

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Caracterização molecular e avaliação da infectividade *in vitro* e *in vivo* de duas cepas de  
*Leishmania* spp. isoladas de cães naturalmente infectados

Marco Miguel de Oliveira

Uberlândia – MG

Julho/2018

Universidade Federal de Uberlândia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Caracterização molecular e avaliação da infectividade *in vitro* e *in vivo* de duas cepas de *Leishmania* spp. isoladas de cães naturalmente infectados

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

**Aluno:** Marco Miguel de Oliveira  
**Orientador:** Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (ICBIM/UFU).

Uberlândia – MG

Julho/2018

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

---

O48c  
2018

Oliveira, Marco Miguel de, 1994

Caracterização molecular e avaliação da infectividade in vitro e in vivo de duas cepas de Leishmania spp. isoladas de cães naturalmente infectados [recurso eletrônico] / Marco Miguel de Oliveira. - 2018.

Orientador: Sydnei Magno da Silva.

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

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.803>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Cão - Doenças. 3. Leishmaniose. 4. Infecção. I. Silva, Sydnei Magno da. (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

---

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



**Marco Miguel de Oliveira**

“Caracterização molecular e avaliação da infectividade *in vitro* e *in vivo* de duas cepas de *Leishmania* spp. isoladas de cães naturalmente infectados”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 26 de julho de 2018.

Dra. Ceres Luciana Alves – PÓS DOC ICB/UFMG

Dra. Renata Cristina de Paula – PÓS DOC/UFU

Prof. Dr. Tiago Wilson P. Mineo (coordenador) – ICBIM/UFU

De tudo ficaram três coisas...

A certeza de que estamos começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que podemos ser interrompidos

antes de terminar...

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

**Fernando Sabino - Pensador**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivone Anselmo de Oliveira e José Miguel de Oliveira, pelo amor, compreensão, apoio incondicional e por sempre me incentivarem. Em particular, à minha mãe pelo exemplo de determinação em correr atrás da realização dos próprios sonhos. Ao meu pai, pelo exemplo de retidão, honestidade e humildade.

À minha família, por compreenderem minhas ausências nas reuniões devido aos compromissos acadêmicos e por torcerem pela minha vitória. Às minhas irmãs, por fazerem parte da minha vida.

Às minhas amigas, Janaína, Nicole, Natysuhalen, Noélli, Bárbara, Hellen e amigo Paulo Cuevas, pela amizade. Em particular, ao meu companheiro, Paulo Vitor, por me compreender, transmitir alegria, paciência, ouvir minhas reclamações e servir como exemplo de determinação e perseverança.

Às minhas colegas de laboratório, Iasmin, Karen, Gabriela e Camila Nogueira pela boa convivência, pelo auxílio nos experimentos e força nos momentos difíceis. Ao Douglas e à Camila Oliveira, por amenizarem o peso das cobranças com os momentos de descontração. À técnica do Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia de Parasitos, Juliana Miranda, pelo auxílio na rotina laboratorial e pelos ensinamentos que levarei por toda a vida. Às Doutoras Renata, Ceres e Maria Júlia, por aceitarem participar da minha banca de defesa. Sem dúvidas, vocês todos contribuíram para o meu desenvolvimento científico e pessoal.

À Vanessa Miranda pelo auxílio nos experimentos, por sua enorme paciência e didática para esclarecer minhas dúvidas. Aos alunos e a técnica do Laboratório de Imunoparasitologia "Dr. Mario Endsfeldz Camargo", pela disposição em auxiliar nas dosagens de DNA e reações de qPCR.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, pelo apoio durante esses dois anos, por toda paciência e dedicação em me orientar. Ao Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo, por ceder toda a infraestrutura do Laboratório de Imunoparasitologia e ajudar a tornar esse trabalho possível.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, pelos ensinamentos. Às secretárias Lucileide e Lucélia, pela prontidão em responder minhas dúvidas e resolver os processos burocráticos.

Aos órgãos de fomento à pesquisa (CNPq, CAPES e FAPEMIG) por subsidiarem diversos projetos do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*.

## RESUMO

As leishmanioses podem assumir duas principais formas clínicas: leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC). Em áreas urbanas, o cão participa como reservatório de *Leishmania infantum* (causadora da LV) e, devido a isso, é alvo das estratégias de controle da doença. Esses animais também podem ser encontrados naturalmente infectados pelas espécies que levam o desenvolvimento de LC. Embora essas infecções sejam raras, alguns achados da literatura têm aberto o questionamento sobre o papel desses animais no ciclo biológico dessas espécies e o potencial infectivo das mesmas. Assim, torna-se importante a caracterização molecular e avaliação do comportamento infectivo desses parasitos. O presente estudo objetivou a identificação da espécie de duas cepas selvagens isoladas de cães procedentes do município de Uberlândia (MG), bem como a avaliação do seu comportamento *in vitro* e infectividade à macrófagos caninos de linhagem comercial e camundongos BALB/c. Para tal, os produtos de amplificação dos alvos ITS1 e *hsp70* de *Leishmania* spp. foram submetidos a restrição enzimática (PCR-RFLP). O perfil de proliferação *in vitro* foi estabelecido pela curva de crescimento, sendo UDI-1 e UDI-2 comparadas à duas cepas de referência, Ba199 (MHOM/BR/1989/Ba199 – *L. amazonensis*) e BH401 (MCAN/BR/2002/BH401 – *L. infantum*). Nos experimentos de infectividade *in vitro* foram utilizados macrófagos (DH82), bem como formas promastigotas de fase estacionária e amastigotas axênicas das cepas selvagens e de referência. A avaliação da infecção *in vivo* foi verificada através da análise da carga parasitária no fígado, baço e lesão de camundongos infectados com as quatro linhagens de parasitos (UDI-1, UDI-2, Ba199, BH401). Além disso, foi verificada a cinética da infecção por acompanhamento do peso, tamanho da lesão e comportamento. Os resultados da PCR-RFLP mostraram que UDI-1 apresentou um perfil de pares de bandas similar à *L. amazonensis* e UDI-2 à *L. infantum*. O comportamento *in vitro* diferiu entre UDI-2 e BH401, sendo similar entre UDI-1 e Ba199. Promastigotas de fase estacionária de UDI-1 apresentaram a maior capacidade infectiva em comparação às demais cepas, sendo que quando utilizadas formas amastigotas axênicas, BH401 foi a cepa que apresentou o maior índice de infectividade. Em ambos os casos, UDI-2 mostrou a menor infectividade *in vitro*. *In vivo*, UDI-1 induziu lesões mais rapidamente (três semanas) e apresentou uma carga parasitária média maior na lesão e no fígado, em comparação à Ba199. Foi comprovado o fenótipo metastático, com consequente visceralização de UDI-1. Em oposição, os valores médios da carga parasitária de UDI-2 foram menores do que os de BH401 nos tecidos avaliados (fígado e baço). Não foram observadas alterações comportamentais e no ganho natural de peso. Em conjunto, esses dados mostram que entre as cepas selvagens, UDI-1 apresenta a melhor capacidade infectiva *in vitro* e *in vivo*, sendo que UDI-2 exibiu o fenótipo menos infectivo. Além disso, este é o primeiro relato sobre a infecção natural de um cão com *L. amazonensis* na região do Triângulo Mineiro (MG).

**Palavras-chave:** infecção, macrófagos caninos, curva de crescimento, carga parasitária e visceralização.

## ABSTRACT

Leishmaniasis can take on two main clinical forms: visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (LC). In urban areas, the dog participates as a reservoir of *Leishmania infantum* (causing LV) and, because of this, is the target of the disease control strategies. These animals can also be found naturally infected by the species that lead to the development of LC. Although these infections are rare, some findings in the literature have opened the question about the role of these animals in the biological cycle of these species and their infective potential. Thus, it becomes important the molecular characterization and evaluation of the infective behavior of these parasites. The present study aimed to identify the species of two wild strains isolated from dogs from the city of Uberlândia (MG), as well as the evaluation of their in vitro behavior and infectivity to canine macrophages of commercial lineage and BALB / c mice. To this end, the amplification products of the ITS1 and *hsp70* targets of *Leishmania* spp. were subjected to enzyme restriction (PCR-RFLP). The in vitro proliferation profile was established by the growth curve, with UDI-1 and UDI-2 being compared to two reference strains, Ba199 (MHOM/BR/1989/Ba199 - *L. amazonensis*) and BH401 (MCAN/BR/2002/BH401 - *L. infantum*). In vitro infectivity experiments were performed using macrophages (DH82), as well as promastigotes of stationary phase and axenic amastigotes of wild and reference strains. In vivo evaluation of the infection was verified by analyzing the parasite load in the liver, spleen and lesions of mice infected with the four parasite strains (UDI-1, UDI-2, Ba199, BH401). In addition, the infection kinetics were verified by weight monitoring, lesion size and behavior. The results of PCR-RFLP showed that UDI-1 presented a profile of pairs of bands similar to *L. amazonensis* and UDI-2 to *L. infantum*. The in vitro behavior differed between UDI-2 and BH401, being similar between UDI-1 and Ba199. Stationary phase promastigotes of UDI-1 showed the highest infectivity capacity compared to the other strains, and when using axenic amastigote forms, BH401 was the strain with the highest infectivity index. In both cases, UDI-2 showed the lowest infectivity in vitro. In vivo, UDI-1 induced lesions more rapidly (three weeks) and had a higher mean parasitic load on lesion and liver compared to Ba199. The metastatic phenotype was verified, with consequent visceralization of UDI-1. In contrast, the mean values of the parasitic load of UDI-2 were lower than those of BH401 in the evaluated tissues (liver and spleen). No behavioral changes and no natural gain were observed. Together, these data show that among the wild strains, UDI-1 shows the best infectivity capacity in vitro and in vivo, and UDI-2 exhibited the least infective phenotype. In addition, this is the first report on the natural infection of a dog with *L. amazonensis* in the Triângulo Mineiro (MG) region.

**Keywords:** infection, canine macrophages, growth curve, parasite load and visceralization.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Iniciadores, alvo, tamanhos (pb) dos produtos amplificados e condições da reação de PCR para <i>Leishmania</i> spp. ....	35
<b>Tabela 2:</b> Tamanhos dos fragmentos (pb) obtidos após digestão dos produtos de reação dos controles de <i>Leishmania</i> spp. ....	35
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores, alvo, tamanhos (pb) dos produtos amplificados e condições da reação de qPCR para <i>Leishmania</i> spp. ....	41

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp. ....	19
<b>Figura 2:</b> Hamster e camundongo experimentalmente infectados (via IP) com a cepa UDI-1 apresentando lesões no focinho (A), patas (B e D) e escroto (C).....	42
<b>Figura 3:</b> Fotomicroscopia de amastigotas intracelulares em neutrófilo (A) e livres (B) visualizadas em extensão sanguínea de cão naturalmente infectado com a cepa UDI-2. ....	43
<b>Figura 4:</b> Caracterização das cepas selvagens de <i>Leishmania</i> spp. por PCR-RFLP para o alvo ITS1. ....	44
<b>Figura 5:</b> Caracterização das cepas selvagens de <i>Leishmania</i> spp. por PCR-RFLP para o alvo <i>hsp70</i> .....	44
<b>Figura 6:</b> Curvas de crescimento <i>in vitro</i> de UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> ), UDI-2 ( <i>L. infantum</i> ), Ba199 e BH401. ....	45
<b>Figura 7:</b> Porcentagem de células infectadas (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de macrófagos caninos infectados com promastigotas de fase estacionária de UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> ), Ba199, UDI-2 ( <i>L. infantum</i> ) e BH401. ....	46
<b>Figura 8:</b> Porcentagem de células infectadas (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de macrófagos caninos infectados com amastigotas axênicas de UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> ), Ba199, UDI-2 ( <i>L. infantum</i> ) e BH401. ....	47
<b>Figura 9:</b> Macrófagos DH82 infectados com promastigotas de fase estacionária e amastigotas axênicas de UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> - A e B), UDI-2 ( <i>L. infantum</i> - C e D) e controle não infectado (E e F).....	48
<b>Figura 10:</b> Tamanho da lesão em camundongos BALB/c infectados com UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> ) e Ba199 na base da cauda. ....	49
<b>Figura 11:</b> Carga parasitária no baço, fígado e lesão de camundongos BALB/c infectados com UDI-1 ( <i>L. amazonensis</i> ) e Ba199. ....	49
<b>Figura 12:</b> Carga parasitária no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com UDI-2 ( <i>L. infantum</i> ) e BH401.....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

B.O.D.: *Biological Oxygen Demand* (Demanda Biológica de Oxigênio);  
DALYs: *Disability-adjusted life years* (Anos de vida ajustados por incapacidade);  
DMSO: Dimetilsulfóxido;  
GPI: Glicosilfosfatidilinositol;  
HIV: *Human immunodeficiency virus*;  
ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas;  
IFN- $\gamma$ : Interferon-gama;  
IgE: Imunoglobulina E;  
IgG: Imunoglobulina G;  
IgM: Imunoglobulina M;  
IL: Interleucina;  
IP: Intraperitoneal;  
ITS1: *Ribosomal Internal Transcribed Spacer 1* (Espaçador do transcrito interna do gene do RNA ribossomal 1);  
kDNA: DNA do cinetoplasto;  
LC: Leishmaniose Cutânea;  
LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa;  
LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada;  
LD: Leishmaniose Disseminada;  
LDPK: Leishmaniose Dérmica Pós-Kalazar;  
LMC: Leishmaniose Mucocutânea;  
LPG: Lipofosfoglicano;  
LV: Leishmaniose Visceral;  
LVC: Leishmaniose Visceral Canina;  
MHC II: Complexo principal de histocompatibilidade de classe II;  
MLEE: *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (Eletroforese de Isoenzimas);  
NO: Óxido nítrico;  
OMS: Organização Mundial da Saúde;  
pb: Pares de bases;  
PBS: *Phosphate buffer saline*;  
PCR: *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase);  
qPCR: *Quantitative real-time PCR* (PCR em tempo real quantitativa);

RAPD-PCR: *Random Amplified Polymorphic DNA*;

RFLP: *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição);

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies reativas de oxigênio);

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*;

SFB: Soro Fetal Bovino;

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação;

SMF: Sistema Fagocitário Mononuclear;

SNP: *Single nucleotide polymorphism* (Polimorfismos de nucleotídeos simples);

SSR-PCR: *Simple Sequence Repeats*;

TBE: Tris-borato-EDTA;

TGF- $\beta$ : Fator transformador do crescimento-beta;

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa;

VP: Vacúolo Parasitóforo;

WHO: *World Health Organization*;

WT: *Wild type*;

$\alpha$ -MEM: *Minimum Essential Medium Alpha modification*;

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1.	O agente etiológico das leishmanioses.....	14
1.2.	Aspectos clínicos e imunológicos das leishmanioses .....	20
1.3.	Aspectos epidemiológicos e controle das leishmanioses .....	25
1.4.	Caracterização de isolados de <i>Leishmania</i> spp.....	28
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>31</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
3.1.	Objetivo geral.....	32
3.2.	Objetivos específicos.....	32
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1.	Caracterização molecular das cepas selvagens de <i>Leishmania</i> spp. ....	33
4.1.1.	Preparação das suspensões celulares de <i>Leishmania</i> spp.....	33
4.1.2.	Extração de DNA .....	33
4.1.3.	Reações em cadeia da polimerase (PCR).....	33
4.1.4.	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</i> .....	34
4.2.	Cultivo de manutenção de <i>Leishmania</i> spp.....	36
4.2.1.	Cultivo das formas promastigotas.....	36
4.2.2.	Diferenciação e manutenção das amastigotas axênicas.....	36
4.3.	Curva de crescimento <i>in vitro</i> das formas promastigotas .....	36
4.4.	Cultivo e manutenção de células DH82 .....	37
4.5.	Infecção de macrófagos .....	37
4.6.	Avaliação da infecção <i>in vivo</i> .....	38
4.6.1.	Animais .....	38
4.6.2.	Infecção experimental de camundongos BALB/c com as cepas selvagens e de referência .....	38
4.6.3.	Cinética da infecção .....	39
4.6.4.	Análise da carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR).....	40
4.6.4.1.	Coleta e extração de DNA dos tecidos animais.....	40
4.6.4.2.	qPCR .....	40
4.7.	Análise estatística.....	41
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>

5.1.	Descrição do isolamento das cepas selvagens de <i>Leishmania</i> spp. ....	42
5.2.	Identificação das cepas selvagens de <i>Leishmania</i> spp. por PCR-RFLP .....	43
5.3.	Avaliação das curvas de crescimento <i>in vitro</i> .....	45
5.4.	Avaliação da infecção de macrófagos DH82 por <i>Leishmania</i> spp.....	46
5.5.	Avaliação da infecção <i>in vivo</i> .....	47
5.5.1.	Cinética da infecção.....	47
5.5.2.	Avaliação da carga parasitária tecidual por qPCR.....	47
6.	DISCUSSÃO.....	51
7.	CONCLUSÕES .....	55
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
	ANEXOS .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O agente etiológico das leishmanioses

As leishmanioses constituem um conjunto de patologias graves e negligenciadas com ampla distribuição nas regiões tropical, subtropical e na bacia do Mediterrâneo (OLIVEIRA et al., 2013; WHO, 2018). Essa doença é causada por protozoários digenéticos (heteroxenos) pertencentes ao gênero *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), táxon que é dividido em três subgêneros capazes de infectar mamíferos, são eles: *Leishmania*, *Viannia* e *Mundinia* (BATES, 2007; LAINSON, 2010; ESPINOSA et al., 2016). A divisão nos dois primeiros se dá em função dos sítios anatômicos de adesão e diferenciação do parasito no tubo digestivo do inseto vetor, sendo que *Leishmania* (*Leishmania*) se desenvolve na região abdominal do intestino médio (porção anterior ao piloro) e *Viannia* na parte posterior (segmento entre o piloro e o íleo) de onde migra para as regiões antecedentes (LAINSON; SHAW, 1987; KILLICK-KENDRICK, 1990). O subgênero *Mundinia* foi recentemente proposto para agrupar espécies com proximidade filogenética anteriormente incluídas no complexo *Leishmania enrietti* (ESPINOSA et al., 2016).

Apesar dos diversos registros e das distintas denominações, a primeira descrição da leishmaniose visceral (LV) data de uma publicação de 1827, onde William Twining relatou o aumento do baço, anemia aguda e febre intermitente de um paciente indiano (TWINING, 1827; STEVERDING, 2017). Em 1885 e 1900, David Cunningham seguido de William Leishman foram os primeiros a observar “corpos ovoides” (formas amastigotas) em esfregaços de tecido e a correlacioná-los às apresentações clínicas da leishmaniose (AZIZI et al., 2016; STEVERDING, 2017). O agente etiológico, entretanto, só foi formalmente descrito, classificado e nomeado em 1903 por Ronald Ross, com auxílio dos dados publicados por Charles Donovan (ROSS, 1903; STEVERDING, 2017). Curiosamente, em 1908 Charles Nicolle identificou e descreveu *Leishmania infantum* em uma criança tunisiana, mesmo ano em que Charles Comte encontrou o parasito em cães procedentes da mesma região (NICOLLE; COMTE, 1908; HAOUAS; BABBA, 2017). Desde então, o cão (*Canis familiaris*) têm sido considerado um dos principais reservatórios do parasito em áreas urbanas (HARHAY et al., 2011).

Em 1571, colonizadores espanhóis relataram que trabalhadores no leste dos Andes peruanos sofriam com uma doença que causava a desfiguração da face, sendo o nariz e os lábios as regiões mais comprometidas (LAINSON, 2010). Embora essa tenha sido uma das primeiras descrições da leishmaniose mucocutânea (LMC) nas Américas, representações em cerâmica das deformidades faciais oriundas desta moléstia foram encontradas em sítios arqueológicos reminiscentes do século V (TUON; AMATO NETO; SABBAGA AMATO, 2008). A associação de que as lesões que acometiam pessoas na região neotropical correspondiam à leishmaniose cutânea (LC) só se deu em 1909, quando Adolpho Lindenbergs, Antônio Carini e Ulyssses Paranhos encontraram os “corpos ovoides” descritos por Cunningham e Leishman em esfregaços provenientes das feridas (CARINI; PARANHOS, 1909; LINDENBERG, 1909; STEVERDING, 2017). A LV, por apresentar uma sintomatologia facilmente confundida com outras patologias e visualmente menos evidente em comparação a LC, só foi registrada no Brasil em 1934 após a análise do material obtido de biópsia hepática *post mortem* (PENNA, 1934; LAINSON, 2010).

Em 1937, Aristides Cunha e Evandro Chagas não conseguiram infectar animais de laboratório com os parasitos isolados de casos de LV brasileiros, equivocadamente eles concluíram que o agente etiológico divergia de *L. infantum* e o denominaram *L. chagasi* (CUNHA; CHAGAS, 1937; STEVERDING, 2017). Apesar de apresentarem algumas diferenças fenotípicas, posteriormente foi comprovado com base em dados moleculares que as espécies eram sinônimas, dessa forma, a nomenclatura *L. infantum* é adotada neste trabalho (MAURICIO et al., 1999). Desde então, muitas outras espécies foram caracterizadas e descritas em animais domésticos e de vida livre, por exemplo, *L. amazonensis* foi primeiramente encontrada em um esfregaço obtido da lesão da cauda do roedor *Oryzomys capito* (LAINSON; SHAW, 1968; MACHADO et al., 1994; LAINSON, 2010). Achados como o de Deane e Deane (1962) que comprovaram a participação de cães e da raposa silvestre (*Lycalopex vetulus*) no ciclo biológico de *L. infantum*, contribuíram para a fundamentação e estabelecimento das medidas de controle da LV como conhecemos hoje.

Atualmente são conhecidas cerca de 33 espécies de *Leishmania* spp., sendo 15 das 22 espécies patogênicas encontradas nas Américas (PAHO, 2017). Apesar desta diversidade, duas morfologias celulares básicas são conservadas entre as diferentes espécies, são elas: promastigota e amastigota. As formas promastigotas (1,5-3 $\mu$ m de largura e 16-40 $\mu$ m de comprimento) são flageladas, apresentam alta motilidade e podem ser encontradas no aparelho

digestivo do inseto vetor, enquanto que as amastigotas (1,5-3 $\mu$ m de largura e 3-6,5 $\mu$ m de diâmetro, sem flagelo evidente) são intracelulares obrigatórias, podendo ser identificadas nas células do Sistema Fagocitário Mononuclear (SFM, constituído por monócitos, macrófagos e células dendríticas) do hospedeiro vertebrado infectado (BATES, 2007; SILVA et al., 2014). Ambas as formas possuem núcleo oval localizado no centro do corpo celular, um conjunto de organelas de cópia única, dentre as quais se destaca a mitocôndria, que ocupa grande parte do citoplasma e conta com uma região em formato de bastão (cinetoplasto) que é composta por uma massa de DNAs circulares (kDNA) (SUNTER; GULL, 2017).

A principal via de transmissão de *Leishmania* spp. é através do repasto sanguíneo do vetor, o qual pertence a ordem Diptera, subordem Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotiminae e aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (BATES; ROGERS, 2004). *Phlebotomus* spp. é prevalente nos ecossistemas semiáridos e desérticos da Europa, Ásia, norte da África e da península Arábica (Velho Mundo), enquanto *Lutzomyia* spp. ocorre nas florestas tropicais, peridomicílio e áreas urbanas das Américas (Novo Mundo) (ORYAN; AKBARI, 2016). Das 900 espécies de flebotomíneos registradas até o momento, aproximadamente 100 são vetores comprovadas das leishmanioses (GRADONI, 2018). Como insetos holometábolos, após a eclosão do ovo, as larvas passam por quatro estádios até se tornarem pupas, das quais emergem os adultos (BRAZIL; BRAZIL, 2018). Nesta última fase, os indivíduos apresentam tamanho diminuto (1,5–3mm de comprimento), corpo piloso e hábitos crepuscular e pós-crepuscular, sendo que durante o dia eles se abrigam em lugares úmidos e protegidos do sol, como: tocas de animais, fendas no solo, troncos de árvores, rachaduras nas paredes e cantos escuros das residências (KILLICK-KENDRICK, 1990; FELICIANGELI, 2004). Embora ainda existam lacunas quanto ao conhecimento da biologia de algumas espécies, sabe-se que as formas imaturas se desenvolvem sob resíduos orgânicos e que o dimorfismo sexual é expresso em termos morfológicos e comportamentais, por exemplo: as fêmeas possuem probóscides alongadas e cibário adaptados para hematofagia, os machos são fitófagos e possuem apêndices abdominais adaptados para a cópula (BRAZIL; BRAZIL, 2018). No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão das leishmanioses são: *Lutzomyia flaviscutellata* (principal transmissora de *Leishmania amazonensis*), *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcomei*, *L. migonei* (para os casos de LC), *L. longipalpis* e *L. cruzi* (transmissoras de *Leishmania infantum*) (BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).

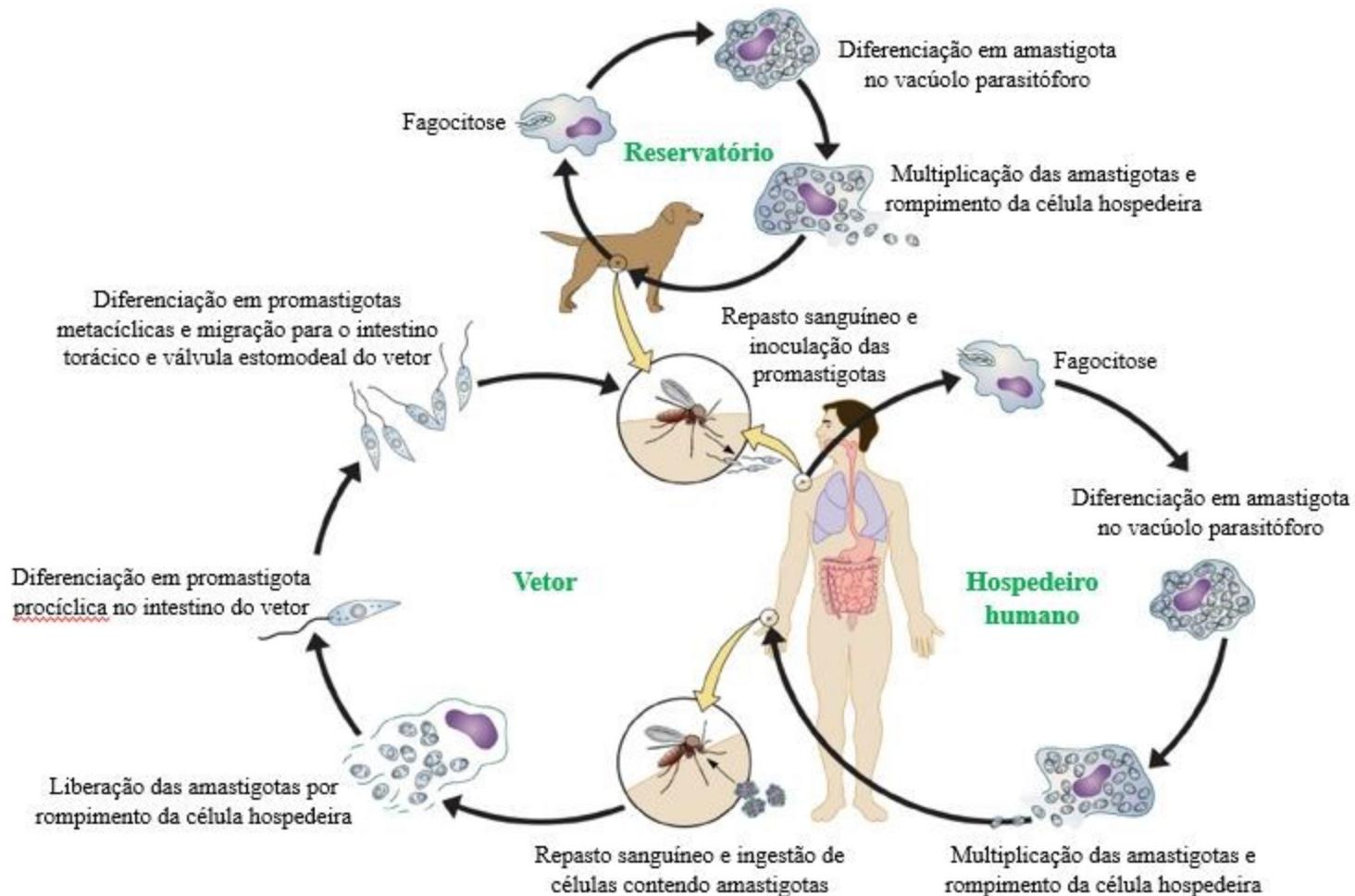
Rotas alternativas de transmissão de *Leishmania* spp. têm sido descritas tanto nos seres humanos quanto em cães, podendo ocorrer por via sexual (venérea), transplacentária (vertical), por transfusão sanguínea, transplante de órgãos e pelo compartilhamento de objetos perfurocortantes, como agulhas (DA SILVA et al., 2009; DE OLIVEIRA; ALVES; SILVA JUNIOR, 2015). No caso dos cães, embora a transmissão venérea ainda seja discutida, já foi confirmado que *L. infantum* apresenta tropismo para o sistema reprodutor masculino, local onde o parasito induz resposta imunológica que pode levar à atrofia degenerativa do epitélio seminífero, prostatite e azoospermia (DINIZ et al., 2005; RIERA; VALLADARES, 1996; SILVA et al., 2009; TURCHETTI et al., 2014). A detecção do parasito em recém-nascidos e natimortos associada ao aborto e a alterações macro e microscópicas na placenta de cadelas sintomáticas e assintomáticas, sugerem a disseminação do protozoário por via vertical (DUBEY et al., 2005; PANGRAZIO et al., 2009; DA SILVA et al., 2009). Outro dado que corrobora essa rota é a proliferação de células T CD4<sup>+</sup> provenientes de filhotes de cadelas naturalmente infectadas, frente a antígenos de *L. infantum* (BOGGIATTO et al., 2011). Ainda nessa perspectiva, o potencial vetorial de outros artrópodes hematófagos, como carrapatos e pulgas, têm sido questionado visto o encontro do DNA de *Leishmania* spp. em alguns desses ectoparasitos (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007; DE MORAIS et al., 2013).

Considerando a transmissão vetorial (Figura 1), o flebotomíneo adquire o parasito ao se alimentar de sangue infectado, mais especificamente, após a ingestão de células do SFM que contenham amastigotas (BATES, 2007; ESCH; PETERSEN, 2013). A população de *Leishmania* spp. no intestino do vetor é composta por várias morfologias celulares que diferem em tamanho, comprimento do flagelo, motilidade, moléculas de superfície e outras propriedades bioquímicas (GRADONI, 2018). De forma simplificada, as amastigotas que sobrevivem à ação das enzimas digestivas se diferenciam em promastigotas procíclicas, as quais proliferam por divisão binária no bolo alimentar (SUNTER; GULL, 2017). Após rompem a matriz peritrófica (membrana quitinosa que envolve e separa o alimento digerido do epitélio intestinal), os parasitos atacam e prendem-se às microvilosidades do intestino médio por meio de hemidesmossomos presentes na ponta do flagelo (LEHANE, 1997; DE ASSIS et al., 2012; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Neste estágio, as promastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicas, que constituem a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (SACKS, 1989; BATES, 2007). Essas formas migram e estabelecem intensa infecção na válvula estomodeal do inseto, o que impede a correta alimentação, estimula o refluxo de saliva

e a regurgitação dos protozoários presentes nas porções anteriores do intestino e no aparato bucal (ROGERS et al., 2004).

Durante a hematofagia, a integridade da epiderme do hospedeiro e dos capilares adjacentes é danificada, sendo formado um “pool” constituído por componentes extravasados do sangue e da matriz extracelular (ALMEIDA et al., 2003; DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016). Com a inoculação e regurgitação das promastigotas metacíclicas na solução de continuidade provocada pela picada, os parasitos podem entrar em contato com as células do SFM. Várias substâncias com ação vasodilatadora, anti-coagulante, quimioática e imunoregulatória presentes na saliva do vetor potencializam esse encontro (KAMHAWI, 2000). O reconhecimento do protozoário pelos fagócitos ocorre através de uma gama de receptores de reconhecimento padrão, como: receptores do Complemento (CR3 e CR1, que reconhecem microrganismos opsonizados pelas proteínas C3b e C1 do Sistema Complemento), receptores para proteína C reativa, receptores de fucose-manose, receptores de fibronectina e receptores para a porção Fc de anticorpos inespecíficos ou específicos (FcR) (ALEXANDER; RUSSELL, 1992; AKILOV et al., 2007; UENO; WILSON, 2012). Uma vez fagocitados, ocorre a fusão do fagossomos com lisossomos (organelas que contém enzimas proteolíticas e moléculas microbicidas), formando o fagolisossomo (LOGGE; DESCOTEAUX, 2008). Com vista ao fato de que é criado um microambiente inóspito, as promastigotas metacíclicas recém internalizadas são capazes de degradar algumas enzimas e modificar o ambiente intracelular, tornando-o apropriado para sua diferenciação em amastigotas (LOGGE; DESCOTEAUX, 2005; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; SÉGUIN; DESCOTEAUX, 2016). Com tais alterações, o ambiente fagolissosomal passa a se chamar vacúolo parasitóforo (VP).

Além dos seres humanos, as leishmanioses podem acometer um amplo espectro de animais, sendo as principais ordens de mamíferos: Carnivora (canídeos e felídeos), Rodentia (roedores), Primata (macacos e demais símios), Marsupialia (gambás), Cingulata (tatus), Pilosa (preguiças e tamanduás), Chiroptera (morcegos), Perissodactyla (antas, equinos e asininos) e Artiodactyla (porcos, catetos, cervídeos, bovinos e ovinos), que são tomados como reservatórios do parasito (GRAMICCI; GRADONI, 2005; ROQUE; JANSEN, 2014; BRASIL, 2017). Conforme o envolvimento destes hospedeiros, a doença assume dois perfis de transmissão principais: zoonótico (quando envolve o reservatório animal) e antropônótico (quando o parasito circula somente entre seres humanos), sendo que em ambos os casos o agente etiológico precisa do inseto vetor para completar o ciclo biológico (DESJEUX, 2004; WHO, 2010; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017).



**Figura 1:** Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Brevemente, as fêmeas de flebotomíneos adquirem o parasito ao ingerirem células do SFM contendo amastigotas durante o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado infectado, em seu trato digestivo essas formas se diferenciam em promastigotas procíclicas e, posteriormente, em promastigotas metacíclicas. Após migrarem para o intestino médio torácico e válvula estomodeal, as promastigotas metacíclicas (formas infectantes) são inoculadas e regurgitadas na solução de continuidade gerada pela hematofagia. Ao encontrarem novamente as células do SFM do hospedeiro humano ou do reservatório animal, os protozoários são reconhecidos e fagocitados. No vacúolo parasitóforo, os parasitos se diferenciam novamente em amastigotas, que proliferam por divisão binária e ao romperem a célula hospedeira, infectam novos fagócitos e tecidos (adaptado de Esch e Petersen, 2013).

## **1.2. Aspectos clínicos e imunológicos das leishmanioses**

Com a inoculação das promastigotas metacíclicas na pele, inicia-se uma complexa interação entre o parasito e a resposta imunológica do hospedeiro que, em conjunto com fatores inerentes à espécie de *Leishmania* spp. envolvida na infecção, irá determinar a expressão dos sinais clínicos. Basicamente, após a descoberta das subpopulações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares, a natureza da imunidade celular tornou-se a “chave” para definição de como a doença irá progredir, sendo proposto um paralelo entre resistência/susceptibilidade conhecido como “dicotomia Th1/Th2” (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A resistência, nesta perspectiva, está associada à capacidade da células Th1 (*T helper 1*) em reconhecer抗ígenos específicos e estimular a produção de citocinas inflamatórios do tipo 1, como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), que induzem sinergicamente a geração de óxido nítrico (NO, do inglês *Nitric Oxide*) e das espécies reativas de oxigênio em macrófagos infectados (HORTA et al., 2012; KIMA, 2007; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Além disso, a eliminação do parasito também está ligada à produção de interleucina-12 (IL-12), IL-1 $\beta$ , IL-8 e o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>) e *Natural killer*, que promovem a morte das amastigotas intracelulares por eliminação das células infectadas (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Por outro lado, a susceptibilidade está relacionada à ativação de células Th2 (*T helper 2*), as quais são responsáveis por suprimir a resposta imunológica do tipo 1 por meio da secreção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e o fator transformador do crescimento-beta (TGF- $\beta$ ) (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Além disso, linfócitos T regulatórios também podem atuar antagonizando os efeitos do INF- $\gamma$  e modulando a via de produção de NO (BELKAID et al., 2002; PETERS; SACKS, 2006; SCOTT; NOVAIS, 2016). Embora muitos autores ainda defendam a importância dessa dicotomia, pesquisas apontam que a resistência ao parasito não é exclusivamente explicada com base em respostas celulares, mas sim em um conjunto de mecanismos ainda não elucidados (ALEXANDER; BRYSON, 2005). Fatores do hospedeiro como sua constituição genética, idade, seu status sanitário e nutricional também devem ser considerados como determinantes no processo de infecção e evolução da enfermidade, pois eles condicionam a fisiologia e a capacidade do organismo de reagir ao agente agressor (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). Aspectos relacionados ao vetor, como composição da saliva e número de promastigotas metacíclicas inoculados, também têm sido discutidos (MAIA et al., 2011; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Em seres humanos, as manifestações clínicas das leishmanioses são diversas, porém, na maioria dos casos resultam em quatro formas principais: LC, LMC, LV e leishmaniose dérmica pós-kalazar (LDPK) (DESJEUX, 2004; WHO, 2010). A LC, em particular, apresenta-se de duas formas distintas conforme a distribuição das lesões, sendo elas: leishmaniose cutânea localizada (LCL) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (HARTLEY et al., 2014).

No Velho Mundo, a LCL é causada por *L. (Leishmania) tropica* e *L. (L.) major*, enquanto que no Novo Mundo, os agentes etiológicos são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) panamanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* (WHO, 2010; BRASIL, 2017). A infecção por *L. (L.) aethiopica* (Velho Mundo) e *L. amazonensis*, podem levar o desenvolvimento de LCD (WHO, 2010; BRASIL, 2017). A LMC ocorre devido à infecção por *L. braziliensis* e ocasionalmente por *L. panamanensis* ou *L. guyanensis* (AMATO et al., 2008; GUERRA et al., 2011; BRASIL, 2017). Esse quadro clínico é decorrente da disseminação linfática ou hematogênica dos parasitos após um intervalo variável da doença cutânea e, sem o correto tratamento pode vir a comprometer as mucosas nasais, orofaríngeas, o trato respiratório superior e ocasionar a completa destruição da pirâmide nasal (AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014). Em oposição às demais formas, a LMC é caracterizada por uma resposta imunológica exacerbada (polo hiperérgico) associada à baixa quantidade de amastigotas teciduais e alta positividade no diagnóstico por intradermorreação de Montenegro (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

O primeiro sinal clínico da LCL é um pequeno eritema no local onde o flebotomíneo realizou o repasto sanguíneo, que se desenvolve após um período pré-patente que varia entre 15 dias a três meses (AMEEN, 2010; BRASIL, 2017). O eritema dá origem a uma pápula de coloração rubra, que aumenta de tamanho, tornando-se um nódulo ulcerativo com necrose central, que progride ao longo de duas semanas a seis meses (AMEEN, 2010). As úlceras geralmente são indolores e apresentam um aspecto arredondado, tamanho variável (de poucos milímetros até 20 centímetros ou mais), bordas bem delimitadas emoldurando a lesão propriamente dita, elevadas e eritematosas, fundo granuloso grosso, avermelhado e com pouca secreção (AZEVEDO-COUTINHO; MENDONÇA, 2014; BRASIL, 2006; BRASIL, 2017). A infecção crônica pode persistir por meses ou anos e geralmente progride para a cura, exceto em casos onde há reativação, que na maioria das vezes é ocasionada por imunossupressão (REITHINGER et al., 2007). Quanto aos aspectos imunológicos, há o

desenvolvimento de uma resposta marcada por equilíbrio entre a produção de citocinas do tipo 1 e 2 (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A LCD, é caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares ou pápulas não ulcerativas, bem como ausência de resposta celular efetiva (GOTO; LINDOSO, 2010). Em comparação com a LCL, a produção de INF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e de NO é reduzida (CAÑEDA-GUZMÁN et al., 2014; DIAZ et al., 2006). A infecção geralmente não progride para a cura, sendo altamente resistente ao tratamento convencional (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Somente com terapia adequada, o quadro evolui para a cura clínica, mesmo que os danos teciduais sejam permanentes e possam atuar como estigma estético por toda a vida (YANIK et al., 2004; HARTLEY et al., 2014). A leishmaniose disseminada (LD) é uma apresentação rara e que pode ser facilmente confundida com a LCD, visto seu potencial metastático (FRANÇA-COSTA et al., 2012). Ao contrário da forma difusa, o paciente com LD exibe numerosas lesões pleomórficas e boa resposta ao tratamento (TURETZ et al., 2002; MACHADO et al., 2011).

Nos focos de transmissão da LC, LMC e LCD, o cão também pode ser encontrado naturalmente infectado por diversas espécies de *Leishmania* spp. (DANTAS-TORRES, 2009). No entanto, sua importância epidemiológica reside apenas na manutenção do ciclo biológico de *L. infantum* (BRASIL, 2014; BRASIL, 2016). Esses achados incomuns geralmente relatam o desenvolvimento de uma doença crônica com manifestações semelhantes à LC, sendo que o parasitismo se estabelece preferencialmente nas mucosas das vias aerodigestivas superiores, na bolsa escrotal e pavilhão auricular (MADEIRA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2017). Como nesses casos o animal é tomado como hospedeiro acidental, desde que a forma clínica seja confirmada pelo diagnóstico diferencial, a eutanásia é preconizada somente quando há o agravamento das ulcerações ou o desenvolvimento de infecções secundárias que possam gerar sofrimento (REITHINGER; DAVIES, 1999; FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014; BRASIL, 2014). De forma similar, também há descrições da leishmaniose cutânea em gatos (*Felis catus*), reportando o acometimento da face, membros e regiões com pouco pelo (SCHUBACH et al., 2004; DE SOUZA et al., 2005; SIMÕES-MATTOS et al., 2005; MARTINS et al., 2010).

A LV é causada por *L. (L.) donovani* no Velho Mundo e *L. (L.) infantum* no Sudeste da Europa, no Mediterrâneo e Novo Mundo (WHO, 2010). As manifestações da doença em seres humanos variam desde infecções assintomáticas ou oligossintomáticas, até um quadro progressivo e potencialmente fatal (BRASIL, 2014). O período de incubação varia de dias a

anos, sendo que os achados clínicos caracterizam-se por perda de peso, palidez, fraqueza, febre recorrente, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, plaquetopenia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia e pancitopenia (HERWALDT, 1999; WHO, 2010; PEDROSA, 2017). O parasitismo se estabelece em órgãos no fígado, baço e medula óssea por migração e acúmulo de células do SMF contendo amastigotas (PACE, 2014). Essa forma é considerada grave principalmente para crianças, idosos e portadores de imunodeficiências, sendo sua letalidade determinada devido às complicações associadas ao quadro visceral-debilitante (BRASIL, 2014; LINDOSO et al., 2016). A LDPK, normalmente é observada nas infecções com *L. donovani*, que após um quadro de LV leva o desenvolvimento de nódulos cutâneos (MURRAY et al., 2005).

Embora a infecção por *L. infantum* se estabeleça em diversos órgãos, existe uma sequência de eventos imunopatológicos gerais que determinam a colonização tecidual pelo parasita. Em um primeiro momento, as amastigotas estabelecem um intenso parasitismo nas células de Kupffer do fígado, sendo que o infiltrado inflamatório nesse órgão forma granulomas na tentativa de conter o protozoário (MURRAY, 2001). Ainda nesse estágio, diferentes populações de macrófagos do baço podem ser encontradas levemente parasitadas (RODRIGUES et al., 2016). Na fase crônica, a carga parasitária hepática é controlada e a infecção esplênica progride levando a desestruturação da zona marginal, destruição dos folículos de células dendríticas e perda dos centros germinativos, ocasionadas pelos elevados níveis de TNF- $\alpha$  (ENGWERDA et al., 2002; STANLEY; ENGWERDA, 2007). Essa desorganização associa-se diretamente à hiperplasia das células infectadas e a produção desregulada de anticorpos pelos linfócitos B (MILES et al., 2005; PACE, 2014; RODRIGUES et al., 2016). Outros eventos marcantes no curso da LV são a exaustão das células T, bem como produção exacerbada de IL-10 que pode ser detectada no soro, em aspirados dos órgãos linfoides e medula óssea (CALDAS et al., 2005; GAUTAM et al., 2014; ESCH et al., 2013).

No cão, a infecção por *L. infantum* pode variar de um quadro de assintomático a uma forma aguda que leva rapidamente ao óbito. O diagnóstico geralmente é complexo, visto que os animais apresentam espectro clínico variável e inespecífico (RIBEIRO et al., 2018). Sendo as principais apresentações da leishmaniose visceral canina (LVC): sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite e uveíte), linfadenopatia local ou generalizada, anemia, febre, coriza, apatia, diarreia, hemorragia intestinal, vômito, hepatoesplenomegalia, paresia dos membros, artrite, caquexia, inanição e morte (ALVAR et al., 2004; BRASIL, 2014). Também

podem ocorrer ulcerações na pele e demais acometimentos do tegumento, como: dermatites (do tipo esfoliativa, erosiva-ulcerativa, nodular, papular ou pustular), hiperqueratose e despigmentação nasal, onicogrifose, eczema e alopecia (BRASIL, 2014). O parasito pode ser encontrado no baço, fígado, linfonodos, lesões, pele íntegra e medula óssea (ALVAR et al., 2004; FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014). Apesar dos mecanismos imunológicos de resistência ainda não serem bem conhecidos, sabe-se que a susceptibilidade varia conforme a raça, expressão dos genes do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e de *Slc11a1* (NRAMP1), que codifica a bomba de próton-cáton fagolissosomal capaz de controlar o crescimento das amastigotas (ALTET et al., 2002; QUINNELL et al., 2003).

Assim como na doença humana, na LVC o desenvolvimento de uma resposta do tipo 1 está relacionada a proteção contra a infecção, e a do tipo 2 com a progressão da enfermidade (BRACHELENTE et al., 2005). Cães sintomáticos (susceptíveis) apresentam elevada expressão de TGF- $\beta$  e IL-10 nos linfonodos, IL-4 na pele e um equilíbrio de citocinas no baço, com predomínio de IL-10 com o avanço da doença (LAGE et al., 2007; ALVES et al., 2009). No fígado, as duas respostas também coexistem, sendo marcadas principalmente pelos altos níveis de TGF- $\beta$ 1, IL-10 e INF- $\gamma$  (CORRÊA et al., 2007). Quanto a produção de anticorpos, ela caracteriza-se pelo aumento de imunoglobulinas totais no soro, sendo estas pertencentes às classes IgG (IgG1 e 2), IgM e IgE (REIS et al., 2006a, 2006b; DAY, 2007). Na literatura ainda há divergências quanto a associação do isotipos com a apresentação de sintomas (DAY, 2007).

No que se referem às características do parasito, variações de ordem genética, como o aumento no número de cópias de um mesmo gene, polimorfismos de nucleotídeos simples (SNP, do inglês *Single nucleotide polymorphism*), presença de pseudogenes, expressão diferencial de determinados fatores de virulência e adaptações que induzem maior resistência ao estresse oxidativo, podem determinar cursos patológicos distintos entre cepas de uma mesma espécie de *Leishmania* spp. (SOLIMAN, 2006; ROGERS et al., 2011; MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013; HARTLEY et al., 2014; DE REZENDE et al., 2017). A espécie *L. amazonensis*, por exemplo, exibe alta variabilidade intraespecífica e, devido a isso, infecções por esta espécie podem se manifestar em um amplo espectro de formas clínicas, podendo variar de assintomática sem lesões aparentes à formas desfigurantes e até mesmo viscerais (BARRAL et al., 1991; FERNANDES et al., 2014). Análises moleculares de isolados viscerotrópicos de *L. braziliensis* comprovaram que em um mesmo hospedeiro podem coexistir distintas populações de protozoários, estas parecem ter a capacidade de colonizar diferencialmente cada

tecido (OLIVEIRA et al., 2013; MARQUEZ et al., 2017). Em oposição, cepas com baixa infectividade de *L. infantum* e *L. donovani* também têm sido descritas acometendo exclusivamente a pele (CUNHA et al., 2013; KARIYAWASAM et al., 2018).

Outros fatores que podem determinar o curso da patologia são coinfecções entre duas espécies de *Leishmania* spp. ou destas com outros microrganismos e parasitos, visto que as áreas de transmissão se sobrepõe (IBRAHIM et al., 1994; LINDOSO et al., 2016; MORGADO et al., 2016). Em um estudo no interior da Bahia, *L. amazonensis* e *L. infantum* foram isoladas de pacientes na mesma localidade, nesse caso especula-se que o desenvolvimento de LV possa ter decorrido da infecção mista ou estar relacionada com uma cepa de *L. amazonensis* em particular (BARRAL et al., 1991). Infecções experimentais em hamsters dourado da Síria (*Mesocricetus auratus*) comprovaram que a coinfecção entre ambas as espécies agrava o quadro clínico, com *L. amazonensis* invadindo precocemente o baço e o fígado, causando esplenomegalia e lesões locais ou disseminadas (CELESTE et al., 2017). Entretanto, o melhor exemplo de coinfecção que conduz a visceralização de cepas originalmente cutâneas é entre *Leishmania* spp. e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (VAN GRIENSVEN et al., 2014).

### **1.3. Aspectos epidemiológicos e controle das leishmanioses**

Endêmica em mais de 98 países e territórios distribuídos em cinco continentes, as leishmanioses apresentam uma incidência anual de 1,3 milhões de novas infecções, sendo 1,0 milhão para a LC e 300.000 para a LV (WHO, 2018). Ainda quanto à forma visceral, aproximadamente 350-400 milhões de indivíduos encontram-se em áreas de risco e 20-30 mil dos casos evoluem para o óbito do portador (CHAPPUIS et al., 2007; ALVAR et al., 2012). Devido a isso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica a LV como o segundo grupo de doenças parasitárias que mais mata no mundo, ficando atrás somente da malária (DESJEUX, 2004; WHO, 2010).

A LC está amplamente distribuída nas Américas, Mediterrâneo, Ásia e Oriente Médio, sendo que destas regiões os países com maiores contagens de casos são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Irã, Nicarágua, Peru, Sudão e Síria, que juntos representam 70-75% dos números globais (PAHO, 2017). Nestes locais, entretanto, observa-se um aumento no número de infecções, devido às melhorias no diagnóstico e das falhas no controle do vetor e dos reservatórios (REITHINGER et al., 2007). Além disso, o aumento na susceptibilidade do

hospedeiro humano à infecção seja por imunossupressão, desnutrição, migrações, pobreza e conflitos étnicos-territoriais, também tem profundos impactos na epidemiologia da doença (DESJEUX, 2001; DU et al., 2016). Sendo assim, essa forma clínica é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas, principalmente devido a capacidade de produzir deformidades que comprometem a vida do indivíduo acometido, com reflexos no campo psicológico, social e econômico (YANIK et al., 2004; WHO, 2010; DU et al., 2016; BRASIL, 2017). Considerando que a LC é uma doença ocupacional, são perdidos cerca de 42 mil anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs, do inglês *Disability-adjusted life years*) (MURRAY et al., 2015).

No continente americano, a LC distribui-se amplamente do sul dos Estados Unidos até norte da Argentina, exceto no Chile e Uruguai (COSTA, 2008; WHO, 2010). De 2001 a 2015, a Organização Pan-Americana de Saúde notificou 845.775 casos, sendo eles registrados na sub-região Andina (40,25%), América Central (15,45%), Brasil (41,65%), Colômbia (19,7%) e Peru (13,12%) (PAHO, 2017). Ainda segundo esses dados, no ano de 2015 a média anual de infecções foi aproximadamente 46.082 (com incidência de 17 casos/100 mil habitantes), sendo os maiores números observados no Suriname (218.48/100 mil habitantes) e Nicarágua (76.64/100 mil habitantes).

No Brasil, a LC é causada principalmente por *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*, que apresentam ampla distribuição por todas as regiões geográficas (COSTA, 2008; COELHO et al., 2011; BRASIL, 2017). Estima-se que no período de 1995 a 2014, a forma cutânea apresentou média anual de 25.763 novos casos, com coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes (BRASIL, 2017). O mesmo estudo ainda aponta que casos autóctones já foram registrados em todas as regiões. Entanto, a real prevalência da LC em território brasileiro não se encontra plenamente estabelecida, principalmente em virtude de subnotificações, diagnósticos incorretos, infecções inaparentes, variações de resposta do hospedeiro e mudança no perfil epidemiológico (COSTA, 2008). Inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, a doença acometia ocasionalmente pessoas em contato com os vetores presentes em áreas naturais (BRASIL, 2017). Entretanto, devido às modificações ambientais feitas pelo homem, como o desmatamento e a urbanização mal planejada que levam os vetores e os reservatórios a entrar em maior contato com os seres humanos, observa-se a inversão do perfil epidemiológico de silvestre para peridomiciliar (ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2001).

Dado ao fato de que o cão participa como hospedeiro accidental no ciclo biológico das espécies causadoras de LC humana, a prevalência das infecções restringe-se a poucos estudos. Tal escassez é um reflexo de como o diagnóstico das leishmanioses nesses animais é realizado em alguns locais, sendo o exame parasitológico e sorológico as metodologias mais utilizadas (BRASIL, 2014; RIBEIRO et al., 2018). Essas ferramentas, no entanto, não possibilitam a identificação do agente etiológico e muitos cães acabam sendo abatidos erroneamente (DANTAS-TORRES, 2009). No Rio de Janeiro, por exemplo, um estudo com 66 cães positivos para anticorpos anti-*Leishmania* revelou que 12 estavam infectados por *L. braziliensis* (MADEIRA et al., 2006). Em Bauru (São Paulo), foram encontrados 77 (74,8%) de 103 cães apresentando o perfil de *L. amazonensis* na análise de polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (SANCHES et al., 2016). Além desse achado, *L. amazonensis* já relatada acometendo cães em São Paulo, Minas Gerais e Paraná (TOLEZANO et al., 2007; DIAS et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012; VALDIVIA et al., 2017).

A LV apresenta ampla distribuição na Ásia, Europa, Oriente Médio, África e nas Américas, sendo que dos 88 países onde a doença é endêmica, 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil (PIGOTT et al., 2014). Das 52.176 notificações entre 2001 a 2015 nas Américas, 96,35% delas foi realizada no Brasil (50.268) (PAHO, 2017). Ainda segundo esse dado, das 3.456 novas infecções registradas em 2015, 95,15% (3.289) ocorreram no Brasil (incidência de 2,54/100 mil habitantes), seguido do 2,7% no Paraguai (92), 1% na Venezuela (37) e 0,6% na Colômbia. Desse total, 257 (7,44%) dos casos foram coinfecções com HIV e 268 (7,75%) evoluíram para óbito do portador (PAHO, 2017).

No Brasil, de 1984-2002 os casos de LV somaram 48.455 e de 2004 a 2014 a média anual foi 3.156 notificações (incidência de dois casos/100 mil habitantes) (BRASIL, 2014). Em 25 anos de registros (1990-2015), torna-se evidente o aumento no número de casos, a mudança no perfil de transmissão de rural para urbana e a expansão no país (BRASIL, 2014). Historicamente, as migrações representaram o principal fator que contribuiu para essa alteração (HARHAY et al., 2011; PAHO, 2017). Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos de LV eram notificados no Nordeste, entretanto, com o passar dos anos a doença se expandiu para outras regiões, como Norte, Centro-Oeste, Sudeste e, recentemente nove casos autóctones foram registrados no Sul, onde anteriormente não havia transmissão (HARHAY et al., 2011; BRASIL, 2014; SINAN, 2018).

No que se refere à LVC, o encontro de cães infectados precede o aparecimento de casos humanos (BRASIL, 2014). Desse modo, ações de controle voltam-se para a importância desse reservatório, sendo preconizada a eutanásia de animais infectados com *L. infantum* (FIGUEIREDO; MADEIRA, 2014). Contudo, a constatação de que o Ministério da Saúde não tem conseguido reduzir os casos de LV humana, suscita o questionamento e a necessidade de reavaliação dessa política (PALATNIK-DE-SOUSA et al., 2001; ALVAR et al., 2004; HARHAY et al., 2011). Em 2017, foi aceito o registro e comercialização do medicamento Miltefora® para cães, permitindo o tratamento de centenas de animais em todo o território nacional (RIBEIRO et al., 2018). Uma vez que o tratamento não elimina por completo o parasito do organismo (cura parasitológica), a decisão de submeter o cão aos protocolos terapêuticos visa aumentar sua expectativa e qualidade de vida, bem como reduzir a carga parasitária e o potencial infectivo ao vetor (RIBEIRO et al., 2018). Outras alternativas de controle da infecção canina, são: o uso de coleiras impregnadas com inseticida piretróides e a administração das vacinas atualmente disponíveis (TRAVI et al., 2018).

#### **1.4. Caracterização de isolados de *Leishmania* spp.**

Os primeiros estudos de caracterização dos protozoários do gênero *Leishmania* spp. objetivaram principalmente estabelecer uma relação entre a espécie e as manifestações da infecção no hospedeiro. Com a introdução das metodologias moleculares e bioquímicas, a distinção das formas clínicas e a espécie do parasito puderam ser identificadas de forma mais sensível e específica (GOMES et al., 2007). A análise de isoenzimas (MLEE, do inglês *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) constitui uma das ferramentas mais importantes para estudos taxonômicos das leishmanioses (CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994; DA SILVA et al., 2010). Através desta, os pesquisadores foram capazes de identificar as zimodemas (agrupamento de cepas com perfil isoenzimático similar) e definir os complexos (conjunto de espécies com menor variabilidade enzimática entre si) (GARDENER; CHANCE; PETERS, 1974; KREUTZER; CHRISTENSEN, 1980; GRIMALDI et al., 1991).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) possibilitou, além de um diagnóstico sensível e altamente específico, o desenvolvimento de estudos taxonômicos e filogenéticos com base nas análises do material genético (DEGRAVE et al., 1994; GOMES et al., 2007; YANG; ROTHMAN, 2004). Variantes dessa técnica têm surgido e sido aplicadas na detecção da variabilidade intra e interespécifica dos parasitos, por exemplo, a RAPD-PCR (do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*) baseia-se na

amplificação do DNA utilizando primers de sequência arbitrária que se ligam em diversas regiões do genoma e geram fragmentos de tamanhos diferentes (WILLIAMS et al., 1990; MARTINEZ et al., 2003; MARQUEZ et al., 2017). A SSR-PCR (do inglês *Simple Sequence Repeats*) tem por base a amplificação de repetições curtas (microssatélites) distribuídas pelo DNA genômico, sendo que as reações resultam em perfis baseados na quantidade de sequências diferentes entre cada espécie e cepa (TAUTZ, 1989; VOLPINI; PASSOS; ROMANHA, 2001). Outra técnica é a RFLP-PCR, que envolve uma o corte do material amplificado com enzimas de restrição (VOLPINI et al., 2004; DA SILVA et al., 2010).

Essas e outras metodologias ajudaram no entendimento da biologia de *Leishmania* spp. e da relação parasito-hospedeiro. Muitos estudos já descreveram genes e moléculas relacionados à capacidade de infecção (infectividade) e geração dos sinais clínicos (patogenicidade). A virulência, conforme proposto por Chang e McGwire (2002), corresponde à gravidade dessas manifestações, sendo os protozoários causadores do quadro visceral mais virulentos do que aqueles que levam ao desenvolvimento de lesões cutâneas autocuráveis. De forma geral, são as moléculas presentes na superfície da membrana das promastigotas e amastigotas que possibilitam o estabelecimento da infecção na célula do SMF, a sobrevivência às pressões seletivas do organismo hospedeiro e fixação no sistema digestivo do vetor, dentre elas destacam-se: o glicosilfosfatidilinositol (GPI), a protease gp63 e o lipofosfoglicano (LPG) (YAO; DONELSON; WILSON, 2003; DE ASSIS et al., 2012; DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Um exemplo de sua importância é mostrado em estudos onde uma forma mutante LPG<sup>(-)</sup> de *L. major* teve sua infectividade atenuada em flebotomíneos, camundongos e macrófagos *in vitro* (SACKS et al., 2000; SPATH et al., 2000).

Uma vez que a regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é feita através de modificações pós-transcricionais, estudos do proteoma (conjunto de proteínas) têm possibilitado a caracterização em larga escala de proteínas envolvidas na infectividade e a diferenciação de linhagens celulares (PAAPE; AEBISCHER, 2011). Um trabalho recente que fez uso dessas técnicas foi capaz de identificar diferenças na abundância de fatores de virulência entre duas cepas de *L. amazonensis* com caráter metastático diferentes (DE REZENDE et al., 2017). Além disso, essas ferramentas também têm sido usadas na busca por novas vacinas, no melhoramento do diagnóstico e entendimento de como *Leishmania* spp. modula a resposta imunológica do hospedeiro (COSTA et al., 2011; PAAPE; AEBISCHER, 2011; TEIXEIRA et al., 2015). Embora tais técnicas forneçam dados substanciais que permitem a caracterização e

agrupamento de espécies, faz-se necessária uma abordagem mais ampla que considere também o comportamento do protozoário e as características da infecção.

O isolamento de *Leishmania* spp. a partir de fragmentos de lesões ou de aspirados de outros órgãos, constitui uma dentre as variadas metodologia para o diagnóstico das leishmanioses (SINGH, 2006). Apesar de suas limitações, como a possibilidade de contaminações bacterianas e fúngicas nos inóculos *in vitro*, esta técnica permite a manutenção dos parasitos em culturas axênicas e, com isso, viabiliza melhor identificação da espécie envolvida na infecção quanto utilizada em associação à outra técnica. Além disso, o cultivo de cepas selvagens facilita a realização de estudos sobre fatores de virulência, resistência a drogas e adaptações que podem ocorrer nas espécies de maior importância epidemiológica (OLIVEIRA et al., 2010).

Aproximadamente 90% dos isolamentos de parasitos de pacientes com doença ativa apresentam crescimento em meios de cultura líquidos ou semissólidos (SINGH, 2006). No entanto, determinadas espécies de *Leishmania* spp. apresentam baixa taxa de multiplicação *in vitro* ou requerem condições rigorosamente controladas (LEMESRE et al., 1988). A inoculação de material biológico em modelos experimentais é adicionalmente empregada para aumentar as chances de isolar o protozoário e, além disso, possibilita a confirmação da forma clínica por reprodução da sintomatologia (PORROZZI; CAVALCANTI; CUPOLILLO, 2014). Dentre os animais de laboratório mais utilizados no estudo das leishmanioses, destacam-se os camundongos (*Mus musculus*), o hamster dourado da Síria, cães e primatas não humanos. O primeiro é altamente suscetível às diferentes espécies de *Leishmania* spp., sendo que a infecção experimental mimetiza eventos marcantes da doença em outros organismos (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Em camundongos, a progressão da doença pode variar conforme a linhagens de roedor isogênico (geneticamente semelhante) utilizada, a espécie de parasito e a via de infecção (ROLÃO; MELO; CAMPINO, 2004; PEREIRA; ALVES, 2008; LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; DE SOUZA et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA

A infecção por *Leishmania* spp. apresenta-se de diferentes formas clínicas e pode acometer um amplo espectro de mamíferos, incluindo o ser humano. O cão desempenha um importante papel como reservatório do parasito causador da LV (*L. infantum*), entretanto, em áreas endêmicas para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, estes também podem ser encontrados naturalmente infectados por tais agentes etiológicos. Embora essas infecções sejam raras, alguns achados da literatura têm aberto o questionamento sobre o papel desses animais no ciclo biológico dessas espécies e o potencial infectivo das mesmas. Tendo isso em vista, torna-se importante a caracterização desses protozoários, bem como o estudo dos aspectos relacionados à sua infectividade e patogenicidade.

Segundo dados não publicados do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*, a transmissão das leishmanioses ainda é recente e restrita a algumas regiões do município de Uberlândia. No ano de 2015, o Prof. Sydnei Magno da Silva (coordenador do laboratório) isolou duas cepas de *Leishmania* spp. provenientes de cães. Ambos os animais apresentavam sinais compatíveis com a LVC. No entanto, ao inocular uma das cepas em hamster e camundongo, esta levou o desenvolvimento de lesões cutâneas nodulares e ulceradas em ambos. A avaliação das extensões sanguíneas do cão do qual foi isolada a segunda cepa, mostrou amastigotas livres, parasitando monócitos e neutrófilos. Neste sentido, nós nos questionamos sobre o perfil infectivo *in vitro* e *in vivo* das mesmas. O presente estudo, portanto, busca contribuir com informações e ampliar o conhecimento com relação à infectividade desses dois parasitos, para que isso sirva de ponto de partida para futuras investigações.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar a infectividade *in vitro* e *in vivo* de duas cepas selvagens de *Leishmania* spp. isoladas de cães.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- ✓ Realizar a caracterização em nível molecular das duas cepas selvagens de *Leishmania* spp.;
- ✓ Avaliar o comportamento da curva de crescimento, em meio quimicamente definido, das cepas selvagens em relação a duas cepas de referência da OMS;
- ✓ Verificar a infectividade das formas promastigotas e amastigotas axênicas das cepas selvagens e de referência, em macrófagos imortalizados de cão;
- ✓ Caracterizar a infectividade das cepas selvagens e de referência em camundongos BALB/c;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Caracterização molecular das cepas selvagens de *Leishmania* spp.

#### 4.1.1. Preparação das suspensões celulares de *Leishmania* spp.

As duas cepas selvagens (referidas como UDI-1 e 2), bem como as cepas Ba199 (MHOM/BR/1989/Ba199 – *L. amazonensis*), BH401 (MCAN/BR/2002/BH401 – *L. infantum*), M2904 (MHOM/BR/1975/M2904 – *L. braziliensis*), M4147 (MHOM/BR/1975/M4147 – *L. guyanensis*) foram descongeladas do criobanco do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* e expandidas em meio α-MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* – Sigma Aldrich Inc., Estados Unidos da América – EUA), pH 7,2, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB – Life Technologies, EUA), 2mM de L-glutamina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 100U/mL de penicilina (Sigma Aldrich Inc.), 100µg/mL de estreptomicina (Sigma Aldrich Inc., EUA), 400µg/mL de gentamicina (Chemitec® Agro-Veterinária, Brasil - BR) e 20mM de tampão HEPES (Ludwig Biotec Ltda., BR) em garrafas de 25cm<sup>2</sup> (Eppendorf®, BR). Os parasitos foram incubados em estufa B.O.D. (Demanda Biológica de Oxigênio, do inglês *Biological Oxygen Demand* – Lucadema, BR) a 24°C. Após quatro dias, as culturas foram transferidas para tubos de 15mL (Sarsted AG & Co., Alemanha) e centrifugadas a 1650x g por 10min a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspensos com tampão fosfato-salino estéril (PBS – NaCl 136mM, KCl 2,6mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7mM, pH 7,2), sendo as suspensões celulares armazenada no freezer -80°C até o momento da extração do DNA.

#### 4.1.2. Extração de DNA

As extrações foram realizadas com o kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* (Promega®, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 100µL de água livre de nucleases, sendo a concentração de DNA determinada por espectrofotometria (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Fischer Scientific, EUA). As amostras foram armazenadas a -20°C até o momento das análises moleculares.

#### 4.1.3. Reações em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi submetido à análise molecular com os primers LITSR/L5.8S e *hsp70* direto/reverso (GRAÇA et al., 2012; SCHÖNIAN et al., 2003). Sendo as PCRs realizadas em um volume final de 25µL utilizando *GoTaq® Green Master Mix* (Promega®, EUA), conforme

instruções do fabricante, o termociclador *SimpliAmp™ Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e as condições descritas na Tabela 1. Em ambas as reações foram utilizados como controles o DNA das cepas Ba199, BH401, M2904 e M4147, bem como água livre de nucleasse (branco).

Após a PCR, os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 3% ou poliacrilamida 6%, juntamente com o padrão de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotec, BR) e com tampão TBE 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM e EDTA 2mM) durante 1h a 100V. Para visualização das bandas, os produtos de reação corridos em gel de agarose foram marcados com intercalante de DNA (*Safer Dye* - Kasvi, BR). Enquanto que, o gel de poliacrilamida foi fixado em solução de álcool etílico 10% v/v e ácido acético 0,5% v/v, corado em solução de nitrato de prata 0,1% p/v e revelado com auxílio de solução de hidróxido de sódio 3% p/v e formaldeído 3% v/v (GREEN; SANMBROOK, 2012). O gel de agarose foi visualizado sobre a indecência de luz ultravioleta em fotodocumentador *Image Quant LAS 4000* (GE Healthcare Life Sciences, EUA).

#### **4.1.4. *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)***

Os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática utilizando a enzima *Hae*III (Promega®, EUA), que cliva o DNA no palíndromo  $\rightarrow 5'-GG\blacktriangledown CCCC\blacktriangle GG-3' \leftarrow$  e possibilita a determinação das espécies de *Leishmania* spp. (SCHÖNIAN et al., 2003; GRAÇA et al., 2012). A reação foi realizada em um volume final de 20 $\mu$ L, sendo 2 $\mu$ L de cada amostra amplificada, 0,5 $\mu$ L de *Hae*III (10U/ $\mu$ L), 2 $\mu$ L de tampão C (Tris-HCl 10mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM, 50mM de NaCl, 1mM de DTT, pH 7,9 – Promega®, EUA) e 15,5 $\mu$ L de água livre de nucleasse. A digestão foi feita a 37°C por 2h em banho seco.

Para a visualização do perfil de pares de bandas (Tabela 2), os produtos das reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% ou poliacrilamida 6%, conforme descrito no tópico 4.1.3.

**Tabela 1:** Iniciadores, alvo, tamanhos (pb) dos produtos amplificados e condições da reação de PCR para *Leishmania* spp., segundo Graça et al. (2012) e Schönian et al. (2003).

Iniciadores	Sequências ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> )	Alvo	Amplicon	Condições da reação
LITSR/L5.8S	<i>F</i> : 5'-CTGGATCATTTCGGATG-3' <i>R</i> : 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'	Sequência conservada da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal 1 (ITS1, do inglês <i>ribosomal internal transcribed spacer 1</i> ) de <i>Leishmania</i> spp.	300-350pb	Desnaturação inicial a 95°C por 2min, seguido de 35 ciclos (95°C por 20seg, 56°C por 30seg, 72°C por 1min) e extensão final a 72°C por 6min
<i>hsp70</i> direto/reverso	<i>F</i> : 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' <i>R</i> : 5'-TCCTTCGACGCCCTGGTTG-3'	Sequência conservada do gene de <i>Leishmania</i> spp. que codifica a proteína de choque térmico de 70 kDa ( <i>Hsp70</i> ).	234pb	Desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 30 ciclos (94°C por 30seg, 61°C por 1min, 72°C por 30seg) e 72°C por 8min

**Tabela 2:** Tamanhos dos fragmentos (pb) obtidos após digestão dos produtos de reação dos controles de *Leishmania* spp., segundo Graça et al. (2012) e Schönian et al. (2003).

Espécie	Alvos digerido com a enzima <i>HaeIII</i>	
	ITS1	HSP70
<i>L. infantum</i>	~190, 70 e 60	90, 80 e 70
<i>L. amazonensis</i>	~190 e 140	230
<i>L. braziliensis</i>	~150 e 140	140
<i>L. guyanensis</i>	~150 e 130	180

## **4.2. Cultivo de manutenção de *Leishmania* spp.**

### **4.2.1. Cultivo das formas promastigotas**

Para todos os ensaios descritos a seguir foram utilizadas somente as cepas Ba199 (*L. amazonensis*), BH401 (*L. infantum*), UDI-1 e UDI-2. A primeira foi isolada de um caso humano de LCD proveniente do estado do Maranhão e a segunda de um cão com LVC em Minas Gerais (DE OLIVEIRA et al., 2007; CELESTE, 2015). As promastigotas das cepas selvagens e de referência foram cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM completo (conforme descrito no tópico 4.1.1) em garrafas de 25cm<sup>2</sup> e incubadas em estufa B.O.D. a 24°C. Sempre que necessário, os parasitos foram repicados entre o 3-5º dias de cultivo, sendo as novas culturas iniciadas com  $5 \times 10^5$  promastigotas/mL. Além disso, para evitar que os parasitos perdessem sua virulência, não foram utilizadas culturas repicadas mais de 10 vezes (MOREIRA et al., 2012).

### **4.2.2. Diferenciação e manutenção das amastigotas axênicas**

As amastigotas foram obtidas por diferenciação *in vitro*. Para tal, aproximadamente  $2 \times 10^7$  promastigotas/mL foram reservadas em tubos de 15mL, centrifugadas a 1650x g por 10min a temperatura ambiente, lavadas três vezes com PBS estéril, ressuspensas com meio  $\alpha$ -MEM completo (pH 4-5) e transferidas para garrafas de 25cm<sup>2</sup> (TEIXEIRA et al., 2002). As culturas foram vedadas e incubadas de dois a cinco dias em estufa a 34°C (*CO<sub>2</sub> Incubator* MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão), sendo acompanhadas quanto as mudanças morfológicas com auxílio do microscópio *EVOS®XL Core Cell Imaging System* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e, quando necessário, passadas três vezes em seringa com agulha de 26G½ para individualização dos parasitos.

## **4.3. Curva de crescimento *in vitro* das formas promastigotas**

A avaliação do desenvolvimento e multiplicação das formas promastigotas foi realizada através da curva de crescimento *in vitro*. Para tal, culturas iniciadas com  $5 \times 10^5$  promastigotas/mL foram acompanhadas por oito dias consecutivos. Basicamente, uma alíquota das culturas foi diluída em solução fixadora (ácido cítrico 0,05M, cloreto de sódio 0,12M, formaldeído 0,5% v/v, pH 7,2). Em seguida, a solução foi diluída novamente em igual volume de eritrosina B 0,4%, aplicada em câmara hemocitométrica (Kasvi, Brasil) e analisada em microscópio óptico (aumento de 40x). O número de parasitos por mililitro de cultura foi

determinado pela média aritmética dos quatro quadrantes multiplicada pelo inverso da diluição e, novamente, por 10.000 (fator de correção da câmara).

#### **4.4. Cultivo e manutenção de células DH82**

Os macrófagos caninos DH82, originalmente obtidos a partir do cultivo de células de medula óssea de um cão com histiocitoma maligno (WELLMAN et al., 1988), foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo. As células foram cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> com meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute Medium* - Sigma Aldrich Inc., EUA) suplementado com 2,0g/L de bicarbonato de sódio (Sigma Aldrich Inc., EUA), 10% de SFB, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 400µg/mL de gentamicina e 20mM de HEPES. A incubação da cultura foi realizada em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade.

Repiques foram realizados a cada três dias ou quando a células atingiam uma confluência próxima a 90%, sendo a monocamada dispersa com solução de EDTA 10mM seguido de centrifugação (500g por 10min a 4°C), descarte do sobrenadante e ressuspensão em meio RPMI completo. Quando necessário, a suspenção celular foi criopreservada com de meio de congelamento composto por solução de dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma Aldrich Inc., EUA) diluído em nove partes de SFB.

#### **4.5. Infecção de macrófagos**

Para a infecção *in vitro*, a quantidade de células viáveis na suspensão celular foi determinada por contagem em câmara hemocitométrica, como descrito no tópico 4.3. A concentração de DH82 foi ajustada para 1x10<sup>5</sup> macrófagos/poço de uma placa de placas de 24 poços (Kasvi, BR) contendo lamínulas estéreis (13 mm). Após isso, a placa foi incubada *overnight* (37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade) até a completa adesão dos macrófagos e, posteriormente, os parasitos foram contados e adicionados aos poços numa proporção de dez protozoários por fagócito.

As promastigotas de fase estacionária foram incubadas juntamente com os macrófagos durante 24h a 34°C (5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade). Após este tempo, os poços foram lavados seis vezes com meio RPMI incompleto e as células infectadas permaneceram incubadas por mais seis horas. Ao fim destes tempos, os poços foram novamente lavados e as lamínulas

retiradas cuidadosamente. Logo depois de secas, elas foram coradas com Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Brasil), montadas em lâminas com o auxílio de Bálsamo do Canadá e analisadas em microscópio ótico (aumento de 100x). Os mesmos procedimentos foram realizados para a infecção com amastigotas axênicas.

A porcentagem de macrófagos infectados (número de DH82 infectadas  $\times$  100/número de DH82 contadas), o número médio de amastigotas intracelulares/célula infectada e o índice de infectividade (porcentagem de DH82 infectadas  $\times$  [número de amastigotas intracelulares/macrófago infectado]) foram determinados após a contagem de 300 macrófagos por lamínula, em duplicata.

#### **4.6. Avaliação da infecção *in vivo***

##### **4.6.1. Animais**

Os ensaios de infectividade *in vivo* foram conduzidos utilizando camundongos BALB/c fêmeas com oito semanas de idade e peso variando entre 20-25g. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da UFU (CEBEA - UFU), onde receberam água e alimento *ad libitum* (Protocolo CEUA/UFU no 069/2013 - Anexo 1).

##### **4.6.2. Infecção experimental de camundongos BALB/c com as cepas selvagens e de referência**

Para as infecções *in vivo*, as culturas de promastigotas foram mantidas até que atingissem a fase estacionária seguindo as mesmas condições descritas no tópico 4.2.1. Após a contagem em câmara hemocitométrica, as culturas foram centrifugadas (3500rpm por 10min a temperatura ambiente) e  $2 \times 10^7$  promastigotas/50 $\mu$ L de PBS foram inoculados na base da cauda (Ba199 e UDI-1) ou por via intraperitoneal (IP - BH401 e UDI-2) nos camundongos. Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

**Grupo 01:** Cinco animais infectados com UDI-1, que tiveram o desenvolvimento de lesões e peso acompanhados durante 12 semanas;

**Grupo 02:** Cinco animais infectados com Ba199, que tiveram o desenvolvimento de lesões e peso acompanhados durante 12 semanas;

**Grupo 03:** Cinco animais infectados com UDI-2, que tiveram o peso acompanhado durante dez semanas;

**Grupo 04:** Cinco animais infectados com BH401, que tiveram o peso acompanhado durante dez semanas;

**Grupo 05:** Cinco animais infectados com UDI-1, que foram eutanasiados para avaliação da carga parasitária após oito semanas;

**Grupo 06:** Cinco animais infectados com Ba199, que foram eutanasiados para avaliação da carga parasitária após oito semanas;

**Grupo 07:** Cinco animais infectados com UDI-2, que foram eutanasiados para avaliação da carga parasitária após cinco semanas;

**Grupo 08:** Cinco animais infectados com BH401, que foram eutanasiados para avaliação da carga parasitária após cinco semanas;

Como a biologia desses parasitos varia entre as espécies de *Leishmania* spp., a critério de comparação o tempo de infecção e as vias de inoculação foram mantidas conforme o que é descrito na literatura para *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis* (ROLÃO; MELO; CAMPINO, 2004; LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016). Sendo assim, nos experimentos *in vivo*, as comparações foram feitas entre as cepas da mesma espécies de *Leishmania* spp.

#### 4.6.3. Cinética da infecção

O desenvolvimento da infecção e das lesões cutâneas foi acompanhado para os grupos um e dois, sendo a progressão das manifestações dérmicas verificadas com auxílio de paquímetro digital (150mm - Western Union, EUA) semanalmente. Além disso, a ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas foram monitorados durante todo o experimento, bem como o peso dos animais dos grupos três e quatro foi verificado semanalmente em balança de precisão (0,001g).

#### **4.6.4. Análise da carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR)**

##### **4.6.4.1. Coleta e extração de DNA dos tecidos animais**

Os animais foram eutanasiados conforme os protocolos nacionais que regulamentam a experimentação animal. Brevemente, os camundongos foram contidos manualmente e quimicamente por associação de Cetamina (Sytec, BR - 20mg/kg) e Xilazina (Sytec, BR - 20mg/kg) inoculadas por via IP. Uma vez constatado o plano anestésico, foi realizado o deslocamento cervical. Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito dorsal para abertura da cavidade abdominal e coleta de órgãos (fígado e baço). Nos grupos onde houve a formação de lesões, as bordas das úlceras foram removidas com auxílio de lâminas histológicas e reservadas em microtubos.

Cerca de 25mg de cada tecido foram pesados em microtubos livres de nucleases com auxílio de balança de precisão e encaminhados para extração de DNA, a qual foi realizada com o kit *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System* seguindo as instruções do fabricante para esse tipo de amostra. O DNA extraído foi eluído em 100µL de água livre de nucleases, sendo sua concentração determinada por espectrofotometria e ajustadas para 10ng/µL. As amostras foram mantidas a -20°C até o momento das análises.

##### **4.6.4.2. qPCR**

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços (*Applied Biosystems* - Life Technologies, EUA) utilizando o sistema *SYBR® Green I* (Promega®, EUA), sendo processadas em termociclador *StepOne PlusTM Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para tal, foram utilizados os primers genéricos L150/L152, conforme Degrave et al. (1994) (Tabela 3). As reações foram realizadas com um volume final de 15µL contendo: 100nM de cada iniciador, *GoTaq qPCR Master Mix* (Promega®, EUA) 1X, água livre de nucleases e 5µL de DNA (50ng) por poço. O número de cópias de DNA de *Leishmania* spp. em cada amostra foi determinado por meio de uma regressão linear elaborada a partir da curva padrão gerada com quantidades conhecidas de DNA de BH401 diluído em série na razão dez ( $10^7$  parasitos até  $10^1$ ).

O procedimento descrito acima também foi realizado com os primers TNF-5241/TNF-5411, conforme Cummings e Tarleton (2003) (Tabela 3). Sabendo que o gene do TNF- $\alpha$  é

expresso de forma constitutiva em todas as células de camundongos, este alvo foi utilizado para verificar a integridade do DNA das amostras e normalizar as reações (BUSTIN et al., 2009).

Os resultados foram analisados no programa *StepOne Software v 2.3* (Thermo Fisher Scientific, EUA), sendo considerados como ótimos os valores de eficiência entre 90-100% e os de  $r^2$  entre 0,95-0,99 (BUSTIN et al., 2009).

**Tabela 3:** Iniciadores, alvo, tamanhos (pb) dos produtos amplificados e condições da reação de qPCR para *Leishmania* spp., segundo Degrave et al. (1994) e Cummings e Tarleton (2003).

Iniciadores	Sequências ( <i>forward</i> e <i>reverse</i> )	Alvo	Amplicon
L150/152	$F: 5'$ -GGG(G/T)AGGGGCG TTCT(G/C)CGAA-3' $R: 5'$ -(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CTAT (A/T)TTACACCAACCCC-3'	Sequência conservada do kDNA de <i>Leishmania</i> spp.	120pb
TNF- 5241/TNF- 5411	$F: 5'$ -TCCCTCTCATCAGT TCTATGGGCCA-3' $R: 5'$ - CAGCAAGCATCTAT GCACCTAGAC CCC-3'	Sequência de um fragmento do gene que codifica a proteína TNF- $\alpha$ de camundongos.	170pb

#### 4.7. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, de acordo com o pacote estatístico do GraphPad® Instat 6 (GraphPad Software Inc., EUA). Sendo o tipo de distribuição amostral verificada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*.

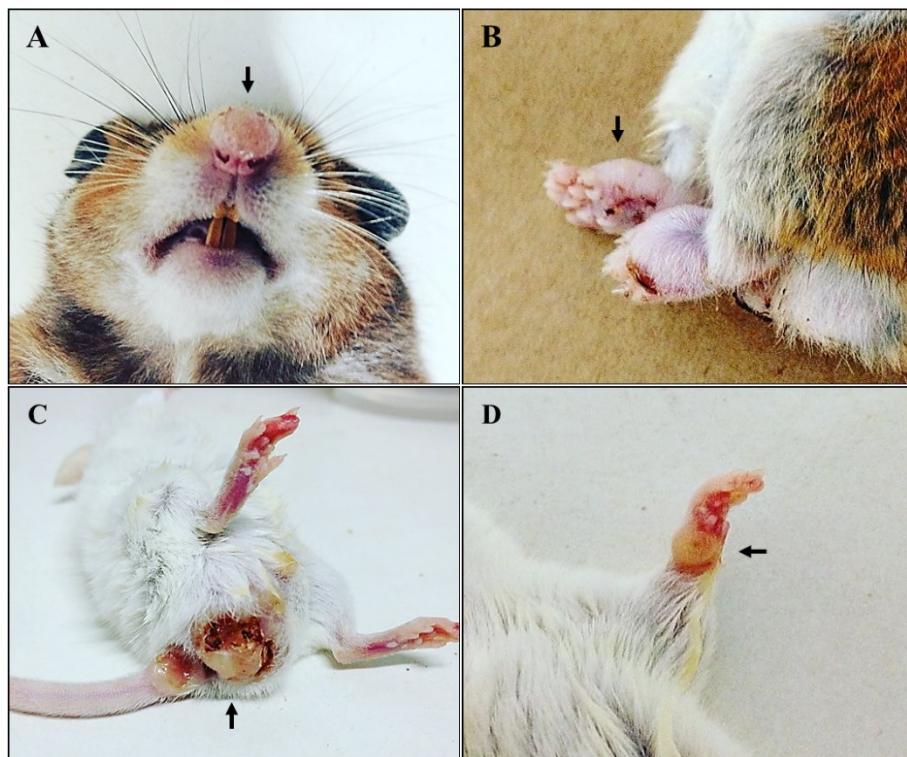
Nas análises foram utilizados os testes de variância *One-way ANOVA* e *Two-way ANOVA*, seguido de comparação múltipla pelo teste de *Tukey*. Em todas essas avaliações, foi considerado um nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ).

## 5. RESULTADOS

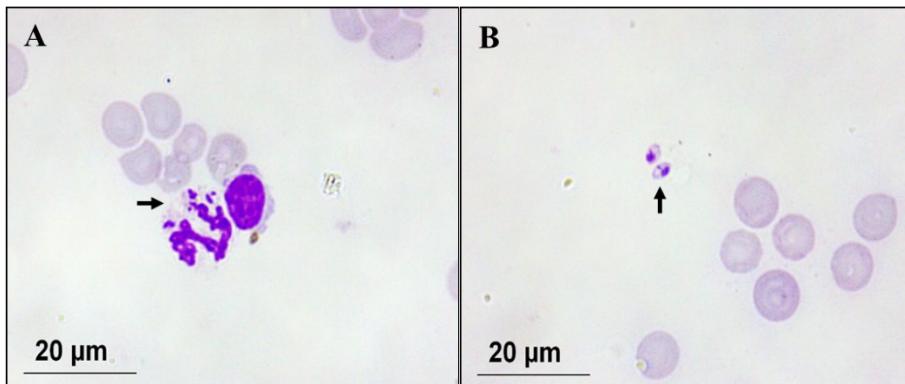
### 5.1. Descrição do isolamento das cepas selvagens de *Leishmania* spp.

As cepas UDI-1 e UDI-2 foram isoladas pelo Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva, a partir de cães atendidos no Hospital Veterinário da UFU, no ano de 2015. A primeira foi obtida de uma amostra de aspirado de baço de uma fêmea adulta domiciliada. O material biológico também foi inoculado, por via IP, em hamster e camundongo para confirmação do quadro clínico. Nestes, foram verificadas lesões nodulares e ulceradas nas patas, escrotos e focinhos (Figura 2). Uma possível infecção mista do cão foi descartada, por PCR-RFLP para o alvo ITS1 ( dado não mostrado).

A cepa UDI-2 foi isolada a partir do sangue de um macho adulto, sem raça definida, não-domiciliado. Além do isolamento, o diagnóstico foi realizado por exame parasitológico direto (extensão sanguínea), sendo constatadas amastigotas livres e intracelulares em monócitos e neutrófilos (Figura 3).



**Figura 2:** Hamster e camundongo experimentalmente infectados (via IP) com a cepa UDI-1 apresentando lesões (indicadas por setas) no focinho (A), patas (B e D) e escroto (C).

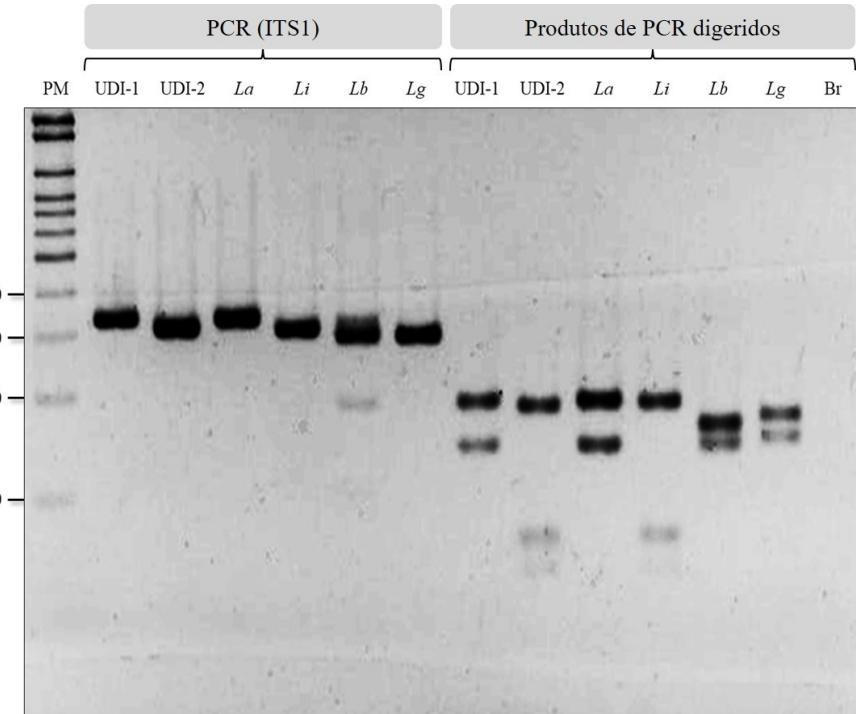


**Figura 3:** Fotomicroscopia de amastigotas intracelulares em neutrófilo (A) e livres (B) visualizadas em extensão sanguínea de cão naturalmente infectado com a cepa UDI-2.

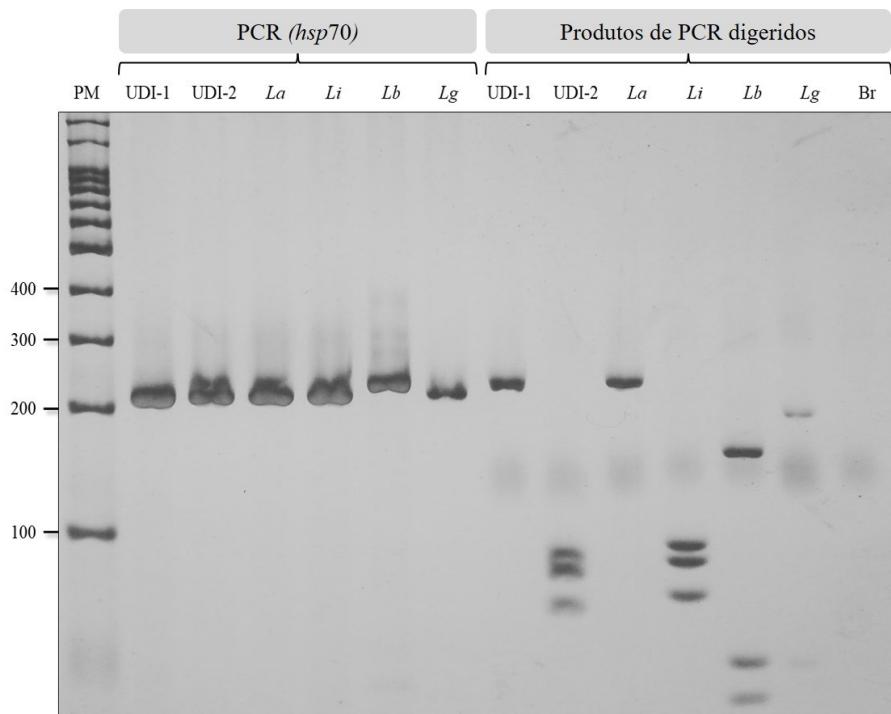
### 5.2. Identificação das cepas selvagens de *Leishmania* spp. por PCR-RFLP

Para identificação das espécies das duas cepas selvagens, ambas foram submetidas à reação de PCR-RFLP juntamente com quatro cepas de referência da OMS. Através da digestão enzimática do produto amplificado do alvo ITS1 foram gerados padrões para cada espécie de *Leishmania* spp., sendo duas bandas para *L. amazonensis* (aproximadamente 190 e 140pb), duas para *L. braziliensis* (aproximadamente 150 e 140pb), duas para *L. guyanensis* (aproximadamente 150 e 130pb) e três para *L. infantum* (aproximadamente 190, 70 e 60pb). Como mostrado na Figura 4, UDI-1 apresentou um perfil eletroforético idêntico à cepa Ba199 (*L. amazonensis*) e UDI-2 à BH401 (*L. infantum*).

A confirmação das espécies também foi realizada através da digestão enzimática do produto amplificado do alvo *hsp70*. Na Figura 5 são mostrados os padrões eletroforéticos para *L. amazonensis* (uma banda com 230pb), *L. infantum* (três bandas de 90, 80 e 70pb), *L. braziliensis* (uma banda com 140pb), *L. guyanensis* (uma banda com 180pb). De forma similar, UDI-1 apresentou uma banda idêntica à de Ba199 (*L. amazonensis*) e UDI-2 três bandas correspondentes à BH401 (*L. infantum*).



**Figura 4:** Caracterização das cepas selvagens de *Leishmania* spp. por PCR-RFLP para o alvo ITS1. Perfil de amplificação do gene ITS1 (à esquerda, 300-350pb) e digestão dos produtos de PCR com *Hae*III (à direita) submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%. PM – padrão de peso molecular 100pb, UDI-1 – cepa selvagem 1, UDI-2 – cepa selvagem 2, *La* – *L. amazonensis*, *Li* – *L. infantum*, *Lb* – *L. braziliensis*, *Lg* – *L. guyanensis*, Br – branco.

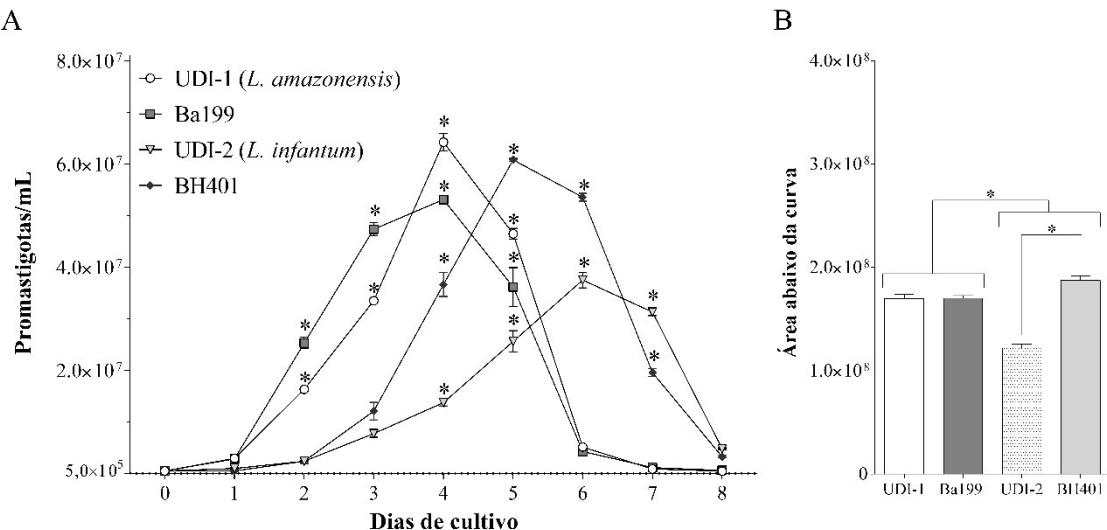


**Figura 5:** Caracterização das cepas selvagens de *Leishmania* spp. por PCR-RFLP para o alvo *hsp70*. Perfil de amplificação do gene *hsp70* (à esquerda, 234pb) e digestão dos produtos de PCR com *Hae*III (à direita) submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. PM – padrão de peso molecular 100pb, UDI-1 – cepa selvagem 1, UDI-2 – cepa selvagem 2, *La* – *L. amazonensis*, *Li* – *L. infantum*, *Lb* – *L. braziliensis*, *Lg* – *L. guyanensis*, Br – branco.

### 5.3. Avaliação das curvas de crescimento *in vitro*

As formas promastigotas de UDI-1, UDI-2, Ba199 e BH401 foram cultivadas em meio quimicamente definido  $\alpha$ -MEM e incubadas a 24°C durante oito dias consecutivos. A Figura 6 mostra que as cepas de *L. amazonensis* (UDI-1 e Ba199) e de *L. infantum* (UDI-2 e BH401) iniciaram a fase exponencial após o segundo e terceiro dias, respectivamente. Ambas as culturas de *L. amazonensis* atingiram o pico de crescimento no quarto dia, sendo o número máximo de parasitos/mL de aproximadamente:  $6.4 \times 10^7$  para UDI-1 e  $5.3 \times 10^7$  para Ba199. Em oposição, BH401 atingiu o pico no quinto dia ( $6 \times 10^7$  promastigotas/mL) e UDI-2 no sexto ( $3.7 \times 10^7$  promastigotas/mL). A partir desses picos, a proliferação diminuiu dando início a fase estacionária (quarto ao quinto dia para UDI-1 e Ba199, quinto ao sexto para BH401 e sexto ao sétimo para UDI-2) e, posteriormente, o declínio acentuado na quantidade de protozoários (fase de declínio).

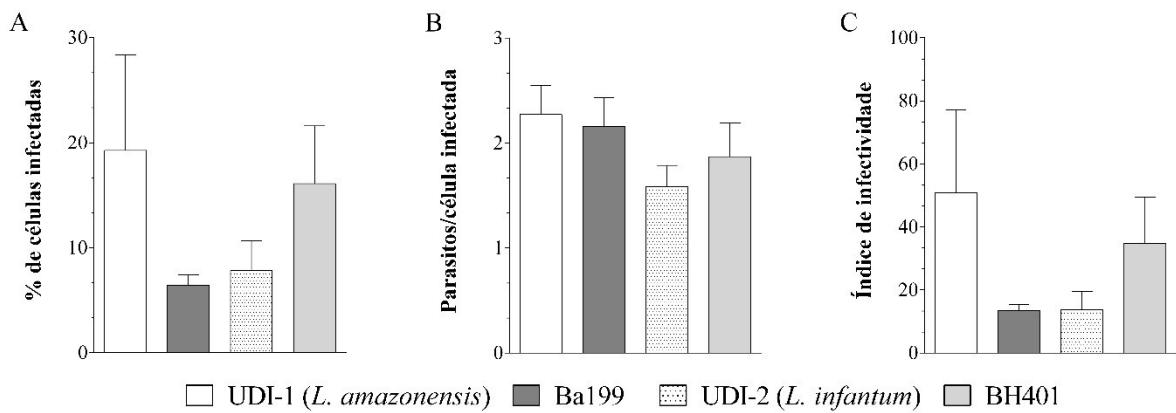
Quanto ao perfil das curvas, UDI-2 e BH401 apresentaram padrão de crescimento diferente entre si, bem como de UDI-1 e Ba199. UDI-1 e Ba199 exibiram perfil de proliferação *in vitro* similar.



**Figura 6:** Curvas de crescimento *in vitro* de UDI-1 (*L. amazonensis*), UDI-2 (*L. infantum*), Ba199 e BH401 (A). Os parasitos foram cultivados em meio quimicamente definido  $\alpha$ -MEM e mantidos à 24°C durante oito dias. Cada ponto representa a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes. A área abaixo da curva (B) evidencia que as espécies apresentam perfis de curva distintos entre si e que o padrão de crescimento de UDI-2 é diferente do de BH401. \* $p<0.05$ , obtido por Two-way ANOVA com comparação múltipla usando o teste de Tukey.

#### 5.4. Avaliação da infecção de macrófagos DH82 por *Leishmania* spp.

Quando utilizadas formas promastigotas de fase estacionária para infectar células DH82 (Figura 7), UDI-1 apresentou a maior percentual médio de infecção ( $19,3 \pm 9,1$ ), seguido de BH401 ( $16,1 \pm 5,5$ ), UDI-2 ( $7,8 \pm 2,8$ ) e Ba199 ( $6,4 \pm 1$ ). A quantidade de parasitos por célula infectada de UDI-1 foi de  $2,3 \pm 0,3$  e de UDI-2  $1,6 \pm 0,2$ . Quanto ao índice de infectividade, que representa a relação entre a porcentagem de DH82 infectadas vezes a quantidade de amastigotas intracelulares por macrófagos infectados, UDI-1 apresentou o maior valor ( $50,8 \pm 26,4$ ), seguido de BH401 ( $34,9 \pm 14,6$ ), Ba199 ( $13,4 \pm 2$ ) e UDI-2 ( $13,8 \pm 5,8$ ). Em comparação as demais cepas, a infectividade de UDI-1 foi aproximadamente  $3,7 \times$  maior em comparação com Ba199 e UDI-2. Já BH401 foi  $2,5 \times$  mais infectiva que UDI-2.

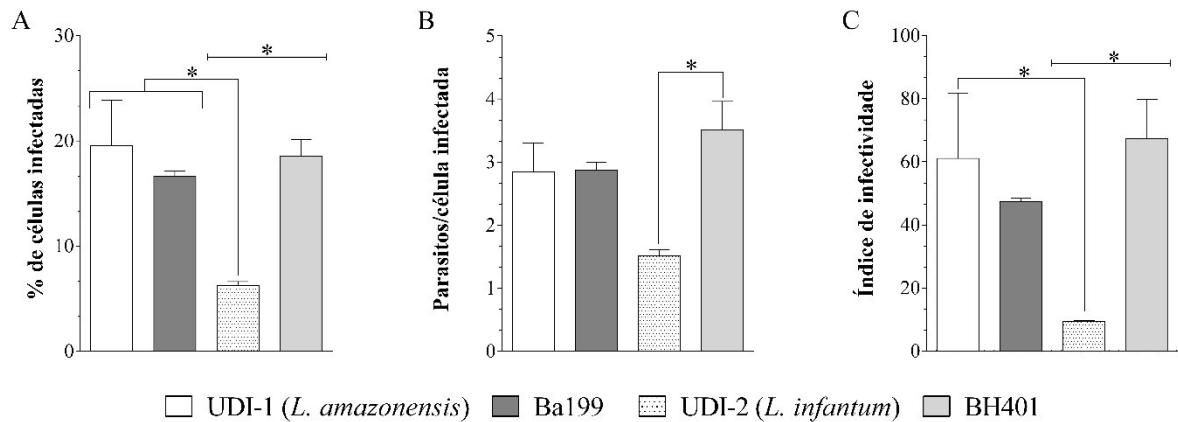


**Figura 7:** Porcentagem de células infectadas (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de macrófagos caninos infectados com promastigotas de fase estacionária de UDI-1 (*L. amazonensis*), Ba199, UDI-2 (*L. infantum*) e BH401. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de três ensaios independentes, nos quais foram contados 300 macrófagos em duplicata.

Quando utilizadas amastigotas axênicas (Figura 8), UDI-1 também apresentou o maior percentual médio de infecção ( $19,6 \pm 4,3$ ), seguido de BH401 ( $18,6 \pm 1,6$ ), Ba199 ( $16,6 \pm 0,5$ ) e UDI-2 ( $6,3 \pm 0,4$ ). Os valores para a quantidade de parasitos por célula infectada foram maiores para BH401 ( $3,5 \pm 0,4$ ), sendo os de UDI-1 ( $2,8 \pm 0,5$ ) próximos aos de Ba199 ( $2,0 \pm 0,1$ ). Quanto ao índice de infectividade, BH401 apresentou o maior valor ( $67,4 \pm 12,5$ ), seguido de UDI-1 ( $61,1 \pm 20,7$ ), Ba199 ( $47,52 \pm 0,9$ ) e UDI-2 ( $9,4 \pm 0,4$ ). A infectividade de UDI-1 foi  $6,5 \times$  maior em comparação a UDI-2, enquanto BH401 foi  $7,2 \times$  com maior que UDI-2.

Os resultados obtidos mostram que tanto promastigotas quanto amastigotas de UDI-1 apresentaram alta infectividade a macrófagos caninos *in vitro*. Além disso, UDI-2 exibe a

menor infectividade em comparação com as cepas padrão e UDI-1. A Figura 9 mostra imagens de fotomicroscopia de células infectadas e não infectadas.



**Figura 8:** Porcentagem de células infectadas (A), proporção de parasitos por célula infectada (B) e índice de infecção (C) de macrófagos caninos infectados com amastigotas axênicas de UDI-1 (*L. amazonensis*), Ba199, UDI-2 (*L. infantum*) e BH401. Os dados representam a média ± EPM de três ensaios independentes, nos quais foram contados 300 macrófagos em duplícata. \*p<0,05, obtido por One-way ANOVA com comparação múltipla usando o teste de Tukey.

## 5.5. Avaliação da infecção *in vivo*

### 5.5.1. Cinética da infecção

Durante todo o experimento, não foram verificadas alterações no padrão de pelagem, coloração das mucosas, comportamento e ganho natural de peso nos animais dos grupos um à quatro.

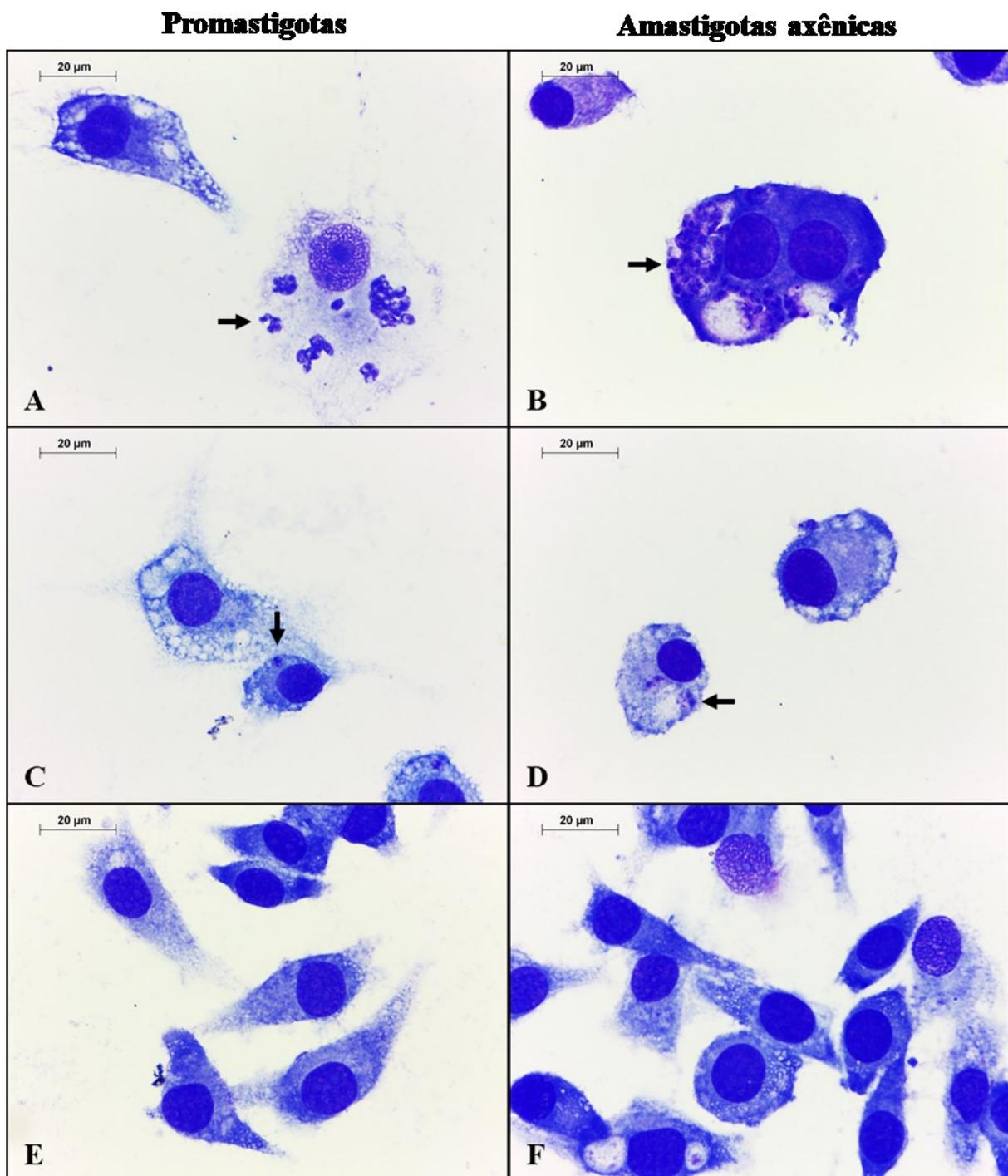
Quanto ao desenvolvimento de lesões, as ulcerações se iniciaram na terceira semana de infecção por UDI-1 e quinta semana por Ba199 e progrediram até a décima segunda semana (Figura 10). O perfil de desenvolvimento das lesões foi diferente entre as cepas, sendo 2,6× maior para UDI-1.

### 5.5.2. Avaliação da carga parasitária tecidual por qPCR

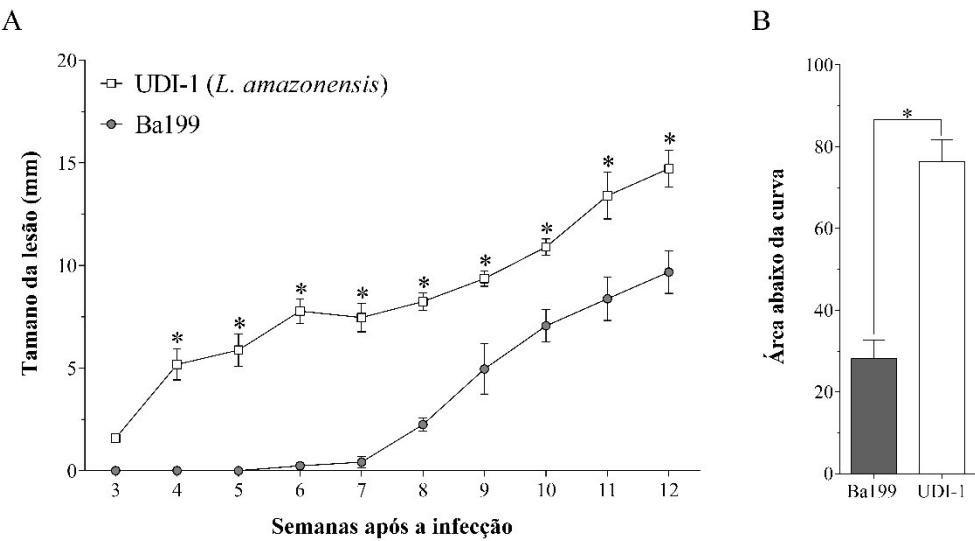
A Figura 11 e 12 mostra a quantidade de DNA de *Leishmania* spp. por 1mg de tecido (baço, fígado e lesão) dos camundongos infectados com *L. amazonensis* (UDI-1 e Ba199) e *L. infantum* (UDI-2 e BH401), respectivamente.

Os resultados mostram que a infecção foi eficiente, sendo que os animais infectados com UDI-1 apresentaram alta carga parasitária na lesão ( $2,2 \times 10^{12} \pm 7,7 \times 10^{11}$  *Leishmania*/mg), fígado ( $1,8 \times 10^7 \pm 6,7 \times 10^6$  *Leishmania*/mg) e baço ( $1,6 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^4$  *Leishmania*/mg). O mesmo foi

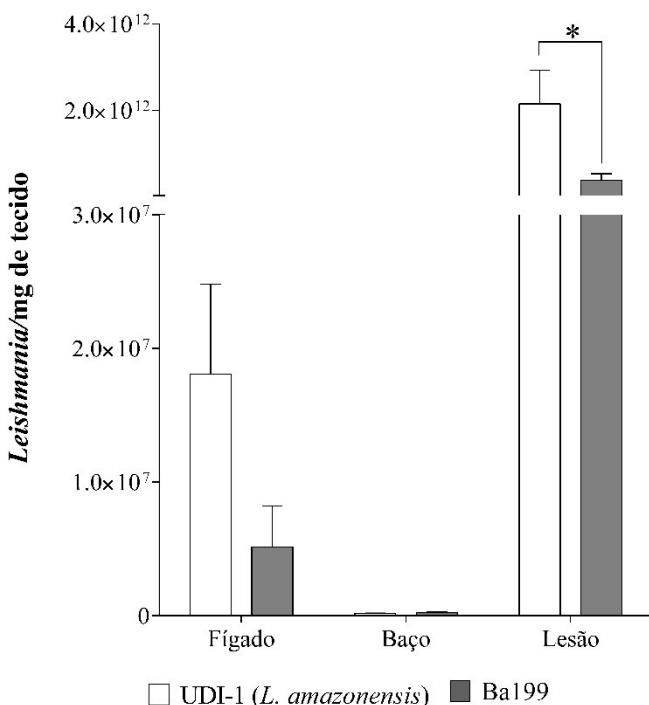
observado para Ba199 na lesão ( $3,8 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{11}$  Leishmania/mg), fígado ( $5,1 \times 10^6 \pm 3,1 \times 10^6$  Leishmania/mg) e baço ( $2,1 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4$  Leishmania/mg). Sendo os valores médios de UDI-1 5,6× maiores que Ba199 na lesão e 3,5× no fígado.



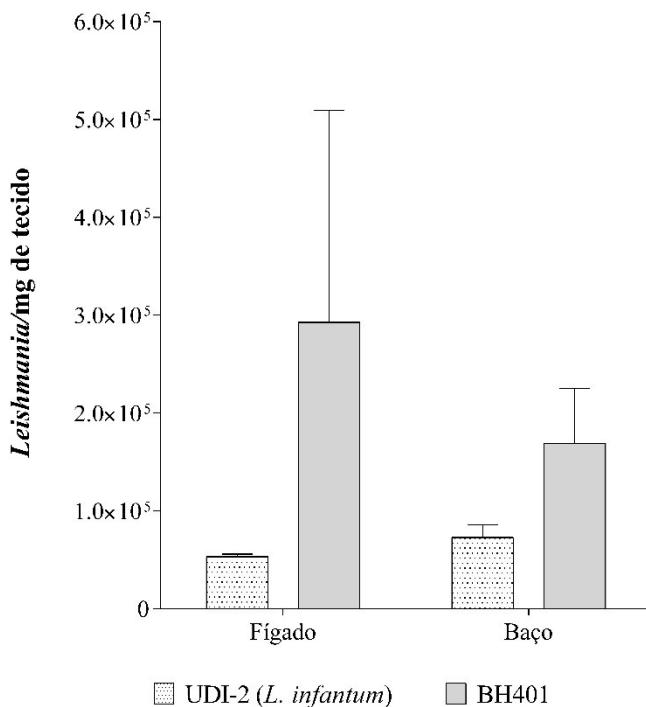
**Figura 9:** Macrófagos DH82 infectados com promastigotas de fase estacionária e amastigotas axênicas de UDI-1 (*L. amazonensis* - A e B), UDI-2 (*L. infantum* - C e D) e controle não infectado (E e F). As setas indicam os parasitos intracelulares. Barra = 20μm.



**Figura 10:** Tamanho da lesão em camundongos BALB/c infectados com UDI-1 (*L. amazonensis*) e Ba199 na base da cauda (A). Os animais foram acompanhados por 12 semanas consecutivas, sendo as ulcerações medidas com paquímetro digital. Os dados apresentados correspondem as médias  $\pm$  EPM de cada grupo/tecido (n = 5). A área abaixo da curva evidencia que às espécies apresentam perfis de curva distintos entre si e que o padrão de desenvolvimento de lesões em UDI-1 é diferente do de Ba199 (B). \*p<0.05, obtido por Two-way ANOVA com comparação múltipla usando o teste de Tukey.



**Figura 11:** Carga parasitária no baço, fígado e lesão de camundongos BALB/c infectados com UDI-1 (*L. amazonensis*) e Ba199. Os valores foram determinados por qPCR. Os dados apresentados correspondem às médias  $\pm$  EPM de cada grupo/tecido (n = 5). \*p<0.05, obtido por Two-way ANOVA com comparação múltipla usando o teste de Tukey.



**Figura 12:** Carga parasitária no baço e fígado de camundongos BALB/c infectados com UDI-2 (*L. infantum*) e BH401. Os valores foram determinados por qPCR. Os dados apresentados correspondem às médias ± EPM de cada grupo/tecido (n = 5).

Para UDI-2, a carga parasitária no fígado foi de  $5,3 \times 10^4 \pm 2,6 \times 10^3$  e no baço  $7,4 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^4$  *Leishmania*/mg. Enquanto que BH401 apresentou  $2,9 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$  no fígado e  $1,7 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^4$  no baço. Sendo os valores médios de BH401 5,5× maiores que UDI-1 no fígado e 2,3× no baço.

Esses dados mostram a visceralização das cepas UDI-1 e Ba199 em camundongos BALB/c, sendo que a cepa selvagem desenvolve lesões mais rapidamente (três semanas) e apresenta uma carga parasitária média maior na lesão e no fígado, em comparação a Ba199. Em oposição, os valores médios de UDI-2 e BH401 mostram que a cepa padrão apresentou a maior carga parasitária em ambos os tecidos avaliados (fígado e baço).

## 6. DISCUSSÃO

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública e nas últimas décadas têm passado por um processo de inversão no perfil de transmissão (HARHAY et al., 2011; BRASIL, 2014; BRASIL, 2017). Isso se deve à diversos fatores, dos quais se destacam a urbanização descentralizada e a perda de habitats naturais ocasionada pelas modificações antrópicas, que levam o vetor e os reservatórios silvestres à entrarem em maior contato com o ser humano (DESJEUX, 2001; ESCH; PETERSEN, 2013). Em áreas urbanas, o cão participa como reservatório de *L. infantum* e, devido a isso, é alvo das estratégias de controle da doença. A eutanásia dos animais soropositivos ou que tiveram a infecção confirmada pelo exame parasitológico direto, ainda é preconizada pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2016; RIBEIRO et al., 2018). No entanto, a constatação de que essa medida não têm reduzido o número de casos humanos à níveis aceitáveis suscita o questionamento e reavaliação desta ação (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; HARHAY et al., 2011).

A caracterização das espécies de *Leishmania* spp. é importante para o estabelecimento de critérios epidemiológicos e clínicos para o combate do parasito. Contudo, com a multiplicidade de agentes etiológicos e a variabilidade intraespecífica de algumas delas, faz-se necessária a utilização de abordagens mais amplas, que considerem o comportamento infectivo do protozoário e sua patogenicidade. Neste sentido, a possibilidade de isolar parasitos com características fenotípicas distintas e mantê-los em culturas axênicas, representa um cenário onde estudos sobre sua biologia podem ser realizados. Modelos *in vitro* têm sido descritos e amplamente empregados para definição da virulência e resistência a drogas (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004; MAIA et al., 2007; DE MORAIS et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2014).

Pouco se sabe sobre a infectividade e patogenia de alguns dos agentes causadores da leishmaniose cutânea em cães. A maioria dos estudos realizados até hoje, concentraram-se em relatar a ocorrência do parasito ou estabelecer as apresentações clínicas com base em infecções experimentais (MADEIRA et al., 2005; DANTAS-TORRES, 2009; DIAS et al., 2011; FIGUEREDO et al., 2012; HOFFMANN et al., 2012; CRUZ-CHAN et al., 2014; SANCHES et al., 2016). Os principais problemas na utilização desses animais como modelos residem na escassez de reagentes imunológicos específicos para determinação dos mecanismos imunopatológicos e na necessidade de infraestrutura técnica e operacional para seu manejo (MORENO; ALVAR, 2002). Assim, a utilização de roedores susceptíveis têm se tornado uma

alternativa viável e amplamente empregada, pelo fato de que eles mimetizam aspectos marcantes da doença em outros organismos e algumas linhagens são geneticamente semelhantes, excluindo as variações individuais de hospedeiros heterogênicos (LOEUILLET; BAÑULS; HIDE, 2016; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

Neste contexto, o presente estudo destaca a caracterização da infectividade de dois isolados de cães provenientes do município de Uberlândia. Os animais dos quais as cepas selvagens foram obtidas apresentavam sintomatologia similar a LVC, sendo que uma delas (UDI-1) foi capaz de induzir lesões nodulares e ulceradas nas patas, escrotos e focinhos de roedores inoculados com material biológico (aspirado de baço). A outra (UDI-2), exibiu amastigotas livres e intracelulares em monócitos e neutrófilos. Apesar dos macrófagos serem a principal célula hospedeira de *Leishmania* spp., estudos recentes têm demonstrado que algumas espécies podem sobreviver à resposta oxidativa dos neutrófilos e parasitá-los (REGLI et al., 2017). Basicamente, o neutrófilo é uma das primeiras células que migra para o local da infecção, onde libera os mediadores tóxicos presentes em seus grânulos (RIBEIRO-GOMES; SACKS, 2012). Com a apoptose dos neutrófilos infectados, os restos celulares são consumidos por macrófagos e células dendríticas, que acabam adquirindo indiretamente o parasito (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003). Este mecanismo proporciona o escape da resposta imunológica, pois essa via não estimula a ativação dos fagócitos e inibe a produção de citocinas (REGLI et al., 2017). Um levantamento com 1438 cães infectados com *L. infantum*, revelou uma positividade de 0,28% das análises de extensões sanguíneas, em dois casos relatados foram observadas amastigotas livres (GIUDICE; PASSANTINO, 2011). Visto o baixo encontro desses protozoários em extensões sanguíneas, achados este são raros.

A caracterização das cepas selvagens por PCR-RFLP para os alvos ITS1 e *hsp70*, mostrou que UDI-1 e UDI-2 apresentaram um perfil de bandas correspondente ao de *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente. Nos últimos anos, vários autores têm descrito o encontro de cães naturalmente infectados por *L. amazonensis* (TOLEZANO et al., 2007; DIAS et al., 2011; HOFFMANN et al., 2012; SANCHES et al., 2016; VALDIVIA et al., 2017). O encontro de *L. flaviscutellata* em área urbana aliado a um estudo de modelagem de nicho ecológico, sugerem a possível expansão desse vetor na América do Sul com consequente urbanização de *L. amazonensis* (BRILHANTE et al., 2015; CARVALHO et al., 2015). Até a última revisão da literatura em julho de 2018, nenhum apresentação similar em cães foi registrada na região do Triângulo Mineiro (MG). No que se refere a presença de *L. infantum* em Uberlândia, conforme

divulgação do Centro de Controle de Zoonoses, no período de 2009 à 2011 foram confirmados 306 casos de LV, com ocorrência restrita a alguns bairros (MONTEIRO, 2011). Dados não publicados do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*, mostraram que 18 de 57 cães (31,58%) cães atendidos no Hospital Veterinário da UFU no ano de 2014 foram positivos para *L. infantum*.

Para os ensaios de infectividade com formas promastigotas, a caracterização do perfil de crescimento *in vitro* fez-se necessária, pois através dele é possível determinar a fase onde as formas infectantes são mais abundantes (CYSNE-FINKELSTEIN et al., 1998). Assim, a análise da curva demonstrou que as cepas de *L. amazonensis* (UDI-1 e Ba199) exibem tempos de replicação celular semelhantes, sendo o pico de crescimento constatado no quarto dia de cultivo. Em oposição, UDI-2 exibiu um crescimento reduzido em comparação à BH401, com picos registrados no quinto e sexto dia, respectivamente. Embora isso tenha sido observado, foi possível estabelecer as fases exponencial, estacionária e de declínio em todas as cepas. Esses resultados são corroborados por outros autores, mesmo que para cepas e meios de cultura diferentes (CUNHA et al., 2013; DA SILVA et al., 2015). Estudos sobre a diferenciação de promastigota *in vitro*, comprovaram uma maior expressão de genes reguladores da diferenciação em formas metacíclicas após quatro dias de cultivo para *L. amazonensis* e cinco para *L. infantum* (CUNHA et al., 2013; SANTOS et al., 2011). Além disso, um ensaio conduzido com isolados viscerotrópicos e cutâneos de *L. infantum* verificou diferenças entre os padrões de crescimento, com picos variando entre o terceiro e sétimos dias (KBAIER-HACHEMI et al., 2011).

No modelo de infecção *in vitro* proposto, buscamos verificar o perfil infectivo tanto de formas promastigotas de fase estacionária quanto de amastigotas axênicas, visto a expressão de moléculas de superfície pode diferir entre ambas (KIMA, 2007). Foi verificado que na infecção utilizando promastigotas, UDI-1 apresentou o maior índice de infectividade, seguido de BH401, apesar de não ser observada significância. Quanto utilizadas amastigotas axênicas, o perfil se inverteu sendo BH401 mais infectiva que UDI-1. Para ambas as formas, UDI-2 mostrou as menores porcentagens de células infectadas e quantidades de parasitos internalizados. As imagens de fotomicroscopia mostram diferenças entre as espécies, sendo que os macrófagos infectados por UDI-1 exibiram vacúolos parasitóforos (VPs) grandes e bem visíveis, contendo grande número de parasitos, enquanto UDI-2 apresentou VPs menores, pouco visíveis e com quantidade escassa de parasitos. O mesmo foi visualizado para Ba199 e BH401 (dados não

mostrados). A literatura sugere que VPs grandes estão relacionados à parasitos mais virulentos, visto este constitui um mecanismo de escape aos efeitos de NO e ROS (CHANG et al., 2003; FRANÇA-COSTA et al., 2012; SACKS; SHER, 2002). Madeira et al. (1999), ao compararem a infecção de formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* em macrófagos peritoneais de cão, constataram que a segunda apresentava a maior capacidade infectiva, corroborando com os resultados obtidos nos nossos ensaios. Sampaio et al. (2007), demonstraram que a opsonização por proteínas do sistema Complemento aumentou as porcentagens de infecção de macrófagos de cão à *L. infantum*. Em seguida, Nadaes (2014) comprovou que as imunoglobulinas também participam da interação entre DH82 e *L. infantum*, sendo que quando as formas promastigotas foram incubadas com soro imune, houve um aumento na carga parasitária e percentual de células infectadas. Em associação ao fato de que uma das manifestações da LVC é o aumento nos níveis totais de IgG, o sucesso infectivo de *L. infantum* parece estar ligado à opsonização por anticorpos e proteínas do Complemento, o que pode explicar a baixa infectividade de UDI-2. Entretanto, isso não descarta a possibilidade que UDI-2 apresente um fenótipo menos infectivo.

No modelo de infectividade *in vivo*, por comparação intraespecífica pode-se observar que os valores referentes à carga parasitária de BH401 no fígado e baço foram maiores que os de UDI-2, apesar de não ser observada significância. Em comparação a Ba199, UDI-1 induziu manifestações dérmicas mais severas (com início na terceira semana após a infecção) e demonstrou valores de carga parasitária maiores na lesão e no fígado. Esses dados corroboram com o fato de que UDI-1 exibiu uma maior infectividade e virulência, bem como reproduziu o fenótipo metastática observado no cão. A visceralização de *L. amazonensis* já foi observada no hospedeiro humano e em modelos experimentais (BARRAL et al., 1991; ABREU-SILVA et al., 2003, 2004; CELESTE et al., 2017; DE SOUZA et al., 2018). Embora não se conheça os mecanismos de visceralização das espécies parasitárias que originalmente apresenta tropismo cutâneo, *L. amazonensis* exibe uma série de estratégias de evasão à resposta imunológica. Por exemplo, o comprometimento da sinalização intracelular de ativação das células imunes inatas e a capacidade de inibir a produção de citocinas inflamatórias e a apresentação de抗ígenos (SANABRIA et al., 2008; WANDERLEY et al., 2009; FRANÇA-COSTA et al., 2012). No tempo testado, o parasitismo tecidual observado para BH401 e UDI-2 condiz com o curso clínico da LVC, onde o fígado é o principal órgão de estabelecimento da infecção e o baço o local de persistência do parasito (PORROZZI; CAVALCANTI. CUPOLILLO, 2014).

## 7. CONCLUSÕES

As duas cepas selvagens isoladas de cães provenientes do município de Uberlândia, apresentam perfis distintos de crescimento e infectividade *in vitro*. Sendo que UDI-1 (*L. amazonensis*), apresentou crescimento em meio quimicamente definido similar a Ba199 e foi mais infectiva que UDI-2 (*L. infantum*). UDI-2 exibiu um padrão de crescimento diferente de BH401, sendo também a cepa que apresentou a menor infectividade em macrófagos caninos.

Através da infecção experimental de camundongos BALB/c com as cepas selvagens e de referência, foi possível verificar que UDI-1 reproduziu o fenótipo metastático, apresentou uma maior infectividade e induziu lesões maiores e em menor tempo que Ba199. Enquanto BH401 foi mais infectiva que UDI-2, porém ambas não ocasionaram redução significativa no ganho natural de peso.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M. N.; CARDOSO, F. O.; SOUZA, C. S. F.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3-4, p. 179-187, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.03.002>
- ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; TEDESCO, R. C.; MORTARA, R. A.; GONÇALVES DA COSTA, S. C. Central nervous system involvement in experimental infection with *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 6, p. 661-665, 2003. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2003.68.661>
- AKILOV; O. E.; KASUBOSKI, R. E.; CARTER, C. R.; McDOWELL, M. A. The role of mannose receptor during experimental leishmaniasis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 5, p. 1188–1196, 2007. <https://doi.org/10.1189/jlb.0706439>
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2005.01.009>
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. **Advances in Parasitology**, v. 31, p. 175–254, 1992. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60022-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60022-6)
- ALMEIDA, M.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p. 861–870, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000700001>
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L.; RENIER, C.; SÁNCHEZ, A. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and immunity**, v. 70, n. 6, p. 2763-2771, 2002. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.6.2763-2771.2002>
- ALVAR, J. VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R. MORENO, J.; NIETO, J. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**. v. 57, p. 1–88, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(04\)57001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(04)57001-X)

ALVES, C. F.; AMORIM, I. F.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F. MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 and TGF- $\beta$  in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.020>

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, V. A.; NICODEMO, A. C. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.003>

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2010.03851.x>

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00136-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00136-3)

AZEVEDO-COUTINHO, R. B.; MENDONÇA, S. C. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1 ed., 2014. P. 311-326.

AZIZI, M. H.; BAHADORI, M.; DABIRI, S.; SHAMSI MEYMANDI, S.; AZIZI, F. A history of leishmaniasis in Iran from 19th century onward. **Archives of Iranian Medicine**, v. 19, n. 2, p. 153–162, 2016. <https://doi.org/0161902/AIM.0016>

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON JUNIOR, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.536>

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2004.  
<https://doi.org/10.2174/1566524043360285>

BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A.; MENDEZ, S.; SHEVACH, E. M.; SACKS, D. L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 2002. <https://doi.org/10.1038/nature01152>

BOGGIATTO, P. M.; GIBSON-CORLEY, K. N.; METZ, K.; GALLUP, J. M.; HOSTETTER, J. M.; MULLIN, K.; PETERSEN, C. A. Transplacental Transmission of *Leishmania infantum* as a Means for Continued Disease Incidence in North America. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 4, p. e1019, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019>

BRACHELENTE, C.; MÜLLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M. Cutaneous Leishmaniasis in Naturally Infected Dogs is Associated with a T Helper-2-biased Immune Response. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 2, p. 166–175, 2005.  
<https://doi.org/10.1354/vp.42-2-166>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2014. 120 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2017. 189 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância, prevenção e controle de zoonoses : normas técnicas e operacionais**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2016. 121 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, ed. 1, 2006. 136 p.

BRAZIL, R. P.; BRAZIL, B. G. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. In: RANGEL, E. F.; SHAW, J. J. **Brazilian Sand Flies. Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control.** Springer International Publishing, p. 299–318, 2018.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-75544-1_5)

BRILHANTE, A. F.; NUNES, V. L. B.; KOHATSU, K. A.; GALATI, E. A. B.; ROCCA, M. E. G.; ISHIKAWA, E. A. Y. Natural infection of phlebotomines (Diptera: Psychodidae) by Leishmania (Leishmania) amazonensis in an area of ecotourism in Central-Western Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, v. 21, n. 1, p. 39, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0041-8>

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTWER., C. T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

CALDAS, A.; FAVALI, C.; AQUINO, D.; VINHAS, V.; VAN WEYENBERGH, J.; BRODSKY, C.; COSTA, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-113>

CAÑEDA-GUZMÁN, I. C.; SALAIZA-SUAZO, N.; FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A.; CARRADA-FIGUEROA, G.; AGUIRRE-GARCÍA, M.; BECKER, I. NK Cell Activity Differs between Patients with Localized and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis Infected with Leishmania mexicana: A Comparative Study of TLRs and Cytokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112410, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112410>

CARINI, A.; PARANHOS, U. Identification de l'Ulcera de Bauru avec le bouton d'Orient. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 2, p. 255–256, 1909.

CARVALHO, B. M.; RANGEL, E. F.; READY, P. D.; VALE, M. M. Ecological niche modelling predicts southward expansion of *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), vector of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in South America, under climate change. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. e0143282, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143282>

CELESTE, J. L. D. L.; MOURA, A. P. V.; FRANÇA-SILVA, J. C.; SOUSA, G. M.; SILVA, S. O.; MELO, M. N.; TAFURI, W. L.; SOUZA, C. C.; ANDRADE, H. M. Experimental mixed infection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology**, v. 144, n. 9, p. 1191–1202, 2017.

<https://doi.org/10.1017/S0031182017000464>

CELESTE, J. L. L. Avaliação clínica e parasitológica da coinfecção experimental por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* em hamster (*Mesocricetus auratus*). **Dissertação (Mestrado em Parasitologia)**. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 95. p., 2015.

CHANG, K. P.; MCGWIRE, B. S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 1, n. 1, p. 1, 2002.

<https://doi.org/10.1186/1475-9292-1-1>

CHANG, K.P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B.S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta Tropica**, v. 85, n. 3, p. 375–390, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00238-3](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00238-3)

CHAPPUIS, F. SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.

<https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

COELHO, L. I. C.; PAES, M.; GUERRA, J. A.; BARBOSA, M. D.; COELHO, C.; LIMA, B.; BRITO, M. E.; BRANDÃO FILHO, S. P. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2139-9>

CORRÊA, A. P. F. L.; DOSSI, A. C.; VASCONCELOS, R. O.; MUNARI, D. P.; DE LIMA, V. M. Evaluation of transformation growth factor  $\beta$ 1, interleukin-10, and interferon- $\gamma$  in male

symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3–4, p. 267–274, 2007.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.023>

Correio de Uberlândia, Uberlândia, Julho, 2011. Disponível em:

<[www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/agentes-enfrentam-resistencia-para-combater-leishmaniose](http://www.correiodeuberlandia.com.br/cidade-e-regiao/agentes-enfrentam-resistencia-para-combater-leishmaniose)>. Acesso em: 21/06/2018.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, v. 1, p. 3-17, 2008.

COSTA, M. M.; ANDRADE, H. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; FREITAS, L. M.; PIRES, S. F.; CHAPEAUROUGE, A. D.; PERALES, J.; FERREIRA, A. T.; GIUSTA, M. S.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Electrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172–2184, 2011. <https://doi.org/10.1021/pr101286y>

COUTINHO, M. T. Z.; BUENO, L. L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R. T.; BOTELHO, J. R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 149–155, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.011>

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 3–4, p. 320–325, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.008>

CRUZ-CHAN, J. V.; ADEL, C. A. C.; VILLANUEVA-LIZAMA, L. E.; MARTÍNEZ-VEGA, P. P.; RAMÍREZ-SIERRA, M. J.; ROSADO-VALLADO, M. E.; GUILLERMO-CORDERO, J. L.; DUMONTEIL, E. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 361, 2014.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-361>

CUMMINGS, K. L.; TARLETON, R. L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 53-59, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00093-8](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00093-8)

CUNHA, A. M.; CHAGAS, E. Nova espécie de protozoário do gênero *Leishmania* patogênico para o homem. *Leishmania chagasi*, p. 3-9, 1937.

CUNHA, J.; CARRILLO, E.; SÁNCHEZ, C.; CRUZ, I.; MORENO, J.; CORDEIRO-DASILVA, A. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermotropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 122, 2013.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-122>

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A General Classification of New World Leishmania Using Numerical Zymotaxonomy. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 296–311, 1994.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.296>

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M.; ALVES, F. A.; LEON, L. L. *Leishmania amazonensis*: Long-Term Cultivation of Axenic Amastigotes Is Associated to Metacyclogenesis of Promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 89, n. 1, p. 58–62, 1998.

<https://doi.org/10.1006/expr.1998.4276>

DA SILVA, I. A. J.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B.; PEREIRA, L. I.; DORTA, M. L.; DE OLIVEIRA, M. A.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

<http://dx.doi.org/10.1155/2015/393049>

DA SILVA, L. A.; SOUSA, C. S.; GRAÇA, G. C.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying **Leishmania** species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 77–83, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.001>

DA SILVA, S. M.; RIBEIRO, V. M.; RIBEIRO, R. R.; TAFURI, W. L.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 166, n. 1–2, p. 159–162, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasites & Vectors**, v. 2, 2009. Suplemento 1. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 139–146, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.007>

DAY, M. J. Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: A review and analysis of pitfalls in interpretation. **Veterinary Parasitology**, v. 147, n. 1–2, p. 2–8, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.03.037>

DE ASSIS, R. R.; IBRAIM, I. C.; NOGUEIRA, P. M.; SOARES, R. P.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1820, n. 9, p. 1354–1365, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.11.001>

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>

DE MORAIS, R. C. S.; GONÇALVES S. C.; COSTA, P. L.; SILVA, K. G.; SILVA, F. J.; SILVA, R. P.; BRITO, M. E.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F.; PAIVA-CAVALCANTI, M. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental and Applied Acarology**, v. 59, n. 4, p. 473–481, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9611-4>

DE OLIVEIRA, J. P. C.; FERNANDES, F.; CRUZ, A. K.; TROMBELA, V.; MONTEIRO, E.; CAMARGO, A. A.; BARRAL, A.; OLIVEIRA, C.I. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 6, p. 5, 2007. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-6-5>

DE OLIVEIRA, V. V. G.; ALVES, L. C.; SILVA JUNIOR, V. A. DA. Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1622–1628, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141368>

DE REZENDE, E.; KAWAHARA, R.; PENA, M. S.; PALMISANO, G.; STOLF, B. S. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006090, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006090>

DE REZENDE, E.; KAWAHARA, R.; PEÑA, M. S.; PALMISANO, G.; STOLF, B. S. Quantitative proteomic analysis of amastigotes from *Leishmania (L.) amazonensis* LV79 and PH8 strains reveals molecular traits associated with the virulence phenotype. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006090, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006090>

DE SOUZA, A. I.; BARROS, E. M.; ISHIKAWA, E.; ILHA, I. M.; MARIN, G. R.; NUNES, V. L. Feline leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 128, n. 1–2, p. 41–45, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.11.020>

DE SOUZA, C. S. F.; CALABRESE, K. S.; ABREU-SILVA, A. L.; CARVALHO, L. O. P.; CARDOSO, F. O.; DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; QUARESMA, P. F.; GONTIJO, C. M. F.; PACHECO, R. S.; ROSSI, M. I. D.; COSTA, S. C. G.; ZAVERUCHA, V. T. *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in different inbred mice. **Histology and Histopathology**, v. 18, p. 11965, 2018. <https://doi.org/10.14670/HH-11-965>

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 4, n. 3, 1962.

DEGRAVE, W.; FERNANDES, O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES, U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463–469, 1994. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300032>

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001.  
[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90223-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90223-8)

DIAS, E. S.; REGINA-SILVA, S.; FRANÇA-SILVA, J. C.; PAZ, G. F.; MICHALSKY, E. M.; ARAÚJO, S. C.; VALADÃO, J. L.; DE OLIVEIRA LARA-SILVA, F.; DE OLIVEIRA, F. S.; PACHECO, R. S.; FORTES-DIAS, C. L. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2–3, p. 101–111, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.014>

DIAZ, N. L.; ARVELÁEZ, F. A.; ZERPA, O.; TAPIA, F. J. Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 31, n. 1, p. 114–117, 2006.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2005.01991.x>

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M. BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital Lesions Associated with Visceral Leishmaniasis and Shedding of *Leishmania* sp. in the Semen of Naturally Infected Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, n. 5, p. 650–658, 2005. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-650>

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: Parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2012.  
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-276>

DU, R.; HOTEZ, P.J.; AL-SALEM, W.S.; ACOSTA-SERRANO, A. Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004545, 2016.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004545>

DUBEY, J. P.; ROSYPAL, A.C.; PIERCE, V.; SCHEINBERG, S.N.; LINDSAY, D.S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 8, p. 1266–1269, 2005.  
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1266>

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, v. 26, p. 32–40, 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.007>

ENGWERDA, C. R.; ATO, M.; COTTERELL, S. E.; MYNOTT, T. L.; TSCHANNERL, A.; GORAK-STOLINSKA, P. M.; KAYE, P. M. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during *Leishmania donovani* infection. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 429–437, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64199-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64199-5)

ESCH, K. J.; JUELSGAARD, R.; MARTINEZ, P.A.; JONES, D.E.; PETERSEN, C.A. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5542–5550, 2013. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301810>

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013. il color. <https://doi.org/10.1128/CMR.00067-12>

ESPINOSA, O. A.; SERRANO, M. G.; CAMARGO, E. P.; TEIXEIRA, M. M. G.; SHAW, J. J. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, v. 154, n. 4, p. 1–13, 2016. <https://doi.org/10.1017/S0031182016002092>

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71–80, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.0487.x>

FERNANDES, A. P.; CANAVACI. A. M. C.; MCCALL, L. I.; MATLASHEWSKI, G. A2 and other Visceralizing proteins of *Leishmania*: role in pathogenesis and application for vaccine development. In: SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H.; D'AVILA-LEVY, C. M.; KNEIPP, L. F.; SODRÉ, C. L. **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma**. Springer, 2014. p. 77-101.

FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. F. Os Parasitos e a Questão da Infecção em Animais Domésticos e Domiciliados. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.p. 259-273.

FIGUEREDO, L. A.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P.; DANTAS-TORRES, F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia**

Veterinária, v. 21, n. 4, p. 418–420, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012005000010>

FRANÇA-COSTA, J.; WANDERLEY, J. L.; DEOLINDO, P.; ZARATTINI, J. B.; COSTA, J.; SOONG, L.; BARCINSKI, M. A.; BARRAL, A. BORGES, V. M. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36595, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036595>

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 4, p. 224–230, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.01.001>

GARDENER, P. J.; CHANCE, M. L.; PETERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 317–325, 1974. <https://doi.org/10.1080/00034983.1974.11686954>

GAUTAM, S.; KUMAR, R.; SINGH, N.; SINGH, A. K.; RAI, M.; SACKS, D.; SUNDAR, S.; NYLÉN, S. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–299, 2014. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit401>

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs — Short communication. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 59, n. 2, p. 205–213, 2011. <https://doi.org/10.1556/AVet.2011.003>

GOMES, A. H. S.; FERREIRA, I. M.; LIMA, M. L.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3–4, p. 234–241, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.008>

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010. <https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

GRAÇA, G.C.; VOLPINI, A.C.; ROMERO, G.A.; OLIVEIRA NETO, M.P.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M.C.; CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite

species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–74, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500014>

GRADONI, L. A Brief Introduction to Leishmaniasis Epidemiology. In: BRUSCHI, F.;

GRADONI, L. **The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases**. Springer, 1 ed.,

2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-72386-0>

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and

approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p.

1169–1180, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>

GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; NAIFF, R. D.; MCMAHON-PRATT, D.; BARRETT, T. V.

Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and

sand flies in the Amazon region of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine**

**and Hygiene**, v. 44, n. 6, p. 645–661, 1991. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.645>

GUERRA, J.O.A.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.; GAMA, P.; MOURA,

A.; AMATO, V.; BARBOSA, M.D.; FERREIRA, L.C. Mucosal leishmaniasis caused by

*Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian

Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2011.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000980>

HAOUAS, N.; BABBA, H. Leishmaniasis in Tunisia: History and New Insights into the

Epidemiology of a Neglected Disease. In: CLABORN, D. **The Epidemiology and Ecology**

**of Leishmaniasis**. INTECH, v.1, 2017. p. 117–135. <http://dx.doi.org/10.5772/65000>

HARHAY, M.O.; OLLIARIO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology:

Visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

HARTLEY, M. A; DREXLER, S.; RONET, C.; BEVERLEY, S. M.; FASEL, N. The

immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis.

**Trends in Parasitology**, v. 30, n. 8, p. 412–422, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.05.006>

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)10178-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)10178-2)

HOFFMANN, A. R.; NAVARRO, I. T.; CAMARGO-JUNIOR, V. E.; CALDART, E. T.; BREGANÓ, R. M.; PEREIRA, P. M. *Leishmania amazonensis* em cão com quadro clínico de leishmaniose visceral no Estado do Paraná, Brasil - Relato de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 3265–3270, 2012. Suplemento 2. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33Supl2p3265>

HORTA, M. F.; MENDES, B. P.; ROMA, E. H.; NORONHA, F. S. M.; MACÊDO, J. P.; OLIVEIRA, L. S.; DUARTE, M. M.; VIEIRA, L. Q. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–11, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/203818>

<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>. Acesso em 21/07/2018.

IBRAHIM, M. E.; SMYTH, A. J.; ALI, M. H.; BARKER, D. C.; KHARAZMI, A. The polymerase chain reaction can reveal the occurrence of naturally mixed infections with *Leishmania* parasites. **Acta Tropica**, v. 57, n. 4, p. 327–332, 1994.

[https://doi.org/10.1016/0001-706X\(94\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0001-706X(94)90078-7)

KAMHAWI, S. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of *Leishmania* infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 14, p. 1765–1773, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01331-9](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01331-9)

KARIYAWASAM, K. K. G. D. U. L.; SELVAPANDIYAN, A.; SIRIWARDANA, H. V. Y. D.; DUBE, A.; KARUNANAYAKE, P. SENANAYAKE, S. A. S. C.; DEY, R.; GANNAVARAM, S.; NAKHASI, H. L.; KARUNAWEERA, N. D. Dermotropic *Leishmania donovani* in Sri Lanka: visceralizing potential in clinical and preclinical studies. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 443–452, 2018. <https://doi.org/10.1017/S003118201700169X>

KBAIER-HACHEMI, H.; GUERBOUJ, S.; TURKI-MANNOUBI, L.; KAABI, B.; GUIZANI, I. In vitro growth kinetics, differentiation and morphological characterisation of Tunisian *Leishmania infantum* parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 20–25, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.08.012>

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 4, n. 1, p. 1–24, 1990. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1990.tb00255.x>

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007>

KREUTZER, R. D.; CHRISTENSEN, H. A. Characterization of *Leishmania* spp. by isozyme electrophoresis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 2, p. 199–208, 1980. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1980.29.199>

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G.C.; BUSEK, S.U. GUERRA, L.L.; GIUNCHETTI, R.C.; CORRÊA-OLIVEIRA. R.; REIS, A.B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1–2, p. 135–145, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.001>

LAINSON, R. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The leishmanias in biology and medicine**, Academic, v. 1, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis in Brazil: I. Observations on enzootic rodent leishmaniasis-incrimination of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) as the vector in the Lower Amazonian Basin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 3, p. 385–395, 1968. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(68\)90090-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(68)90090-4)

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–4, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00075-1)

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, n. 1, p. 525–550, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>

Leishmaniasis). In: CLABORN, D. **The Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis**. INTECH, v.1, 2017. p. 17–30. <http://dx.doi.org/10.5772/67398>

LEMESRE, J. L.; DARCY, F.; KWEIDER, M.; CAPRON, A.; SANTORO, F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of *Leishmania* promastigotes in vitro. **Acta Tropica**, v. 45, n. 2, p. 99–108, 1988.

LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 2, p. 252–254, 1909.

LINDOSO, J. A. L.; CUNHA, M.A.; QUEIROZ, I.T.; MOREIRA, C.H. Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges. **HIV/AIDS - Research and Palliative Care**, v. 8, p. 147–156, 2016. <https://doi.org/10.2147/HIV.S93789>

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* Invasion and Phagosome Biogenesis. In: BURLEIGH, B. A.; SOLDATI-FAVRE, D. **Molecular Mechanisms of Parasite Invasion**. Springer, 2008. p. 174–181. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6\\_14](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78267-6_14)

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v. 114, n. 3, p. 256–265, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2004.07.018>

LOEUILLET, C.; BAÑULS, A. L.; HIDE, M. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 144, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1413-9>

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000100001>

MACHADO, M.I.; MILDER, R.V.; PACHECO, R.S.; SILVA, M.; BRAGA, R.R.; LAINSON, R. Naturally acquired infections with *Leishmania enriettii* Muniz and Medina 1948 in guinea-pigs from São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 109, n. 2, p. 135–138, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0031182000076241>

MACHADO, P. R.; ROSA, M. E.; COSTA, D.; MIGNAC, M.; SILVA, J. S.; SCHRIEFER, A.; TEIXEIRA, M. M.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–44, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.05.002>

MADEIRA, M. F.; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A. Experimental infection of canine peritoneal macrophages with visceral and dermotropic *Leishmania* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 645-648, 1999.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761999000500015>

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH ADE, O.; SCHUBACH, T. M.; SERRA, C. M.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; CONFORT, E. M.; QUINTELLA, L. P.; MARZOCHI, M. C. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* preferentially restricted to the cutaneous lesions of naturally infected dogs? **Parasitology Research**, v. 97, n. 1, p. 73–76, 2005.

<https://doi.org/10.1007/s00436-005-1374-y>

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A. O.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; LEAL, C. A.; MELO, C. X.; CONFORT, E. M.; MARZOCHI, M. C. *Post mortem* parasitological evaluation of dogs seroreactive for *Leishmania* from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 3–4, p. 366–370, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.059>

MAGALHÃES, R. D. M.; DUARTE, M. C.; MATTOS, E. C.; MARTINS, V. T.; LAGE, P. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, D. P.; MENEZES-SOUZA, D.; RÉGIS, W. C.; MANSO ALVES, M. J.; SOTO, M.; TAVARES, C. A.; NAGEN, R. A.; COELHO, E. A. Identification of Differentially Expressed Proteins from *Leishmania amazonensis* Associated with the Loss of Virulence of the Parasites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2764, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002764>

MAIA, C.; ROLÃO, N.; NUNES, M.; GONÇALVES, L.; CAMPINO, L. Infectivity of five different types of macrophages by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 103, n. 2, p. 150–155, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.001>

MAIA, C.; SEBLOVA, V.; SADLOVA, J.; VOTYPKA, J.; VOLF, P. Experimental Transmission of *Leishmania infantum* by Two Major Vectors: A Comparison between a Viscerotropic and a Dermotropic Strain. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1181, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001181>

MARQUEZ, E. S.; DE CASTRO E. A.; NABUT, L. B.; DA COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; ARAÚJO, L. D. C. T.; POUBEL, S. B.; GONÇALVES, A. L.; CRUZ, M. F. R.; DOS SANTOS TRAD, A. P. M. E.; DIAS, R. A. F.; NAVARRO, I. T.; THOMAZ-SOCCOL, V.

Cutaneous leishmaniosis in naturally infected dogs in Paraná, Brazil, and the epidemiological implications of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detection in internal organs and intact skin. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 219–225, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.07.003>

MARTINEZ, E.; ALONSO, V.; QUISPE, A.; THOMAS, M. C.; ALONSO, R.; PIÑERO, J. E.; GONZÁLEZ, A. C.; ORTEGA, A.; VALLADARES, B. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific primers for *L. braziliensis*.

**Parasitology**, v. 127, p. 513–517, 2003. <https://doi.org/10.1017/S0031182003004104>

MARTINS, R.; ARRUDA, C. C. P.; ANDRADE, A. R. O.; NUNES, V. L. B.; SOUZA, A. I.; DOURADO, D. M.; COSTA, S. C. G. Comportamento biológico de *Leishmania (L.) amazonensis* isolada de um gato doméstico (*Felis catus*) de Mato Grosso do Sul, Brasil.

**Revista de Patologia Tropical**, v. 39, n. 1, p. 33–40, 2010.

<https://doi.org/10.5216/rpt.v39i1.9496>

MAURICIO, I.L.; HOWARD, M.K.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 237–46, 1999.

<https://doi.org/10.1017/S0031182099004710>

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 1, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003053>

MILES, S. A.; CONRAD, S. M.; ALVES, R. G.; JERONIMO, S. M.; MOSSER, D. M. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*.

**The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 5, p. 747–54, 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20041470>

MONTEIRO, C. Agentes enfrentam resistência para combater leishmaniose.

MOREIRA, D.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A. M.; AMORIM, A. M.; OUASSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; SILVESTRE, R. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1469, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001469>

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02347-4)

MORGADO, F. N.; CAVALCANTI, A. D.; MIRANDA, L. H.; O'DWYER, L. H.; SILVA, M. R.; MENEZES, R. C.; ANDRADE DA SILVA, A. V.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E.; PORROZZI, R. *Hepatozoon canis* and *Leishmania* spp. coinfection in dogs diagnosed with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 450–458, 2016. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016065>

MURRAY, C. J. L. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. **The Lancet**, v. 386, n. 10009, p. 2145–2191, 2015. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61340-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61340-X)

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–267, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2001.00199.x>

MURRAY, H. W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5)

NADAES, R. N. Caracterização da Infecção da Linhagem de Macrófagos Caninos (DH82) por duas espécies de *Leishmania*: *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*. **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)**. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédia, Rio de Janeiro, 94. p., 2014.

NICOLLE, C.; COMTE, C. Origine canine du kala-azar. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 1, p. 299–301, 1908.

OLIVEIRA, G. M.; MADEIRA, M. F.; OLIVEIRA, F. S.; PIRES, M. Q.; PACHECO, R. S. Canine Cutaneous Leishmaniasis: Dissemination and Tissue Tropism of Genetically Distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* Populations. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, p. 1–5, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/982183>

OLIVEIRA, M.A.P.; PIRES ADA, S.; DE BASTOS, R.P.; LIMA, G.M.; PINTO, S.A.; PEREIRA, L.I.; PEREIRA, A.J.; ABRAHAMSOHN IDE, A.; DORTA, M.L.; RIBEIRO-DIAS, F. *Leishmania* spp. parasite isolation through inoculation of patient biopsy macerates in interferon gamma knockout mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, n. 2, p. 83–88, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000200004>

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>

PAAPE, D.; AEBISCHER, T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1614–1624, 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.005>

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, p. 10–18, 2014. Suplemento 1.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

PALATNIK-DE-SOUZA, C. B.; DOS SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 510–517, 2001.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.510>

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). **Plan of Action to Strengthen the Surveillance and Control of Leishmaniasis in the Americas 2017-2022**, 2017.

PANGRAZIO, K. K.; COSTA, E. A.; AMARILLA, S. P.; CINO, A. G.; SILVA, T. M.; PAIXÃO, T. A.; COSTA, L. F.; DENGUES, E. G.; DIAZ, A. A.; SANTOS, R. L. Tissue distribution of *Leishmania chagasi* and lesions in transplacentally infected fetuses from symptomatic and asymptomatic naturally infected bitches. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 3–4, p. 327–331, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.013>

PEDROSA, C. M. S. Clinical Manifestations of Visceral Leishmaniasis (American Visceral Penna, H. A. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brasil Med**, v. 48, p. 949-950, 1934.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 239–255, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.015>

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 159–179, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00432.x>

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIDELD, C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global distribution maps of the leishmaniases. **eLife**, v. 3, p. e02851, 2014. <https://doi.org/10.7554/eLife.02851.001>

PORROZZI, R.; CAVALCANTI, A. S.; CUPOLILLO, E. Modelos Experimentais na Leishmaniose Visceral. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.p. 277-292.

QUINNELL, R. J.; KENNEDY, L. J.; BARNES, A.; COURTENAY, O.; DEY, C.; GARCEZ, L. M.; SHAW, M. A.; CARTER, S. D.; THOMSON, W.; OLLIER, W. E. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 23-28, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00251-003-0545-1>

REGLI, I. B. et al. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1558, 2017. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01558>

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; GIUNCHETTI, R. C.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68–75, 2006a. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.09.011>

REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological

markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311, 2006b. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x>

REITHINGER, R.; DAVIES, C. R. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 4, p. 530–541, 1999.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.530>

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)

RIBEIRO, R. R.; MICHALICK, M. S. M.; DA SILVA, M. E.; DOS SANTOS, C. C. P.; FRÉZARD, F. J. G.; DA SILVA, S. M. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–12, 2018.  
<https://doi.org/10.1155/2018/3296893>

RIBEIRO-GOMES, F. L.; SACKS, D. The influence of early neutrophil-*Leishmania* interactions on the host immune response to infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 59, 2012. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00059>

RIERA, C.; VALLADARES, J. E. Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs. **Parasitology Today**, v. 12, n. 10, p. 412, 1996.  
[https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)90062-9)

RODRIGUES, V.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; LAFORGE, M.; SILVESTRE, R.; ESTAQUIER, J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 118, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>

ROGERS, M. B.; HILLEY, J. D.; DICKENS, N. J.; WILKES, J.; BATES, P. A.; DEPLEDGE, D. P.; HARRIS, D.; HER, Y.; HERZYK, P.; IMAMURA, H.; OTTO, T. D.; SARDERS, M.; SEEGER, K.; DUJARDIN, J. C.; BERRIMAN, M.; SMITH, D. F.; HERTZ-FOWLER, C.; MOTTRAM, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, 2011.  
<http://doi.org/10.1101/gr.122945.111>

- ROGERS, M.E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A.V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463–467, 2004. <https://doi.org/10.1038/nature02675>
- ROLÃO, N.; MELO, C.; CAMPINO, L. Influence of the inoculation route in BALB/c mice infected by *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 123–126, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.09.010>
- ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1261-1262, 1903.
- SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, 1989. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90176-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90176-8)
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri933>
- SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041–1047, 2002. <https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>
- SACKS, D.L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPÄTH,.G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*-sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 1, p. 406–411, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.406>
- SAMPAIO, W. M.; MOURA, E. P.; ARRUDA, F. C. S.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C. F.; MELO, F. A.; FERNANDES, A. P. S. M.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N.; TAFURI, W. T.; TAFURI, W. L. In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **BMC Veterinary Research**, v. 3, n. 1, p. 11, 2007. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-11>

SANABRIA, M.X.H., VARGAS-INCHAUSTEGUI, D.A.; XIN, L.; SOONG, L. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 11, p. 5100–9, 2008.

<https://doi.org/10.1128/IAI.00438-08>

SANCHES, L. C.; MARTINI, C. C.; NAKAMURA, A. A.; SANTIAGO, M. E.; DOLABELA DE LIMA, B.; LIMA, V. M.; Natural canine infection by *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and their implications for disease control. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 465–469, 2016. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612016071>

SANTOS, M.G.; SILVA, M.F.; ZAMPIERI, R.A.; LAFRAIA, R.M.; FLOETER-WINTER, L.M. Correlation of meta 1 expression with culture stage, cell morphology and infectivity in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 190–193, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000200012>

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCHE, C.; SCHALLIG, H.D.; PRESBER, W.; JAFFE, C.L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p. 349–358, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)

SCHUBACH, T.M.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; MADEIRA, M.F.; SANTOS, I.B.; ANDRADE, M.V.; CUZZI, T.; MARZOCHI, M.C.; SCHUBACH, A. American cutaneous leishmaniasis in two cats from Rio de Janeiro, Brazil: first report of natural infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 3, p. 165–167, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00040-3](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00040-3)

SCORZA, B.; CARVALHO, E.; WILSON, M. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18061296>

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

<https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>

SÉGUIN, O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 1–6, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2016.08.004>

SILVA, C. G.; SILVA, R. M. M.; DINIZ, V. A.; CÔRTE-REAL, S. Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.p. 53-67.

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>

SIMÕES-MATTOS, L.; MATTOS, M. R.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA-LIMA, J. W.; BEVILAQUA, C. M.; PRATA-JÚNIOR, R. C.; HOLANDA, C. M.; RONDON, F. C.; BASTOS, K. M. COÊLHO, Z. C.; COÊLHO, I. C.; BARRAL, A.; POMPEU, M. M. The susceptibility of domestic cats (*Felis catus*) to experimental infection with *Leishmania braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 3–4, p. 199–208, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.008>

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <

SINGH, S. New developments in diagnosis of leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, p. 311–330, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.160257897>

SOLIMAN, M. F. M. The persistence, dissemination, and visceralization tendency of *Leishmania major* in Syrian hamsters. **Acta Tropica**, v. 97, n. 2, p. 146-150, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2005.09.007>

SPATH, G. F.; EPSTEIN, L.; LEADER, B.; SINGER, S. M.; AVILA, H. A.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 9258–9263, 2000.

<https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.9258>

STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 138–147, 2007.

<https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100011>

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic acids research**, v. 17, n. 16, p. 6463–6471, 1989. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TEIXEIRA, M.; DE JESUS SANTOS, R.; SAMPAIO, R. B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; DOS-SANTOS, W. L. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 88, n. 11, p. 963–968, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0695-3>

TEIXEIRA, P. C.; VELASQUEZ, L. G.; LEPIQUE, A. P.; DE REZENDE, E.; BONATTO, J. M.; BARCINSKI, M. A.; CUNHA-NETO, E.; STOLF, B. S. Regulation of *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* Protein Expression by Host T Cell Dependent Responses: Differential Expression of Oligopeptidase B, Tryparedoxin Peroxidase and HSP70 Isoforms in Amastigotes Isolated from BALB/c and BALB/c Nude Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 2, p. e0003411, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003411>

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J. The first records of *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3–4, p. 280–284, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006082, 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>

TUON, F. F.; AMATO NETO, V.; SABBAGA AMATO, V. *Leishmania*: Origin, evolution and future since the Precambrian. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 158–166, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00455.x>

TURCHETTI, A. P.; SOUZA, T. D.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 4, p. 403–407, 2014. <https://doi.org/10.3855/jidc.4108>

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W. D. J.; CARVALHO, E. M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002. <https://doi.org/10.1086/345772>

TWINING, W. Observations on diseases of the spleen particularly on the vascular engorgement of that organ common in Bengal. **Trans. Med. Phys. Soc. Bengal**, v. 3, p 351–412, 1827.

UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>

VALDIVIA, H.O.; ALMEIDA, L. V.; ROATT, B. M.; REIS-CUNHA, J. L.; PEREIRA, A. A.; GONTIJO, C.; FUJIWARA, R. T.; REIS, A. B.; SANDERS, M. J.; COTTON, J. A.; BARTHOLOMEU, D. C. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep40804>

VAN GRIENSVEN, J.; CARRILLO, E.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; LYNEN, L.; MORENO, J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical microbiology and infection**, v. 20, n. 4, p. 286–99, 2014. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12556>

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M. A.; ROMANHA, A. J. Attempt to differentiate *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. **Parasitology research**, v. 87, n. 12, p. 1056–1059, 2001. <https://doi.org/10.1007/s004360100469>

VOLPINI, A. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–7, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>

WANDERLEY, J.L.M.; PINTO DA SILVA, L.H.; DEOLINDO, P.; SOONG, L.; BORGES, V.M.; PRATES, D.B.; DE SOUZA, A.P.; BARRAL, A.; BALANCO, J.M.; DO NASCIMENTO, M.T.; SARAIVA, E.M.; BARCINSKI, M.A.; Cooperation between Apoptotic and Viable Metacyclics Enhances the Pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. e5733, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005733>

WELLMAN, M. L.; KRAKOWKA, S.; JACOBS, R. M.; KOCIBA, G. J. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. **In vitro Cellular & Developmental Biology**, v. 24, n. 3, p. 223–229, 1988. <https://doi.org/10.1007/BF02623551>

WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6531, 1990. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniasis**. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. Geneva: WHO Press, 2010, v. 949. (WHO technical report series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis fact sheet.

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>, Accesso em 21/07/2018.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 337–348, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(04\)01044-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(04)01044-8)

YANIK, M.; GUREL, M. S.; SIMSEK, Z.; KATI, M. The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 464–467, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01605.x>

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and**

**biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1–16, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00211-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00211-1)

## ANEXOS

### Anexo 1

 Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:[ceua@propp.ufu.br](mailto:ceua@propp.ufu.br);  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

#### ANÁLISE FINAL Nº 119/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 069/13

Projeto Pesquisa: “Formulação inovadora de lipossomas convencionais e furtivos contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral”.

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013

