de um complexo ecossistema com importante relação com o sistema imune do hospedeiro e suas células epiteliais⁴⁰. Essa interação permite um bom funcionamento desse ecossistema, reduzindo o risco de uma passagem excessiva de agentes microbianos para a circulação, prevenindo a ativação imune sistêmica⁴¹, sendo assim, é importante a identificação de bactérias suscetíveis a translocação microbiana.

No trato gastrointestinal, especificamente nos intestinos, é onde se concentra a maior parte de microrganismos, e com maior diversidade. Essa microbiota pode exercer significativa influência sobre os mecanismos homeostáticos humanos, como, por exemplo, a sua participação na digestão de alimentos e produção de vitaminas B12 e K, que têm impacto sobre a função e conservação da saúde do sistema digestivo, e a saúde humana como um todo⁴². Além disso, a microbiota intestinal corrobora com o sistema imune, impedindo que ocorram possíveis proliferações de organismos patogênicos, isto por competição⁴¹.

O microbioma é o conjunto de microrganismos que habitam um organismo, e não se refere apenas a bactérias, mas inclui bactérias, *archaea*, *eucarya*, vírus e seus elementos genéticos^{39;41}. Existe uma relação de simbiose entre o organismo humano e os microrganismos que no mesmo habitam, sendo que ambos desfrutam dos benefícios desta associação⁴³. Os termos microbioma e microbiota são considerados por alguns autores como sinônimos⁴⁴, outros consideram microbiota um grupo de microrganismos que habitam um determinado local do organismo, e microbioma o conjunto inteiro de genes que constituem o genoma deste mesmo grupo de organismos⁴⁵, consideramos correto que microbiota e microbioma não são sinônimos, portanto usamos o termo microbioma.

Aproximadamente 35 mil espécies bacterianas compõem o microbioma humano e estão distribuídas por todo o organismo humano (pele, vagina, mucosa oral, vias respiratórias e intestinos)⁴⁶, sendo que 70% concentram-se no intestino grosso e interagem diretamente com o sistema imune (Figura 3)⁴⁷. A distribuição das bactérias depende de inúmeros fatores, tais como temperatura, umidade, acidez e, principalmente, disponibilidade de nutrientes⁴⁰. A variabilidade é significativa, inclusive em indivíduos saudáveis, além de gêneros de bactérias *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, o cólon humano

também hospeda patógenos primários, porém estes com baixa abundância (0,1% ou menos)^{47: 48}.

Figura 3- Distribuição da microbiota intestinal normal humana (Modificado de Jandhyala et al)⁴⁷.

O microbioma começa a definir-se após o nascimento e alguns fatores determinam o microbioma do indivíduo, tornando-o singular, com a idade, dieta, ambiente, uso de antibióticos e até situações de estresse⁴⁹.

O microbioma intestinal também pode ser alterado com a evolução de patogenias e para esta determinação, pode-se utilizar a técnica de sequenciamento de genes, que consiste em duas principais fases: sequenciamento de genes bacterianos com base em rRNA 16S e análise bioinformática. A região 16S do gene bacteriano é pequena (~1,5kb) e bem conservada, suficiente para diferenciação de diversas espécies bacterianas⁵⁰, e tem sido o principal gene de escolha para o estudo de taxonomia e filogenética de bactérias⁵¹. Estas bactérias podem translocar-se da luz intestinal para a corrente sanguínea ou então pode haver passagem de produtos das mesmas. Tanto a bactéria, como componentes da sua parede podem estar relacionados com a resposta imune, induzindo uma ativação

policlonal, com participação de diversos tipos celulares e citocinas secretadas pelas células imunoativadas.

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina liberada da membrana celular externa das bactérias Gram negativas, que normalmente compõem a microbiota intestinal. A presença dessa molécula no plasma sugere a ocorrência de um possível dano à barreira do trato gastrointestinal, que permite a passagem deste para a circulação⁵². A TM pode ser indiretamente detectada pela quantificação dos níveis plasmáticos de LPS⁵². Esta endotoxina possui a capacidade de estimular as células mononucleares por meio do reconhecimento dos receptores TLR-4, e, assim, promover a secreção de inúmeros fatores inflamatórios solúveis, como o IFN- γ , IL-1, IL-6, TNF- α e o MIF⁵³, além disto, pode causar danos ao organismo se uma excessiva inflamação for induzida.

A resposta pró-inflamatória durante a LV é potencializada em pacientes coinfectados com HIV, podendo resultar em uma progressão da doença mais agressiva e assim os níveis de LPS aumentam durante esta infecção e junto a isto, ocorre ativação celular do hospedeiro. Na patogenicidade de infecções como o HIV, a translocação de produtos microbianos também tem sido indiciada como um importante fator de ativação de resposta imune crônica que está associado à progressão destas doenças e o mesmo ocorre em pacientes coinfectados LV-HIV^{20; 54}.

Estudos em modelo experimental de hamsteres infectados com *Leishmania infantum* demonstraram que ocorre aumento de LPS em sangue periférico, com aumento da ativação de resposta imune. Interessantemente o uso de antibiótico reduziu tanto a carga parasitaria quanto a ativação crônica de resposta imune, indicando que a TM que ocorre durante a doença ativa parece estar relacionada com possível dano em mucosa intestinal, entretanto, não houve mensuração das alterações intestinais, assim como da origem do produto bacteriano^{55;56}.

Apesar da detecção de LPS na corrente sanguínea de pacientes com LV³³ e de modelos experimentais^{55,56}, não se sabe ao certo qual a origem desse produto. Sendo assim, a elucidação da origem do LPS circulante, pode contribuir para um melhor entendimento da imunopatogenia da LV, visto que durante a doença ativa já foi descrita a imunoativação como mecanismo de lesão órgão-específico. Pressupõe-se que o acometimento da luz intestinal, pela presença de *Leishmania*, promova alterações

inflamatórias que podem favorecer a TM de bactérias Gram negativas ou produtos destas e, conseqüentemente, ativar células que produzam citocinas pró-inflamatórias que induziriam a imunoativação. A caracterização do processo inflamatório intestinal e a identificação das bactérias podem auxiliar na determinação do uso de antimicrobiano específico ou de anti-inflamatórios que possam diminuir a carga bacteriana e a inflamação, com o intuito de reduzir o dano tecidual e conseqüentemente do processo imunopatogênico.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis lesões intestinais e alteração de flora intestinal em animais infectados com *Leishmania (L.) infantum* e se ocorre translocação microbiana durante esta infecção.

2.1 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a evolução da infecção por *Leishmania (L.) infantum* em hamsteres, através da determinação de peso dos baços, de alterações intestinais e ainda pela quantificação de carga parasitária em baço;
- b) Determinar níveis de LPS circulantes em animais controle e infectados;
- c) Caracterizar as alterações intestinais e determinar carga parasitária nesses tecidos;
- d) Avaliar possíveis alterações na flora intestinal dos animais infectados, e determinar se estas alterações são tempo dependentes.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados hamsteres (*Mesocricetus auratus*), não isogênicos, machos, com idade entre 40-60 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Instituto de Medicina Tropical, em gaiolas convencionais contendo cinco animais cada, alimentados 2 vezes ao dia com ração em pellet (NUVITAL) autoclavada e água *ad libitum*, ciclo de luz/escurecimento. Trinta hamsteres foram divididos nos grupos GC (Controle sem infecção); G48HPI (48 horas pós-infecção); G72HPI (72 horas pós-infecção); G15DPI (15 dias pós-infecção); G45DPI (45 dias pós-infecção); e G90DPI (90 dias pós-infecção). Este projeto teve aprovação pela Comissão de Ética e Pesquisa Animal do Instituto de Medicina Tropical – SP (CEUA-IMT), sob o protocolo 000311A (Anexo I).

3.2 Parasitos

L. (L.) infantum (CEPA MHOM/BR/1972/LD46) foi mantida em hamsteres com inoculações intraperitoneais periódicas de homogeneizado de baço de animais infectados a cada 90 dias, aproximadamente.

3.2.1 Obtenção de amastigotas.

Baços de hamsteres infectados com *Leishmania (L.) infantum* foram macerados em meio RPMI 1640 (GIBCO, EUA), e filtrados em gaze estéril. O macerado foi processado progressivamente, em agulhas 19G, 21G, e 24G e centrifugado a 250 G a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi submetido à nova centrifugação nas mesmas condições seguido de centrifugação por 30 minutos a 1200 G a 4 °C. O precipitado contendo formas amastigotas foi ressuspensão em meio RRMI 1640 e contadas em câmara de Neubauer.

3.3 Protocolo experimental

Para indução de infecção, hamsteres foram inoculados, intraperitonealmente, com 2×10^7 amastigotas de *L. (L.) infantum*, em cada animal. Os animais foram eutanasiados em tempos crescentes após a infecção. Como grupo controle, hamsteres foram inoculados intraperitonealmente com meio de cultura RPMI 1640.

3.3.1 Coleta de Amostras

Nos tempos determinados pós-infecção os animais foram anestesiados com 200mg/Kg de cloridrato de quetamina, associado com 10mg/Kg de peso de cloridrato de xilazina, intramuscular⁵⁷; sendo então coletado o sangue periférico por punção cardíaca em tubo de coleta com EDTA. Após eutanásia sob CO₂ foram retirados o intestino grosso, intestino delgado e baço, por dissecação abdominal. As amostras de tecidos foram divididas em duas partes: uma parte mantida em formalina tamponada 10% e, posteriormente emblocada em parafina para análise histológica; e outra parte do tecido armazenada em freezer -20 °C para extração de DNA.

3.4 Análise da carga parasitária por microscopia óptica

A contagem de amastigotas de *Leishmania* e células mononucleares foi realizada por meio da leitura de *imprints* de baço (aposição do órgão em lâminas), os quais foram corados com Panótico (Newprov, Paraná, Brasil), e examinados em microscopia óptica (Zeiss, Alemanha). A determinação de carga parasitária foi realizada segundo Stauber (1958)⁵⁸. Contou-se 1000 células ou parasitos de cada amostra, e a *Leishmania donovani* Unit (LDU) foi calculada com a seguinte fórmula:

$$\text{LDU} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{N}^\circ \text{ de células}} \times \text{peso do órgão (mg)} \times 2 \times 10^4$$

Nº de células

3.5 Quantificação de LPS

O sangue total foi coletado em tubo contendo EDTA, dos animais, sob anestesia e antes da eutanásia. Após a coleta, o sangue foi centrifugado imediatamente, a 3000rpm por 10 minutos, para separar o plasma, que foi mantido em -80 °C até o momento do uso. Para a quantificação do LPS, utilizamos o kit QCL-1000 Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Lonza, Suíça), seguindo orientações do fabricante. Em microplacas de 96 poços, adicionou-se 50µL das amostras de cada tempo de infecção, em duplicata, o controle da concentração, a partir de amostra de *E. coli* (fornecido pelo fabricante) e amostras negativas, isto é, água apirogênica. Posteriormente, acrescentou-se 100µL de solução de substrato, mantido a 37 °C, por 10 minutos. Depois foi adicionado 100µL do reagente de parada (ácido acético glacial). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 410nm, os resultados foram expressos em pg/mL, com limite de detecção de 10pg/mL.

3.6 Análise Histopatológica

A análise histopatológica foi realizada no centro de anatomia patológica do Instituto Adolfo Lutz. Amostras de baço, intestino grosso e delgado foram removidos e mantidos em formalina tamponada a 10%, pH7.0, em seguida emblocados em parafina. Foram realizados cortes de 5 µm e fixados em lâmina tratada com organo-silano. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em álcoois em concentrações crescentes de 70, 85, 95 e 100%. Após a desidratação, os tecidos foram embebidos em três banhos de xilol para diafanização e em seguida incluídos em parafina e seccionados em micrótomo manual. Cortes de 5µm de espessura foram dispostos em lâminas de vidro, com coloração de hematoxilina-eosina (HE), analisados por microscopia de luz, sem identificação prévia dos grupos.

3.7 Reação de Imunohistoquímica

Os cortes de tecidos de intestinos grosso e delgado já emblocados, foram desparafinizados e rehidratados com xilol quente, à temperatura ambiente, submergidos em etanol absoluto, 95%, 80% e 50%, respectivamente. Após, foi realizada a recuperação

antigênica, com solução pH 9,0, contendo Tris EDTA, em panela de pressão. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio com incubação de 30 minutos, a 37 °C. Em seguida foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas, com incubação a 37 °C, por 40 minutos. Realizamos a incubação com anticorpo primário *Leishmania*, diluído 1/5000 em solução de albumina bovina a 1%. As lâminas permaneceram em geladeira (4 °C) overnight. Após este período, foi realizada a incubação com anticorpo secundário, em estufa a 37 °C, durante 30 minutos. Em seguida, foi realizada a incubação com polímero (complexo estreptoavidina peroxidase), em estufa a 37 °C, por 30 minutos. A revelação foi realizada com DAB (Substrato cromogênico) e a contra-coloração com a Hematoxilina de Harris, seguida de desidratação com etanol a 50%, 80%, 95% e absoluto, respectivamente e xilol. A montagem das lâminas foi realizada com Entellan.

3.8 Extração e Quantificação de DNA

Foi extraído o DNA total dos tecidos de intestinos grosso e delgado, utilizando-se kit comercial de isolamento de DNA gênomico (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen Biotecnologia Brasil), seguindo orientações do fabricante. O DNA foi quantificado por espectrometria de massa no equipamento Nanodrop 2000.

3.9 Detecção de *L. (L.) infantum* através de qPCR

A detecção do DNA de *L. (L.) infantum* foi realizada por meio da qPCR utilizando-se oligonucleotídeos que se ligam à região conservada do minicírculo do kDNA, previamente descritos por Ghasemian *et al* (2016)⁵⁹, RV1 CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG e RV2 CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA. O mix de reação foi composto por 12,5µL de intercalante de DNA, BRYT Green (Promega, Brasil), 4µL DNA a 25ng/µl, 0,1µL de cada iniciador a 10pMol e 6,5µL de H₂O. As condições de ciclagem foram as seguintes: um ciclo a 95 °C por 15 segundos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 1 minuto e 60 °C por 20 segundos.

3.10 Extração do DNA de bactérias a partir de amostras fecais

Após eutanásia foram coletadas 100mg de fezes dos animais, a partir do intestino grosso, centrifugadas em salina estéril (NaCl 0,85%). Foi utilizado o protocolo modificado de Ley *et al* (2005)⁶⁰. O DNA foi extraído utilizando-se 500µL de solução tampão (200mM Tris*_{pH8.0}, 200mM NaCl, 20mM EDTA), 210µL de SDS 20%, 500µL fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e 5 esferas de vidro de 0,1mm de diâmetro. Após a adição da amostra foi realizada homogeneização em vórtex à temperatura ambiente, por 15 segundos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação a 21480 g, durante 5 minutos, para a separação do sobrenadante, o qual foi incubado com 10µL de Proteinase K (10U/µL) durante 15 minutos, a 37 °C. Após isso foi feita nova precipitação com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e separado o sobrenadante. Foi adicionado ao sobrenadante 600µL de isopropanol, misturado por inversão e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente. O isopropanol foi desprezado e foi adicionado 1000µL de etanol 70% gelado. Foi realizada centrifugação por 5 minutos, a 21480g, desprezando-se o etanol. Depois de seco o pellet, o DNA foi ressuspenso em água estéril.

3.11 Sequenciamento

3.11.1 Amplificação de sequências-alvo

Para amplificação das sequências-alvo, utilizamos os oligonucleotídeos iniciadores específicos para RNA Ribossomal - 16S, sendo eles: 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGHTACCTTGTTACGACTT)⁶¹.

Os iniciadores foram utilizados em volumes iguais (2µL) a 10pMol, junto a 12,5µL do PCR *MasterMix* (Promega, Brasil), 5µL de 20–50 ng de DNA genômico, e 5,5µL de H₂O DNase Free, em um volume total de 25µL.

Os tubos foram então colocados no termociclador com as seguintes condições de amplificação: ativação da enzima a 95 °C, por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto, com extensão final de 72 °C por 10 minutos e 4 °C ∞⁶².

3.11.2 Purificação de fragmentos

Os fragmentos foram purificados com kit comercial QIAquick PCR purification (Qiagen Biotecnologia Brasil), seguindo orientações do fabricante. Foram adicionados 10µL do produto de PCR e 50µL de tampão PB à coluna, centrifugados por 60 segundos a 18928g. Desprezado o filtrado, foi adicionado 750µL de tampão PE, após uma nova centrifugação nas mesmas condições. Novamente descartado o filtrado, e eluído com 30µL de tampão EB, deixado à temperatura ambiente por 1 minuto, seguido de centrifugação final de 18928g por 60 segundos.

3.11.3 Reação de Sequenciamento

As amostras foram enviadas ao Setor de Serviços de Sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco da Universidade de São Paulo. Os produtos desta reação foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies, Estados Unidos), utilizando 5mM de cada primer e BigDye Terminador v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Estados Unidos) para prosseguir a reação.

As sequências foram analisadas pelo software BioEdit 7.0.4 (Carlsbad, CA) e os resultados obtidos foram comparados com a base de dados do GenBank, as bactérias encontradas foram comparadas entre si, afim de verificar se houve alteração no microbioma dos hamsteres.

3.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA), e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. As comparações foram feitas entre os grupos de animais controle e infectados, para isto, foi utilizado o teste Kruskal Wallis (não-paramétrico).

4. RESULTADOS

4.1 Análise morfológica do baço

Para acompanhar a evolução do quadro clínico dos animais infectados, fizemos análise morfológica do baço, pesando-os após serem coletados. A única manifestação clínica evidente foi a esplenomegalia, não houve outras manifestações clínicas de LV, como arqueamento das patas ou alteração na textura dos pelos. Observou-se o aumento do baço dos animais do grupo G90DPI, em três vezes, em relação ao baço de um animal não infectado na mesma idade. Consideramos significativa a diferença no peso com $p < 0,05$, ou seja, o grupo com 90 dias pós-infecção sobre os outros grupos infectados e controle (Figura4).

Figura 4- Determinação do peso do baço (mg) dos hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*, nos vários tempos de infecção. Valor $p < 0,05$. GC=grupo controle; G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.

4.2 Determinação da Carga Parasitária

A carga parasitária foi mensurada utilizando o método de Stauber (1958), ou seja, a contagem das formas amastigotas intracelulares a partir de *imprints* de baço. Observamos que o aumento da carga parasitaria no baço dos hamsteres infectados com *L. (L.) infantum* foi pertinente ao tempo de infecção, sendo maior a carga parasitária no tempo de 90 dias após infecção. O grupo com 90 dias pós-infecção teve resultado significativo sobre todos os outros grupos, incluindo o grupo com 45 dias pós-infecção (Figura 5).

Figura 5- Determinação da carga parasitária, no baço de hamsteres infectados com *L. L. infantum*, de acordo com o tempo pós-infecção. Para determinação da LDU (*Leishmania donovani Unit*) utilizou-se o método de Stauber (1958), sendo contadas 1000 células mononucleares ou 1000 parasitos em 10 campos por lâmina. Valor p: <0,05. G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.

4.3 Correlação Peso do Baço e Carga Parasitaria

Notamos que houve correlação no aumento tanto de peso do baço e carga parasitaria, este aumento foi expressivo aos 90 dias após infecção, com progressão discreta nos tempos inferiores de infecção.

Figura 6- Correlação entre o peso do baço e a carga parasitaria de hamsteres infectados intraperitonealmente com 2×10^7 *Leishmania (L.) infantum*, nos vários tempos de infecção (48 hs, 72 hs, 15 dias, 45 dias e 90 dias após a infecção). Correlação de Pearson. Intervalo de confiança (95%)=0,9496 a 0,9911. Valor de $p=0,0001$ (<0.05).

4.4 Quantificação dos níveis de LPS circulante

A quantificação do LPS circulante no plasma dos animais mostrou que os níveis da endotoxina são elevados na fase aguda da infecção, quando se inicia a resposta imune do animal e volta a aumentar na fase crônica. Houve diferença significativa somente quando comparados os grupos GC e G90DPI, sendo mais elevado neste grupo (Figura 6).

Figura 7- Quantificação de LPS circulante no plasma de hamsteres infectados e não infectados por *L. (L.) infantum*. Valor $p < 0,05$. LPS=Lipopolissacarídeo; GC=grupo controle; G48HPI=48 horas após infecção; G72HPI=72 horas após infecção; G15DPI= 15 dias após infecção; G45DPI=45 dias após infecção; G90DPI=90 dias após infecção.

4.5 Correlação de Carga Parasitária e Níveis plasmáticos de LPS

Houve aumento significativo nos níveis plasmáticos de LPS aos 90 dias de infecção, este aumento também foi significativo quando quantificamos a carga parasitária, a correlação mostra que a infecção tardia é a com maior carga parasitaria e alterações provocadas por esta, como aumento do LPS (Figura 8).

Figura 8- Correlação entre a carga parasitaria no baço e níveis plasmáticos de lipopolissarídeos (LPS) de hamsteres controle (sem infecção) e infectados intraperitonealmente com 2×10^7 *Leishmania* (*L.*) *infantum*, nos vários tempos de infecção (48 hs, 72 hs, 15 dias, 45 dias e 90 dias após a infecção). Correlação de Pearson. Intervalo de confiança (95%)= 0.04189 a 0.6870. Valor de $p= 0,0312$ (<0.05).

4.6 Análise histológica

A avaliação histológica foi realizada no baço, intestinos grosso e delgado. Observamos que a infecção por *L. (L.) infantum* promove alterações histológicas variadas nos diferentes órgãos analisados, sendo mais proeminente nos tempos mais tardios de infecção. Foram encontrados diferentes graus de inflamação, classificados de acordo com a severidade da lesão.

- Baço: Na polpa branca observamos hiperplasia, em quatro dos cinco animais do G45DPI e um no G90DPI. Depleção da polpa branca foi observada somente nos animais do G90DPI (em quatro animais). Histiocitose foi observada nos diferentes tempos após a infecção (48 horas, 72 horas, 15 dias, 45 dias e 90 dias), entretanto este achado é mais evidente no G90DPI. Neste grupo, dois animais apresentaram parâmetros discrepantes: a ocorrência de focos de calcificação (Animal 2) e esplenite aguda discreta (Animal 3). Congestão foi observada a partir de 72 horas pós-infecção, porém mais exacerbada aos 45 e 90 dias pós-infecção (Tabela 1) (Figura 9).

Tabela 1- Descrição das alterações histopatológicas do baço de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); presença de amastigotas (AMG).

BAÇO					
Grupo	Animal	Polpa branca	AMG	Histiocitose	Congestão
GC	A1	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-
	A5	-	-	-	-
G48HPI	A1	-	-	+	-
	A2	-	+	+	-
	A3	-	-	-	-
G72HPI	A1	-	-	+	+
	A2	-	+	+	-
	A3	-	-	++	-
	A4	-	-	+	+
	A5	-	-	+	-
G15DPI	A1	-	-	+	-
	A2	-	+	++	-
	A3	-	+	+	++
	A4	-	+	+	++
	A5	-	+	++	++
G45DPI	A1	Hiperplasia	-	++	+++
	A2	-	+	++	++
	A3	Hiperplasia	+	+	+++
	A4	Hiperplasia	-	++	+++
	A5	Hiperplasia	+	++	-
G90DPI	A1	Hiperplasia	+	+++	+++
	A2	Depleção	+	+++	+++
	A3	Depleção	+	+++	+++
	A4	Depleção	+	+++	+++

Figura 9- Fotomicrografia de baço de hamsteres com coloração hematoxilina-eosina. A) GC= animal controle; B) G48HPI (Seta: histiocitose discreta); C) 72HPI (Seta: histiocitose discreta); D) G15DPI (Seta: histiocitose moderada); E) G45DPI (Seta: Hiperplasia de polpa branca); F) G90DPI (Seta: Depleção de polpa branca).

Intestino grosso: Foi observado infiltrado inflamatório em diferentes níveis a partir de 48 horas pós-infecção, sendo estes caracterizados por infiltrado neutrofílico e linfocitário. Três dos cinco animais do G90DPI apresentaram infiltrado eosinofílico. Alguns animais apresentaram enterite, com maior predominância no G90DPI. Nos animais dos grupos G72HPI, G15DPI e G45DPI pôde-se observar uma invasão de bactérias na lâmina própria, evento este que não ocorreu com os animais do G90DPI (Tabela 2) (Figura 10).

Tabela 2- Descrição histopatológica da mucosa do intestino grosso de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); distribuição (DT); focal (F); difuso (D); multifocal (M); amastigotas (AMG); congestão (CONG).

INTESTINO GROSSO							
Grupo	Animal	Infiltrado Inflamatório	DT	Tipo	AMG	Enterite	CONG
GC	A1	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	-
	A5	-	-	-	-	-	-
G48HPI	A1	+	F	Neutrofílico	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-
	A3	+	F	Neutrofílico	-	-	-
G72HPI	A1	++	F	Linfocitário	-	-	-
	A2	++	F	Linfocitário	-	-	+
	A3	+	F	Neutrofílico	-	-	-
	A4	+	F	Neutrofílico	+	-	-
	A5	++	F	Neutrofílico	-	-	+
G15DPI	A1	+	D	Linfocitário	-	-	-
	A2	++	D	Linfocitário	-	+++	-
	A3	+	D	Neutrofílico	+	-	+
	A4	+	D	Linfocitário	+	+	-
	A5	++	D	Neutrofílico	-	-	+++
G45DPI	A1	+	D	Linfocitário	+	-	-
	A2	+	D	Linfocitário	-	-	-
	A3	+	D	Linfocitário	+	-	-
	A4	++	D	Linfocitário	-	++	++
	A5	++	D	Linfocitário	-	++	+
G90DPI	A1	+	D	Eosinofílico	+	-	-
	A2	+	M	Eosinofílico	+	++	-
	A3	+	M	Eosinofílico	+	++	-
	A4	+	M	Linfocitário	+	+	-

Figura 10- Fotomicrografia de intestino grosso de hamsteres com coloração hematoxilina-eosina. A) Animal controle; B) G48HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); C) G72HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); D) G15DPI (Seta: Infiltrado linfocitário difuso moderado); E) G45DPI (Seta: Congestão moderada); F) G90DPI (Setas: Infiltrado eosinofílico multifocal discreto).

-Intestino delgado: Observamos que houve infiltrado inflamatório em diferentes níveis, a partir de 48 horas pós-infecção, variando entre neutrofílico e linfocitário. A partir de 72 horas ocorreu enterite em ao menos um animal de cada grupo, com maior predominância no grupo de 45 dias pós-infecção. Com 45 dias pós-infecção observamos histiocitose, e diminuição das células caliciformes. Pôde-se observar congestão em intestino delgado dos animais de todos os grupos infectados. Interessantemente encontramos presença de amastigotas em tecidos dos grupos G72HPI e G15DPI. A partir do G15DPI foi possível identificar que as áreas mais afetadas no intestino delgado estavam nas proximidades das placas de Peyer (PP) (Tabela 3) (Figura 11).

Tabela 3- Descrição das alterações histopatológicas da mucosa do intestino delgado de hamsteres controle e infectados com 2×10^7 *L. (L.) infantum*. Ausente (-); discreto (+); moderado (++); severo (+++); distribuição (DT); focal (F); difuso (D); multifocal (M)); amastigota (AMG); congestão (CONG).

Grupo	Animal	Infiltrado Inflamatório	DT	Tipo	AMG	Enterite	CONG
GC	A1	-	-	-	-	-	-
	A2	-	-	-	-	-	-
	A3	-	-	-	-	-	-
	A5	-	-	-	-	-	-
G48HPI	A1	+	F	Neutrofílico	-	-	+
	A2	+	F	Neutrofílico	-	-	-
	A3	+	F	Neutrofílico	-	-	-
G72HPI	A1	++	D	Linfocitário	-	+	-
	A2	++	M	Linfocitário	+	-	-
	A3	++	D	Linfocitário	+	-	++
	A4	++	M	Linfocitário	-	-	-
	A5	++	D	Linfocitário	-	++	-
G15DPI	A1	+++	M	Linfocitário	-	-	-
	A2	++	M	Linfocitário	+	++	-
	A3	+++	M	Linfocitário	-	++	-
	A4	++	D	Linfocitário	-	+	-
	A5	++	M	Linfocitário	-	+	+
G45DPI	A1	++	M	Linfocitário	-	+++	-
	A2	++	M	Linfocitário	-	+	++
	A3	++	M	Linfocitário	-	+++	-
	A4	++	M	Linfocitário	-	+	-
	A5	++	M	Linfocitário	-	+++	+
G90DPI	A1	+	M	Linfocitário	-	+	++
	A2	-	-	-	-	-	-
	A3	+	M	Linfocitário	-	-	++
	A4	+	M	Linfocitário	-	+	-

Figura 11- Fotomicrografia de intestino delgado de hamsteres com coloração hematoxilina-eosina. A) Animal controle; B) G48HPI (Seta: Infiltrado neutrofílico focal discreto); C) G72HPI (Seta: Congestão focal); D) G15DPI (Seta: Infiltrado linfocitário multifocal moderado); E) G45DPI (Seta: Enterite severa); F) G90DPI (Seta: Infiltrado linfocitário multifocal discreto).

4.7 Relação Vilosidades / Criptas

Consideramos anormal toda vilosidade diminuída e criptas alongadas, pois normalmente, e sem alteração as criptas são curtas e as vilosidades alongadas compostas por células absortivas e caliciformes, sendo assim todos os animais dos grupos G15DPI, G45DPI e G90DPI dias pós-infecção apresentaram anormalidade desses aspectos. É possível afirmar que as células absortivas das vilosidades apresentaram alterações significativas, possivelmente comprometendo sua função. Em alguns casos as criptas ficaram no mesmo tamanho das vilosidades, outros animais apresentaram criptas alongadas e diminuição de vilosidades. No grupo G90DPI, os animais apresentaram grave anormalidade na relação vilosidades / criptas, sendo esta, o aplanamento da mucosa e atrofia vilositária (Figura 12B).

Figura 12- Fotomicrografia de criptas e vilosidade do intestino delgado de hamsteres com coloração hematoxilina-eosina. A) Animal controle (Seta: Vilosidade normal, sem alteração histológica e B) G90DPI (Seta: Vilosidade com aplanamento da mucosa, e atrófica vilositária).

4.8 Detecção de amastigotas

Como método de detecção de amastigotas utilizamos a reação de imunohistoquímica e a PCR em tempo real.

4.8.1 Imunohistoquímica

Utilizando a detecção de antígenos de *Leishmania* com a técnica de imunohistoquímica observamos presença de amastigotas em tecido do intestino grosso aos 90 dias pós-infecção. Não foram detectadas amastigotas no intestino delgado dos animais por esta técnica.

Além de confirmar a hipótese de que as amastigotas comprometem e alojam-se no tecido intestinal, na Figura 13 é possível identificar que, após uma área extensa de serosite em meio a uma área de infiltrado inflamatório, há presença de amastigotas de *L. (L.) infantum* aos 90 dias pós-infecção.

Figura 13- Imunomarcacão de amastigotas presentes no tecido de intestino grosso de hamster com 90 dias pós-infecção. 11 A. Seta: Serosite extensa. 11 B. Aumento maior da área de serosite, em detalhes amastigotas marcadas.

4.8.2 Detecção de DNA de *L. (L.) infantum* em mucosa intestinal por meio da PCR tempo real.

Foi feita uma biópsia de aproximadamente 10 mg da mucosa do intestino grosso e do intestino delgado. O tecido da mucosa intestinal foi avaliado por qPCR, sendo que a mucosa do intestino delgado foi avaliada de forma independente da mucosa do intestino grosso. Em ambas as estruturas, detectamos a presença de DNA dos parasitos. Houve detecção de DNA de *Leishmania* no intestino grosso a partir de 72 horas de infecção, sendo que houve aumento maior da detecção nos tempos mais tardios de infecção (Figura 14). No intestino delgado houve detecção de DNA de *Leishmania* a partir de 15 dias de infecção, sendo mais proeminente nos tempos de 90 dias de infecção (Figura 13).

Figura 14- Curva de detecção de DNA de *L. (L.) infantum* por PCR em tempo real em intestino grosso de hamsteres: GC, G48HPI, G72HPI, G15DPI, G45DPI e G90DPI.

Figura 15- Curva de detecção de DNA de *L. (L.) infantum* por PCR em tempo real em intestino delgado de hamsteres: GC, G48HPI, G72HPI, G15DPI, G45DPI e G90DPI.

4.9 Amplificação de sequências-alvo pré-sequenciamento

A fim de obter amostras qualificadas para o sequenciamento, realizamos a reação de PCR antes da purificação das amostras. As amostras procedentes das fezes dos animais foram positivas para 16S (Figura 16), e como controle positivo utilizamos DNA extraído de cultura de *E.coli* padrão (ATCC25922). Sendo assim, estas amostras estavam aptas para sequenciamento e análise de alteração no microbioma.

Figura 16- Eletroforese em gel de agarose 1,8% corado com GelRed, demonstrando produto de PCR purificado após amplificação do alvo 16S com 1500pb. Poços 1-5 GC; Poços 6-8: Animais do grupo G48HPI; Poços 9-13: Animais do grupo G72HPI; Poços 14-18: Animais do grupo G15DPI; Poços 19-23 animais do grupo G45DPI; Poços 24-29 animais do grupo G90DPI; Poço 31 controle positivo.

4.10 Sequenciamento

As sequências obtidas foram analisadas no Genbank (Blast), comparamos as bactérias encontradas nos grupos infectados com o controle e entre si, de acordo com a Tabela 4. No grupo GC foram identificadas as seguintes bactérias: *Coprobacter fastidiosus* e *Clostridiales bacterium*, não detectadas nos grupos infectados. Dos 5 animais avaliados no grupo G72HPI, 2 apresentaram os gêneros *Ruminococcus sp.*; dos 5 animais do grupo G45DPI, 2 apresentaram a bactéria *Arthrobacter koreensis*; no grupo G90DPI, 4 dos 5 animais avaliados apresentaram a bactéria *Herbinix hemicellulosilytica*.

Tabela 4- Bactérias Gram negativas encontradas nas fezes de hamsteres controle e infectados. As sequências que não mostram semelhança significativa com as depositadas em GenBank não foram consideradas.

Grupo	Bactérias encontradas
GC	<i>Coprobacter fastidiosus</i>
	<i>Clostridiales bacterium</i>
G48HPI	<i>Massiliprevotella massiliensi</i>
G72HPI	<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>
	<i>Rumen bacterium</i>
	<i>Ruminococcus faecis</i>
	<i>Ruminococcus torques</i>
G15DPI	<i>Eisenbergiella massiliensis</i>
	<i>Thermanaerovibrio acidaminovorans</i>
G45DPI	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>
	<i>Arthrobacter koreensis</i>
G90DPI	<i>Herbinix hemicellulosilytica</i>

4 DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral tem apresentação clínica espectral, com formas assintomáticas e forma sintomática, caracterizada principalmente pela hepatoesplenomegalia e febre, associado a alterações laboratoriais, com pancitopenia e hipergamaglobulinemia⁶³. A doença pode ser fatal se não tratada e as principais causas de morte são alterações de coagulação, icterícia e infecção bacteriana^{12;14}, no entanto os fatores desencadeantes destas alterações não estão bem claros. Em relação à infecção bacteriana, algumas espécies bacterianas parecem ser mais frequentes em pacientes com LV, porém a origem dessas bactérias não está certa, sendo que bactérias Gram negativas são bastante incriminadas como causadoras de infecção. Desta forma, torna-se necessário à realização de estudos que visem determinar a espécie de bactéria e quais possíveis alterações histopatológicas possam ocorrer que favoreceriam a passagem da bactéria para o lúmen vascular. Em decorrência da dificuldade de realizarmos estudos em humanos com LV, devido à necessidade de obtermos amostras de tecido, os estudos em modelos experimentais podem mostrar resultados que possam ser extrapolados para a doença em humanos, entretanto para tal, há necessidade de utilizar-se modelos experimentais que mimetizem a doença humana. Neste contexto, o hamster é um dos melhores modelos para os estudos de imunossupressão na leishmaniose visceral, pois o mesmo apresenta manifestações clínicas de doença plenamente manifesta semelhante ao homem¹⁷. O desenvolvimento da LV em hamster tem características clínico-patológicas que se assemelham à doença humana, apresentando aumento de carga parasitária tecidual⁶⁴, caquexia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia⁶⁵. Neste trabalho utilizamos hamsteres infectados com *L (L.) infantum* por via intraperitoneal e observamos que há progressão da doença relacionada ao tempo de infecção, sendo que nos tempos mais tardios houve aumento do baço e maior carga parasitária neste órgão. Neste modelo ocorre hipertrofia, hiperplasia de órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, tais como baço e fígado⁶⁶. Este modelo experimental tem sido utilizado em nosso grupo, para avaliar mecanismos de imunossupressão relacionados a infecção por *L (L.) infantum* e imunopatogenia em diversos órgãos⁶⁷.

Sabidamente a *L. (L.) infantum*, além de acometer órgãos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, pode haver também comprometimento de outros órgãos. Matias *et al* (2001)¹⁸ demonstraram a presença de antígeno de *Leishmania* em pulmão de hamsteres infectados com *L. (L.) infantum*, assim como processo inflamatório neste órgão sendo que a inflamação estaria relacionada com a presença do parasito. Além do pulmão, Costa *et al* (2003)⁶⁸ observaram que cães naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* desenvolvem lesões glomerulares decorrentes da infiltração de células T ativadas induzidas provavelmente pela presença do parasito no órgão. Também, intestinos grosso e delgado são acometidos durante a LV ativa, porém os relatos desse acometimento não são bem esclarecidos e nem qual seria o possível dano que a presença de *Leishmania* na mucosa desses órgãos poderia causar e quais seriam as consequências imunopatogênicas. Neste trabalho os objetivos principais foram avaliar o comprometimento intestinal em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum*, se esse acometimento seria tempo dependente e se os possíveis danos poderiam induzir a uma quebra da barreira gastrointestinal e como consequência, ter-se-ia a passagem de bactérias Gram negativas para o lúmen vascular.

Inicialmente observamos que tanto intestino grosso, quanto delgado estão acometidos durante a doença ativa, sendo que a presença do parasito pôde ser determinada por qPCR e imunoistoquímica. Observou-se que quanto maior o tempo de infecção, maior a detecção do parasito no tecido, demonstrando que a progressão da doença está intimamente relacionada com o tempo de infecção e quantidade de parasito. Este comprometimento da mucosa intestinal poderia levar a um dano tecidual e consequente quebra de barreira gastrointestinal, com possível TM, que induziria a uma resposta inflamatória sistêmica mais agravada pela presença, não somente da *Leishmania*, mas também da bactéria ou produtos destas na corrente sanguínea.

A presença de parasito em mucosa intestinal já foi demonstrada na leishmaniose visceral humana e canina. Luz *et al* (2005)⁶⁹ demonstraram em pacientes com LV, a presença de amastigotas em duodeno. Além da presença do parasito, há descrição de ocorrência de aplanamento das vilosidades e infiltração de macrófagos infectados no duodeno de indivíduos com LV⁷⁰. Em cães, foram observadas alterações histológicas, sendo observado infiltrados inflamatórios com distribuição focal e difusa, com variedade populacional entre linfócitos, neutrófilos, macrófagos e raros eosinófilos, além da presença de amastigotas⁷¹. Esses achados assemelham-se aos resultados alcançados em

nosso trabalho utilizando hamsteres como modelo experimental. Em nosso estudo, observamos que com a progressão da doença ocorreu alteração na mucosa intestinal, com infiltrado inflamatório neutrofílico, linfocitário e misto. Essas alterações histológicas foram tempo dependente, sendo que esses infiltrados foram diferentes em intestino delgado e grosso. No intestino grosso, houve predominância de infiltrado misto (neutrofílico e linfocitários) em todos os tempos de infecção, exceto aos 90 dias em que houve predominância de eosinófilos. Essa mudança do padrão de infiltrado celular em mucosa de intestino grosso parece estar relacionada com a presença de maior quantidade de amastigotas nesse órgão, pois observamos claramente que quanto maior o tempo de infecção, maior a detecção de DNA de *Leishmania* por qPCR. A cronicidade da infecção, mensurada pelo tempo de evolução da doença neste modelo experimental, está relacionada ao tipo de infiltrado observado, pois no tempo mais precoce de infecção (48 horas), o predomínio foi de infiltrado neutrofílico e no tempo mais tardio (90 dias) houve predominância de eosinófilos. Pela primeira vez, que se tem conhecimento, as alterações histopatológicas intestinais foram aqui descritas, correlacionando-as com o tempo de infecção em hamsteres. Silva *et al* (2002)⁷², em caso reportado de cão naturalmente infectado, observaram ao longo de todo o tecido gastrointestinal ocorre uma reação inflamatória ocasionada pela presença de amastigotas de *L. (L.) infantum* e infiltrado inflamatório eosinofílico. Provavelmente, esta observação em cão deveu-se ao fato de que este animal já estaria com doença plenamente manifesta, com longo tempo de evolução. Também em cães naturalmente infectados, Pinto *et al* (2011)⁷¹ observaram a presença de amastigotas e infiltrado de lamina própria caracterizado por neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos.

Em intestino delgado também observamos infiltrado inflamatório neutrofílico em animais com 48 horas de infecção e predominantemente linfocitário a partir de 72 horas de infecção, não sendo observado infiltrado eosinofílico neste órgão. Observamos também diminuição de células caliciformes no período de 45 dias após infecção no intestino delgado. Essas células são responsáveis por parte da produção de glicoproteínas que permitem que o tecido permaneça lubrificado⁷³, sendo assim, tal achado pode sugerir que essa deficiência possa estar aumentando a fragilidade do tecido, facilitando sua ruptura e consequentemente a translocação microbiana. Além disso, observamos aplanamento das vilosidades que pode estar diretamente relacionado às alterações na

absorção de nutrientes, por conseguinte, resultando em ocorrência de quadros diarreicos que é referido em pacientes com LV e que está relacionado com desfecho desfavorável¹⁹. O comprometimento intestinal que observamos neste estudo, corroboram com trabalhos anteriores que descrevem que a LV compromete não somente ricos em células do sistema fagocítico mononuclear, como também o tecido intestinal.

O dano tecidual em mucosa intestinal observado durante a LV ativa pode favorecer a uma maior gravidade da doença, visto que por haver, provável ruptura da barreira gastrointestinal, isto favoreceria a passagem de bactérias e/ou produtos destas da luz intestinal para o lúmen vascular, ou ainda mudança da flora intestinal durante a progressão da doença.

Neste estudo, importantes alterações histológicas intestinais foram encontradas; tais como infiltrados inflamatórios, serosite, enterite em diferentes níveis, invasão de bactérias em sua lâmina própria, histiocitose, linfocitólise, e ainda a presença de amastigotas nesse tecido, sugerindo que a barreira de proteção intestinal tenha sido rompida durante a infecção, facilitando a TM e a invasão de amastigotas em tecido intestinal.

A translocação bacteriana, durante a LV ativa já foi anteriormente descrita, tanto em pacientes, como em modelo experimental^{33;55;56}. Estes autores observaram que durante a fase ativa da LV havia aumento de LPS circulante em sangue periférico e durante a fase de remissão, houve redução do mesmo. A TM mensurada pelo aumento de LPS em sangue periférico é relacionada com maior ativação de linfócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias e estes achados estariam relacionados com maior gravidade da LV. Nós semelhantemente observamos aumento de LPS em sangue periférico de hamsteres, com diferença significativa aos 90 dias de infecção, entretanto nos tempos de 48 e 72 horas houve aumento em relação ao controle, porém sem diferença significativa. Este resultado de aumento de LPS no tempo mais tardio de infecção coincide com maior quantidade de parasito que observamos tanto em intestino delgado quanto grosso e também com maiores alterações histopatológicas em mucosa intestinal. Em estudo anterior⁵⁵, foi observado aumento de LPS nos tempos de infecção superiores a 15 dias, em hamsteres infectados com *L (L.) infantum*, enfatizando-se que não foram avaliados tempos precoces. Em infecções por hepatite B e C houve aumento semelhante dos níveis de LPS

circulantes, que diminuiu à medida que o tratamento com INF- α foi instituído⁷⁴. Há descrições do mesmo evento em pacientes com cirrose hepática, confirmando o pressuposto de que doenças que afetam o fígado facilitam indiretamente a ocorrência da TM⁷⁵.

É importante ressaltar que na literatura não há estudos mostrando alterações histológicas intestinais e TM em hamsteres infectados com *L. (L.) infantum*, essas alterações foram observadas somente em cães e humanos naturalmente infectados. A TM pode ser facilitada pela alteração na permeabilidade da barreira gastrointestinal, provocada por diferentes estímulos físicos e patológicos³⁸.

Em pacientes HIV positivos, a depleção de TCD4+ no GALT é um dos possíveis fatores que também contribuem no comprometimento da integridade da membrana intestinal³³. Com relação à infecção por *L. (L.) infantum*, 41- 49% de pacientes tem por principal causa de morte a infecção bacteriana, com quadros graves de diarreia^{37;38}. Considerando-se os achados da literatura e nossos resultados, sugere-se que isto ocorre devido à somatória de fatores que agravam e facilitam a TM, dentre estes, o comprometimento das criptas e vilosidades desses pacientes, ocasionando a perda de células absortivas e consequentemente quadros graves de diarreia, diminuição do número de células caliciformes, diminuindo consequentemente o muco e aumentando o atrito, facilitando a ocorrência de possíveis microfissuras e reação inflamatória. Além disso, a presença de amastigotas de *Leishmania* na mucosa intestinal e/ou a alteração do microbioma em pacientes coinfectados são importantes na alteração da permeabilidade intestinal.

Não somente as alterações intestinais e a translocação microbiana podem ser os fatores que estão relacionados com a gravidade da LV. Alteração no microbioma tem sido descrito em doenças de evolução crônica^{75;76} com comprometimento do trato gastrointestinal, e esta alteração no microbioma poderia ser um fator relacionado com ativação da resposta imune e alterações metabólicas⁴⁰. Em um estudo sobre a interação dos sistemas metabólico, imunológico e intestinal foi descrita alteração na composição do microbioma de camundongos infectados por *L. (L.) major*. Nesta ocasião, ao avaliar-se o material fecal observou-se alteração na flora intestinal dos camundongos principalmente nas classes *Clostridia* e *Gammaproteobacteria*⁴⁰. A infecção por *Leishmania* pode afetar

a flora microbiana, não somente de hospedeiro vertebrado, mas a virulência da infecção transmitida por flebotomínios é influenciada pelo microbioma do mesmo⁷⁷.

Neste estudo, avaliamos se houve alteração no microbioma dos hamsteres infectados, e para isto utilizamos o laudo inicial dos animais, o que foi fornecido pelo biotério (Anexo II). Utilizamos material fecal para o sequenciamento de bactérias e encontramos os seguintes agentes nos animais controle: *Coprobacter fastidiosus* e *Clostridiales bacterium*, estas são bactérias Gram negativas, facilmente encontradas na microbiota humana, quando pesquisadas em material de fezes, especificamente na procura por gene 16S⁷⁸. Quando sequenciamos o mesmo material dos animais infectados, encontramos diferentes espécies de bactérias, tais como *Massiliprevotella massiliensi*, *Bacillus alkalinitrilicus*, *Rumen bacterium*, *Ruminococcus faecis*, *Ruminococcus torques*, *Eisenbergiella massiliensis*, *Thermanaerovibrio acidaminovorans*, *Intestinimonas butyriciproducens*, *Arthrobacter koreensis*, *Herbinix hemicellulosilytica*, não detectadas no grupo controle, demonstrando uma mudança na flora intestinal dos animais infectados. É importante salientar a detecção da bactéria *Herbinix hemicellulosilytica* em 90% dos animais do G90DPI, não foi observado no grupo controle ou nos de menor tempo de infecção, sugerindo que a mudança de microbioma dos animais infectados está relacionada ao tempo de infecção. *Ruminococcus faecis*, *Ruminococcus torques* e *Intestinimonas butyriciproducens*, são bactérias pertencentes a microbiota gastrointestinal humana⁷⁹, que se mostram importantes durante o processo de infecção em períodos agudos (72 horas) ou tardios (45 dias), considerando nossos resultados de sequenciamento. Estes achados de alteração no microbioma de hamsteres com LV experimental não haviam sido descritas anteriormente, principalmente quando avaliamos essa alteração no decorrer do tempo de infecção. Levando em consideração ser o primeiro trabalho a mostrar este tipo de alteração, encontramos limitações no estudo, acerca dos resultados de sequenciamento, isto é, nem todos os animais mostraram sequencia similar ao depositado em GenBank, ou seja, os resultados encontrados no sequenciamento referem-se a 17 animais somente, dos 30 animais de estudo.

Os nossos achados de alteração histopatológicas da mucosa intestinal, tempo dependente, correlacionada com aumento de parasito na referida mucosa e aumento de LPS circulante no tempo mais tardio de infecção, induzem a pensar que as alterações intestinais na LV são em decorrência da presença de *Leishmania* na mucosa, na fase

crônica da doença, que estaria induzindo uma quebra na barreira da mucosa e facilitando a translocação bacteriana que teria um papel importante na patogenia da LV, visto que a imunoativação que foi observada em pacientes com LV ativa²⁰ estava relacionada com maior nível de LPS circulante. Como consequência clínica poderia haver maior ocorrência de diarreia, a qual é uma das principais causas de morte por LV em humanos¹². Ainda assim, a mudança no microbioma poderia ser um fator de agravamento da LV, pois diferentes bactérias que comumente não são encontradas como flora de animais sem infecção foram detectadas em animais com infecção por *Leishmania (L.) infantum*. Por fim, nossos achados, associados aos dados da literatura, sugerem que a busca por terapia mais eficaz, que possa diminuir a letalidade por LV, principalmente relacionada à diarreia, deveria centrar no uso de antibióticos que tenham ação contra bactérias Gram negativas.

5 CONCLUSÕES

- a) Nos exames histológicos foram comprovadas alterações na mucosa intestinal (com lesões que variaram de discretas, moderadas e severas), de acordo com a progressão da infecção; A invasão das amastigotas na mucosa intestinal pode ser a principal causa dessas lesões e um possível fator de facilitação para translocação microbiana;
- b) A ocorrência da translocação microbiana pode ser sugerida com a detecção de LPS circulante nos animais infectados, principalmente com 90 dias após a infecção, no qual o aumento da endotoxina foi expressivo;
- c) Por meio do sequenciamento observamos alteração da flora intestinal dos animais infectados. O grupo com 90 dias de infecção teve predominância da bactéria *Herbinix hemicellulosilytica*, que não foi vista nos grupos controle e menores tempos de infecção, conclui-se que esta bactéria é encontrada apenas em período tardio de infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Vermelho AB, Capaci GR, Rodrigues IA, Cardoso VS, Mazotto AM, Supuran CT. Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets. *Bioorg Med Chem*. 2017 Mar 1;25(5):1543-55.
- 2- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 Apr;8(4):419-33.
- 3- Zhang WW, Ramasamy G, McCall LI, Haydock A, Ranasinghe S, Abeygunasekara P et al. Genetic analysis of *Leishmania donovani* tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. *PLoS Pathog*. 2014 Jul 3;10(7):e1004244.
- 4- Alvarenga DG, Escalda PM, Costa AS, Monreal MT. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Mar-Apr;43(2):194-7.
- 5- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 2012; 7(5): e35671.
- 6- Sunter J, Gull K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook description to biological understanding. *Open Biol*. 2017 Sep;7(9).
- 7- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília (DF): Ministério de Saúde; 2014.
- 8- WHO. Leishmaniasis magnitude of the problem [cited in November 1, 2017] Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
- 9- Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira, CH. Leishmaniasis-HIV Coinfection: current challenges. *HIV AIDS (Auckl)*. 2016 Oct 7;8:147-56.
- 10- Lindoso JA, Cota GF, da Cruz AM, Goto H, Maia-Elkhoury AN, Romero GA, et al. Visceral Leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep 18;8(9):e3136.
- 11- Goto H, Prianti MD. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2009 Sep-Oct;51(5):241-6.

12-Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010 Mar-Apr;43(2):188-93.

13-Kafetzis DA. An overview of paediatric leishmaniasis. *J Postgrad Med*. 2003 Jan-Mar;49(1):31-8.

14-Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowick S, Ali N. Immune response in kala-azar. *Indian J Med Res* 123, March 2006; p 245-66.

15- Carrión J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, et al. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol*. 2006 May;28(5):173-83.

16-Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Apr;37(4):615-23.

17-Nieto A¹, Domínguez-Bernal G, Orden JA, De La Fuente R, Madrid-Elena N, Carrión J. Mechanisms of resistance and susceptibility to experimental visceral leishmaniosis: BALB/c mouse versus syrian hamster model. *Vet Res*. 2011 Feb 23;42:39.

18-Mathias R, Costa FA, Goto H. Detection of immunoglobulin G in the lung and liver of hamsters with visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*. 2001; 34(4): 539-43.

19-Belo VS, Struchiner CJ, Barbosa DS, Nascimento BW, Horta MA, da Silva ES et al. Risk Factors for Adverse Prognosis and Death in American Visceral Leishmaniasis: A meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jul 24;8(7):e2982.

20-Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, Lindoso JA, et al. Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection. *J Infect Dis*. 2013;208(1): 57-66.

21-Queiroz e Silva ITB. Comorbidade leishmaniose visceral/AIDS no Estado de São Paulo, Brasil (1999-2010): aspectos epidemiológicos e moleculares [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2013.

22-Berg RD, Garlington AW. Translocation of *Escherichia coli* from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes in gnotobiotic mice receiving *Escherichia coli* vaccines before colonization. *Infect Immun*. 1980; 30(3): 394-8.

23-Gatt M, Reddy BS, MacFie J. Review article: bacterial translocation in the critically ill--evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Apr 1;25(7):741-57.

24-D'Ettorre G, Douek D, Paiardini M, Ceccarelli G, Vullo V. Microbial translocation and infectious diseases: what is the link? *Int J Microbiol*. 2012;2012:356981.

25-Fuller R, Jayne-Williams DJ. Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora. II. Clearance of translocated intestinal bacteria. *Res Vet Sci*. 1970 Jul;11(4):368-74.

26-Seki E, Schnabl B. Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. *J Physiol*. 2012 Feb 1;590(3):447-58.

27-Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol*. 1995; 3:149 –54.

28-Tancrède CH, Andremont AO. Bacterial translocation and gramnegative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Dis*. 1985; 152:99 – 103.

29-Vrakas S, Mountzouris KC, Michalopoulos G, Karamanolis G, Papatheodoridis G, Tzathas C, et al. Intestinal Bacteria composition and translocation of bacteria in inflammatory bowel disease. *PLoS One*. 12(1):e0170034. 2017.

30-Lee PI, Ciccone EJ, Read SW, Asher A, Pitts R, Douek DC, et al. Evidence for translocation of microbial products in patients with idiopathic CD4 lymphocytopenia. *J Infect Dis*. 2009; 199(11): 1664-70.

31-Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, Wurcel A, et al. Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS One*. 2008 Jun 25;3(6):e2516.

32-Marchetti G, Tincati C, Silvestri G. Microbial Translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. Clin Microbiol Rev. 2013 Jan;26(1):2-18.

33-Santos-Oliveira JR, Regis EG, Leal CR, Cunha RV, Bozza PT, Da-Cruz AM. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jul;5(7):e1198.

34- Brenchley JM¹, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, Beilman GJ, et al. CD4⁺ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. J Exp Med. 2004 Sep 20;200(6):749-59.

35-Brenchley, JM; Price, DA; Schacker, TW; Asher, TE; Silvestri, G; Rao, S; et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med. 2006; 12:1365–71.

36-Luz KG, Tuon FF, Duarte MI, Maia GM, Matos P, Ramos AM, et al. Cytokine expression in the duodenal mucosa of patients with visceral leishmaniasis. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Jul-Aug;43(4):393-5.

37-Kadivar MR, Kajbaf TZ, Karimi A, Alborzi A. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. East Mediterr Health J. 2000 Sep-Nov;6(5-6):879-83.

38-Oliveira JM, Fernandes AC, Dorval ME, Alves TP, Fernandes TD, Oshiro ET, et al. Mortality due to visceral leishmaniasis: clinical and laboratory characteristics. Rev Soc Bras Med Trop. 2010 Mar-Apr;43(2):188-93.

39-Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. J Hepatol. 2012 Jun;56(6):1283-92.

40-Lamour SD, Veselkov KA, Poma JM, Giraud E, Rogers ME, Croft S, et al. Metabolic, Immune, and Gut Microbial Signals Mount a Systems Response to *Leishmania major* infection. J Proteome Res. 2015 Jan 2;14(1):318-29.

41-Fiocchi CS, Pereira de Souza HS. Microbiota intestinal; Sua importância e função. JBM. 2012;100(3):30-8.

42-Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ. Nonspecific (innate) Host Resistance. In: Willey, JM; Sherwood, LM; Woolverton, CJ. (Editors.). Prescott's Principles of Microbiology, 7th Edition. McGraw-Hill Higher International Education. 2009: 656-77.

43-Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 859-904.

44-Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):220-30

45-Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the Human Microbiome. *Nutr Rev*. 2012; 70(1):38-44.

46-Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: Evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nature Rev*. 2008; 6: 776-88.

47-Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803.

48-Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14.

49-Gillespie JJ¹, Wattam AR, Cammer SA, Gabbard JL, Shukla MP, Dalay O, et al. PATRIC: the comprehensive bacterial bioinformatics resource with a focus on human pathogenic species. *Infect Immun*. 2011 Nov;79(11):4286-98

50-Alain B Pajarillo E, Chae JP, Balolong MP, Bum Kim H, Kang DK. Assesment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J Gen Appl Microbiol*. 2014;60(4):140-6.

51-Cassler M¹, Peterson CL, Ledger A, Pomponi SA, Wright AE, Winegar R, et al. Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. *Microb Ecol*. 2008 Apr;55(3):384-94.

52-Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, et al. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(11): 4988-95.

53-Schietroma M, Cappelli S, Carlei F, Di Giuro G, Agnifili A, Recchia CL, et al. Intestinal and systemic endotoxaemia after laparotomic or laparoscopic cholecystectomy. Chir Ital. 2006; 58(2): 171-7.

54-Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. Nature. 2001; 414 (6866): 920-4.

55-Cappato MDS. Avaliação do fenômeno da translocação microbiana e seus efeitos no agravamento da infecção experimental por *Leishmania (Leishmania) infantum* em *Golden Hamster* [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2017.

56-Paulo EM. Efeitos da associação de aminoglicosídeo ao tratamento antimonial na translocação microbiana decorrente do envolvimento da mucosa intestinal na leishmaniose visceral experimental [dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2013.

57-Amaral A, Taha MO, Juliano H. Estudo morfológico das enterro-anastomoses com suturas em pontos separados complementados com adesivo sintético ou biológico em coelho. Acta Cir Brasileira. 2004; 19(4).

58-Stauber LA. Host resistance to the Kharthoum strain of *Leishmania donovani*. Rice Inst Pamphlet. 1958; 45:80-9.

59-Ghasemian M, Ghavari MJ, Akhlaghi L, Mohebbi M, Meamar AR, Aryan E, et al. SYBR green-based detection of *Leishmania infantum* DNA using peripheral blood samples. J Parasitol Dis. 2016; 40(1): 81-7.

60-Ley RE, Backhed R, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA. 2005; 102(31): 11070-5.

61-Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J of Bacteriol. 1991; 173(2): 697-703.

62-Galkiewicz, JP and Kellogg, CA. Cross-Kingdom Amplification Using *Bacteria*-Specific Primers: Complications for Studies of Coral Microbial Ecology. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008; 74(24): 7828-31.

63-Makaritsis KP, Gatselis NK, Ioannou M, Petinaki E, Dalekos GN. Polyclonal hypergammaglobulinemia and high smooth-muscle autoantibody titers with specificity against filamentous actin: consider visceral leishmaniasis, not just autoimmune hepatitis. *Int J Infect Dis*. 2009 Jul;13(4):e157-60.

64-Zivcec M, Safronetz D, Haddock E, Feldmann H, Ebihara H. Validation of Assays to Monitor Immune Responses in the Syrian Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). *J Immunol Methods*. 2011 May 31;368(1-2):24-35.

65-Pearson RD, Roberts D. Host immunoglobulin on spleen-derived *Leishmania donovani* amastigotes. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43(3):263-5.

66-Lindoso JAL. Apoptose na evolução da leishmaniose visceral experimental em hamster[tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2002.

67-Pinho FA. A patogênese da pancitopenia da leishmaniose visceral canina e murina[tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo; 2015.

68-Costa FAL, Goto H, Saldanha LCB, Silva SMMS, Sinhorini IL, Silva TC, et al. Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally acquired canine Visceral Leishmaniasis. *Vet Pathol*. 2003; 40:677-84.

69-Luz KG. Avaliação das alterações imunohistológicas da mucosa do intestino delgado em pacientes portadores da leishmaniose visceral[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2005.

70-Samiullah S, Dinneen HS, Klein KM, Demyen M. Endoscopic appearance of duodenal mucosa in GI leishmaniasis. *Gastrointest Endosc*. 2013; 78(6): 962-3.

71-Pinto AJ, Figueiredo MM, Silva FL, Martins T, Michalick MS, Tafuri WL, et al. Histopathological and parasitological study of the gastrointestinal tract of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Acta Vet Scand*. 2011 Dec 13;53:67.

72-Silva FL, Tafuri WL, Oliveira MR, Tafuri WL. Histopathological and immunohistochemical study of the gastrointestinal tract from a dog naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*: A case report. Arq Bras Med Vet Zootec 2002, 54(4).

73-Specian RD, Oliver MG. Functional biology of intestinal goblet cells. Am J Physiol. 1991 Feb;260(2 Pt 1): C183-93.

74-Caradonna L, Mastronardi ML, Magrone T, Cozzolongo R, Cuppone R, Manghisi OG, et al. Biological and clinical significance of endotoxemia in the course of hepatitis C virus infection. Curr Pharm Des. 2002;8(11):995-1005.

75-Sandler NG, Koh C, Roque A, Eccleston JL, Siegel RB, Demino M, et al. Host response to translocated microbial products predicts outcomes of patients with HBV or HCV infection. Gastroenterology. 2011; 141(4): 1220–30.

76-Saxena D, Li Y, Devota A, Pushalkar S, Abrams W, Barber C, et al. Modulation of the orodigestive tract microbiome in HIV-infected patients. Oral Dis. 2016 Apr;22 Suppl 1:73-8.

77-Kelly PH, Bahr SM, Serafim TD, Ajami NJ, Petrosino JF, Meneses C, et al. The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* is essential for Survival of *Leishmania infantum*. mBio. 2017; 8(1): e01121-16.

78- Chaplin AV, Efimov BA, Khokhlova EV, Kafarskaia LI, Tupikin AE, Kabilov MR, et al. Draft Genome Sequence of *Copro bacter fastidiosus* NSB1^T. Genome Announc. 2014; 2(2): e00122-14.

79- Rajilic-Stojanovic M, Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. FEMS Microbiology Reviews. 2014; 38. 996-1047.

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil - e-mail: cpq-imt@usp.br
Telefones: (55) 11-3061-8650, FAX (55) 11-3064-5132

São Paulo, 23 de Abril de 2015

Ilmo(a):

Dr(a). Dr. José Angelo Lauletta Lindoso
(aos cuidados de Daiane Barros Dias)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **APROVOU**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT/000311A 'Análise do microbioma de bactérias de luz intestinal de hamsteres e sua correlação com LPS circulante, decorrente da translocação microbiana na leishmaniose visceral experimental'**, sob a sua responsabilidade.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CEUA-IMT, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei n 11.794, 8 de outubro de 2008).

As seguintes espécies serão utilizadas no projeto:
Hamster (30 animais).

Atenciosamente,

Dr. Expedito José de Albuquerque Luna
Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Dra. Luciana Regina Méireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP

ANEXO II

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: 501
Espécie: Hamster
Procedência: Convencional

Sequência: 51246
Tempo de exposição: 15 semanas
Linhagem: sentinela Golden

*Bactérias/ **Mycoplasma	* Amostra	Método	Resultados (Positivos/Total)		
			Ago/16	Jun/16	Últimos 12 meses
* <i>Corynebacterium kutscheri</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Klebsiella oxytoca</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Pasteurella multocida</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Staphylococcus aureus</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		0/2	0/10
* <i>Campylobacter coli</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Campylobacter jejuni</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Campylobacter spp.</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Klebsiella oxytoca</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
* <i>Salmonella spp.</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	0/10
Outros microorganismos isolados					
* <i>Aerococcus viridans</i>	Traquéia/orofaringe	Cultura		2/2	0/10
* <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	3/10
* <i>Serratia marcescens</i>	Trato gastrointestinal	Cultura		0/2	2/10
Responsável - Cyntia M. S. C. de Godoy					
CRBio - 31131					
** <i>Mycoplasma pulmonis</i>	Traquéia/orofaringe	PCR		0/2	3/10
* <i>Pasteurella pneumotropica</i>	Traquéia/orofaringe	PCR		0/2	6/10
* <i>Helicobacter spp.</i>	Traquéia/orofaringe	PCR		0/2	0/10
Responsável - Robison José da Cruz					
CRBio - 33762/01

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Divisão Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo

LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE GENÉTICA E SANITÁRIA ANIMAL

Nº do cliente: **501**
Espécie: **Hamster**
Procedência: **Convencional**

Sequencia: **51246**
Tempo de exposição: 15 semanas
Linhagem: sentinela Golden

*Endoparasitas/**Ectoparasitas	Amostra	Método	Resultados (Positivos/Total)		
			Nov/15	Jun/15	Últimos 12 meses
* <i>Aspiculuris tetraptera</i>	Fezes	Microscopia		0/2	0/10
* <i>Chilomastix battencourti</i>	Fezes	Microscopia		0/2	4/10
* <i>Cryptosporidium</i> sp	Fezes	Microscopia		0/2	0/10
* <i>Eimeria</i> sp.	Fezes	Microscopia		0/2	0/10
* <i>Entamoeba</i> sp	Fezes	Microscopia		2/2	5/10
* <i>Giardia muris</i>	Fezes	Microscopia		2/2	10/10
* <i>Hymenolepis diminuta</i>	Fezes	Microscopia		0/2	0/10
* <i>Hymenolepis nana</i>	Fezes	Microscopia		0/2	3/10
* <i>Spirotrichomonas muris</i>	Fezes	Microscopia		0/2	6/10
* <i>Syphacia</i> sp	Fezes	Microscopia		0/2	8/10
* <i>Trichostrongylus axei</i>	Fezes	Microscopia		2/2	10/10
** <i>Demodex musculi</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Myobia musculi</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Myocoptes musculinus</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Notoedres muris</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Ornithonyssus bacoti</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Polyplax</i> sp.	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Psorergates simplex</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Rodfordia</i> sp.	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10
** <i>Trichoecius rombotsi</i>	Pêlo	Microscopia		0/2	0/10

Responsável - Robison José da Cruz

CRBio - 33762/01