

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANTICORPOS ANTI-LJM11/LJM17 COMO BIOMARCADORES DE
SUSCEPTIBILIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES
ACOMPANHADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA**

MAIARA REIS ARRUDA

Salvador – Bahia

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**ANTICORPOS ANTI-LJM11/LJM17 COMO BIOMARCADORES DE
SUSCEPTIBILIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES
ACOMPANHADOS EM UMA ÁREA ENDÊMICA**

MAIARA REIS ARRUDA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr^a. Deborah Bittencourt Mothé Fraga

Co-orientadora: Dr^a. Manuela da Silva Solcà

Salvador – Bahia

2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Arruda, Maiara Reis.
A779a Anti-LJM11/LJM17 como biomarcador de exposição ao vetor e sua
associação com resistência e susceptibilidade à leishmaniose visceral em cães. /
Maiara Reis Arruda. - 2019.
91 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr^a. Deborah Bittencourt Mothé Fraga, Laboratório de
Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.
Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. *Leishmania*. 2. Coorte. 3. Flebotomíneo. 4. Saliva. I. Título.

CDU 616.993.161

" ANTICORPOS ANTI-LJM11/LJM17 COMO BIOMARCADORES DE SUSCEPTIBILIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES ACOMPANHADOS EM, UMA ÁREA ENDÊMICA."

MAIARA REIS ARRUDA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 14 de agosto de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Valéria de Matos Borges

Dra. Valéria de Matos Borges
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

Geraldo Gileno de Sá Oliveira

Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

D. Bacellar

Dra. Maria Olívia Amado Ramos Bacellar
Professora permanente
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de
Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ednalva Reis Arruda e José Antônio Barbosa Arruda e minha irmã, Monalisa Reis Arruda.

Ao meu esposo e melhor amigo, Igor Antônio Pereira Machado.

Ao meu cachorro, Sawyer Reis Arruda.

Aos meus grandes amigos de longa data, Murilo Caldas Pereira de Queiroz e Lucas Nogueira Paz.

Por terem sido pacientes, me incentivado e me dado forças para continuar. Essa conquista não é só minha, é de vocês também.

AGRADECIMENTOS

São os meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de alguma forma para que a realização desse trabalho se tornasse possível.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Deborah Bittencourt Mothé Fraga, e à minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Manuela da Silva Solcá, pela paciência, confiança e por terem me possibilitado valiosos anos de aprendizado.

A Dr^a Cláudia Ida Brodskyn por sua vasta contribuição na área de Imunologia e pelo apoio financeiro ao projeto.

A Prof^a Dr^a Leila Amorin e à MSc Ana Clara Campos por todo o auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos do LAIPHE pelos momentos de aprendizado e confraternização. Em especial à Lívia Coelho e ao Matheus Jesus pelo apoio intelectual e psicológico, sem vocês eu não teria conseguido todos esses resultados.

Aos tutores que confiaram seus animais ao estudo, sempre atenciosos e prestativos.

A todos os animais que fizeram parte do estudo, sem eles não teria sido possível concluir o mestrado.

Ao motorista do Instituto Gonçalo Moniz, Amaro Nunes Da Silva ("Seu" Amaro), que memorizou todos os endereços dos animais e foi sempre prestativo. Sem ele não teríamos conseguido dar continuidade aos acompanhamentos.

A coordenação da Pós-graduação, em especial a Simone Fortunato e Noélia dos Santos, por sempre estarem disponíveis e dispostas a ajudar no que fosse necessário.

A Ana Maria Fiscina, Eliana Garcia, Daiana Santos e todos os funcionários da Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Ana.

A FIOCRUZ e ao Instituto Gonçalo Moniz pela infraestrutura que possibilitou meu crescimento pessoal e profissional.

Às agências de fomento CNPq, pela bolsa de mestrado, CAPES e FAPESB, pelo financiamento do projeto.

Educação é uma descoberta progressiva
de nossa própria ignorância

Voltaire

ARRUDA, Maiara Reis. Anti-LJM11/LJM17 como biomarcador de exposição ao vetor e sua associação com resistência e susceptibilidade à leishmaniose visceral em cães. 91 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A *Leishmania infantum* é transmitida pela picada do *Lutzomyia longipalpis*. A saliva do vetor é inoculada no momento da picada, tendo papel importante na transmissão do parasito devido a presença de proteínas com propriedades farmacológicas que favorecem a infecção. Ainda não existem dados correlacionando a presença e/ou títulos de anticorpos anti-rLJM11+17 da saliva do vetor e resistência ou susceptibilidade de cães a leishmaniose visceral. **OBJETIVO:** Avaliar os títulos de anticorpos anti-rLJM11+17 e correlacioná-los a susceptibilidade ou resistência a leishmaniose visceral em cães. **METODOLOGIA:** Cães de uma área endêmica para LV foram submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais (deteção de anticorpos anti-*Leishmania* por DPP e ELISA, detecção do DNA de *Leishmania* por PCR em sangue, pele e/ou baço e cultura de aspirado esplênico) a cada 3 ou 6 meses em um período de dois anos. Em cada avaliação, na dependência do número/intensidade das manifestações clínicas, foi atribuído um escore clínico para cada animal e subsequentemente foram classificados como resistentes ou susceptíveis à doença. Amostras de soro dos animais foram avaliadas quanto aos níveis de anticorpos anti-rLJM11+17 da saliva do vetor e a antígenos solúveis da *Leishmania*, por ELISA. Animais que apresentaram índices reativos de anticorpos anti-rLJM11+17 maiores ou igual a duas vezes maiores em mensurações subsequentes foram considerados como animais reexpostos ao vetor. Além disso, foi feita caracterização do perfil imunológico dos animais nos momentos antes, durante e após a infecção utilizando as técnicas de ELISA e Luminex. **RESULTADOS:** Um total de 285 animais foram incluídos no estudo, sendo que 111 destes finalizaram todos os inquéritos de acompanhamento. Dentre os 111, 46 animais apresentavam resultado negativo para exposição a saliva e 19 também apresentavam-se negativos para infecção por *L. infantum* no início do estudo. Foram necessários apenas 6 meses para que a maioria (70%), dos 46 animais que começaram o estudo como não expostos se tornassem expostos ao vetor. O aumento da incidência de exposição ao longo do acompanhamento foi seguido pelo aumento da incidência de infecção. Dentre os 285 cães avaliados, a maioria dos animais (55%) foi reexposta ao vetor em algum momento. Animais susceptíveis apresentaram maiores níveis de anticorpos anti-saliva quanto comparados aos animais resistentes e os animais reexpostos tiveram 2 vezes mais risco de serem susceptíveis à LVC. Houve diferença na expressão de alguns mediadores entre animais resistentes e susceptíveis. CXCL1 estava menos expresso no momento da infecção nos resistentes e mais expresso 6 meses após a infecção nos susceptíveis. No momento da infecção, os níveis de IL-10 foram maiores nos susceptíveis. Nos resistentes, LTB4 e PGE2 mostraram-se com níveis elevados no momento da infecção, quando comparados com o período antes da infecção. **CONCLUSÃO:** A presença de anticorpos anti-rLJM11+17 além de ser um biomarcador de exposição ao vetor, também demonstrou estar associado à susceptibilidade à LVC. Adicionalmente, a quantificação de mediadores LBT4, PGE2 e IL-10 também podem ser úteis para predição de perfil de susceptibilidade e resistência.

Palavras-chave: Coorte, Flebotomíneo, *Leishmania*, Saliva

ARRUDA, Maiara Reis. Anti-LJM11/LJM17 as biomarker of vector exposure and its association with resistance and susceptibility to visceral leishmaniasis in dogs. 91 f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Medicine Investigative) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Leishmania infantum* is transmitted by sand fly vectors. The vector biting is followed by the injection of salivary proteins, which have an important role in the transmission of parasite due to their pharmacological properties that favor the infection. The correlation between the levels of antibodies against LJM11 and LJM17 (rLJM11+17) salivary proteins with resistance or susceptibility in canine visceral leishmaniasis (CVL) remains unknown. **OBJETIVE:** We aimed to evaluate anti-rLJM11+17 antibody titers and correlate them with susceptibility or resistance to visceral leishmaniasis in dogs. **METHODS:** Dogs from a VL endemic area underwent clinical and laboratory evaluations (detection of anti-*Leishmania* antibodies by DPP and ELISA, detection of *Leishmania* DNA by PCR in blood, skin and/or spleen, and splenic aspirate culture) every 3 or 6 months for 2 years. In each evaluation, depending on the number/intensity of clinical manifestations, a clinical score was assigned to each animal and they were subsequently classified as resistant or susceptible to disease. Animal serum samples were evaluated for antibody levels of vector salivary proteins rLJM11+17 and soluble *Leishmania* antigens by ELISA. Animals that showed reactive indices of rLJM11+17 antibodies greater than or equal to two times higher in subsequent measurements were considered as animals re-exposed to the vector. Also, the characterization of the immunological profile of the animals was performed at the moments before, during and after infection by ELISA and Luminex techniques. **RESULTS:** A total of 285 animals were included in the study, 111 of which completed all follow-up surveys. Of the 111 animals, 46 animals were negative for saliva exposure and 19 were also negative for *L. infantum* infection at baseline. It took only 6 months for the majority (70%) of the 46 animals that had started the study as unexposed to become exposed to the vector. The increased incidence of exposure over follow-up was followed by the increased incidence of infection. Of the 285 dogs evaluated, most animals (55%) were re-exposed to the vector at some point. Susceptible animals had higher levels of anti-saliva antibodies compared to resistant animals, and re-exposed animals were twice as likely to be susceptible to CVL. There was a difference in the expression of some mediators between resistant and susceptible animals. CXCL1 was less expressed at the time of infection in resistant dogs and more expressed at 6 months after infection in susceptible ones. At the time of infection, IL-10 levels were higher in susceptible animals. In resistant individuals, LTB4 and PGE2 were elevated at the time of infection when compared with the time before infection. **CONCLUSION:** The presence of anti-rLJM11+17 antibodies in addition to being a biomarker of vector exposure has also been shown to be associated with susceptibility to CVL. Additionally, quantitation of LBT4, PGE2, and IL-10 mediators may also be useful for predicting susceptibility and resistance profiles.

Keywords: Cohort, *Leishmania*, Phlebotomine, Saliva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa da área do estudo realizado em Camaçari-BA.....37
- Figura 2** - Cronograma de acompanhamento dos animais incluídos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.....38
- Figura 3** - Esquema de acompanhamento dos cães incluídos no estudo de coorte acompanhados em cada período do estudo realizado em Camaçari-BA e a perda de seguimento.....48
- Figura 4** – Validação das proteínas rLJM11+17 como marcadores de exposição ao flebótomo utilizando um total de 157 animais da área endêmica testados para detecção de anticorpos anti-SGS e anti-rLJM11+17.....50
- Figura 5** – Proporção de cães expostos e não expostos ao vetor, com a frequência de positivos e negativos para infecção por *L. infantum* no início do estudo, levando em consideração os animais que participaram de todos os acompanhamentos do estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.....51
- Figura 6** – Dinâmica de exposição ao vetor em cães acompanhados por 2 anos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.....52
- Figura 7** – Fluxograma justificando a seleção dos animais que fizeram parte da sub coorte. Foram selecionados os animais que começaram o estudo não expostos ao vetor e negativos para infecção por *L. infantum*. Foram excluídos os animais que começaram o estudo expostos ao vetor e/ou positivos para infecção por *L. infantum* e/ou que não foi possível realizar a análise de exposição em todos os acompanhamentos53
- Figura 8** – Dinâmica de exposição ao vetor e de soropositividade para LVC em cães que começaram o estudo como não expostos e não infectados (n=19)54
- Figura 9** – Esquema com as proporções de animais expostos e não expostos a saliva do vetor pertencentes a subcoorte de animais que começaram o estudo não infectados por *Leishmania infantum* e que foram realizados os ensaios de ELISA com rLJM11+1755
- Figura 10** – Esquema das proporções de animais infectados por *L. Infantum* por perfil de susceptibilidade e resistência para LVC ao longo do acompanhamento da subcoorte dos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA57

- Figura 11** – Detecção dos níveis de anticorpos anti-rLJM 11 e 17 e anti-*Leishmania* em cães classificados como resistentes e susceptíveis ao longo do acompanhamento de acordo com o tempo de infecção em cães que começaram o estudo como não infectados (n=57)59
- Figura 12** – Esquema demonstrando o critério de seleção dos 247 animais que foram selecionados para análise de reexposição ao vetor e perfil de susceptibilidade à LVC ao longo do acompanhamento dos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA60
- Figura 13** – Exposição ao vetor em cães susceptíveis e resistentes (n=247).....61
- Figura 14** – Agrupamento dos perfis imunológicos presentes no soro de cães acompanhados da área endêmica de Camaçari-BA com relação à resistência ou susceptibilidade à LVC nos períodos de 6 meses antes da infecção (-6), infecção (I) e 6 meses após a infecção (+6)65
- Figura 15** – Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença entre os períodos de 6 meses antes da infecção (-6) e 6 após a infecção (+6) no *heatmap*, estratificados por resistentes e susceptíveis (n=17)66
- Figura 16** – Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença entre os períodos de 6 meses antes da infecção (-6) e infecção (I) no *heatmap*, estratificados por resistentes e susceptíveis (n=17).....67
- Figura 17** – Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença no *heatmap*.....68

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição da população de cães incluídos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA47
- Tabela 2** - Resultado da análise de regressão logística multinível empregada nos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA que começaram como negativos para infecção por *L. Infantum*56
- Tabela 3** - Associação entre exposição ao vetor e susceptibilidade à LVC.....62

LISTA DE ANEXOS

Anexo A - Aprovação do estudo pelo comitê de Ética.....	86
Anexo B - Renovação da aprovação do estudo pelo Comitê de Ética.....	87
Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	88
Anexo D - Parâmetros para a classificação da LVC nos animais.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AI	Antes da infecção
Inf	Infecção
PI	Pós-infecção
BALB/C	Linhagem de camundongos albinos
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCL2	Quimiocina responsável pelo recrutamento de monócitos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (atual IGM)
CXCL1	Quimiocina responsável pelo recrutamento de neutrófilos
CXCL10	Responsável pelo recrutamento várias células de defesa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DPP	Plataforma de Duplo Percurso
DTH	Hipersensibilidade Tardia
ELISA	Ensaio e imunoabsorção enzimática
EIE	ELISA
FioCruz	Fundação Oswaldo Cruz
GM-CSF	Fator estimulador de granulócitos e macrófagos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
ICC	Índice de Correlação Intraclasse
IFN- γ	Interferon gama

IgG	Imunoglobulinas G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IR	Índice de Reatividade
LTB4	Leucotrieno B4
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
N	Amostra
NNN	Meio de Cultura
NS	Não Significativo
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação da Cadeia da Polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E2
qPCR	Reação da Cadeia da Polimerase quantitativa
ROC	Curva Recebedora das Características dos Operadores

RPM	Rotações Por Minuto
RR	Risco Relativo
SALO	Proteína Salivar Anti-Complemento
SGE	Extrato Total da Glândula Salivar
SGH	Homogenizado da Glândula Salivar
SGS	Sonicado da Glândula Salivar
TGF- β	Fator de Transformação do Crescimento
Th1	Linfócitos T auxiliares tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral beta
VPN	Valor Preditivo Negativos
VPP	Valor Preditivo Positivo
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	LEISHMANIOSE VISCERAL	21
2.1.1	Epidemiologia	21
2.1.2	Agente etiológico	22
2.1.3	Transmissão	23
2.2	LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	25
2.2.1	Cão como reservatório	25
2.2.2	Patogenia e sinais clínicos	26
2.3	RESPOSTA IMUNE	28
2.3.1	Possíveis Marcadores de Susceptibilidade e de Resistência em cães	29
2.4	PROTEÍNAS DA SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS	30
2.4.1	Proteínas da família Yellow	31
2.5	LJM11 E LJM17 COMO BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AOS FLEBOTOMÍNEOS	32
3	OBJETIVOS	35
3.1	GERAL	35
3.2	ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
4.2	ÁREA DE ESTUDO	36
4.3	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS	37
4.4	EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DOS CÃES	38
4.5	DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR <i>L. INFANTUM</i>	40
4.5.1	Testes Sorológicos	40
4.5.2	qPCR	40
4.5.3	Teste Parasitológico	40
4.6	CLASSIFICAÇÃO DOS CÃES QUANTO A SUSCEPTIBILIDADE E RESISTENCIA A LVC	41
4.7	AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO AO VETOR	42
4.8	VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS RLJM11+17	42
4.9	AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DOS CÃES	43
4.10	ANÁLISES	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES ESTUDADA	47
5.2	DINÂMICA DE ACOMPANHAMENTO DOS CÃES NO ESTUDO DE COORTE	48
5.3	VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS RLJM11+17 COMO MARCADOR DE EXPOSIÇÃO AO VETOR	49
5.4	DINÂMICA DE EXPOSIÇÃO AO VETOR NOS CÃES ACOMPANHADOS	50
5.5	AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXPOSIÇÃO AO VETOR E DE INFECÇÃO POR <i>L. INFANTUM</i>	52

5.6	AVALIAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPOSIÇÃO AO VETOR E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA LVC	54
5.7	AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO VETOR NO DECORRER DO TEMPO DE ACOMPANHAMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA DO CÃO À LVC	57
5.8	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTE REEXPOSIÇÃO AO VETOR E SUSCEPTIBILIDADE A LVC	59
5.9	AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE REEXPOSIÇÃO AO VETOR COM SUSCEPTIBILIDADE À LVC	61
5.10	CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DOS ANIMAIS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES À LVC	62
6	CONCLUSÃO	69
7	REFERENCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, a leishmaniose visceral (LV) pode ser uma zoonose ou antropozoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (KUHLS et al., 2011), protozoário que é transmitido pela picada do inseto vetor *Lutzomyia longipalpis* (BRASIL, 2017a; OMS, 2013). A LV representa um grave problema de saúde pública e é uma doença que quando negligenciada pode ser fatal (CAMARGO; LANGONI; 2006). Mais de 25.000 novos casos da doença foram relatados no ano de 2015, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo aproximadamente 45% destes no Novo Mundo.

A Leishmaniose visceral canina (LVC) é a forma da doença que atinge os cães. O cão é o principal reservatório urbano da *L. infantum* e a presença de um cão infectado na área endêmica pode estar associada à ocorrência de LV em humanos (CUNHA et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2001; LOPES et al., 2016). Porém, uma questão que permanece controversa é o impacto de cães sem manifestação clínica no ciclo de transmissão da doença e sua influência para a saúde pública (TRAVI et al., 2001; COSTA-VAL et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008; LAURENTI et al., 2013; COURTNEY et al., 2014; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016; BORJA et al., 2016).

Animais infectados por *L. infantum* sem manifestação clínica apresentam um padrão predominante de resposta imune celular, demonstrando maior resistência à *Leishmania*, podendo ocorrer o controle da carga parasitária presente (CHAMIZO et al., 2005; MANNA et al., 2006). Este controle da infecção pode diminuir as chances destes cães se tornarem fonte de infecção para o inseto vetor, tendo em vista que a literatura sugere que a carga parasitária presente na pele está diretamente associada com maior capacidade de transmissão (VERÇOSA et al., 2008; ASLAN et al., 2016; BORJA et al., 2016). Além disso, a maioria dos estudos que avaliaram cães com e sem sinais clínicos quanto a capacidade de transmissão encontraram que nos animais sem sinais clínicos a taxa de transmissão foi menor ou inexistente (TRAVI et al., 2001; COSTA-VAL et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008; COURTNEY et al., 2014; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

A transmissão ocorre quando o vetor flebotomíneo alimenta-se de um hospedeiro vertebrado infectado e posteriormente realiza o repasto sanguíneo em outro hospedeiro vertebrado (KILLICK-KENDRICK, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Ao alimentar-se, o vetor infectado não apenas inocula as formas

promastigotas metacíclicas da *Leishmania*, como também inocula sua saliva. As proteínas da saliva favorecem o estabelecimento da infecção pelo parasito (ABDELADHIM et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2014) por possuírem propriedades anticoagulantes, antiplaquetárias e anti-inflamatórias (CAVALCANTE et al., 2003; ABDELADHIM et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

O papel da saliva no estabelecimento da infecção por *Leishmania* vem chamando a atenção de vários grupos de pesquisa desde o início da década de 90. (SAMUELSON et al., 1991; THEODOS et al., 1991; VALENZUELA et al., 2001; NORSWORTHY et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2008a; HOSSEINI-VASOUKOLAEI et al., 2016). Alguns estudos demonstraram que a pré-estimulação de animais com proteínas da saliva do vetor anteriormente à sua co-inoculação com *Leishmania* apontaram para neutralização dessas proteínas por anticorpos anti-saliva, e ocorrência de estímulo da resposta Th1 e reação de hipersensibilidade tardia em camundongos e ratos, resultando em uma diminuição da carga parasitária e do diâmetro da lesão na orelha desses animais quando comparados aos indivíduos controles, o que poderia sugerir proteção contra a infecção (KAMHAWI et al., 2000; GOMES et al., 2012a). Por outro lado, estudos mais recentes têm demonstrado que a resposta imune anti-saliva pode estar associada a maior gravidade da LVC em cães de área endêmica (SOLCÀ et al., 2016), com infecção ativa por *L. infantum* (KOSTALOVA et al., 2015) e com maior risco de transmissão do parasito (VLKOVA et al., 2018).

Porém, nenhum desses estudos avaliou a resposta imune contra proteínas recombinantes da saliva de *Lutzomyia longipalpis* de forma longitudinal. Até a presente data não existem dados que correlacionem o desenvolvimento da resposta imune anti-LJM11+17 da saliva do vetor ao longo do tempo em cães expostos a infecção por *L. infantum* com os achados clínicos e o agravamento da doença na espécie canina em um estudo longitudinal com um número significativo de animais, para elucidar se há associação da exposição ao vetor com susceptibilidade ou com resistência à infecção por *Leishmania*.

A avaliação da resposta imune anti-saliva nos cães pode auxiliar no estabelecimento de biomarcadores referentes à susceptibilidade ou resistência, assim como marcadores de prognóstico da doença no cão. A identificação de marcadores de resistência ou susceptibilidade que sejam fáceis de ser detectados e que possam ser utilizados em larga escala é de extrema importância para direcionar

as medidas de controle da doença para apenas cães que sejam susceptíveis a LV e, portanto, com maior possibilidade de transmissão. Neste contexto, a utilização de proteínas recombinantes em substituição ao extrato total da saliva (SGH), cuja obtenção é laboriosa, tem grande importância e favorece a potencialidade de utilização desses marcadores. Um estudo realizado por Teixeira et al. (2010) avaliou diferentes moléculas da saliva do *L. longipalpis* e apontou as proteínas recombinantes LJM11+17 como as mais reconhecidas por soros de cães de uma área endêmica evidenciando seu grande potencial de utilização.

Dessa forma, propomos neste estudo avaliar se há correlação entre a presença de anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis* no soro de cães e a ocorrência da leishmaniose visceral canina, seu prognóstico e o desfecho clínico da doença. Os níveis de anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis* foram avaliados utilizando as proteínas recombinantes rLJM11 e rLJM17 (rLJM11+17), que poderão ser avaliadas como marcadores de perfil de susceptibilidade ou resistência de LVC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1.1. Epidemiologia

A LV é uma antroponose causada pelo protozoário *Leishmania donovani* no Velho Mundo e uma zoonose causada pela *L. infantum* no Novo Mundo. A LV humana tem ocorrência principalmente nas Américas, Oriente Médio, Ásia Central, China e Mediterrâneo (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Mais de 90% dos novos casos relatados em 2014 se concentraram no Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul, com mais de mil casos novos humanos em cada um dos países (WHO, 2015). No Brasil, a doença está presente em todas as regiões. Porém, o Nordeste é a região onde se encontra o maior número de casos confirmados, com 1.523 casos, o segundo maior coeficiente de incidência, com 2,7 por 100.000 habitantes e o maior número de óbitos pela doença, com 133 óbitos no ano de 2016. O Nordeste possui a doença distribuída por todos os estados, com as maiores prevalências no Maranhão, Ceará, Bahia e Piauí, com 539, 419, 320 e 213 casos relatados, respectivamente, no ano de 2016 (BRASIL, 2017b).

Na Bahia, diversas áreas possuem grande ocorrência de LV como nos municípios de Andaraí, Central, Barra do Mendes e Marcionílio Souza que obtiveram as maiores incidências em humanos, observadas no ano de 2015, perfazendo coeficientes de incidência de 5,8; 5,5; 2,8 e 2,7 casos por 10.000 habitantes cada, respectivamente. Centros urbanos de Jequié, Feira de Santana, Serrinha, Irecê, Juazeiro e Camaçari corresponderam a 23,7% dos casos na Bahia neste mesmo ano, evidenciando a expansão urbana da LV (BAHIA, 2015).

A leishmaniose visceral canina (LVC), a manifestação da doença que atinge os cães infectados pela *L. infantum*, também tem suas maiores prevalências no Nordeste. Em um estudo realizado em 6 municípios no Maranhão, foi encontrada prevalência de infecção por *L. infantum* em 67% dos cães (BARBOSA et al., 2010), e em Fortaleza no Ceará, a prevalência de infecção foi de 26,2% em cães domiciliados (RONDON, 2007). Na Bahia, em um estudo feito por Barboza et al. (2006), foi encontrada grande incidência de soroconversão para o parasito nos municípios de Camaçari (18,5%), e Lauro de Freitas (17,4%), localizados na região metropolitana de Salvador. Outro estudo realizado em 36 bairros no município de Camaçari encontrou prevalência de 22% de cães positivos para *L. infantum*

(GONÇALVES, 2014). A LVC também está dispersa nas outras regiões do Brasil, como na região Sudeste, na qual foi descrita a expansão de casos no Rio de Janeiro (SILVA et al., 2015), Minas Gerais (NUNES et al., 2016; URSINE et al., 2016) e São Paulo (OLIVEIRA et al., 2016), e na região Sul, como no Rio Grande do Sul, que teve seus primeiros casos de LVC relatados em 2008, precedendo o aparecimento dos primeiros casos humanos em 2009 (SILVA et al., 2015; RIO GRANDE DO SUL, 2011).

2.1.2. Agente etiológico

A *Leishmania* é um protozoário patogênico flagelado pertencente ao reino Protista (Haeckel, 1866), sub-reino Protozoa (Goldfuss, 1817), filo Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963), sub-filo Mastigophora (Deising, 1866), classe Kinetoplastea (Cavalier-Smith, 1981), sub-classe Metakinetoplastina (Vickerman, 2004), ordem Trypanosomatida (Kent, 1880), família Trypanosomatidae (Döflein, 1901), sub-família Leishmaniinae (Maslov; Lukes, 2012) e gênero *Leishmania* (Ross, 1903). Já foram identificadas até o momento 53 espécies de *Leishmania* pelo mundo (AKHOUNDI et al., 2016). No Brasil, as espécies presentes são *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, causadoras da leishmaniose cutânea e mucocutânea (LAISON; SHAW, 1978; SILVEIRA; KEMMELMEIER, 1995; SILVEIRA et al., 2009; COELHO et al., 2011) e *L. infantum*, causadora da leishmaniose visceral (LV) (CHAGAS et al., 1936; ALENCAR, 1958; LIMA et al., 2018).

As espécies de *Leishmania* são heteroxenas, necessitando de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar o ciclo de vida. Em seu ciclo, estes parasitos possuem duas principais formas evolutivas, a promastigota e a amastigota (LAISON; SHAW, 1978; NEVES et al., 2004; AKHOUNDI et al., 2016). A forma promastigota é alongada, possui flagelo, é altamente móvel e mede em média 20,5µm de comprimento e 2,5µm de largura. Esta é a forma encontrada no intestino das fêmeas de flebotomíneos. Ela evolui para a forma infectante, promastigota metacíclica, que possui um flagelo longo e fica na válvula estomodeal dos vetores. A forma amastigota é encontrada no interior dos macrófagos das espécies hospedeiras, tem formato oval e diâmetro médio de 2,5µm (LAISON; SHAW, 1978; PEARSON; SOUZA, 1996).

2.1.3. Transmissão

Ao alimentar-se de um indivíduo infectado, o flebótomo ingere as formas amastigotas da *L. infantum* presentes no hospedeiro vertebrado, estas formas se diferenciam em promastigotas, se multiplicam no intestino do vetor e se transformam nas formas infectantes, promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas para o próximo hospedeiro vertebrado no momento de um novo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRIC, 1999; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Já foi descrito na literatura que a *Leishmania* causa dano à válvula estomodeal do flebótomo, interferindo na habilidade do flebótomo de se alimentar, isso faz com que sejam feitos vários repastos sanguíneos de curta duração, aumentando assim o contato entre o flebótomo e o hospedeiro vertebrado, o que pode aumentar as chances de transmissão do parasito (KILLICK-KENDRIC et al., 1977; ROGERS; BATES, 2007). Além disso, o dano à válvula promove uma regurgitação dos parasitos durante a picada, podendo também favorecer a infecção (KILLICK-KENDRIC et al., 1977; SCHLEIN et al., 1992; VOLF et al., 2004). Além da quantidade de repastos sanguíneos, outros fatores também influenciam na transmissão, como a imunidade do flebótomo, a microbiota do intestino do flebótomo, a virulência do parasito, a quantidade do parasito adquirida pelo flebótomo e as condições ambientais (SANT'ANNA et al., 2014; KELLY et al., 2017; LOURADOUR et al., 2017; COURTNEY et al., 2017).

Um novo conceito tem aparecido na literatura, denominando alguns flebótomos como “super disseminadores”. Esta denominação parte do pressuposto de que a quantidade de parasitos adquirida pelo flebótomo vai influenciar na transmissão e no quadro clínico da doença provocada (COURTENEY et al., 2017). Flebótomos que se alimentam de hospedeiros com alta carga parasitária são infectados com alta quantidade de parasitos, gerando assim infecção com maior número de promastigotas metacíclicas, que são transmitidas para um segundo hospedeiro em grande número e com alta eficiência, resultando em doença aguda mais grave e sendo responsável pelo caráter epidêmico da doença. Estes indivíduos são considerados “super disseminadores”, portanto reservatórios eficientes durante a fase aguda da doença. Em contrapartida, indivíduos infectados por flebótomos albergando baixas cargas parasitárias, não desenvolvem a doença ou a desenvolvem de forma branda tanto na fase aguda quanto na fase crônica, com baixas cargas parasitárias, sendo reservatórios menos eficientes, mas responsáveis

pela manutenção do caráter endêmico da doença (LIRA et al., 2000; MÉNDEZ, et al., 2001; KIMBLIN et al., 2008; COURTENEY et al., 2017).

Existem dois ciclos envolvidos na transmissão do parasita, o ciclo silvestre que pode envolver algumas espécies de marsupiais (HUMBERG et al., 2012; CARREIRA et al., 2012) e a raposa (LAINSON et al., 1990), atuando como reservatórios, e o ciclo doméstico, que possui o cão como o principal reservatório urbano (ASHFORD, 1996; OMS, 2010). Também existe a possibilidade da ligação entre ambos os ciclos (GONTIJO; MELO, 2004), principalmente em áreas periurbanas.

Trabalhos que investigaram o hábito alimentar de flebótomos em áreas endêmicas detectaram preferência principalmente por sangue de aves, cães e equinos em áreas rurais e urbanas do Nordeste (AFONSO et al., 2012) e Mato Grosso (MISSAWA et al., 2008), enquanto que em uma área periurbana de Natal no Rio Grande do Norte, Macedo-Silva et al. (2014) encontraram maior preferência por humanos, assim como Oliveira et al. (2008b) em Campo Grande no Mato Grosso onde houve preferência predominante pela combinação de sangue humano e de aves. Estes estudos avaliaram a preferência por meio das técnicas de ELISA, com a detecção de anti-soro anti espécies testadas, ou com a técnica de PCR, na qual foram construídos os primers iniciadores levando em consideração a sequência do gene *Cyt b* de cada espécie.

Alguns estudos demonstraram outras formas de transmissão da doença entre cães e entre humanos, como a transmissão vertical (ROSYPAL et al., 2005; BOEHME et al., 2006), venérea (SYMMERS, 1960; SILVA et al., 2009) e por transfusão sanguínea (OWENS et al., 2001; MANSUETO et al., 2014). Ainda sem comprovação, também foi sugerida a transmissão por inoculação com agulha contaminada (MORILLAS-MARQUEZ et al., 2002; CRUZ et al., 2002) e por outros artrópodes hematófagos como carrapatos (COLOMBO et al., 2011; MEDEIROS-SILVA et al., 2015; DABAGHMANESH et al., 2016) e pulgas (COLOMBO et al., 2011). Em vários estudos realizados já foi encontrado DNA de *Leishmania* em carrapatos e pulgas coletados de animais infectados, e em um destes estudos foi detectado kDNA de *Leishmania* na glândula salivar de carrapatos. Porém, apesar de já ter sido possível detectar DNA de *Leishmania* em carrapatos, inclusive em larvas e ovos de teleógenas experimentalmente infectados com promastigotas (DANTAS-

TORRES et al., 2010a; 2010b; DE MORAIS et al., 2013), isso não comprova que o protozoário consiga completar seu ciclo neste artrópode.

2.2. LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

2.2.1. Cão como reservatório

Devido à sua grande proximidade com os humanos, o cão é apontado como o reservatório da *L. infantum* mais importante no meio urbano (MORENO; ALVAR, 2002; COURTENAY et al., 2002). Várias razões embasam essa afirmação, como o fato dos cães apresentarem um parasitismo cutâneo intenso favorecendo a transmissão, estarem sempre dentro ou próximos às casas favorecendo a manutenção do ciclo de transmissão doméstica, além de serem capazes de albergar a infecção sem demonstrar sinais clínicos da doença (ASHFORD, 1996; MORENO; ALVAR, 2002; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; DANTAS-TORRES, 2007).

Como medida de controle para LV, o Ministério da Saúde recomenda a eutanásia de animais sororreagentes residentes de áreas endêmicas que não podem ser submetidos a um tratamento que seja permitido pela portaria Interministerial ANVISA-MAPA 1.426 de 11/07/2008 (BRASIL, 2017a) no entanto, esta medida não tem sido eficaz, tendo em vista que a eutanásia não tem diminuído os casos em cães e humanos (DYE, 1996; DIETZE et al., 1997; COSTA et al., 2001; COURTENAY et al., 2002). Inúmeras razões estão por trás da falha dessa estratégia de controle, a primeira delas é que os métodos de diagnóstico disponíveis atualmente no mercado não conseguem identificar os animais infectantes (COURTNEY et al., 2002; MOREIRA et al., 2004).

Outro aspecto que deve ser considerado é que nem todo cão vai se comportar como um reservatório, tendo em vista que a condição clínica do cão está associada a capacidade de transmissão do parasito. Estudos em áreas endêmicas demonstraram que há alta prevalência de cães e sem sinais clínicos infectados por *L. infantum* (FISA et al., 1992; BRANDONISIO et al., 1992; MADEIRA et al., 2004; DANTAS-TORRES; BRITO; BRANDÃO-FILHO, 2006; QUEIROZ et al., 2009; SILVEIRA et al., 2012). Cães sem sinais clínicos exibem resposta imune eficiente, portanto conseguem controlar a carga parasitária na pele e com isso se tornam menos infectantes para flebótomos (VERÇOSA et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; ASLAN et al., 2016; BORJA et al., 2016). A maioria dos

estudos que pesquisaram grau de transmissibilidade encontraram que animais sem sinais clínicos transmitem menos ou não são capazes de transmitir o parasito para o vetor (TRAVI et al., 2001; DA COSTA-VAL et al., 2007; VERÇOSA et al., 2008; COURTNEY et al., 2014; MAGALHÃES-JUNIOR et al., 2016).

Em relação aos métodos de diagnóstico preconizados pelo Ministério da Saúde são os testes sorológicos, o teste rápido DPP como triagem e o ELISA como confirmatório, ambos levam apenas em consideração a detecção de anticorpos contra *L. infantum*, não sendo capazes de identificar animais infectantes. Além disso, a eliminação de cães baseada apenas no resultado do exame pode resultar na eliminação de animais resistentes que terminariam sendo substituídos por animais susceptíveis que estariam efetivamente transmitindo o parasita (BRAGA et al., 1998; COURTNEY et al., 2002; MOREIRA JR. et al., 2004). Outra razão que também pode explicar a falha desta medida de controle da LV pode ser a presença de outras espécies animais que podem estar envolvidas no ciclo de transmissão da doença, como marsupiais (TRAVI et al., 1998; CARREIRA et al., 2012; HUMBERG et al., 2012), gatos (OLIVEIRA et al., 2015; AKHTARDANESH et al., 2017; BENASSI et al., 2017), roedores silvestres (NAVEA-PÉREZ et al., 2015) e sinantrópicos (CALDART et al., 2017).

2.2.2. Patogenia e sinais clínicos

A LVC é uma doença sistêmica. O animal acometido por esta patologia pode apresentar uma variedade de sinais clínicos, nenhum deles sendo patognomônico. Alguns cães infectados apresentam manifestação clínica da doença enquanto outros permanecem sem sinais clínicos. Dentre as manifestações clínicas que podem estar presentes, as mais frequentes são: dermatite, linfadenomegalia, palidez de mucosas, alterações oculares, hepatomegalia, esplenomegalia, caquexia, febre e onicogribose (CIARAMELLA et al., 1997; KOUTINAS et al., 1999; PEÑA et al., 2000; NARANJO et al., 2005; BANETH et al., 2008).

As alterações na pele mais frequentes são dermatite esfoliativa, ulcerativa e nodular. Menos frequentemente também pode estar presente a dermatite pustular (BANETH et al., 2008; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014). A dermatite esfoliativa afeta principalmente na cabeça, a região ao redor dos olhos, ponta de orelha e no dorso. O estudo histológico da pele revela inflamação granulomatosa ou piogranulomatosa na derme, com predominância de macrófagos ou linfócitos

(FERRER et al., 1988; FONDEVILA; VILAFRANCA; JAFFE, 1997; PAPADOGIANNAKIS et al., 2005). Papadogiannakis et al. (2005) relataram presença de adenite sebácea em metade dos fragmentos de pele examinados nas áreas de dermatite esfoliativa com predominância de células T CD4+ mesmo sem a presença de amastigotas nessas áreas. Isto pode tanto significar que essas células conseguiram controlar o crescimento parasitário, como também pode se tratar de uma adenite sebácea imunomediada (SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS, 2014). A dermatite ulcerativa localiza-se principalmente na ponta da orelha, nariz e patas (FERRER et al., 1988; SLAPPENDEL, 1988; KOUTINAS et al., 1992; CIARAMELLA; CORONA, 2003). Ao exame histopatológico, na borda da lesão pode ser vista hiperplasia da derme e exocitose de neutrófilos. Nas demais regiões, pode ser vista dermatite difusa com presença de eosinófilos, neutrófilos macrófagos e linfócitos (FERRER et al., 1988; FONDEVILA VILAFRANCA; JAFFE, 1997). De acordo com a localização dessas lesões, sugere-se que ela seja causada por vasculite associada a complexo imune (SLAPPENDEL, 1988, SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS et al., 2014). A dermatite nodular pode ser encontrada em qualquer lugar na pele e em mucosas, é caracterizada por nódulos que normalmente não são ulcerados e nem causam prurido (FERRER et al., 1988; KOUTINAS et al., 1992, CIARAMELLA; CORONA, 2003). No histopatológico pode ser vista predominância de macrófagos, células gigantes multinucleadas e cargas parasitárias maiores do que nas lesões citadas anteriormente (FERRER et al., 1988). A dermatite pustular é caracterizada por pequenas pústulas com halos eritematosos que se rompem levando à formação de crostas na epiderme (FERRER et al., 1988; SARIDOMICHELAKIS; KOUTINAS et al., 2014). Geralmente essas lesões apresentam cargas parasitárias baixas (FERRER et al., 1988).

A linfadenomegalia é causada pelo aumento da quantidade e do tamanho dos folículos linfóides e pela hipertrofia e hiperplasia de macrófagos (MARTINEZ-MORENO et al., 1993; LIMA et al., 2004; MYLONAKIS et al., 2005; MOREIRA et al., 2010; MOREIRA et al., 2013). A palidez das mucosas é resultado da anemia causada pela insuficiência renal crônica e consequente deficiência na produção de eritropoietina, além de hemorragias e/ou anemia imunomediada. Uma das alterações oculares que podem ser encontradas em cães com sinais clínicos é a ceratoconjutivite seca, que é causada por infiltrados inflamatórios nos ductos

lacrimais e promovendo a retenção lacrimal (KOUTINAS et al., 1999; PEÑA et al., 2000; NARANJO et al., 2005).

A hepatomegalia resulta de infiltrados inflamatórios, hipertrofia ou hiperplasia de células residentes e possivelmente por conta da congestão passiva (RALLIS et al., 2005; GIUNCHETTI et al., 2008). A esplenomegalia pode ser decorrente da hiperplasia do tecido linfóide que resulta da proliferação de linfócitos T e B e infiltração de macrófagos no baço (ALEXANDRE-PIRES et al., 2006; BANETH et al., 2008; LIMA et al., 2014). Estudos demonstraram que a hiperplasia de folículos linfóides ocorre nos momentos iniciais da doença e a atrofia dos folículos em tamanho e quantidade, além da desorganização da polpa branca do baço, estão relacionados a maior gravidade da LVC (VERESS et al., 1977; VERESS et al., 1983; KEENAN et al., 1984; SANTANA et al., 2008). Também foi observada associação entre substituição de linfócitos T por plasmócitos e sua retenção na polpa vermelha, com a desorganização da polpa branca do órgão (SANTANA et al., 2008; LIMA et al., 2014; SILVA-O'HARE et al., 2016; SANTOS et al., 2016). A onicogribose é caracterizada clinicamente pela hipertrofia e o aumento do tamanho das unhas e deve-se a uma dermatite mononuclear liquenóide que leva a um excessivo acúmulo de estrato córneo (KOUTINAS et al., 2010; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014).

2.3. RESPOSTA IMUNE

Em relação a resposta imune na LV e LVC, estudos apontavam que para que o combate à *Leishmania* fosse efetivo o perfil de resposta imune presente no hospedeiro deveria ser predominantemente Th1, portanto, a resistência à doença deveria estar relacionada à capacidade do hospedeiro de produzir resposta imune caracterizada por maior produção de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ citotóxicos e produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF, IL-2, IL-12, considerados até então como possíveis marcadores de resistência. Por outro lado, os marcadores de susceptibilidade estariam geralmente relacionados à predominância de um perfil Th2, ou seja, produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e IL-13 que ativariam a proliferação de células B, produção de anticorpos e troca de classe entre eles (SEDER; PAUL, 1994; PUNNONEN; VRIES, 1994; LAI; MOSNANN, 1999; XU et al., 2004; REIS et al., 2010). Porém, a maioria destes estudos foi realizada utilizando roedores como modelo experimental e em estudos com humanos e cães esta dicotomia não tem se mostrado presente e a

resposta imune à infecção por *Leishmania* apresenta-se bastante complexa conforme foi revisado por Hosein et al. (2016).

Alguns fatores como raça, imunossupressão, doenças concomitantes e condição nutricional podem influenciar no desfecho da infecção em cães (MIRÓ et al., 2008). Além disso, estudos demonstraram que a resposta imune contra *Leishmania* é órgão específica (REIS et al., 2009). Os perfis de resposta Th1, Th2 ou uma mistura dos dois foram observados em diferentes órgãos de cães com LVC e esse achado se correlacionou com a ausência ou a presença de sinais clínicos e a carga parasitária detectada (STRAUSS-AYALI et al. 2007; TRAVI et al. 2009; BOGGIATTO et al. 2010), demonstrando que os perfis fenotípicos de células e as citocinas envolvidas na resposta imune têm efeitos variáveis nos locais em que os parasitas normalmente se replicam, evidenciando uma compartimentalização da resposta imune (ROGRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2016).

2.3.1. Possíveis Marcadores de Susceptibilidade e de Resistência em cães

O aumento na expressão de citocinas como IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β , aumento da carga parasitária (LAGE et al., 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011), depressão da resposta imune celular (PINELLI et al., 1994) ou alta produção de anticorpos IgG (BOGIATTO et al., 2010) foram apontados como marcadores de progressão da LVC. Em um estudo realizado por Solcà et al. (2016) analisando o soro de 70 cães de uma área endêmica, não foi detectada correlação entre IL-10 e TGF- β , mas houve correlação diretamente proporcional entre o aumento na produção das quimiocinas CXCL1 e CCL2 com maior gravidade da doença nos animais (SOLCÀ et al., 2016). O decréscimo na produção de LTB4 e PGE2 também foi correlacionado com maior gravidade da LVC (SOLCÀ et al., 2016). CXCL1 é a responsável pelo recrutamento de neutrófilos e o CCL2 é responsável pelo recrutamento de monócitos, logo, essas quimiocinas aumentadas em animais com maior gravidade da doença podem estar relacionadas ao recrutamento de células imaturas e não responsivas, levando a incapacidade de controlar a carga parasitária (MENEZES-SOUZA et al., 2012; SOLCÀ et al., 2016).

A ativação de células Th1 levando ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α e IL-12, assim como o aumento na produção de células como linfócitos T CD4+ e CD8+ no sangue periférico podem estar

relacionados à resistência (CHAMIZO et al., 2005; CARRILLO; MORENO, 2009; REIS et al., 2010).

A resposta imune de cães frente a infecção por *Leishmania* ao longo do tempo ainda não está muito bem compreendida, precisando de confirmação por estudos longitudinais que avaliem cães ao longo da infecção por *L. infantum*.

2.4. PROTEÍNAS DA SALIVA DOS FLEBOTOMÍNEOS

Ao se alimentar de um hospedeiro, a fêmea do flebotomíneo introduz seu aparelho bucal juntamente com sua saliva na pele, corta o tecido e dilacera os capilares, causando uma hemorragia no local da picada. As proteínas presentes na saliva do inseto conseguem modular a resposta inflamatória, hemostática e imune do hospedeiro, criando um ambiente favorável à infecção por *Leishmania* spp. (ABDELADHIM et al., 2014). Dentre estas proteínas, pode-se encontrar moléculas que funcionam como potentes vasodilatadores, anticoagulantes, antiplaquetários, imunomoduladores, anti-inflamatórios e inibidores do sistema complemento (CAVALCANTE et al., 2003; ABDELADHIM et al., 2014; FERREIRA et al., 2016).

A interação das proteínas salivares de diversas espécies de flebotomíneos com o hospedeiro foi bastante estudada (KAMHAWI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008; GOMES et al., 2012; KOSTALOVA et al., 2015; SOLCÀ et al., 2016; QUINNEL et al., 2018). Alguns dos primeiros estudos publicados avaliando a importância da saliva do flebotomo envolveram a co-inoculação do lisado da glândula salivar juntamente com *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, sendo evidente a exacerbação da infecção e da lesão (SAMUELSON et al., 1991). Resultado também encontrado por Theodos et al. (1991) realizando co-inoculação do lisado de glândula salivar com *L. major*. Norsworthy et al. (2004) encontraram também uma exacerbação da infecção e da lesão em camundongos BALB/c co-infectados com *L. amazonensis* e extrato da saliva (SGE) de *L. longipalpis*.

Estudos relacionados à proteína PpSP15 presente na saliva do *Phlebotomus papatasi*, flebotomíneo responsável pela transmissão da *L. major* nas regiões sudoeste e central da Ásia, no norte da África e no subcontinente Indiano, demonstraram que esta proteína possuiu um caráter imunogênico em roedores e esteve associada a proteção contra a infecção por *L. major*. Esta proteção foi associada ao estímulo da resposta do tipo Th1 (VALENZUELA et al., 2001; DE OLIVEIRA et al., 2008). Em um estudo realizado por Hosseini-Vasoukolaei et al.

(2016), foi encontrada maior produção desta proteína por flebotomíneos fêmeas não infectadas quando comparadas com as infectadas. Em contraste, uma outra proteína da saliva deste mesmo vetor, a proteína PpSP44, foi associada a um perfil predominantemente do tipo Th2 e foi associada ao aumento de infecção por *L. major* em camundongos (DE OLIVEIRA et al., 2008).

Até a presente data, foram identificadas 17 moléculas que compõem a saliva do *L. longipalpis* e oito destas foram caracterizadas (Abdeladhim et al., 2014). As proteínas LJM11, LJM17, Lufaxin, Maxadilan e SALO foram as mais estudadas e com maior potencial de utilização para produção de vacinas ou utilizadas como biomarcadores de suscetibilidade, resistência ou exposição ao vetor.

2.4.1. Proteínas da família Yellow

A família de proteínas Yellow, maior família que compõe a saliva do *L. longipalpis*, são proteínas correlatas de outros insetos, como mosquitos, abelhas e moscas (NASH et al., 1983; HANES; SIMUTH, 1992; JOHNSON et al., 2001; XU et al., 2011; SIMA et al., 2016). Esta classe de proteínas atua removendo pequenos mediadores da hemostasia por possuir uma alta afinidade de ligação por essas proteínas, resultando em vasodilatação, efeito antiplaquetário e diminuição da permeabilidade vascular. Ademais, funcionam também como imunógenos indutores de resposta imune humoral e celular (XU et al., 2011; SIMA et al., 2016). LJM11, LJM111 e LJM17 compreendem as principais proteínas já identificadas pertencentes a esta família (XU et al., 2011).

Segundo Xu et al. (2011), em um estudo feito visando entender a função dessas proteínas, a LJM11 possui baixa afinidade por epinefrina e adrenalina, e alta afinidade por serotonina. Esta proteína também foi capaz de induzir uma resposta de hipersensibilidade do tipo IV (DTH) em camundongos imunizados com outras proteínas da saliva de *L. longipalpis* e conferiu proteção nos animais infectados com *L. major*.

Em contraste com a LJM11, a LJM111 se ligou com menor afinidade a serotonina e com alta afinidade as catecolaminas. Esta proteína não demonstrou ter caráter imunogênico, tendo em vista que não foi capaz de induzir resposta DTH ou produção de anticorpos. A proteína LJM111 possui ação anti-inflamatória, tendo em vista que esta foi capaz de inibir a produção de IFN- γ , TNF- α e IL-17 por leucócitos *in vitro*, inibiu a migração de neutrófilos em camundongos e afetou a maturação de

células dendríticas, influenciando no aumento da produção de IL-10 e diminuição na síntese de TNF- α (GRESPLAN et al., 2012).

A LJM17 se ligou com alta afinidade a histamina e a serotonina, sugerindo que esta proteína ajuda a diminuir a inflamação causada por esse composto na pele durante o repasto sanguíneo, uma vez que as aminas biogênicas são um grupo de mediadores pró-hemostáticos e pró-inflamatórios que podem obstruir a alimentação do flebótomo (ABDELADHIM et al., 2014). Em um estudo feito por Collin et al. (2009) foi encontrada resposta DTH induzida pelas proteínas LJM11 e LJM17 em cães.

2.5. LJM11 E LJM17 COMO BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AOS FLEBOTOMÍNEOS

As proteínas da saliva do flebótomo são capazes de estimular resposta humoral específica no hospedeiro, por isso foi sugerido na literatura seu uso como marcador de exposição à picada do inseto. Diversas proteínas foram testadas em relação ao seu reconhecimento por soro de três principais espécies envolvidas na epidemiologia da doença (humanos, cães e raposas). LJM11 e LJM17 foram reconhecidas tanto por soro de humanos quanto de cães residentes em áreas endêmicas para LV no Brasil (SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010; ABDELADHIM et al., 2014). Já soros de raposas só foram capazes de reconhecer a LJM17 (TEIXEIRA et al., 2010). A proteína LJM111 foi reconhecida apenas pelo soro de humanos. Soros de cães foram capazes de reconhecer, além das proteínas LJM11 e LJM17, também as proteínas LJM23, LJM13, LJM04 e LJM143 (Lufaxin). Sendo esta última fracamente reconhecida por humanos (TEIXEIRA et al., 2010; ABDELADHIM et al., 2014).

A combinação das proteínas LJM11 e LJM17 demonstrou sensibilidade similar ao uso do extrato total da glândula salivar (SGH), validando o uso destas proteínas como marcadores de exposição ao *L. longipalpis* em humanos (SOUZA et al., 2010). A validação da utilização dessas proteínas como marcadores de exposição ao *L. longipalpis* foi de extrema importância, já que a utilização de SGH como antígeno para ser utilizado em um teste sorológico em larga escala é impossível, tendo em vista que a obtenção das glândulas é bastante laboriosa e cara (QUINNELL et al., 2018).

Notavelmente, alguns estudos demonstraram sucesso na utilização das proteínas LJM11 e LJM17 como monitores de soroconversão em galinhas, podendo

assim serem usadas como sentinelas para identificar a presença de *L. longipalpis* em áreas endêmicas (SOARES et al., 2013; ABDELADHIM et al., 2014). Além disso, elas não demonstraram reatividade cruzada com as proteínas de *Lutzomyia intermedia*, principal vetor da *L. braziliensis*, causadora da leishmaniose cutânea no Brasil (SOUZA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010; ABDELADHIM et al., 2014).

Portanto, as proteínas LJM11 e LJM17 são antígenos promissores para a detecção de exposição à picada do vetor, uma vez que estudos demonstram que humanos e animais expostos à picada do inseto ou imunizados com proteínas da saliva podem produzir anticorpos que reconhecem proteínas específicas da saliva do vetor (GOMES et al., 2002; VINHAS et al., 2007; COLLIN et al., 2009). No entanto, o papel destas proteínas na infecção por *Leishmania* ainda é controverso, tendo em vista que esses anticorpos se correlacionaram com proteção contra *L. infantum* em humanos, sugerindo que a neutralização das proteínas da saliva pelos anticorpos anti-saliva durante os eventos iniciais da transmissão do parasito e a alta capacidade dessas proteínas induzirem resposta imune celular poderiam estar associadas à proteção contra o desenvolvimento da LV (GOMES et al., 2002; ANDRADE et al., 2007; AQUINO et al., 2010; BARRAL et al., 2010; VINHAS et al., 2010; GOMES; OLIVEIRA, 2012). Por outro lado, estudos também demonstraram que a resposta imune anti-saliva pode ser um marcador de intensidade de transmissão, como no estudo de coorte realizado por Quinzel et al. (2018), no qual os autores encontraram correlação positiva entre resposta imune contra o extrato total da glândula (SGH) do flebótomo com maior incidência de infecção por *L. infantum*. Apesar do estudo citado anteriormente não ter apresentado uma associação com a gravidade da doença, Solcà et al. (2016) demonstraram que maiores títulos de anticorpos anti-saliva (rLJM11+17) eram mais frequentes em cães com altas cargas parasitárias e que a frequência de animais expostos ao flebótomo foi maior nos grupos de animais com LVC grave.

Neste contexto, ainda não está bem elucidado se a produção de anticorpos contra estas proteínas presentes na saliva do vetor poderia estar relacionada a resistência ou susceptibilidade de cães à doença. A avaliação da resposta imune anti-saliva nos cães pode auxiliar no estabelecimento de biomarcadores referentes à susceptibilidade ou resistência, assim como marcadores de prognóstico da doença no cão. Dessa forma, encontrar marcadores de resistência ou susceptibilidade que sejam fáceis de ser detectados e que possam ser utilizados em larga escala é de

extrema importância para direcionar as medidas de controle da doença para apenas cães que sejam susceptíveis a LV e, portanto, com maior possibilidade de transmissão.

Propomos então neste estudo avaliar se há correlação entre a presença e os níveis de anticorpos contra a saliva de *L. longipalpis* no soro de cães com a ocorrência da leishmaniose visceral canina, seu prognóstico e desfecho clínico da doença, testando as proteínas recombinantes rLJM11 e rLJM17 (rLJM11+17) como marcadores de perfil de susceptibilidade ou resistência à doença.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Identificar marcadores de resistência e susceptibilidade a leishmaniose visceral em cães residentes em uma área para LVC.

3.2. ESPECÍFICOS

- Detectar e quantificar anticorpos reativos as proteínas LJM11/17 da saliva do vetor em uma coorte de cães de uma área endêmica para LVC.
- Detectar a infecção por *L. infantum* em uma coorte de cães de uma área endêmica para LVC.
- Avaliar o perfil imunológico de uma coorte de cães de uma área endêmica para LVC.
- Determinar a associação entre anticorpos reativos a LJM11/17 e infecção por *L. infantum*, carga parasitária e desfecho clínico de uma coorte de cães de uma área endêmica para LVC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho consistiu em um estudo de coorte, no qual foram realizadas avaliações clínicas e coleta de amostras biológicas de cães durante 24 meses. Estes cães foram selecionados em uma área endêmica para LVC a partir de um estudo de corte transversal (*baseline*).

O critério de seleção dos animais para serem incluídos no estudo de coorte foi a assinatura do termo de consentimento por seus guardiões, terem mais de 6 meses de idade e a possibilidade dos cães serem acompanhados, a cada 3 meses, durante 2 anos.

Os animais incluídos no estudo permaneceram com seus guardiões e os exames foram realizados periodicamente em suas residências entre os anos de 2014 e 2017. Além disso, foi prestada assistência veterinária não só para os cães participantes do estudo, como também aos demais cães pertencentes a cada guardião.

Este estudo foi desenvolvido no Instituto Gonçalo Moniz (FIOCRUZ-BA) no Laboratório de Patologia e Biointervenção (sucedido em parte pelo Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia) e foi aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-CPqGM) da FIOCRUZ, sob o protocolo: 007/2013, validade: 02/10/2017 (Anexos A e B). Todos os guardiões dos animais incluídos no estudo foram esclarecidos quanto aos procedimentos a serem realizados e assinaram um termo de consentimento (Anexo C).

4.2. ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi realizado em Jauá, Machadinho e Jacuípe, áreas endêmicas para LVC, pertencentes ao município de Camaçari-BA (Figura 1), situado na latitude 12°41'51" Sul e longitude 38°19'27" Oeste, com altitude média de 36 metros. O município de Camaçari possui uma área territorial de 784,7 km², com uma população de 242.970 habitantes, densidade demográfica de 309,65 hab/km² e está localizado a 41 km de Salvador, segundo o último censo demográfico realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2010. Em 2017, a população estimada foi de 296.893 habitantes (IBGE, 2017). Os bairros de Jauá, Machadinho e Jacuípe foram escolhidos por apresentarem alta prevalência de

leishmaniose visceral canina em um estudo epidemiológico anterior (Gonçalves, 2014), além disso, Jauá e Jacuípe são áreas geográficas nas quais podem ser detectados grandes números de flebotomos (Silva, 2016).

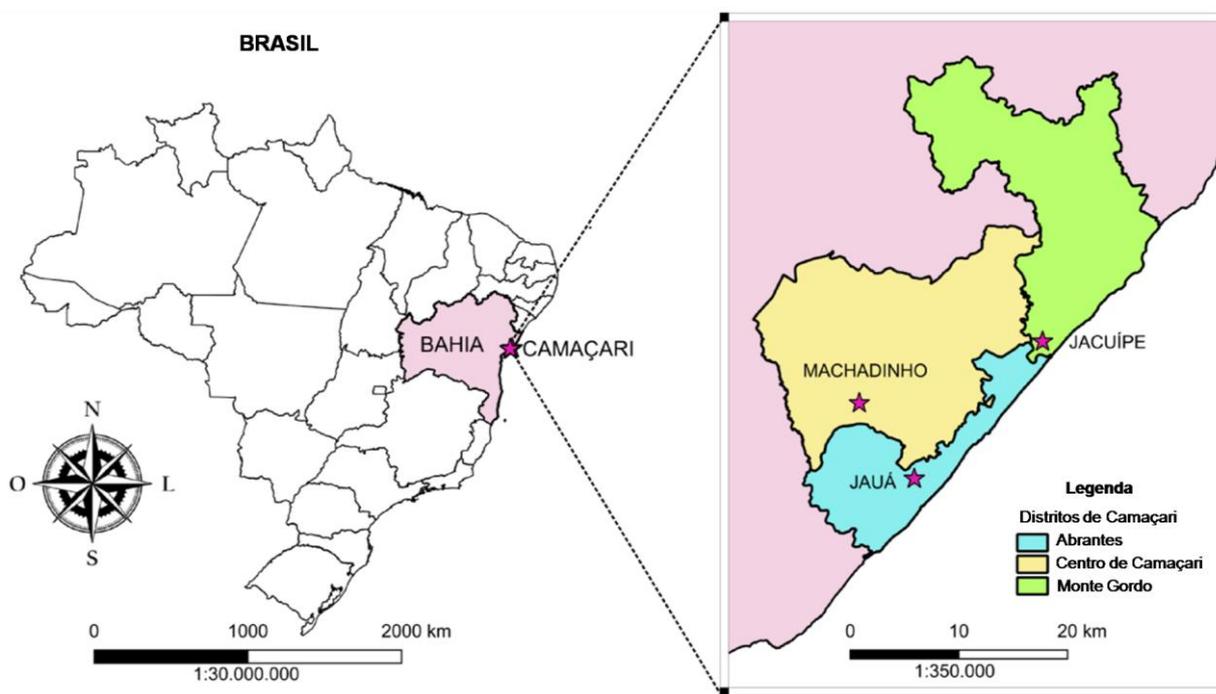


Figura 1. Mapa da área do estudo realizado em Camaçari-BA.

4.3. AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS CÃES E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No *baseline* e depois durante o período de 2 anos, os animais incluídos no estudo foram reavaliados a cada três meses quanto ao seu quadro clínico e foram realizadas coletas de sangue (Figura 2). Os parâmetros avaliados no exame clínico foram: estado nutricional, coloração das mucosas, volume do baço e linfonodos, onicogribose, úlceras em orelha, despigmentação em focinho, hiperqueratose em focinho, lesão no focinho, alopecia e dermatite furfurácea (Anexo D). Os animais receberam uma pontuação que variou entre 0 (ausente), 1 (discreta) e 2 (intensa) em cada um dos parâmetros avaliados. O escore clínico em cada ponto de avaliação dos animais foi atribuído pela soma dos valores de cada um desses parâmetros. Os cães que obtiveram escores menor ou igual a 3 foram classificados como animais sem manifestação clínica característica de LVC e os que obtiveram escore maior do que 3 foram classificados como animais apresentando manifestação clínica. Após

cada exame clínico foram coletadas amostras de sangue das veias cefálica, jugular ou safena lateral.

Além da avaliação física e da coleta de sangue, a cada 6 meses também foram realizadas biópsias de pele e punções de baço para coleta de aspirado esplênico. A biópsia de pele com uma lâmina circular (punch dermatológico) de 3mm foi realizada na região escapular esquerda e o aspirado esplênico foi coletado com conforme método descrito por Barrouin-Melo et al., 2006. Entre as duas últimas avaliações do período do estudo houve um intervalo de 6 meses. (Figura 2). Desta forma o estudo de coorte consistiu em 7 pontos de avaliação realizados aos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 24 meses após a inclusão (*baseline*) de cada animal (Figura 2).

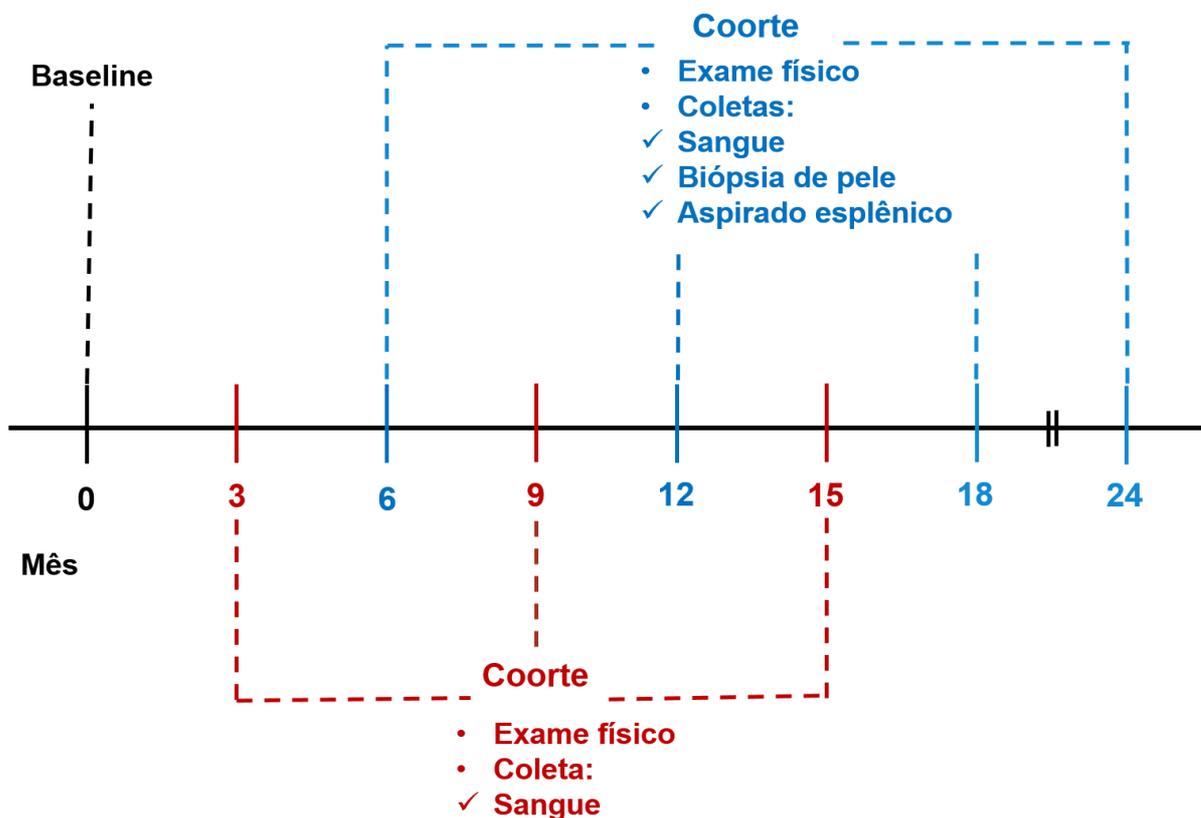


Figura 2. Cronograma de acompanhamento dos animais incluídos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.

4.4. EXTRAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS DOS CÃES

A extração do DNA das amostras de sangue, pele e aspirado esplênico foi realizada utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue* da (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo os seguintes passos:

a) para extração do DNA das amostras de sangue, a quantidade de 200µl do sangue foi incubada juntamente com 20µL de proteinase K e 200µL do tampão AL durante 30 minutos em banho-maria à 56°C. Após este período, foi adicionado 200µL de etanol 96%, a amostra foi então levada ao vórtex e homogeneizada por 15 segundos e centrifugada por 30 segundos a 8000 rpm. O volume final foi transferido para uma mini coluna (DNeasy Mini Spin) e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. Após a primeira filtragem, foram feitas 3 lavagens, sendo as duas primeiras utilizando 500µL do tampão AW1 e a última 500µL do tampão AW2. Foi feita então uma centrifugação a 12000 rpm durante 3 minutos. A coluna foi transferida para um microtubo e foi aplicado 100µL do tampão AE (eluição) diretamente na membrana do filtro presente na coluna. Foi realizada incubação por 5 minutos em temperatura ambiente e após este período, foi feita centrifugação a 8000 rpm durante 1 minuto, sendo obtido assim o DNA purificado.

b) para a extração do DNA do aspirado esplênico, o mesmo procedimento foi utilizado diferindo apenas no primeiro passo e no passo da eluição. No primeiro passo, a quantidade de 200µL da amostra do aspirado foi macerada e incubada juntamente com 20µL de proteinase K e 200µL do tampão AL durante 18 horas no banho-maria à 56°C. A eluição do DNA foi feita utilizando 200µL do tampão AE.

c) para extração do DNA do fragmento de 3mm de pele, o mesmo protocolo foi realizado com algumas diferenças nas primeiras etapas e na etapa de eluição. O fragmento de pele foi cortado utilizando lâmina de bisturi sobre uma lâmina de vidro, obtendo oito pedaços. O tecido cortado foi transferido para um microtubo contendo 180µL do tampão ATL e 20µL de proteinase K. O conteúdo foi homogeneizado no vórtex por 15 segundos, seguido de centrifugação por 15 segundos a 8000 rpm e então foi incubado no banho-maria à 56°C por 18 horas. Após a incubação, a amostra foi homogeneizada no vórtex por 15 segundos e então foram adicionados 200µL do tampão AL. Foi repetida a homogeneização e a amostra foi centrifugada durante 15 segundos a 8000 rpm. Foram adicionados então 200µL de etanol 96%. Os passos subsequentes foram executados conforme o descrito para extração de DNA em amostra de sangue, com exceção da eluição do DNA que foi realizada com 80µL do tampão AE. Uma alíquota de 2µL de cada amostra foi utilizada para a quantificação do DNA no aparelho Nanodrop a título de verificação da qualidade do DNA extraído.

4.5. DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

Foram feitos testes sorológicos, parasitológico e molecular para o diagnóstico de infecção por *L. infantum* nos animais.

4.5.1. Testes Sorológicos

O Teste rápido de triagem DPP-LVC (Biomanguinhos, Rio de Janeiro) e o teste confirmatório EIE-LVC (Biomanguinhos, Rio de Janeiro) foram realizados com as amostras de soro coletadas de cada animal em cada um dos pontos de avaliação, conforme as orientações do fabricante.

4.5.2. qPCR

Foi realizada a técnica de qPCR duplex para detecção e quantificação de DNA do cinetoplasto de *L. infantum* e de uma região conservada do gene de expressão constitutiva em mamíferos 18S rRNA (gb|DQ287955.1) em amostras de sangue, pele e aspirado esplênico de cada cão. As sequências de iniciadores utilizados para a amplificação do DNA de *Leishmania* foram: LEISH-1, 5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'; LEISH-2, 5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'; e LEISH-P, 5'-FAMAAAAATGGGTGCAGAAAT-MGB/NFQ-3'. Enquanto as sequências para detecção do DNA canino foram: 18SCanis_F, 5'-TGCGAATGGCTCATTAAATC-3'; 18SCanis_R, 5'-CGTCGGCATGTATTAGCTCT-3'; e 18SCanis_P, 5'-HEX-TGGTTCCTTTGGTCGCTCGCT-BHQ1-3'.

A técnica foi composta pelos seguintes itens: 5 µL do DNA extraído das amostras de sangue, pele ou aspirado esplênico, a *Mastermix* da PCR *Multiplex* (IBMP/Fiocruz-PR, Brazil), 40 nM do iniciador 18SCanis_P, 160 nM dos *primers* 18SCanis_F e 18SCanis_R cada, 900 nM dos iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 cada e 200 nM do iniciador LEISH-P, e foi realizada conforme descrito por Rampazzo et al. (2017).

4.5.3. Teste Parasitológico

As amostras de aspirado esplênico foram cultivadas em meio NNN acrescido de meio Schneider a 20%. As culturas foram mantidas por 4 semanas em estufa com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. As culturas que apresentaram crescimento de promastigotas pela visualização ao microscópio óptico foram consideradas como positivas.

4.6. CLASSIFICAÇÃO DOS CÃES QUANTO A SUSCEPTIBILIDADE E RESISTENCIA A LVC

Os animais do estudo foram classificados como susceptíveis, resistentes ou negativos. Os animais classificados como negativos foram aqueles que apresentaram resultado negativo para o diagnóstico infecção por *L. infantum* em todos os pontos de avaliação do estudo independentemente do escore clínico apresentado. O critério de elegibilidade para classificação como susceptível ou resistente consistiu em os cães terem sido acompanhados por pelo menos dois pontos de avaliação após terem tido o diagnóstico de infecção confirmado.

Os animais foram classificados como susceptíveis quando após um diagnóstico de infecção positivo, apresentaram-se com manifestação clínica (escore > 3) por mais de 2 pontos de avaliação, independentemente do diagnóstico nestes pontos, sendo que a avaliação do escore foi considerada a partir do momento em que ele se tornou positivo para infecção junto com a manifestação clínica (escore > 3). Adicionalmente, os animais que tiveram um agravamento do escore seguido por óbito ou eutanásia por LVC ao longo do estudo também foram considerados como susceptíveis.

A classificação como resistente ocorreu nos animais seguindo as 3 premissas a seguir:

- i. animais que tiveram um diagnóstico positivo de infecção sem manifestação clínica (escore ≤ 3) e se mantiveram como negativos, ou até mesmo positivos para infecção, porém sem manifestação clínica ao longo do acompanhamento.
- ii. animais que após um diagnóstico positivo infecção com manifestação clínica se mantiveram sem manifestação clínica ou até mesmo como negativos para infecção com redução do escore clínico para valores ≤ 3 por 2 pontos de avaliação seguidos.
- iii. animais que durante o período de acompanhamento tiveram apenas um episódio de positividade para infecção junto com um aumento de escore clínico, porém mostraram redução do escore e negatividade para infecção nos tempos subsequentes.

Animais que não se encaixaram em nenhuma das descrições acima foram classificados como perfil indeterminado.

4.7. AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO AO VETOR

Para avaliar a exposição dos cães a picada do vetor foi empregado o ELISA indireto para a detecção de anticorpos contra as proteínas recombinantes rLJM11 e rLJM17 (rLJM11+17) da saliva do vetor. As placas foram sensibilizadas com as proteínas purificadas da saliva do *L. longipalpis*, o equivalente a 5 pares de glândulas salivares / mL, com 1 µg de cada proteína recombinante / mL (utilizadas em combinação) em tampão carbonato bicarbonato (NaHCO₃ 0,45 M, 0,02 M de Na₂CO₃, pH 9,6), por uma noite a 4°C. Após três lavagens com PBS-Tween a 0,05%, as placas foram bloqueadas durante 1 hora a 37°C com PBS-Tween a 0,05% acrescido de BSA a 4%. Os soros dos cães foram diluídos a 1:50 com PBS-Tween a 0,05% e incubados durante a noite a 4°C. Após três lavagens, os poços foram incubados com fosfatase alcalina conjugada com anti-IgG canina (Sigma, Ir Louis, MO) em uma diluição de 1:10000 durante 1 hora a 37°C. Após mais um ciclo de lavagem com PBS-Tween a 0,05%, foi adicionada à placa uma solução cromogênica de p-nitrofenila em tampão carbonato bicarbonato com pH 9,6 com 1 mg / mL de MgCl₂, e então a placa foi incubada a temperatura ambiente ao abrigo da luz durante 40 minutos para o desenvolvimento da cor na reação. As amostras foram avaliadas em duplicata em cada placa, o ponto de corte foi determinado como a média da densidade óptica (DO) de três controles negativos mais 2.5 desvios padrão. Os controles negativos consistiram em soros de cães da raça *Beagle*, adquiridos para fins de pesquisa em um projeto anterior, sem qualquer exposição aos flebótomos. Em todas as placas, um painel de amostras negativas e positivas foi inserido para cálculo do ponto de corte e controle da reação. A leitura dos resultados foi feita no espectrofotômetro, utilizando onda de 405 nm de comprimento.

4.8. VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS RLJM11+17

O ELISA indireto foi empregado para a detecção de anticorpos contra o sonicado da glândula salivar (SGS) do vetor *L. longipalpis* para comparação com os

resultados do ELISA realizado com as proteínas rLJM11+17. As placas foram sensibilizadas com SGS do *L. longipalpis*, o equivalente a 5 pares de glândulas salivares/mL (aproximadamente 5µg/mL) em tampão carbonato bicarbonato (NaHCO₃ 0,45 M, 0,02 M de Na₂CO₃, pH 9,6), por uma noite a 4°C. As demais atividades do protocolo da reação foram executadas conforme o descrito na metodologia do ELISA realizado no item 4.7.

4.9. AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DOS CÃES

Os níveis sorológicos de citocinas e quimiocinas foram dosados pela técnica de Luminex (Milliplex Map Kit, EUA). Os marcadores caninos examinados foram IFN-γ, IL-10, TNF-α, IL-2, IL-6, IL-7, IL-15, IL-8, CCL2, CXCL10, GM-CSF e CXCL1. O protocolo utilizado consistiu em: as placas foram preparadas com 200 µL do tampão de ensaio, incubadas em agitação por 10 minutos, submetidas a três lavagens e logo após a última lavagem foram adicionados 25 µl da solução padrão juntamente com 25 µL do tampão de ensaio e 25 µL da matriz de solução. Foram então adicionadas as amostras de soro na diluição de (1:3) nos poços adequados. Logo após, as microesferas foram adicionadas aos poços e a placa foi selada submetida a agitação a 4° C (geladeira) por uma noite.

Após este período, as placas foram submetidas novamente a três lavagens utilizando-se um suporte magnético para que as microesferas não fossem descartadas. O passo seguinte consistiu em adicionar 25 µl do anticorpo de detecção e as placas foram mantidas em agitação à temperatura ambiente por 1h. Streptavidina conjugada com Picoeritrina foram então adicionadas aos poços e as placas foram mantidas novamente em agitação durante 1h à temperatura ambiente. As placas foram submetidas a uma última lavagem, posteriormente foi adicionado o fluido de calibração para ressuspensão das microesferas e as placas foram agitadas por 5 minutos. Por fim, as placas foram lidas no aparelho MAGPIX® com o software xPONENT®.

As concentrações de PGE₂ e LTB₄ foram mensuradas utilizando a técnica de ELISA (*Cayman Chemical*, EUA). Foram adicionados 50 µL das amostras às placas na diluição de 1:500 em tampão de ELISA, tanto para a dosagem de PGE₂ quanto para de LTB₄. Logo após, foram adicionados 100 µL apenas do tampão de ELISA

nos poços dos controles negativos. Em seguida, 50µL de cada concentração referente à curva padrão foram adicionados mais 50 µL do PGE₂ ou LTB₄ *AchE Tracer*. Foram adicionados também 50 µL dos anticorpos monoclonais anti-PGE₂ ou anti-LTB₄. As placas foram incubadas a 4°C por 18h. Após esse período, as placas foram lavadas 5 vezes e foi adicionado o reagente de Ellman para a revelação. As placas então foram mantidas em agitação por 1 hora e meia ao abrigo da luz. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com o comprimento de onda de 402 nm.

4.10. ANÁLISES

Os animais foram considerados positivos para infecção por *L. infantum* quando apresentaram positividade para ambos os testes sorológicos: DPP e EIE Biomanguinhos, e/ou apresentaram crescimento de *Leishmania* na cultura esplênica e/ou detecção de DNA de *Leishmania* na qPCR em pelo menos um dos tecidos avaliados.

Para validar o uso das proteínas rLJM11+17 como marcador de exposição em substituição ao SGS, foi realizada uma amostragem de 157 dos 285 animais incluídos no acompanhamento. Dentre os 157, 74 animais haviam apresentado resultado positivo para rLJM11+17 e 83 animais haviam testado como negativos para rLJM11+17 anteriormente. Estes soros foram então testados simultaneamente para SGS e rLJM11+17, com o intuito de realizar os ensaios sob as mesmas condições. Foram então realizados os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), razão de verossimilhança e índice de concordância de *Kappa*. As análises foram realizadas no programa GraphPad Prism 5 e Stata 13. Como critério de positividade do ELISA para SGS e do ELISA com as proteínas rLJM11+17, as amostras que tiveram um valor de DO acima do ponto de corte calculado foram consideradas como reagentes. O índice de reatividade (IR), que consiste na relação DO/ponto de corte, foi calculado no intuito de normalizar os resultados das placas do ELISA tanto para a exposição ao vetor quanto para LVC.. Os termos “expostos” e “não expostos” ao vetor foram utilizados para nomear evidência ou não de exposição ao flebótomo, respectivamente, tendo em vista que não podemos garantir que animais cujos níveis de anticorpos anti-saliva eram

menores do que o cut-off no início do estudo eram realmente nunca expostos, já que estes poderiam ter sido expostos anteriormente a nossa detecção e os anticorpos já terem decaído a níveis não detectáveis. Adicionalmente foi avaliada a ocorrência de reexposição ao vetor, que foi definida por um aumento no IR do ELISA maior ou igual ao dobro do IR anterior.

Para avaliar a associação entre exposição ao vetor e a manifestação clínica da LVC, devido ao fato do estudo tratar-se de um acompanhamento e por existirem mais de duas medidas repetidas do desfecho ao longo do tempo para cada animal, foi necessário utilizar modelagem logística multinível com intercepto aleatório, pois esta leva em consideração essas repetições deixando as análises mais confiáveis, além de ser possível avaliar cada indivíduo e não uma média populacional. O desfecho de interesse foi a manifestação clínica da LVC, medido em 7 ocasiões (aos 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 24 meses após a inclusão do cão no estudo). As co-variáveis de interesse foram IR do ELISA rLJM11+17, IR do ELISA *Leishmania*, carga parasitária do baço, presença de anemia e trombocitopenia, e FA e ALT aumentadas, que também foram medidas nos mesmos 7 tempos do desfecho. Avaliou-se primeiramente se os dados faltantes exibiam distribuição aleatória (MAR) usando-se o teste CDM de Little. A hipótese foi de que os dados faltantes apresentavam distribuição completamente aleatória. Posteriormente, o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) foi estimado para levar em consideração a dependência entre as medidas repetidas de cada animal nas análises estatísticas. O programa Stata 13 foi utilizado para a realização das análises descritas acima.

O programa Graphpad Prism 5 foi utilizado para realizar os testes estatísticos descritos a seguir: i) o teste de Qui-Quadrado foi utilizado para verificar diferença entre a distribuição dos animais por área do estudo; ii) o teste de normalidade D'Agostino & Pearson foi utilizado e a distribuição dos dados se mostrou em sua maioria não paramétrica; iii) para detectar diferença nos níveis de anticorpos anti-saliva e anti-*Leishmania* entre susceptíveis e resistentes em cada tempo de infecção foi utilizado Teste T de Student quando os dados se apresentaram paramétricos e Teste de Mann-Whitney quando estes se apresentaram não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Comparação Múltipla de Dunn foram utilizados para comparar diferenças nos níveis de anticorpos intragrupo entre os pontos de infecção. Análise semelhante foi utilizada para identificar diferença entre as medianas dos níveis de anticorpos anti-saliva entre reexpostos e não reexpostos,

com o teste de Mann-Whitney para testar diferenças entre os grupos e o teste de Kruskal-Wallis mais pós teste de Comparação Múltipla de Dunn para verificar diferença intragrupo em cada ponto de observação. Dentro da classificação de reexpostos e não reexpostos, também foi utilizado o teste de Qui-Quadrado de Tendência com intuito de checar se haveria diferença na distribuição de animais negativos, resistentes e susceptíveis entre os dois grupos.

O programa Epi InfoTM 7.0.1 (*Center for Disease Control and Prevention-CDC, EUA*) foi utilizado para análise de associação entre a susceptibilidade para LVC e a reexposição às proteínas da saliva do vetor. Para essas análises foram calculados os valores de risco relativo (RR).

O programa JMP 13 foi utilizado para a Análise Hierárquica de Clusters (Método de Ward) dos marcadores imunológicos e inflamatórios e para a realização de análise pareada entre a produção desses marcadores nos tempos antes, durante e após infecção por *L. infantum*, utilizando o Teste de Wilcoxon.

Os resultados com valores de $p < 0.05$ foram considerados como estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÃES ESTUDADA

A população total de cães incluídos no estudo, a partir do *Baseline*, foi de 285 cães residentes em Jauá, Jacuípe e Machadinho, áreas pertencentes ao Município de Camaçari-BA. A maioria dos animais era sem raça definida (SRD) (87%), utilizados tanto para companhia quanto para guarda (62%), domiciliados (58%), machos (52%) e com a mediana de idade de 3 anos. Quanto a distribuição por área, a maior parte desses animais estava concentrada em Machadinho, com 42% (119/285) da população. Dos outros 58% dos cães avaliados, 30% (86/285) eram residentes de Jacuípe e 28% (80/285) residentes de Jauá. As três áreas estudadas foram comparáveis quanto as categorias descritas (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição da população de cães incluídos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA

Categoria	Jauá (N=80)		Jacuípe (N=86)		Machadinho (N=119)		p
	n	%	n	%	n	%	
Sexo							
Macho	39	49	49	57	60	50	0,52
Fêmea	41	51	37	43	59	50	
Raça*							
Pura	10	12	16	19	10	9	0,1
SRD	70	88	70	81	108	91	
Utilidade*							
Companhia	30	38	8	9	30	26	<0,05
Guarda	10	12	14	16	17	14	
Ambos	40	50	64	75	71	60	
Manejo*							
Domiciliado	26	32	60	70	78	66	0,6
Semi-domiciliado	54	68	24	28	39	33	
Errante	0	0	2	2	1	1	
Mediana de idade	3 anos		3 anos		3 anos		

*Não foi possível resgatar informação de 1 cão da localidade de Machadinho

5.2. DINÂMICA DE ACOMPANHAMENTO DOS CÃES NO ESTUDO DE COORTE

Dos 285 cães recrutados no início do estudo, 124 cães foram acompanhados por 24 meses, tendo ocorrido uma perda de seguimento de 56% (161/285) ao final do estudo (Figura 3).

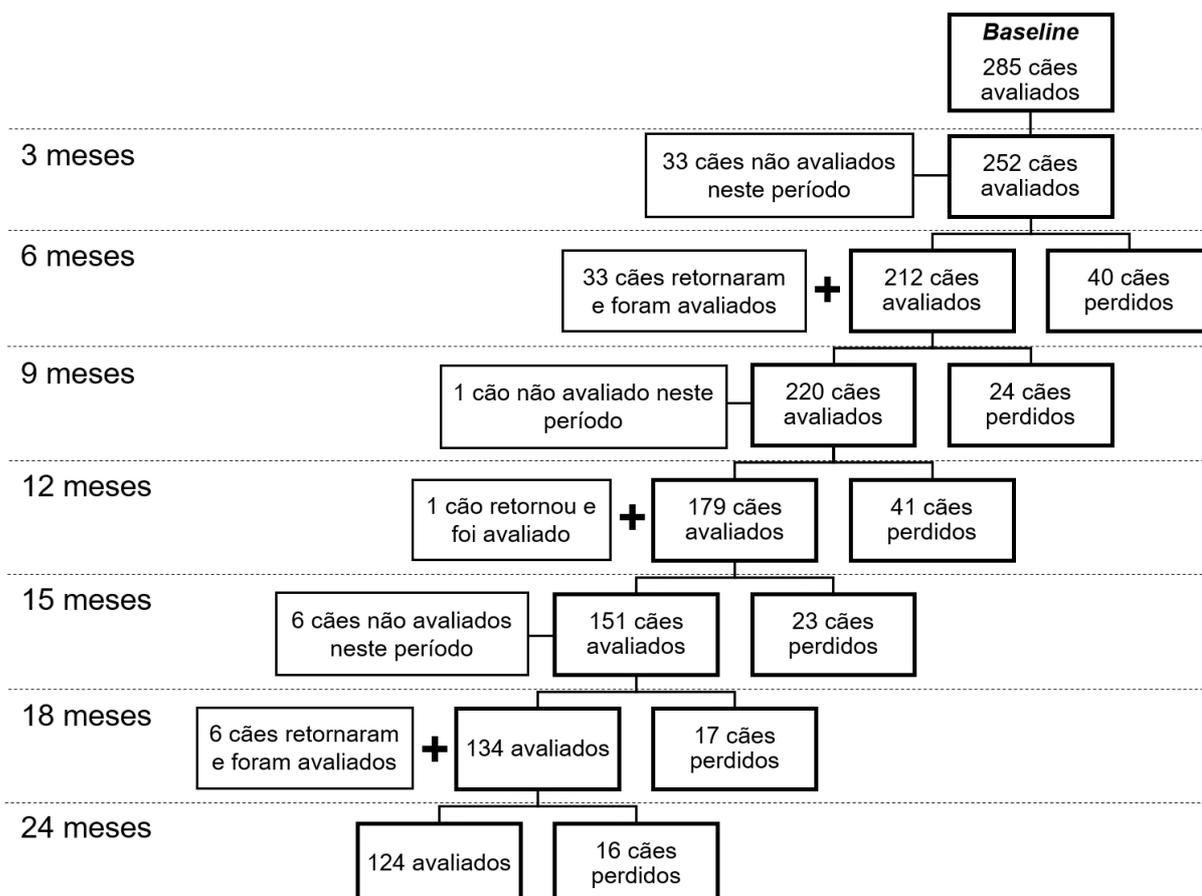


Figura 3. Esquema de acompanhamento dos cães incluídos no estudo de coorte acompanhados em cada período do estudo realizado em Camaçari-BA e a perda de seguimento.

A perda de seguimento de 56% ao final de 24 meses ocorreu principalmente devido a morte não relacionada à LVC e mudança de residência, perfazendo, respectivamente, 34% (54/161) e 17% (30/161) das perdas.

5.3. VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS RLJM11+17 COMO MARCADOR DE EXPOSIÇÃO AO VETOR

Para validar a utilização das proteínas rLJM11+17 como um marcador de exposição a saliva de flebotomíneos, foi avaliada a reatividade de um painel de soros testado com ELISA utilizando rLJM11+17 e ELISA com SGS. Nessa avaliação foi observada uma forte correlação positiva ($r=0,91$; $p<0,0001$) entre os resultados do ELISA utilizando-se SGS e os do ELISA utilizando-se rLJM11+17 (Figura 4A). Adicionalmente, os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e razão de verossimilhança foram, respectivamente, 81% (IC: 71-89), 92% (IC: 83 – 97), 92% (IC: 83 – 97), 80% (IC:70-88) e 9.8, demonstrando que essas proteínas recombinantes tiveram desempenho semelhante ao do SGS (Figura 4B). Reforçando esses resultados, o índice de concordância *Kappa* foi de 0.72 ($p<0,0001$), demonstrando uma boa concordância entre os ELISA (LANDIS; KOCK, 1977).

Adicionalmente, os valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e razão de verossimilhança foram maiores ou próximos dos encontrados por Souza et al. (2010), em um estudo anterior que validou a utilização dessas proteínas recombinantes LJM11+17 como marcadores de exposição ao vetor em substituição ao SGS em soro de humanos. Desta forma, confirmamos que o ELISA com rLJM11+17 pode ser usado para avaliação de exposição de cães a saliva de *Lu. longipalpis* em substituição a utilização de SGS como antígeno que inviabilizaria ensaios sorológicos em larga escala por sua obtenção ser laboriosa e por necessitar da presença constante e manutenção de colônia de flebótomos mantidas em insetário.

A utilização destas proteínas recombinantes como biomarcadores de exposição pode ser útil para rastrear soros caninos de áreas endêmicas para leishmaniose visceral, possibilitando assim a avaliação da eficácia de medidas de controle de vetores, como a utilização de coleiras impregnadas com repelentes, e também para estimar o risco de transmissão de *L. infantum* em cães. Além disso, poderia facilitar também o reconhecimento de novas áreas cuja presença do vetor ainda não foi identificada, monitorando assim a possível expansão da transmissão.

Com base nesses resultados, foram utilizadas as proteínas rLJM11+17 para detectar e mensurar a exposição dos animais avaliados neste presente estudo ao vetor da LVC.

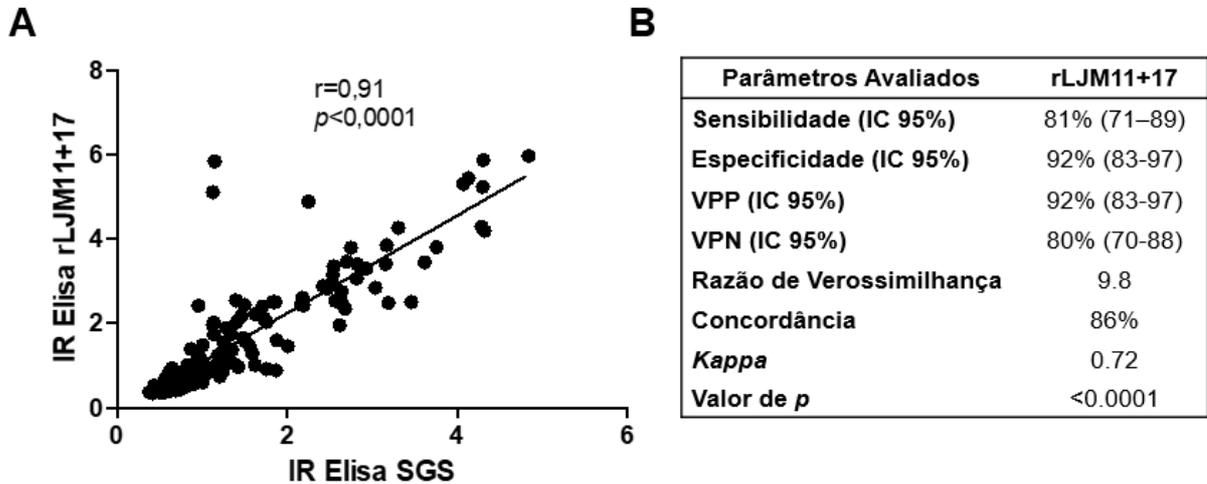


Figura 4. Validação das proteínas rLJM11+17 como marcadores de exposição ao flebótomo utilizando um total de 157 animais da área endêmica testados para detecção de anticorpos anti-SGS e anti-rLJM11+17. **(A)** Correlação entre IR detectados em ELISA anti-SGS e ELISA anti-LJM11+17. **(B)** Resultados de sensibilidade, especificidade, VPP (valor preditivo positivo), VPN (valor preditivo negativo), razão de verossimilhança e índice de concordância *Kappa* do ELISA utilizando rLJM11+17 quando comparado ao ELISA com SGS.

5.4. DINÂMICA DE EXPOSIÇÃO AO VETOR NOS CÃES ACOMPANHADOS

Dos 124 cães que foram acompanhados até o final que participaram de todos os inquéritos dos acompanhamentos, foi possível avaliar a exposição a saliva do vetor em 111 animais e em 13 animais não foi possível, pois não houve quantidade de soro suficiente para utilização no ELISA. Dentre esses 111 animais avaliados, 41% (46/111) ainda não haviam sido expostos ao vetor na primeira avaliação, e 59% (65/111) já haviam sido expostos. Quanto ao diagnóstico de infecção por *L. infantum*, dentre os 46 que não haviam sido expostos ao vetor a positividade para infecção foi de 59% (27/46) e dentre os expostos ao vetor a positividade para infecção foi de 49% (32/65) (Figura 5).

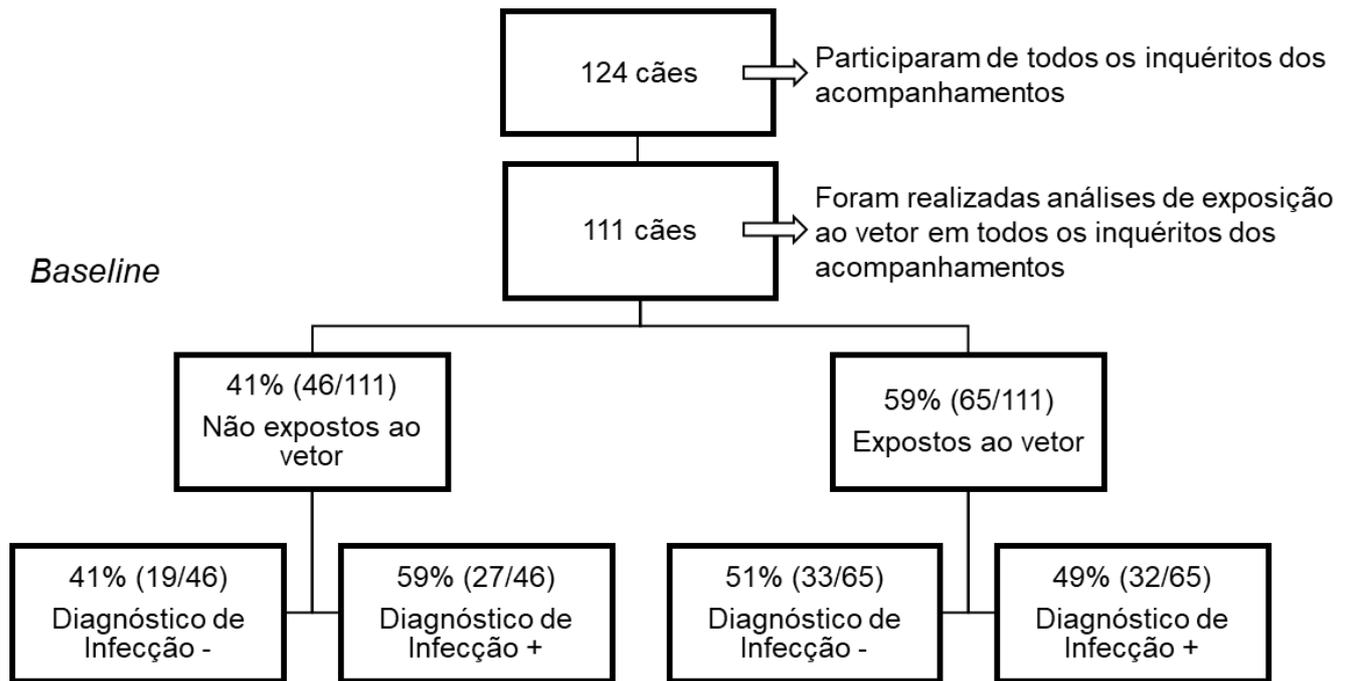


Figura 5. Proporção de cães expostos e não expostos ao vetor, com a frequência de positivos e negativos para infecção por *L. infantum* no início do estudo, levando em consideração os animais que participaram de todos os acompanhamentos do estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.

Durante o acompanhamento, ao analisarmos a incidência de exposição ao vetor, levando em consideração os 46 animais que iniciaram o estudo como negativos para esta exposição, percebemos que, após 6 meses de acompanhamento, a maioria dos animais, 78% (32/46), se tornaram expostos e, ao final dos 24 meses de acompanhamento, 96% (44/46) já haviam se tornado expostos. Esses resultados demonstram a rapidez e a intensidade com que os animais são picados pelos flebótomos nessa área endêmica, demonstrando mais uma vez a importância do cão para a manutenção do ciclo da doença (Figura 6A e B). Quinzel et al. (2018) também relataram a rapidez com que cães sentinelas, previamente não expostos, se tornaram expostos ao serem introduzidos em uma área endêmica, levando em média 65 dias para que a exposição natural ao flebótomo ocorresse.

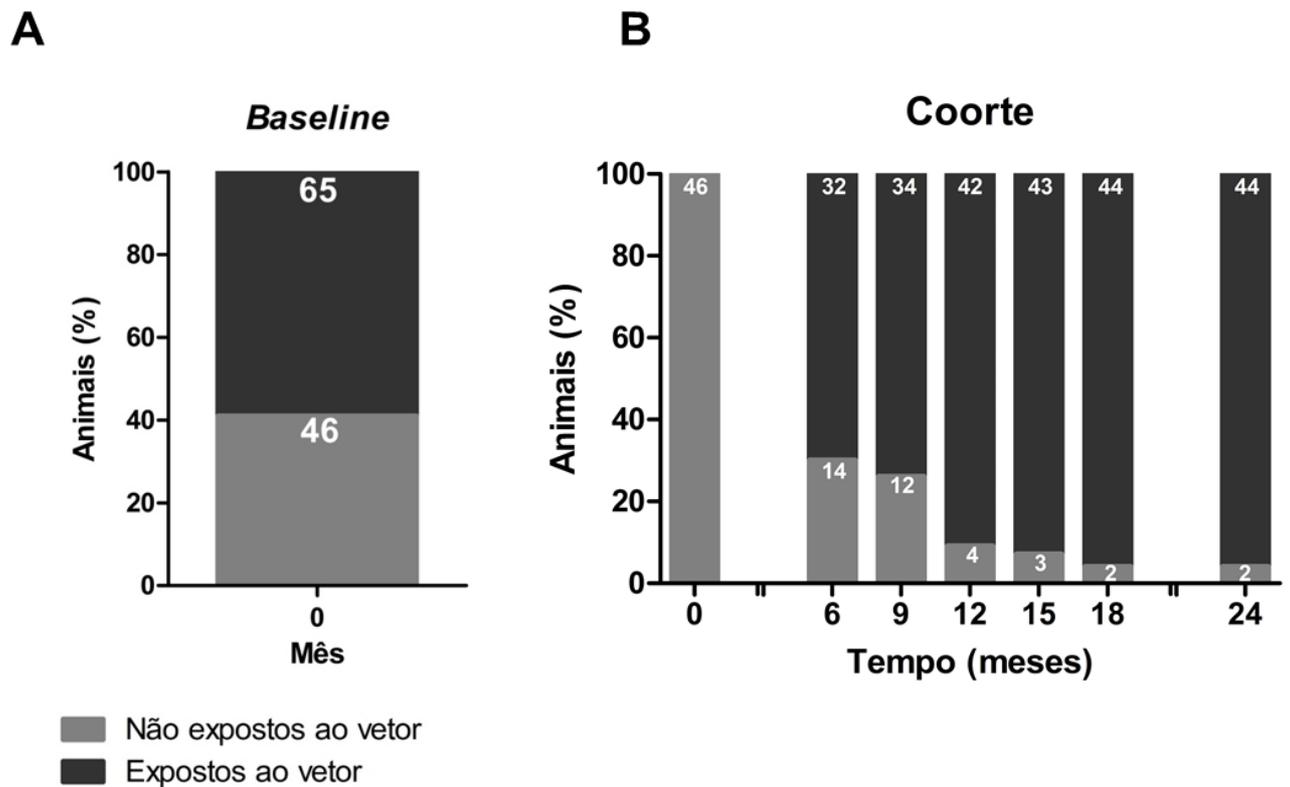


Figura 6. Dinâmica de exposição ao vetor em cães acompanhados por 2 anos no estudo de coorte realizado em Camaçari-BA. **(A)** Prevalência de exposição ao vetor nos animais avaliados no início do estudo (*Baseline*). **(B)** Incidência cumulativa de exposição ao vetor durante o acompanhamento de 24 meses dos cães negativos no *Baseline*.

5.5. AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE EXPOSIÇÃO AO VETOR E DE INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*

Uma subcoorte foi estabelecida para avaliação da associação entre a incidência de exposição ao vetor e a incidência de infecção por *L. infantum*, assim como o tempo entre essas (Figura 7). A subcoorte foi composta de 19 animais selecionados dentre os 111 cães avaliados quanto a exposição ao vetor. Esses 19 cães apresentavam resultados negativos para a exposição ao vetor e para infecção por *Leishmania* no *baseline*.

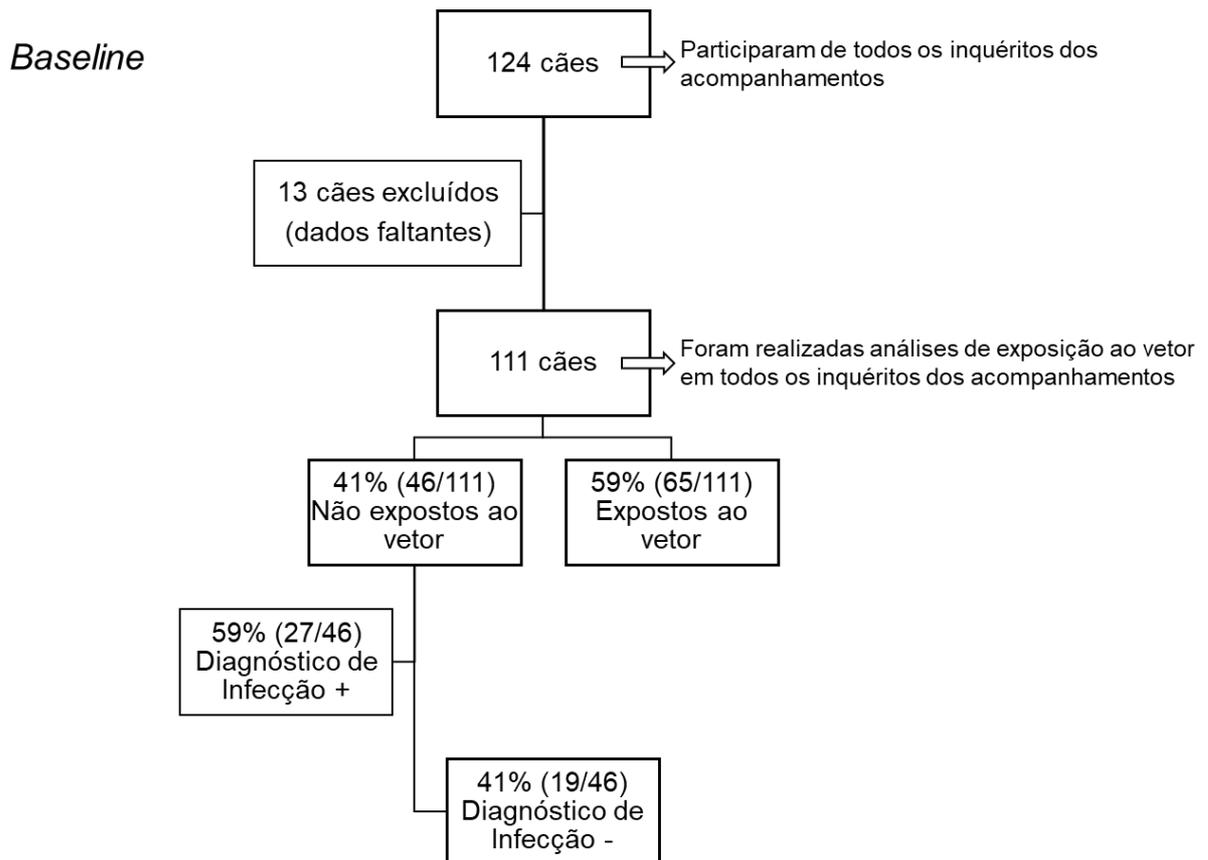


Figura 7. Fluxograma justificando a seleção dos animais que fizeram parte da sub coorte. Foram selecionados os animais que começaram o estudo não expostos ao vetor e negativos para infecção por *L. infantum*. Foram excluídos os animais que começaram o estudo expostos ao vetor e/ou positivos para infecção por *L. infantum* e/ou que não foi possível realizar a análise de exposição em todos os acompanhamentos.

Como pode ser observado na Figura 8, o aumento da taxa de incidência de infecção por *L. infantum* acompanhou o aumento da incidência de exposição aos flebótomos durante os 24 meses de acompanhamento. Depois de 24 meses, 95% (18/19) dos cães haviam sido expostos ao vetor e destes, 83% (15/18) se encontravam positivos para infecção por *L. infantum*. Estes dados corroboram ao encontrado em um trabalho realizado por Quinnel et al. (2008), no qual animais não infectados e com alto nível de exposição ao vetor tiveram mais chances de se infectarem na avaliação subsequente. Adicionalmente, anticorpos anti-saliva foram sugeridos por Vlkova et al. (2018) como marcadores de risco de transmissão de *L. infantum* em área endêmica. A possível justificativa para estes achados deve-se ao fato de que quanto mais o animal é exposto ao vetor, maior é a chance do animal ser picado por um flebótomo infectado e então ocorrer a infecção.

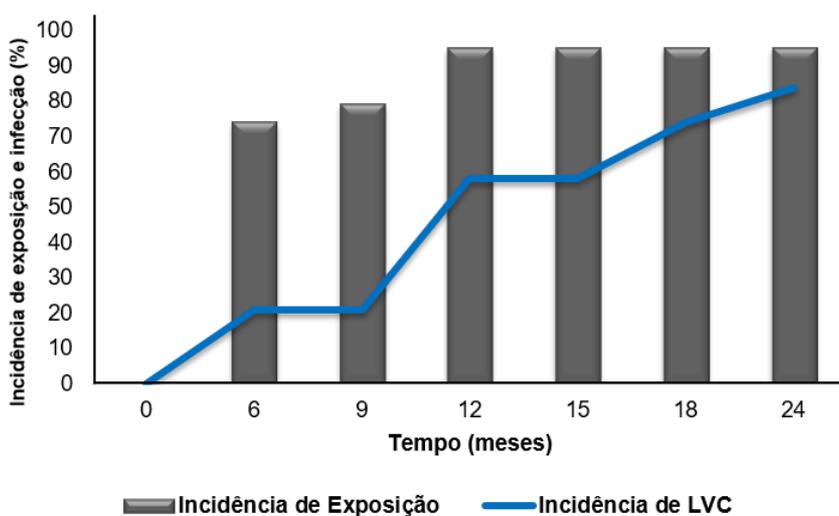


Figura 8. Dinâmica de exposição ao vetor e de soropositividade para LVC em cães que começaram o estudo como não expostos e não infectados (n=19).

5.6. AVALIAÇÃO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE EXPOSIÇÃO AO VETOR E MANIFESTAÇÃO CLÍNICA DA LVC

Para a análise de associação entre a exposição ao vetor e a manifestação clínica da LVC, foi necessário selecionar outra subcoorte com apenas os animais que começaram o estudo não infectados por *L. infantum*, realizaram o ensaio de ELISA com rLJM11+17 e que tiveram número de acompanhamento suficiente (n=115) (Figura 9).

Os 115 animais foram avaliados quanto a exposição ao vetor e a positividade para infecção por *L. infantum* a partir do 3º mês após a inclusão no estudo. Houveram dados faltantes no decorrer do acompanhamento dos cães, por isso foi utilizada modelagem logística multinível que é flexível e leva em consideração os dados faltantes. A porcentagem de dados faltantes e a descrição das co-variáveis utilizadas na modelagem podem ser conferidas na Tabela 2.

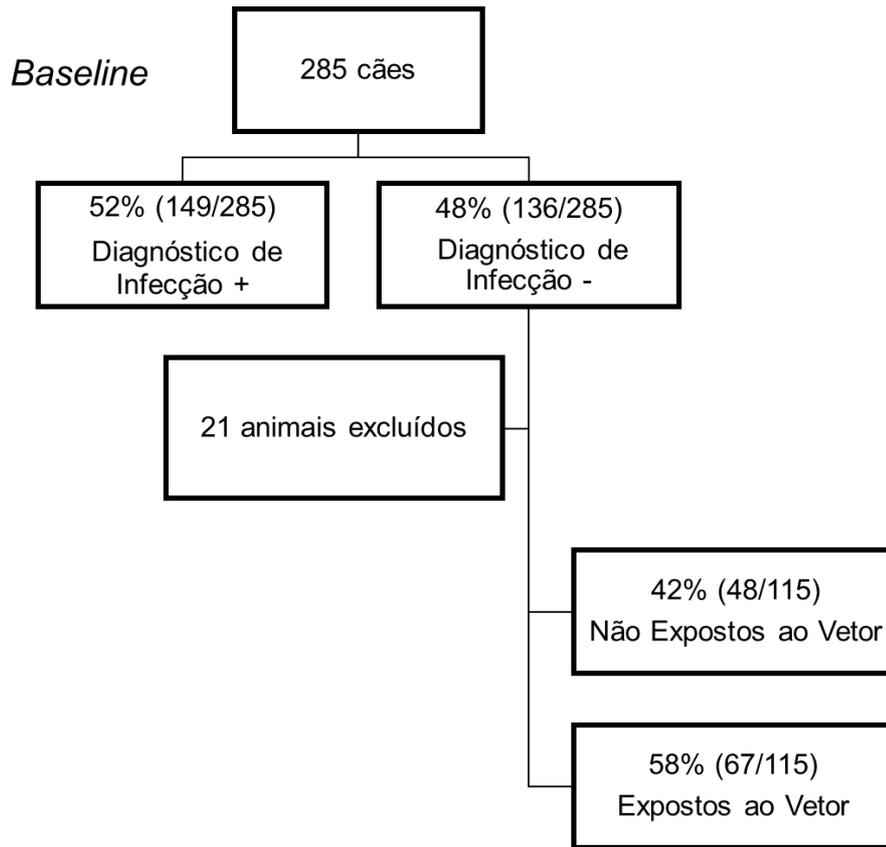


Figura 9. Esquema com as proporções de animais expostos e não expostos a saliva do vetor pertencentes a subcoorte de animais que começaram o estudo não infectados por *Leishmania infantum* e que foram realizados os ensaios de ELISA com rLJM11+17.

Na modelagem foi observada associação entre exposição ao vetor e manifestação clínica da LVC, na qual, prevê-se que, condicional ao efeito aleatório, animais mais expostos têm 74% ($p=0,04$) a mais de chance de apresentarem sinais clínicos da LVC ao longo do tempo do que os não expostos. Além disso, também houve associação entre os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* e a manifestação clínica da LVC, na qual animais com maior produção de anticorpos anti-*Leishmania* têm 244% a mais de chance de apresentarem os sinais clínicos. Foram testadas também outras variáveis, como carga parasitária (baço), presença de anemia, presença de trombocitopenia, FA aumentada e ALT aumentada, porém nenhuma delas influenciaram no desfecho (Tabela 3). O coeficiente de correlação intraclassa (ICC) estimado para estes dados foi de 0,57, o qual pode ser considerado moderado, implicando que a dependência entre as medidas repetidas foi levada em consideração nas análises estatísticas. Adicionalmente, os dados faltantes para o desfecho foram completamente aleatórios ($p=0,55$).

Tabela 2. Resultado da análise de regressão logística multinível empregada nos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA que começaram como negativos para infecção por *L. infantum*.

Manifestação Clínica da LVC	Cães (n)	OR	IC	P
Anticorpos anti-saliva	114	1,74	1,03 – 2,93	0,04
Anticorpos anti- <i>Leishmania</i>	115	2,44	1,37 – 4,32	0,02
Carga Parasitária - Baço	114	1,00	0,99 – 1,00	0,68
Anemia	100	1,19	0,31 – 4,49	0,80
Trombocitopenia	98	1,14	0,31 – 4,16	0,84
FA aumentada	74	0,25	0,002 – 21,92	0,54
ALT aumentada	100	2,97	0,26 – 34,5	0,38

Estes dados corroboram os achados no estudo de corte transversal realizado por nosso grupo, no qual foi notado o aumento da frequência de cães expostos ao vetor conforme a gravidade da doença (SOLCÀ et al., 2016) e com os resultados encontrados por De Moura et al. (2007), no qual os anticorpos contra o sonicado da glândula salivar de *Lutzomyia intermedia* foi apontado como um marcador de manifestação clínica da leishmaniose cutânea. Em contrapartida, também já foi evidenciado que animais assintomáticos possuíam maiores níveis de anticorpos anti-saliva quando comparados com animais sintomáticos, controle negativo de área endêmica e controle de negativo de área não endêmica (BATISTA et al, 2016). Porém, como este tratou-se de um estudo de corte transversal, talvez essa discordância no resultado encontrado deva-se ao fato da produção de anticorpos anti-saliva não ser contínua, pois ocorre diminuição de anticorpos circulantes na corrente sanguínea com o passar do tempo caso o animal seja exposto novamente (HOSTOMSKA et al., 2008) e por se tratar de um estudo pontual, a classificação dos animais como sintomáticos ou assintomáticos foi baseada apenas no momento da coleta do soro, não levando em consideração que talvez a classificação desses animais pudesse mudar no decorrer do tempo.

5.7. AVALIAÇÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPOSIÇÃO AO VETOR NO DECORRER DO TEMPO DE ACOMPANHAMENTO E A SUSCEPTIBILIDADE E RESISTÊNCIA DO CÃO À LVC

Os animais que foram passíveis de classificação como susceptíveis ou resistentes ($n=57$), dentre os cães que começaram o acompanhamento com diagnóstico de infecção por *L. infantum* negativo para, compuseram a subcoorte de animais utilizada para a análise da comparação entre os níveis de anticorpos anti-saliva do vetor e anti-*Leishmania* por tempo de infecção (Figura 10).

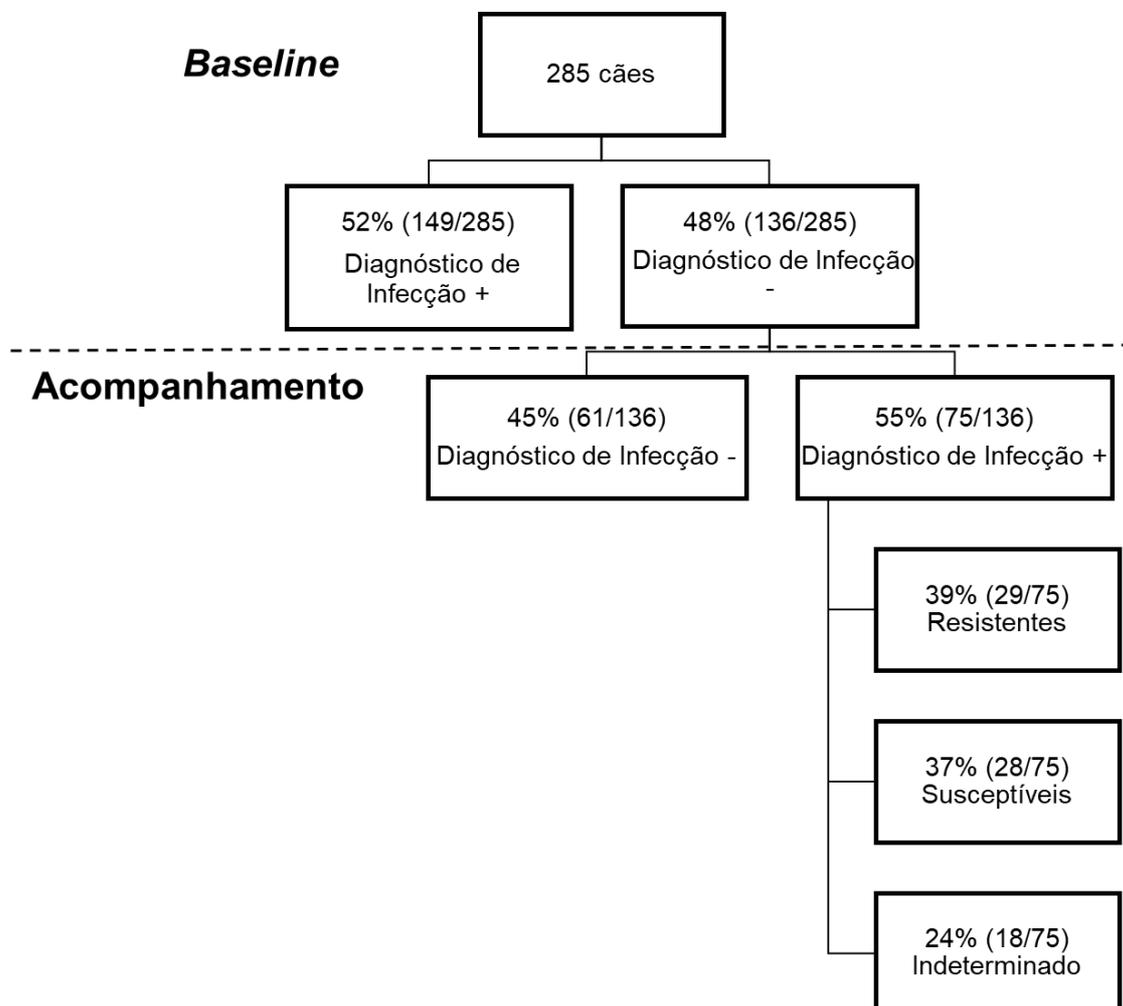


Figura 10. Esquema das proporções de animais infectados por *L. Infantum* por perfil de susceptibilidade e resistência para LVC ao longo do acompanhamento da subcoorte dos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.

Na figura 11A observamos que, embora não houvesse diferença estatística ($p>0,5$), animais susceptíveis apresentaram, numericamente, maiores níveis de anticorpos anti-rLJM 11 e 17 e anti-*Leishmania* durante todo o acompanhamento quando comparados com resistentes. Após 1 ano de acompanhamento, animais susceptíveis produziram mais anticorpos anti-*Leishmania* do que os animais resistentes ($p<0,05$) (Figura 11A e B). O pico de produção de anticorpos anti-saliva ocorreu no momento da infecção tanto para animais susceptíveis quanto para resistentes, apesar destes dados também não terem apresentado diferença estatística (Figura 11A). Os dados sugerem que animais susceptíveis foram mais picados por flebótomos, ou que talvez, pelo fato da susceptibilidade estar relacionada com predominância da resposta humoral anti-*Leishmania*, esses animais estavam mais sensíveis a produzir resposta humoral anti-saliva também (KOSTALOVA et al., 2015; CARRILLO; MORENO et al., 2009). Uma associação positiva entre a produção de anticorpos anti-saliva de *Phlebotomus perniciosus* e infecção ativa por *L. infantum* foi encontrada em um estudo realizado por Kostalova et al. (2015), e por Quinzel et al. (2018), foi encontrada correlação positiva significativa entre a produção de anticorpos anti-*Leishmania* e anti-saliva de *L. longipalpis*. A alta titulação de anticorpos anti-*Leishmania* já vem sendo apontada por alguns autores como estando relacionada à susceptibilidade à doença (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; REIS et al., 2010).

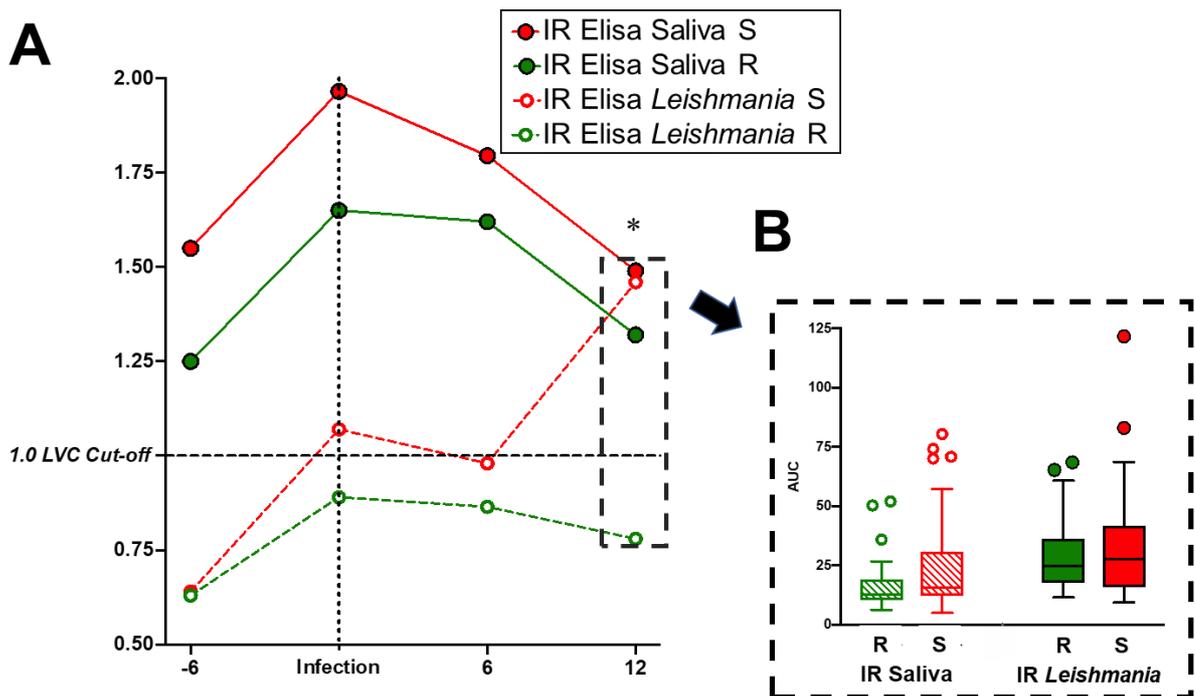


Figura 11. Detecção dos níveis de anticorpos anti-rLJM 11 e 17 e anti-*Leishmania* em cães classificados como resistentes e susceptíveis ao longo do acompanhamento de acordo com o tempo de infecção em cães que começaram o estudo como não infectados (n=57). Tempos de infecção: -6 (6 meses antes da infecção), Infecção (momento que foi detectada a primeira infecção), 6 (6 meses pós-infecção) e 12 (12 meses pós-infecção). Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e o pós teste de Comparação Múltipla de Dunn para comparar os valores entre os períodos de infecção. Para a comparação de cada ponto de infecção entre susceptíveis e resistentes foi utilizado o Teste T de Student quando a distribuição foi paramétrica, e o Teste de Mann-Whitney quando a distribuição foi não paramétrica.

5.8. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE REEXPOSIÇÃO AO VETOR E SUSCEPTIBILIDADE A LVC

Levando em consideração os resultados do tópico anterior, foi avaliada a frequência de reexposição destes animais a picada do vetor e se esta estaria impactando no perfil de susceptibilidade e resistência dos animais.

Dentre os 285 animais que fizeram parte do *baseline*, 38 animais não foram passíveis de serem classificados, portanto foram incluídos apenas 247 animais para esta análise (Figura 12). Dos 247 animais, 55% (137/247) foram reexpostos em algum momento a picada de flebotomíneos e 45% (110/247) deles não foram reexpostos ao vetor. A maioria desses animais foi reexposta nos períodos de 6, 12 e 24 meses de acompanhamento (Figura 13A).

Ao comparar a frequência de animais negativos, resistentes e susceptíveis entre reexpostos e não reexpostos, pode se perceber que a frequência de animais

susceptíveis foi maior no grupo de reexpostos ($p < 0,05$) enquanto que a frequência de animais negativos foi maior no grupo de não reexpostos ($p < 0,05$) (Figura 13B).

Uma hipótese que pode estar relacionada à maior frequência de animais susceptíveis no grupo de animais reexpostos é que múltiplas exposições ao vetor pode aumentar a chance do animal ser reinfectado, o que estaria levando o animal à susceptibilidade. Porém, esta é uma hipótese difícil de ser verificada, tendo em vista que as formas de prová-la seria medindo a carga parasitária de *L. infantum* e/ou os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* nos momentos pré e pós reexposição para verificar se houve aumento, sendo que ambas as situações poderiam ocorrer mesmo sem reinfeção, já que trata-se de um parasito que pode estar em constante replicação.

Uma segunda hipótese é que o mecanismo que desencadeia a susceptibilidade pode estar relacionado ao silenciamento, causado pela *Leishmania*, de vários genes envolvidos na resposta imune efetiva que foram ativados por múltiplas pré exposições ao flebótomo, o que resulta no descontrole da infecção e o animal apresenta doença mais grave (WEINKOPFF et al., 2014).



Figura 12. Esquema demonstrando o critério de seleção dos 247 animais que foram selecionados para análise de reexposição ao vetor e perfil de susceptibilidade à LVC ao longo do acompanhamento dos animais pertencentes ao estudo de coorte realizado em Camaçari-BA.

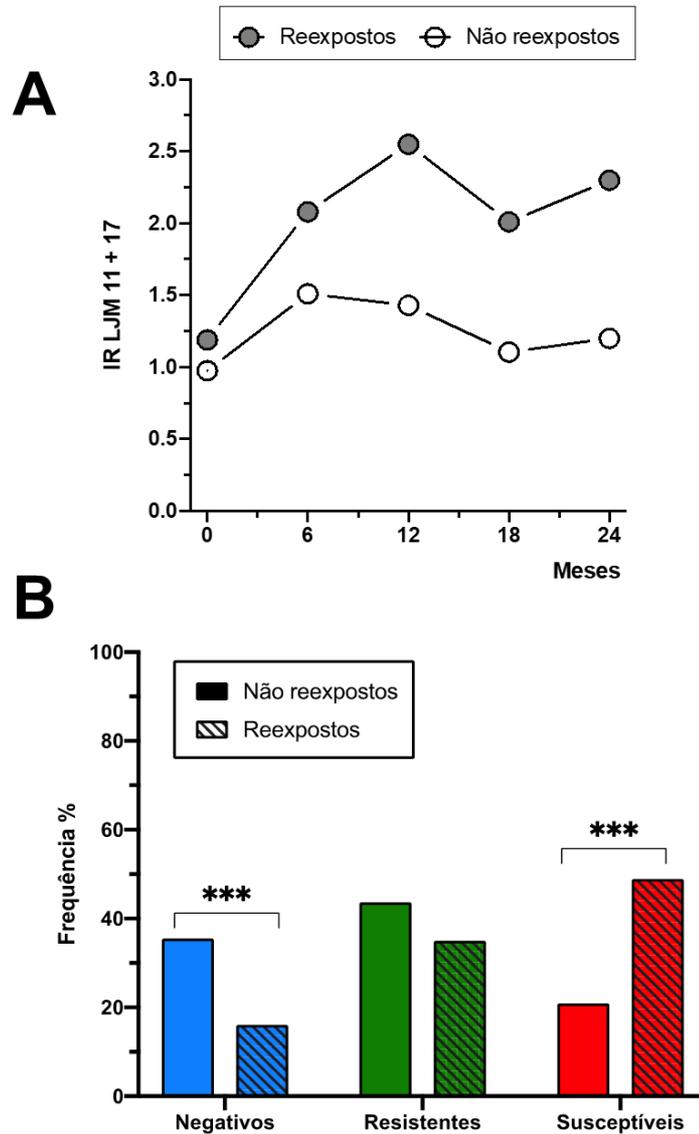


Figura 13. Exposição ao vetor em cães susceptíveis e resistentes (n=247). **(A)** Comparação da mediana dos IR do ELISA para rLJM11+17 entre animais reexpostos e não reexpostos, Teste Mann-Whitney. **(B)** Frequência de animais negativos, resistentes e susceptíveis entre reexpostos e não reexpostos, Teste de Qui-Quadrado de Tendência. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5.9. AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE REEXPOSIÇÃO AO VETOR COM SUSCEPTIBILIDADE À LVC

Para o cálculo do risco relativo referente à susceptibilidade para LVC, foram avaliados 247 cães, todos os acompanhados em que foi possível a classificação quanto ao perfil de susceptibilidade a LVC. Foi observada associação positiva entre a reexposição a saliva do vetor e susceptibilidade para o desenvolvimento da LVC.

Os animais reexpostos ao vetor tiveram 2 vezes mais risco (CI: 1,6 – 3,5 $p<0,001$) de serem susceptíveis à LVC (Tabela 3). Esta associação pode ser consequência das múltiplas exposições ao flebótomo aumentarem as chances dos animais serem reinfectedados e talvez mais reinfecções os tornem mais predispostos a se tornarem susceptíveis a doença. Porém, esta é uma hipótese difícil de ser checada, tendo em vista que as formas de se estimar reinfecção seriam o aumento da carga parasitária entre os tempos pré-reexposição e pós reexposição e/ou o aumento nos níveis de anticorpos anti-*Leishmania* entre estes períodos, ou seja, situações que também podem acontecer mesmo que não haja reinfecção, já que o protozoário replica-se no hospedeiro. Logo, não conseguimos avaliar os animais quanto a ocorrência de reinfecções.

Tabela 3. Associação entre exposição ao vetor e susceptibilidade à LVC

Reexposição à Saliva (rLJM11+17)	Susceptibilidade à LVC		TOTAL	Frequência (%)	RR* (IC** 95%)
	Sim	Não			
Sim	67	70	137	49%	2,3 (CI:1,6 – 3,5)
Não	23	87	110	21%	

*risco relativo, **intervalo de confiança, $p<0,001$.

5.10. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL IMUNOLÓGICO DOS ANIMAIS SUSCEPTÍVEIS E RESISTENTES À LVC

Para essas análises, foram selecionados 17 animais dentre os 285 que participaram do estudo. O critério de seleção foi o cão possuir os pontos antes da infecção (-6), infecção (I) e 6 meses após a infecção (+6) e ser classificável quanto ao perfil de susceptibilidade e resistência. Dentre os 17 animais, 9 foram classificados 9 como resistentes e 8 como susceptíveis à LVC após o acompanhamento.

A avaliação do exploratória do perfil imunológico dos animais em relação à susceptibilidade e resistência mostrou que, nos animais resistentes, houve diferença nas concentrações dos mediadores avaliados entre os períodos do

acompanhamento (-6, I e +6). Por outro lado, nos susceptíveis não foi notada diferença na produção dos mediadores entre estes períodos, com exceção de CXCL1 (Figura 14), o que talvez pode estar relacionado com uma anergia do sistema imune neste grupo de animais.

Os mediadores que aparentaram padrões diferentes no heatmap (Figura 14) entre os períodos avaliados foram então analisados estatisticamente e exibidos em forma de gráficos de caixa de bigode (Figuras 15, 16 e 17A). Nos resistentes, houve redução nas concentrações de GM-CSF, IL-15, IL-6 e TNF- α 6 meses após a infecção quando comparado com o período de 6 meses antes da infecção ($p < 0,05$) (Figura 15). Já IL-18 e CCL2 demonstraram essa redução nos níveis entre o período de 6 meses antes da infecção e durante a infecção, enquanto PGE2 e LTB4 demonstraram aumento nos níveis entre este mesmo período avaliado ($p < 0,05$) (Figura 16).

Estes resultados corroboram os achados da literatura, no qual já foi evidenciado que animais infectados apresentaram menores níveis de GM-CSF quando comparados aos animais não infectados (ABBEHUSEN et al., 2017) e que a manifestação clínica da leishmaniose visceral possui correlação fortemente positiva com os níveis de IL-6, TNF- α , IL-27 e IL-10 (DOS SANTOS et al., 2016). GM-CSF, IL-6 e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias e suas reduções no período de 6 meses após a infecção é compatível com o relatado na literatura, já que inflamação sistêmica e persistente já foi relatada ser uma das causas de dano tecidual e consequentemente apresentação dos sinais clínicos da doença (COSTA et al., 2010; 2013; DOS SANTOS et al., 2016), além de que já foi demonstrado que indivíduos assintomáticos não apresentam níveis aumentados destes mediadores na infecção (DOS SANTOS et al., 2016).

Confirmamos também os resultados obtidos no estudo de corte transversal realizado por nosso grupo quanto as expressões de CCL2, LTB4 e PGE2, no qual foi demonstrado que quanto maior era a gravidade da doença no cão, maiores eram os níveis de CCL2 e menores eram os níveis de LTB4 e PGE2 (Solcà et al., 2016). Altos níveis de CCL2 estão relacionados à indução da resposta imune humoral e persistência parasitária no baço, fatores envolvidos na susceptibilidade (ROUSSEAU et al., 2001). O balanço entre a produção de LTB4 e PGE2 é crucial para controlar tanto a infecção quanto a inflamação e determinar susceptibilidade ou resistência, tendo em vista que PGE2 favorece a sobrevivência parasitária no interior de

macrófagos por promover um ambiente de imunossupressão (ARAUJO-SANTOS et al., 2014; SAHA et al., 2014; BHATTACHARJEE et al., 2016), enquanto que LTB4 age em contraposição ativando macrófagos de forma a estimular a destruição parasitária (CHAVES et al., 2014; TAVARES et al., 2014; SEREZANI et al., 2005). Neste presente trabalho observamos que apesar de ambos mediadores estarem mais expressos no momento da infecção, LTB4 demonstrou-se mais expresso que PGE2, favorecendo então à resistência.

CXCL1 foi o único mediador que demonstrou diferença na expressão entre os períodos do acompanhamento tanto no grupo de resistentes quanto dos susceptíveis (Figura 17A). Nos resistentes houve redução dos níveis no período de infecção, enquanto nos susceptíveis houve aumento nos níveis no período de 6 meses após a infecção. Resultado que também concorda com os achados do corte transversal, no qual foi demonstrado que animais apresentação clínica mais grave apresentaram maiores níveis de CXCL1 (SOLCÀ et al., 2016). Em outro estudo também foi demonstrada essa relação entre altos níveis de CXCL1 e manifestação clínica da LVC, bem como baixos níveis desta quimiocinas relacionado à ausência de manifestação clínica nos cães. Sugere-se que os baixos níveis encontrados nos animais sem manifestação clínica seja decorrente das baixas cargas parasitárias, o que acaba por estimular resposta imune mais branda (ABBEHUSEN et al., 2017). Por outro lado, nos animais susceptíveis o aumento de CXCL1 pode ser decorrente da tentativa de conter o controle parasitário, sem sucesso, estimulando assim continuamente a produção de neutrófilos imaturos, por não haver tempo hábil de maturá-los, que por sua vez não serão aptos a matar o parasito, resultando em mais células infectadas. Além disso, já é relatado na literatura que *Leishmania* spp. utiliza-se de neutrófilos para conseguir infectar silenciosamente nos macrófagos, este mecanismo sendo bastante conhecido como “cavalo de Tróia” (VAN ZANDBERGEN et al., 2004).

Quando comparamos se haveria diferença entre os níveis dos mediadores entre resistentes e susceptíveis em cada ponto do acompanhamento, apenas IL-10 demonstrou diferença e esta diferença ocorreu apenas no momento da infecção (Figura 17B). Em modelo murino experimental já foi demonstrado que altos níveis de IL-10 na fase inicial da infecção está relacionada a maior susceptibilidade à LV (MESQUITA et al., 2018), assim como já foi identificado que altos níveis séricos desta citocina está associado à LV sintomática, enquanto que baixas concentrações está associado à LV assintomática em humanos (SABAT et al., 2010). IL-10 protege o tecido contra dano tecidual causado por inflamação aguda, porém quando expressa em altos níveis acaba por comprometer o controle parasitário (CALDAS et al., 2005).

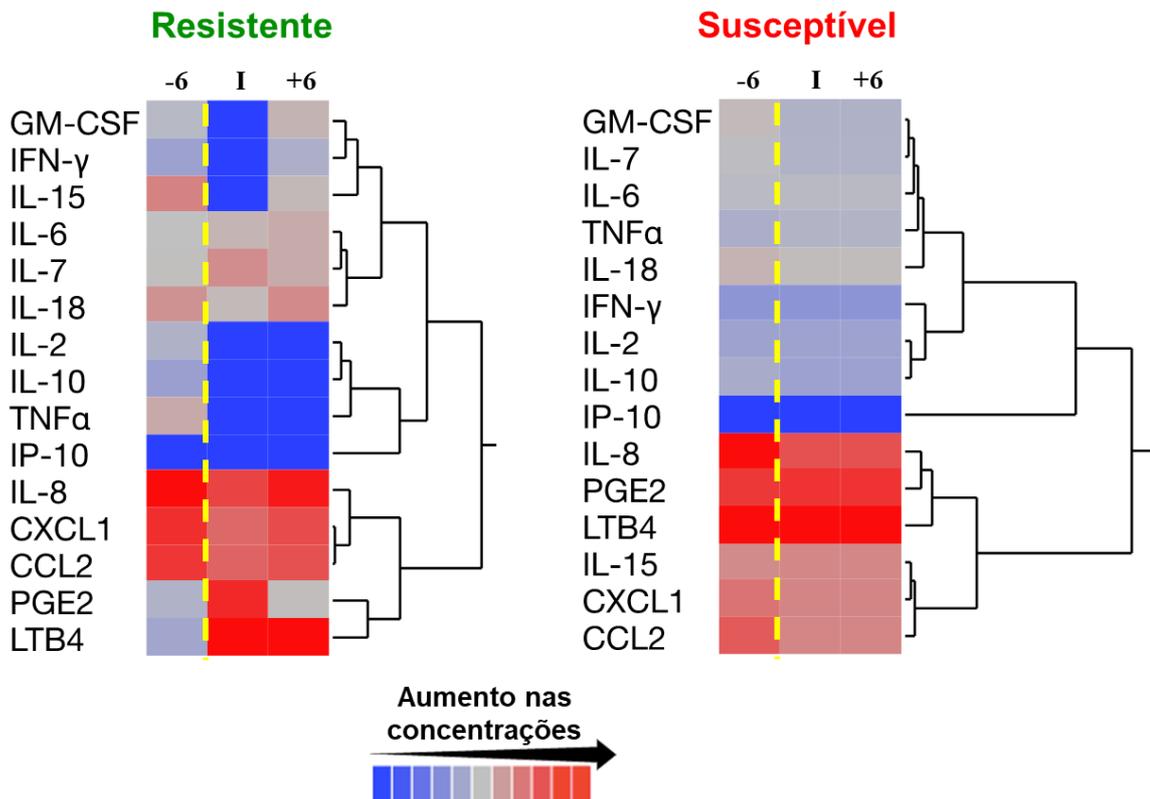


Figura 14. Agrupamento dos perfis imunológicos presentes no soro de cães acompanhados da área endêmica de Camaçari-BA com relação à resistência ou susceptibilidade à LVC nos períodos de 6 meses antes da infecção (-6), infecção (I) e 6 meses após a infecção (+6) (n=17). Foi utilizada Análise Hierárquica de Clusters (Método de Ward).

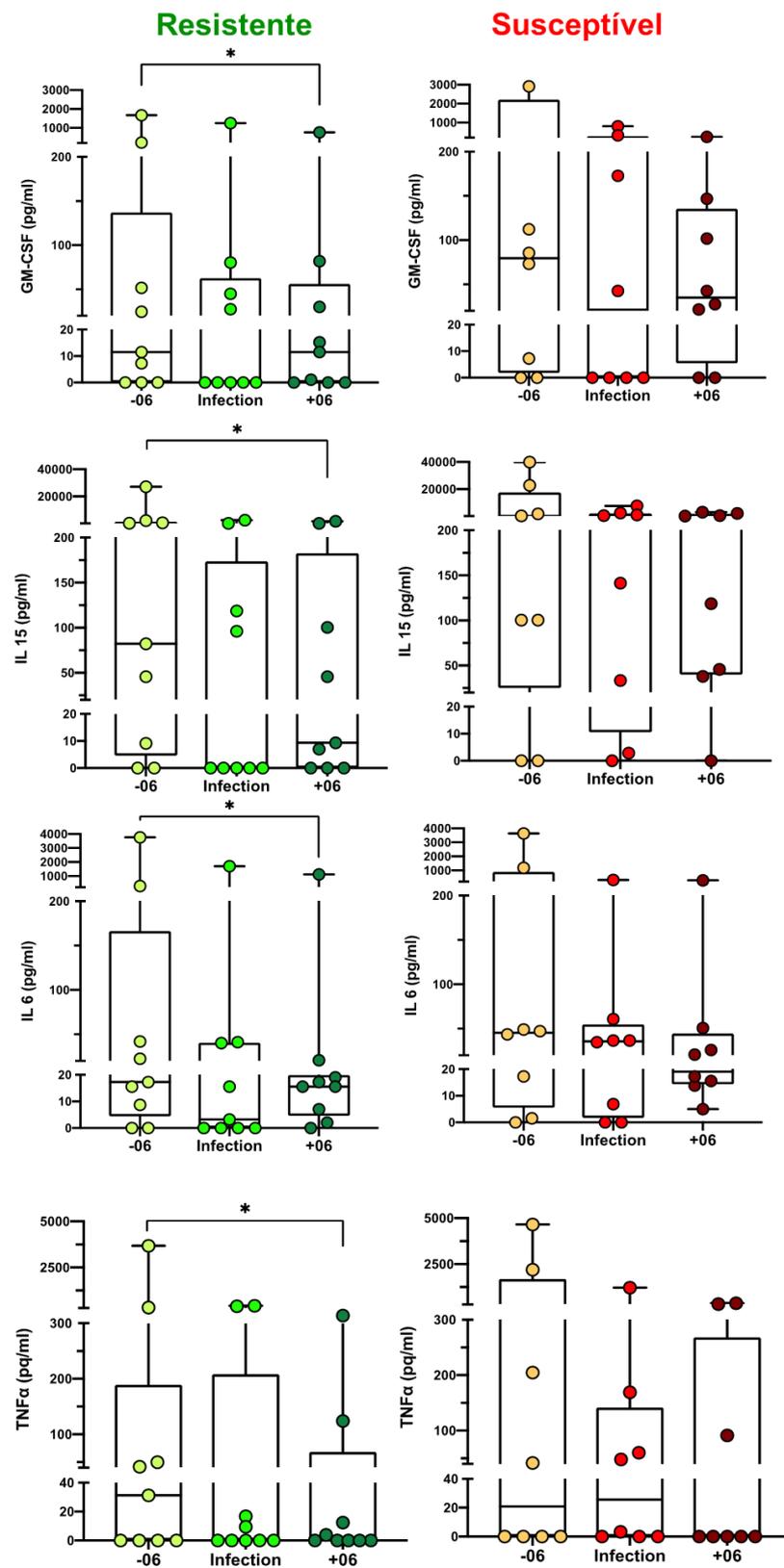


Figura 15. Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença entre os períodos de 6 meses antes da infecção (-6) e 6 após a infecção (+6) no *heatmap*, estratificados por resistentes e susceptíveis (n=17). Foi realizado o teste de Wilcoxon Pareado para a comparação intragrupo. *($p < 0,05$).

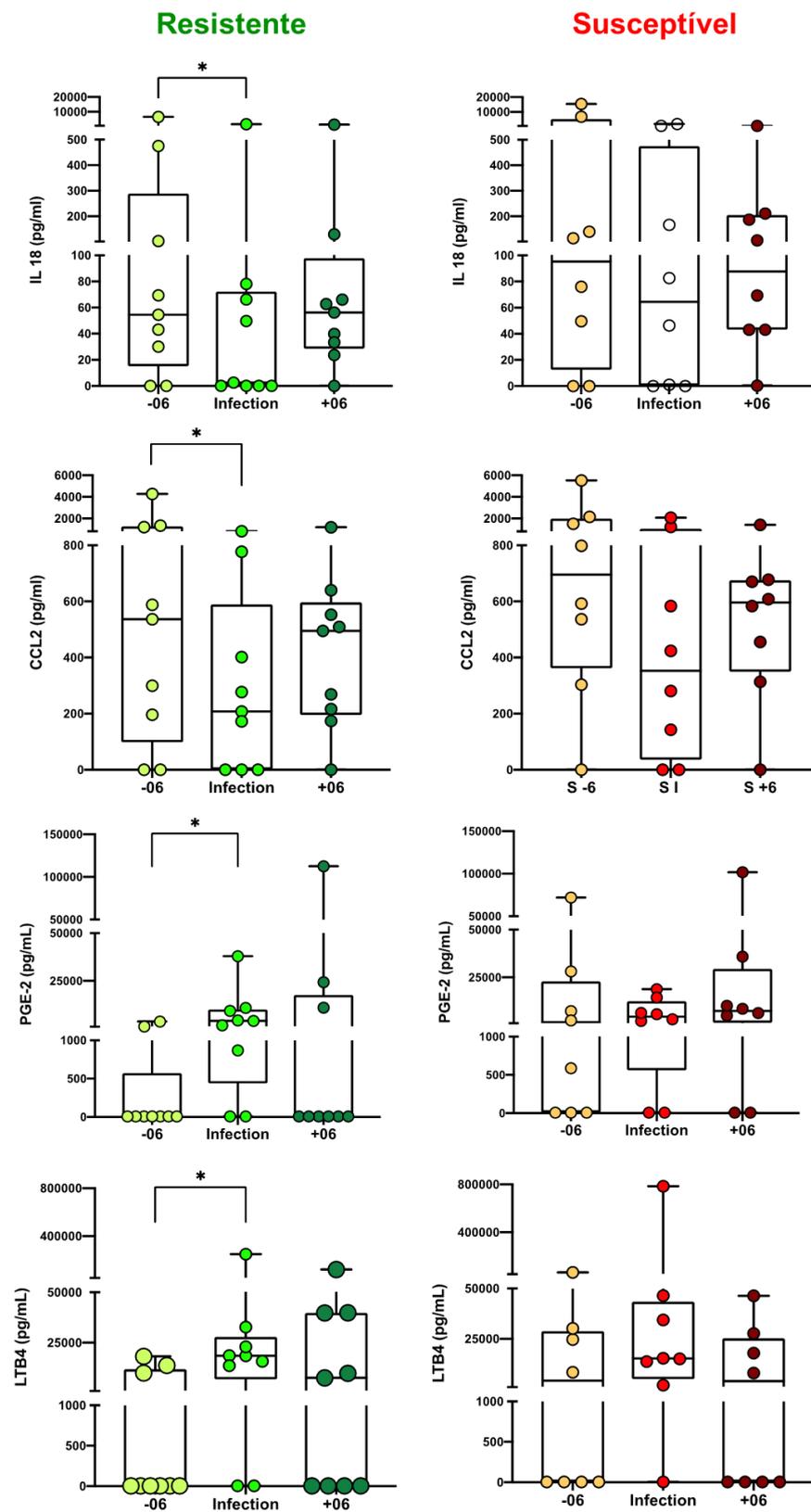


Figura 16. Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença entre os períodos de 6 meses antes da infecção (-6) e infecção (I) no *heatmap*, estratificados por resistentes e susceptíveis (n=17). Foi realizado o teste de Wilcoxon Pareado para a comparação intragrupo. * ($p < 0,05$).

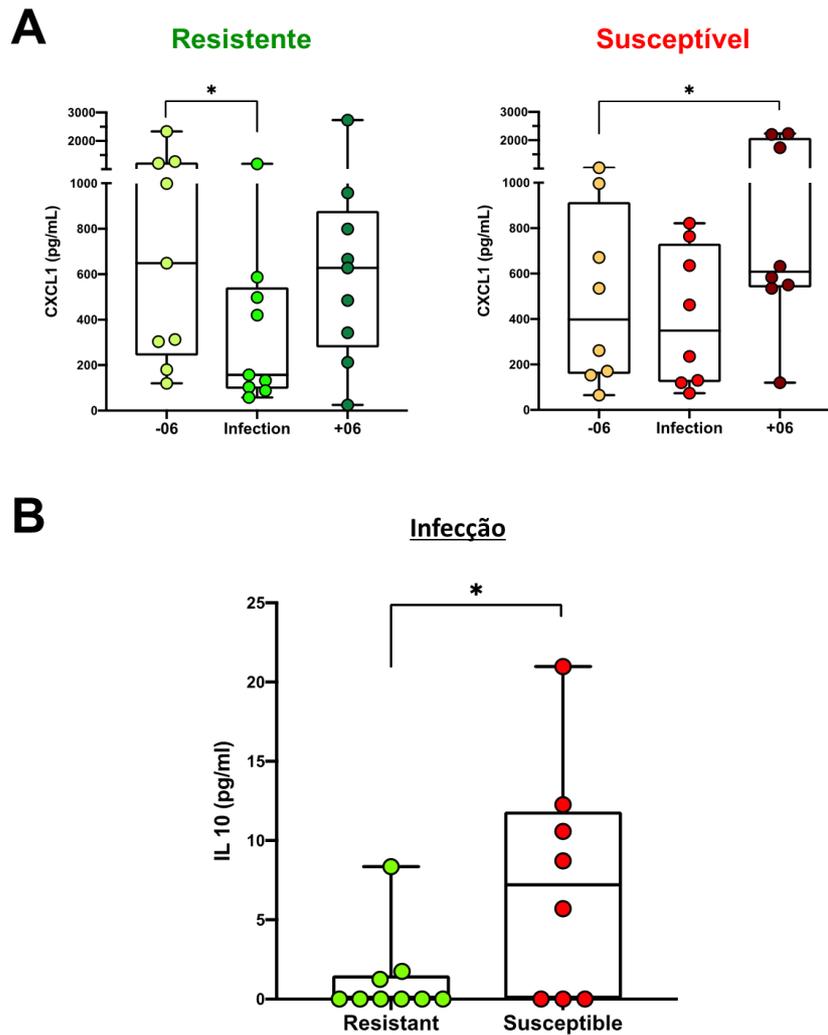


Figura 17. Gráfico de caixa de bigode mostrando os níveis dos mediadores que aparentaram ter diferença no *heatmap* **(A)** entre os períodos de 6 meses antes da infecção (-6) e infecção (I) nos resistentes e entre os períodos de 6 meses antes da infecção e 6 meses após a infecção nos susceptíveis **(B)** entre resistentes e susceptíveis no momento da infecção. Foi realizado o teste de Wilcoxon Pareado para a comparação intragrupo **(A)** e o teste de Mann-Whitney para a comparação intergrupo **(B)**. $^*(p < 0,05)$.

6. CONCLUSÃO

A presença de anticorpos anti-rLJM11+17 além de ser um biomarcador de exposição ao vetor em área endêmicas, também demonstrou estar associado à susceptibilidade à LVC. Adicionalmente, a quantificação de mediadores LBT4, PGE2 e IL-10 também podem ser úteis para predição de perfil de susceptibilidade e resistência.

7. Referências

ABBEHUSEN, M. M. C. *et al.* Clinical and immunopathological findings during long term follow-up in *Leishmania infantum* experimentally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.

ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691–703, 2014.

AFONSO, M. M. DOS S. *et al.* Studies on the Feeding Habits of *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Populations from Endemic Areas of American Visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–5, 2012.

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

AKHTARDANESH, B. *et al.* Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: Serological and molecular study. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 54, n. 1, p. 96–102, 2017.

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.

ALENCAR, J. E. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 4, n. 3, p. 222–236, 1958.

ALEXANDRE-PIRES, G. *et al.* Leishmaniosis - A report about the microvascular and cellular architecture of the infected spleen in *Canis familiaris*. **Microscopy Research and Technique**, v. 69, n. 4, p. 227–235, 2006.

ANDRADE, B. B. *et al.* Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: Current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 122–127, 2007.

AQUINO, D. M. C. *et al.* Short report: Epidemiological study of the association between anti-*Lutzomyia longipalpis* saliva antibodies and development of delayed-type hypersensitivity to *Leishmania* antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 4, p. 825–827, 2010.

ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.* Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania infantum* infection. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

ASHFORD RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, p. 523–532, 1996.

ASLAN, H. *et al.* New insights into the transmissibility of *Leishmania infantum* from dogs to sand flies: Experimental vector-transmission reveals persistent parasite depots at bite sites. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 11, p. 1752–1761,

2016.

BAHIA, BAHIA, S. S. E. Situação Epidemiológica da Leishmaniose Visceral no Estado da Bahia. ANO 3, N. 01, mai. 2015. Disponível em: <http://www.suvisa.ba.gov.br/sites/default/files/BOLETIM%20LV2015.pdf>

BANETH, G. *et al.* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BARBOSA, D. S. *et al.* Soroprevalência E Variáveis Epidemiológicas Associadas À Leishmaniose Visceral Canina Em Área Endêmica No Município De São Luís, Maranhão, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 2007–2010, 2010.

BARBOZA, D. C. P. M. *et al.* Estudo de coorte em áreas de risco para leishmaniose visceral canina, em municípios da Região Metropolitana de Salvador, Bahia, Brasil. **Rev. Bras. Saúde Prod.**, v. 7, n. 2, p. 152–163, 2006.

BARRAL, A. *et al.* Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n. 6, p. 740-745, 2000.

BARROUIN-MELO, S. M. *et al.* Can spleen aspirations be safely used for the parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniosis? A study on asymptomatic and polysymptomatic animals. **Veterinary Journal**, v. 171, n. 2, p. 331–339, 2006.

BATISTA, L. F. DA S. *et al.* Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 3, p. 361–364, 2016.

BENASSI, J. C. *et al.* Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 177, p. 93–97, 2017.

BHATTACHARJEE, A. *et al.* *Leishmania donovani*-Induced Prostaglandin E2 Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2–Cytosolic Phospholipase A2 Signaling. **Infection and Immunology**, v. 84, n. 10, p. 2963-2973, 2016.

BOEHME, C. C. *et al.* Congenital Visceral Leishmaniasis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 359-360, 2006.

BOGGIATTO, P. M. *et al.* Immunologic indicators of clinical progression during canine *Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 267–273, 2010.

BORJA, L. S. *et al.* Parasite load in the blood and skin of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* is correlated with their capacity to infect sandfly vectors. **Veterinary Parasitology**, v. 229, p. 110–117, 2016.

BOZIC, C. R. *et al.* Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. **Journal of immunology**, v. 154, n. 11, p. 6048–6057, 1995.

BRAGA, M. D. M. *et al.* Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imunoenzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 5, p. 419–424, 2005.

BRANDONISIO, O. *et al.* Canine Leishmaniasis in the Gargano Promontory (Apulia, South Italy). **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 2, p. 273-276, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE. 2017a. Disponível em: https://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume_3_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE. 2017b. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>

BRINKMANN, V. *et al* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

CALDART, E. T. *et al* *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 26, n. 1, fev. 2017.

CALDAS, A. *et al* Balance of IL-10 and interferon- γ plasma levels in human visceral leishmaniasis: Implications in the pathogenesis. **BMC Infectious Diseases**, v. 5, p. 1–9, 2005.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, 2007.

CARREIRA, J. C. A. *et al* Natural infection of *Didelphis aurita* (Mammalia: Marsupialia) with *Leishmania infantum* in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 111, 2012.

CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 67–70, 2009.

CAVALCANTE, R. R.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. Anti-complement activity in the saliva of Phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. **Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 87–93, 2003.

CHAGAS, E. Visceral leishmaniasis in Brazil. **Science**, v. 84, n. 2183, p. 397-398. 1936.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 67–75, 2005.

CHAVES, M. M. *et al* Leukotriene B₄ Modulates P2X₇ Receptor–Mediated *Leishmania amazonensis* Elimination in Murine Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 10, p. 4765–4773, 2014.

CIARAMELLA, P. CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Small Animals/Exotics**, v. 25, n. 5, 2003.

CIARAMELLA, P. *et al* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **The Veterinary Record**, v. 141, n. 21, p. 539–243, 1997.

CIARAMELLA, P. CORONA, M. Canine leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. **Small Animals/Exotics**, v. 25, n. 5, 2003.

COELHO, L. I. C. *et al* Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 671–677, 2011.

COLLIN, N. *et al* Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.

COLOMBO, F. A. *et al* Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitology Research**, v. 109, n. 2, p. 267–74, 2011.

COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5702–5711, 2009.

COSTA, C. H.; VIEIRA, J. B. Changes in the control program of visceral leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 2, p. 223–228, 2001.

COSTA, C. H. N. *et al* Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 386–392, 2011.

COSTA, D. L. *et al* Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

CUNHA, S. *et al* Visceral leishmaniasis in a new ecological niche near a major metropolitan area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 155–158, 1995.

COURTENAY, O. *et al* Heterogeneities in *Leishmania infantum* Infection: Using Skin Parasite Burdens to Identify Highly Infectious Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 26, 2014.

COURTENAY, O. *et al* Combining epidemiology with basic biology of sand flies, parasites, and hosts to inform leishmaniasis transmission dynamics and control. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 10, p. 1–13, 2017.

COURTENAY, O. *et al* Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320, 2002.

CRUZ, I. *et al* *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1124–1125, 2002.

DA COSTA-VAL, A. P. *et al* Canine visceral leishmaniasis: Relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* infectivity. **Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636–643, 2007.

DABAGHMANESH, T. *et al* Natural transovarial and transstadial transmission of *Leishmania infantum* by naïve *Rhipicephalus sanguineus* ticks blood feeding on an endemically infected dog in Shiraz, south of Iran. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 408–413, 2016.

D'AGOSTINO, P. *et al* Interleukin-15, as interferon-gamma, induces the killing of *Leishmania infantum* in phorbol-myristate-acetate-activated macrophages increasing interleukin-12. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 60, n. 6, p. 609–614, 2004.

DANTAS-TORRES, F. *et al* Detection of *Leishmania infantum* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Italy. **Parasitology Research**, v. 106, p. 857–60, 2010a.

DANTAS-TORRES, F. *et al* Transovarial passage of *Leishmania infantum* kDNA in artificially infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Experimental Parasitology**, v. 125, n. 2, p. 184–185, 2010b.

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.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156, 2006.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F. DE; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1–2, p. 54–60, 2006.

DE MORAIS, R. C. S. *et al* Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental & applied acarology**, v. 59, n. 4, p. 473–481, 2013.

DE MOURA, T. R. *et al* Enhanced *Leishmania braziliensis* infection following pre-exposure to sandfly saliva. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.

DE OLIVEIRA, A. G. *et al* Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, n. 3, p. 238–241, 2008.

DIETZE, R. *et al* Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240–1242, 1997.

DOS SANTOS, P. L. *et al* The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

DYE, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–130, agos. 1996.

FERREIRA, V. P. *et al* SALO, a novel classical pathway complement inhibitor from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–13, 2016.

FERRER, L. *et al* Skin lesions in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 29, n. 6, p. 381–388, 1988.

FISA, R. *et al* El diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina en la comarca del Priorat (Tarragona). **Clinica Veterinaria de pequeños animales**, v. 12, n. 4, p. 0231–236, 1992.

FONDEVILA, D.; VILAFRANCA, M.; FERRER, L. Epidermal immunocompetence in canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 56, n. 3–4, p. 319–327, 1997.

GIUNCHETTI, R. C. *et al* Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 2, p. 269–277, 2008.

GOMES, R. B. *et al* Seroconversion against *Lutzomyia longipalpis* Saliva Concurrent with the Development of Anti-*Leishmania chagasi* Delayed-Type Hypersensitivity . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 10, p. 1530–1534, 2002.

GOMES, R. *et al* Immunity to sand fly salivary protein LJM11 modulates host response to vector-transmitted *Leishmania* conferring ulcer-free protection. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, p. 2735–2743, 2012a.

GOMES, R.; OLIVEIRA, F. The immune response to sand fly salivary proteins and its influence on *Leishmania* immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–8, 2012.

GONÇALVES, M. B. **Prevalência, distribuição e risco para leishmaniose visceral risco para leishmaniose visceral canina**. 113 f. Dissertação (Mestrado). 2014.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GRESPLAN, R. *et al* The protein LJM 111 from *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Extract (SGE) accounts for the SGE-inhibitory effects upon inflammatory parameters in experimental arthritis model. **International Immunopharmacology**, v. 12, n. 4, p. 603–610, 2012.

HANES, J.; ŠIMÚTH, J. Identification and partial characterization of the major royal jelly protein of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Apicultural Research**, v. 31, n. 1, p. 22–26, 1992.

HOSEIN, S.; BLAKE, D. P.; SOLANO-GALLEGO, L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. **Parasitology**, v. 144, n. 1, p. 95–115, 2017.

HOSSEINI-VASOUKOLAEI, N. *et al* Differential expression profiles of the salivary proteins SP15 and SP44 from *Phlebotomus papatasi*. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.

HOSTOMSKA, J. Kinetics of canine antibody response to saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 4, p. 443-450, 2008.

HOERAUF, A. *et al* Effect of IL-7 treatment on *Leishmania major*-infected BALB.Xid mice: enhanced lymphopoiesis with sustained lack of B1 cells and clinical aggravation of disease. **International Immunology**, v. 7, n. 11, p. 1879-1884. 1995.

HUMBERG, R. M. P. *et al* Short report: *Leishmania chagasi* in opossums (*Didelphis albiventris*) in an urban area endemic for visceral leishmaniasis, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 3, p. 470–472, 2012.

JOHNSON, J. K.; LI, J.; CHRISTENSEN, B. M. Cloning and characterization of a dopachrome conversion enzyme from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 11, p. 1125–1135, 2001.

KAMHAWI, S. *et al* Protection Against Cutaneous Leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**, v. 1351, n. 2000, p. 1351–1354, 2008.

KEENAN, C. M. *et al* Visceral Leishmaniasis in the German Shepherd Dog. I. Infection, Clinical Disease, and Clinical Pathology. **Veterinary Pathology**, v. 21, n. 1, p. 74–79, 1984.

KELLY, P. H. *et al* The Gut Microbiome of the Vector *Lutzomyia longipalpis* Is Essential for Survival of *Leishmania infantum*. **American Society for Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2017.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–89, [s.d.].

KILLICK KENDRICK, R. *et al* *Leishmania* in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of *Leishmania mexicana amazonensis* to hamsters by the bite of experimentally infected *Lutzomyia longipalpis*. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences**, v. 196, n. 1122, p. 105–115, 1977.

- KIMBLIN, N. *et al.* Quantification of the infectious dose of *Leishmania major* transmitted to the skin by single sand flies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 29, p. 10125–10130, 2008.
- KOSTALOVA, T. *et al.* Canine antibodies against salivary recombinant proteins of *Phlebotomus perniciosus*: A longitudinal study in an endemic focus of canine Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1–15, 2015.
- KOUTINAS, A. *et al.* Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 35, n. 5, p. 376–383, 2014.
- KOUTINAS, A. F. *et al.* Skin Lesions in Canine Leishmaniasis (Kala-Azar): A Clinical and Histopathological Study on 22 Spontaneous Cases in Greece. **Veterinary Dermatology**, v. 3, n. 3, p. 121–130, 1992.
- KOUTINAS, A. F. *et al.* Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 572–577, 2010.
- KOUTINAS, A. F.; KOUTINAS, C. K. Pathologic Mechanisms Underlying the Clinical Findings in Canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, v. 51, n. 2, p. 527–538, 2014.
- KUHLS, K. *et al.* Comparative microsatellite typing of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent old world origin. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. 1–16, 2011.
- KUNKEL, S. L. *et al.* Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 137, n. 1, p. 404–410, 1986.
- LAGE, R. S. *et al.* 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.
- LAI, Y. H.; MOSMANN, T. R. Mouse IL-13 enhances antibody production in vivo and acts directly on B cells in vitro to increase survival and hence antibody production. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 1, p. 78–87, 1999.
- LAISON, R. *et al.* Amazonian Visceral Leishmaniasis - Distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relation to the fox *Cerdocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. **Memórias dos Instituto Oswaldo Cruz**, n. 85, v. 1, p. 135-137, 1990.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 277, n. 5664, p. 595–600, 1978.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of observer agreement for categorical data data for categorical of observer agreement the measurement. **Society**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 2013.

- LAURENTI, M. D. *et al* Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3–4, p. 296–300, 2013.
- LIMA, I. D. *et al* Changing demographics of visceral leishmaniasis in northeast Brazil: Lessons for the future. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2018.
- LIMA, I. S. *et al* Severe clinical presentation of visceral leishmaniasis in naturally infected dogs with disruption of the splenic white pulp. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- LIRA, R. *et al* Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5176–5182, 2000.
- LOPES, E. G. P. *et al* Transmission of visceral leishmaniasis in dogs in a risk area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 6, p. 1403–1412, 2016.
- LOURADOUR, I. *et al* The midgut microbiota plays an essential role in sand fly vector competence for *Leishmania major*. **Cellular Microbiology**, v. 19, n. 10, 2017.
- MACEDO-SILVA, V. P. *et al* Feeding preferences of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae), the sand fly vector, for *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 237–44, 2014.
- MADEIRA, M. DE F. *et al* Identification of *Leishmania (Leishmania) chagasi* isolated from healthy skin of symptomatic and asymptomatic dogs seropositive for leishmaniasis in the Municipality of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 440–444, 2004.
- MAGALHÃES-JUNIOR, J. T. *et al* Xenodiagnosis on dogs with visceral leishmaniasis: Canine and sand fly aspects related to the parasite transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 120–126, 2016.
- MANNA, L. *et al* *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 271–280, 2006.
- MANSUETO, P. *et al*. Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 617–627, 2014.
- MARTÍNEZ-MORENO, A. *et al* Immunological and histological study of T- and B-lymphocyte activity in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 51, n. 1–2, p. 49–59, 1993.
- MEDEIROS-SILVA, V. *et al* Successful isolation of *Leishmania infantum* from *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) collected from naturally infected dogs. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 1–7, 2015.
- MENDEZ, S. *et al* The Potency and durability of DNA- and protein-based vaccines against *leishmania major* evaluated using low-dose, intradermal challenge. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 8, p. 5122–5128, 2001.

- MENEZES-SOUZA, D. *et al* Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 39–49, 2011.
- MENEZES-SOUZA, D. *et al* Higher expression of CCL2, CCL4, CCL5, CCL21, and CXCL8 chemokines in the skin associated with parasite density in canine visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.
- MESQUITA, I. *et al* The impact of IL-10 dynamic modulation on host immune response against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 112, n. March, p. 16–20, 2018.
- MILANO, S. *et al* IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127, n. 2, p. 360–365, 2002.
- MIRÓ, G. *et al* Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377, 2008.
- MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Feeding preference of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) in transmission area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365–368, 2008.
- MOREIRA, E. D. *et al* Assessment of an optimized dog-culling program in the dynamics of canine *Leishmania* transmission. **Veterinary Parasitology**, v. 122, n. 4, p. 245–252, 2004.
- MOREIRA, P. R. R. *et al* Immune response pattern of the popliteal lymph nodes of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 107, n. 3, p. 605–613, 2010.
- MOREIRA, P. R. R. *et al* Influence of apoptosis on the cutaneous and peripheral lymph node inflammatory response in dogs with visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 149–157, 2013.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: Epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405, 2002.
- MORILLAS-MARQUEZ, F. *et al* *Leishmania infantum* (protozoa, kinetoplastida): transmission from infected patients to experimental animal under conditions that simulate needle-sharing. **Experimental Parasitology**, v. 100, n. 1, p. 71–74, 2002.
- MYLONAKIS, M. E. *et al* Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 243–247, 2005.
- NARANJO, C. *et al* Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 37–47, 2005.
- NAVEA-PÉREZ, H. M. *et al* *Leishmania infantum* in wild rodents: reservoirs or just irrelevant incidental hosts? **Parasitology Research**, v. 114, n. 6, p. 2363–2370, 2015.

- NEVES, D. P. *et al* **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 10. p. 67-83.
- NORSWORTHY, N. B. *et al* Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1240–1247, 2004.
- NUNES, J. B. *et al* *Leishmania infantum* infection in dogs from the Southern region of Minas Gerais State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 75, 2016.
- OLIVEIRA, A. M. *et al* Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233–242, 2016.
- OLIVEIRA, A. C. *et al* Antibodies to *Leishmania spp.* in domestic felines. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 464-470, 2015.
- OLIVEIRA, C. D. L. *et al* Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 5, p. 1231–1239, 2007.
- OLIVEIRA, F. *et al* Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-*Leishmania* immune response towards protection or exacerbation of disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 4, 2008a.
- OLIVEIRA, A. G. *et al* Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Tropica**, v. 107, 2008b.
- OWENS, S. D. *et al*. Transmission of visceral leishmaniasis through blood transfusions from infected English foxhounds to anemic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 8, p. 1076-1083, 2001.
- PAPADOGIANNAKIS, E. I. *et al* Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 104, n. 3–4, p. 227–237, 2005.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. D. Q. Clinical Spectrum of Leishmaniasis. **Oxford journals, Oxford university press**, v. 22, n. 1, p. 1–11, 1996.
- PEÑA, M. T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M. G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993 – 1998). **Veterinary Ophthalmology**, v. 3, n. 1, p. 35–41. 2000.
- PINELLI, E. *et al*. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 1, p. 229–35, 1994.

- PUNNONEN, J.; DE VRIES, J. E. IL-13 induces proliferation, Ig isotype switching, and Ig synthesis by immature human fetal B cells. **Journal of Immunology**, v. 152, n. 3, p. 1094–1102, 1994.
- QUEIROZ, P. V. S. *et al* Canine visceral leishmaniasis in urban and rural areas of Northeast Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 86, n. 2, p. 267–273, 2009.
- QUINNELL, R. J. *et al* Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018.
- RALLIS, T. *et al* Chronic hepatitis associated with canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*): A clinicopathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2–3, p. 145–152, 2005.
- REIS, A. B. *et al*. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.
- REIS, A. B. *et al* Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–349, 2010.
- RIO GRANDE DO SUL. **Nota técnica conjunta da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde e da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul sobre a situação da Leishmaniose Visceral na fronteira do Estado do Rio Grande do Sul com a Argentina**. Rio Grande do Sul: Ministério da Saúde, 2010.
- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. *et al* Compartmentalized immune response in leishmaniasis: Changing patterns throughout the disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–13, 2016.
- ROGERS, M. E.; BATES, P. A. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 6, p. 0818–0825, 2007.
- RONDON, F. C. M. **Estudo Transversal Da Leishmaniose Visceral Canina Na Cidade De Fortaleza, Ceará, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.
- ROSYPAL, A. C. *et al* Transplacental Transmission of a North American Isolate of *Leishmania infantum* in an Experimentally Infected Beagle. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4, p. 970–972, 2006.
- ROUSSEAU, D. *et al* Sustained parasite burden in the spleen of *Leishmania infantum*-infected BALB/c mice is accompanied by expression of MCP-1 transcripts and lack of protection against challenge. **European Cytokine Network**, v. 12, n. 2, p. 340–347, 2001.
- SABAT, R. *et al* Biology of interleukin-10. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 5, p. 331–344, 2010.
- SAHA, A. *et al* Prostaglandin E2 Negatively Regulates the Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines and IL-17 in Visceral Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 5, p. 2330–2339, 2014.

- SAMUELSON, J. A mouse model of *Leishmania braziliensis braziliensis* infection produced by coinjection with sand fly saliva. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p. 49–54, 2004.
- SANTANA, C. C. *et al* Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. **Parasite immunology**, v. 30, n. 10, p. 515–24, 2008.
- SANT'ANNA, M. R. *et al*. Colonisation resistance in the sand fly gut: *Leishmania* protects *Lutzomyia longipalpis* from bacterial infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 329, 2014.
- SANTOS, S. O. *et al* A minimally invasive approach to spleen histopathology in dogs: A new method for follow-up studies of spleen changes in the course of *Leishmania infantum* infection. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 48, p. 87–92, 2016.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N.; KOUTINAS, A. F. Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 61–72, 2014.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 20, p. 9944–9948, 2006.
- SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annual Reviews of Immunology**, v. 12, p. 635–673, 1994.
- SEREZANI, C. H. C. *et al* Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against *Klebsiella pneumoniae* through the activation of NADPH oxidase. **The American Society of Hematology**, v. 106, n. 3, 2005.
- SILVA-O'HARE, J. *et al* Disruption of splenic lymphoid tissue and plasmacytosis in canine visceral leishmaniasis: Changes in homing and survival of plasma cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–17, 2016.
- SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral leishmaniasis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 5, p. 435–438, 2015.
- SILVA, F. L. *et al* Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 1–2, p. 55–59, 2009.
- SILVEIRA, F. T. *et al* Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, 2009.
- SILVEIRA, F. T. *et al* A cross-sectional study on canine *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection in Amazonian Brazil ratifies a higher prevalence of specific IgG-

antibody response than delayed-type hypersensitivity in symptomatic and asymptomatic dogs. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, p. 1513–1522, 2012.

SILVEIRA, T. G. V.; KEMMELMEIER, C. *Leishmania braziliensis*: isolation of carbohydrate-containing antigen and possibility of its use in the immunodiagnosis of American Cutaneous Leishmaniasis, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 3, p. 245–252, 1995.

SIMA, M. *et al* The diversity of yellow-related proteins in sand flies (Diptera: Psychodidae). **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–17, 2016.

SLAPPENDEL, R. J. Prize-winning paper Jubilee Competition: Canine leishmaniasis. **Veterinary Quarterly**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2011.

SOARES, B. R. *et al* Seroconversion of sentinel chickens as a biomarker for monitoring exposure to visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1–2, p. 1–18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011.

SOLCÀ, M. S. *et al* Circulating Biomarkers of Immune Activation, Oxidative Stress and Inflammation Characterize Severe Canine Visceral Leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–7, 2016.

SOUZA, A. P. *et al* Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, p. 1–8, 2010.

STOLINA, M. *et al* Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. **Journal of immunology**, v. 164, n. 1, p. 361–70, 2000.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; JAFFE, C. L. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 38, n. 4, p. 547–564, 2007.

SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **The Lancet**, v. 1, n. 7116, p. 127–132, 1960.

TAUB, D. *et al* Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. **Science**, v. 260, n. 5106, p. 355–358, 2006.

TAVARES, N. M. *et al* Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: The role of LTB4 derived from human neutrophils. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 4, p. 656–666, 2014.

TEIXEIRA, C. *et al* Discovery of markers of exposure specific to bites of *Lutzomyia longipalpis*, the vector of *Leishmania infantum chagasi* in Latin America. **PLoS**

Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 3, p. 13–15, 2010.

TEIXEIRA, C. *et al* Characterization of the Early Inflammatory Infiltrate at the Feeding Site of Infected Sand Flies in Mice Protected from Vector-Transmitted *Leishmania major* by Exposure to Uninfected Bites. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 2–11, 2014.

TEIXEIRA, C. R. *et al* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces cc chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2014.

THEODOS, C. M.; RIBEIRO, J. M. C.; TITUS, R. G. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on *Leishmania* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 5, p. 1592–1598, 1991.

TRAVI, B. L. *et al* Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 6, p. 994–1003, 2009.

TRAVI, B. L. *et al* *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Clinical and parasitological observations in experimentally infected *Didelphis marsupialis*, reservoir of New World visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 88, n. 1, p. 73–75, 1998.

URSINE, R. L. *et al* Human and canine visceral leishmaniasis in an emerging focus in Araçuaí, Minas Gerais: Spatial distribution and socio-environmental factors. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 8, p. 505–511, 2016.

VALENZUELA, J. G. *et al* Toward a defined anti-*leishmania* vaccine targeting vector antigens. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 3, p. 331–342, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al* Cutting Edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VENTURIN, G. L. *et al* M1 polarization and the effect of PGE2 on TNF- α production by lymph node cells from dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 11, p. 698–704, 2016.

VERÇOSA, B. L. A. *et al* Transmission potential, skin inflammatory response, and parasitism of symptomatic and asymptomatic dogs with visceral leishmaniasis. **BMC Veterinary Research**, v. 4, p. 1–7, 2008.

VERESS, B.; ABDALLA, R. E.; EL HASSAN, A. M. Visceral spreading depletion of thymus-dependent regions and amyloidosis in mice and hamsters infected intradermally with *Leishmania* isolated from Sudanese cutaneous leishmaniasis. **British journal of experimental pathology**, v. 64, n. 5, p. 505–14, 1983.

VERESS, B.; OMER, A.; SATIR, A. A. Morphology of the spleen and lymph nodes. 1977.

VINHAS, V. *et al* Human anti-saliva immune response following experimental exposure to the visceral leishmaniasis vector, *Lutzomyia longipalpis*. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 11, p. 3111–3121, 2007.

VOLF, P. *et al*. Blocked stomodeal valve of the insect vector: Similar mechanism of transmission in two trypanosomatid models. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 11, p. 1221–1227, 2004.

WARDINI, A. B. *et al* Neutrophil properties in healthy and *Leishmania infantum*-naturally infected dogs. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

WEINKOPFF, T. *et al* Repeated Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Fly Saliva Induces Local Expression of Interferon-Inducible Genes Both at the Site of Injection in Mice and in Human Blood. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 33, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2015. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. **Technical Report Series**, n. 949. 2010.

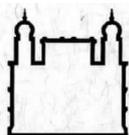
YOREK, M. S. *et al* *Leishmania major* degrades murine CXCL1 – An immune evasion strategy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1–24, 2019.

XU, Q. *et al* IL-10 Augments antibody production in in vitro immunized lymphocytes by inducing a th2-type response and b cell maturation . **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 11, p. 2279–2284, 2004.

XU, X. *et al* Structure and function of a “yellow” protein from saliva of the sand fly *Lutzomyia longipalpis* that confers protective immunity against *Leishmania major* infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 37, p. 32383–32393, 2011.

ZER, R. *et al* Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 8, p. 810–814, 2001.

Anexo A - Aprovação do estudo pelo comitê de Ética



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: **007/2013**

PROJETO: " A importância do cão assintomático na transmissão da leishmaniose visceral: busca de biomarcadores de avaliação e validação de um modelo matemático"

COORDENADORA: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Cães domiciliados	1.500

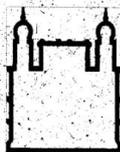
Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 23/07/2013, e tem validade até 23/07/2015.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 07/23/2013, being valid until 07/23/2015.

Salvador, 23 de julho de 2013.

PATRICIA SAMPAIO T. VERAS

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ

Anexo B - Renovação da aprovação do estudo pelo Comitê de Ética

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz

Comissão de Ética no Uso de Animais – FIOCRUZ

Salvador, 02 de outubro de 2015

Cl..nº 010/2015**Para: Dra. Cláudia Brodskyn****Pesquisadora Responsável pelo protocolo 007/2013****Assunto: Resposta ao pedido de extensão do protocolo 007/2013**

Prezada Dra.Cláudia,

Em resposta a sua solicitação de extensão do protocolo 007/2013 intitulado "A importância do cão assintomático na transmissão da leishmaniose visceral: busca de biomarcadores de avaliação e validação de um modelo matemático", informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais analisou a referida solicitação e deu o seu parecer como **aprovado**.

Desta forma, a validade do referido protocolo será até **02/10/2017**.

Atenciosamente,

FERNANDA DE SOUZA SANTOSVice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – FIOCRUZ
Salvador – Bahia

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal da Bahia-UFBA
Escola de Medicina Veterinária-MEV
Laboratório de Monitoramento de Doenças pelo SIG



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
Laboratório de Patologia e Biointervenção

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: Prevenção de risco da disseminação da Leishmaniose Visceral utilizando mapeamento por georreferenciamento da Leishmaniose Visceral Canina em Salvador e em municípios do litoral norte do estado da Bahia

Nome do Participante: _____

No. Identificação do cão: _____ **No. da casa:** _____

Introdução: As informações que se seguem descrevem o estudo que estamos desenvolvendo e seu papel como participante. O entrevistador responderá a quaisquer perguntas que você tiver sobre este questionário ou sobre o estudo. Por favor, ouça com atenção e não hesite em fazer qualquer pergunta sobre a informação que está fornecendo.

Objetivo do Estudo de Pesquisas: Estamos realizando um estudo de pesquisa sobre a Leishmaniose Visceral (Galazar), pela Fundação Oswaldo Cruz em parceria com a Universidade Federal da Bahia e com a Secretaria de Saúde do seu município. A leishmaniose é um grande problema de saúde pública na Bahia e no Brasil. As pessoas podem pegar leishmaniose nas próprias casas ao serem picadas pelo "mosquito asa dura" (ou "pólvora"). Esta doença pode demorar de duas semanas até um ano para aparecer, podendo ou não causar febre, dor abdominal, perda de peso, diarreia e fraqueza. Os cães também podem pegar esta doença, freqüentemente sem demonstrar nenhum sinal, e funcionar como reservatórios para o mosquito se infectar. O propósito deste estudo é avaliar quanto os cães estão funcionando como reservatórios e sua importância na transmissão.

A informação que você poderá fornecer irá auxiliar no desenvolvimento de novas intervenções contra essa doença, tais como kits diagnósticos e medidas de controle da infecção para diminuir o papel dos cães como reservatórios.

Procedimentos: Se você, voluntariamente, decidir que o seu cão pode participar deste estudo, após ter lido este formulário de consentimento, os veterinários irão lhe fazer algumas perguntas a respeito da saúde dele. Seu cão será examinado buscando-se sinais da doença e serão coletados até 10 mililitros (2 colheres de sopa) de sangue por punção da veia no pescoço ou na pata. Será coletada uma amostra do tecido do baço por punção.

A análise laboratorial das amostras indicará se seu cão foi infectado pela *Leishmania*. Por tratar-se de uma zoonose de notificação obrigatória o resultado será encaminhado para o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ). Caso seu animal teste positivo, o pessoal do CCZ entrará em contato com você. Os procedimentos estabelecidos pelo Ministério da Saúde e realizados por estes órgãos compreendem a eutanásia dos animais sorologicamente positivos. Pode ser que o seu animal volte a ser visitado dentro de alguns meses para uma nova avaliação.

Riscos potenciais para o seu cão: A coleta de sangue pode provocar um pouco de dor, inchaço e um pouco de sangramento no local da coleta. Se você observar sangramento no local da coleta, pressione o local por dois minutos e depois olhe se parou. Esses sinais são normais e logo vão desaparecer. Mais raramente, uma infecção pode aparecer no local onde o sangue foi coletado, provocando muita dor, deixando o local quente e fazendo o animal mancar. Em caso de infecção entre em contato conosco ou contate um veterinário.

Anexo C - Termo de consentimento livre e esclarecido

Laboratório de Patologia e Biointervenção

A punção será executada com a ajuda do aparelho de ultrassom, desta forma os riscos para o seu animal são mínimos. Durante a punção em caso de ruptura de alguns vasos, podem acontecer sangramentos internos, deixando o abdômen do cão dolorido e o animal deprimido. Estes sinais podem aparecer até alguns dias após a coleta, no entanto o risco de aparecimento é raro e será reduzido ao mínimo, porque os veterinários são experientes e foram treinados para realizar as coletas das amostras.

A quem contatar: Caso você tenha alguma pergunta no que se refere ao seu cão ou se ocorrerem qualquer um dos sinais descritos acima, por favor, entre em contato com nossa equipe na FIOCRUZ, pelos telefones: (71) 31762269, 31762322 ou 31762263 e procure pelos médicos veterinários Deborah Fraga, Manuela Solcà, Marcelo Bordoni ou Samira Merelles, ou com a médica veterinária Marta Mariana Nascimento pelo telefone: (71) 3283-6745. Se você ligar, vamos avaliar e determinar o procedimento que precisa ser tomado com seu animal.

Participação voluntária: A participação de seu cão neste estudo de pesquisas depende de seu consentimento. Você pode recusar a participação de seu cão em qualquer momento do estudo de pesquisa. Você pode não permitir que colham material do seu animal, se esta for sua opção. Sua recusa em participar no estudo de pesquisa ou em parte do mesmo, não afetará sua relação com a FIOCRUZ. Uma cópia deste formulário será dada para você. Você não será responsável por nenhuma despesa associada a este estudo.

Consentimento:

Eu ouvi e entendi este formulário de consentimento. Minhas dúvidas foram respondidas. Eu, voluntariamente, consinto que o meu cão participe deste estudo.

Assinatura do dono do cão

Data



Impressão Digital do dono do cão

Assinatura do Investigador

Data

Anexo D – Parâmetros para atribuição de escore clínico aos animais

Sinais Clínicos	Pontuação		
	0	1	2
1. Estado Nutricional	Normal	Magro	Caquético
2. Coloração da mucosa	Normal	Anêmica	---
3. Dermatite periorcular	Ausente	Ao redor de um olho	Nos dois olhos
4. Crosta em ponta de orelha	Ausente	Presente em uma orelha	Nas duas orelhas
5. Úlcera na orelha	Ausente	Presente em uma orelha	Nas duas orelhas
6. Despigmentação no focinho	Ausente	Em menos de 1/3	Em mais de 1/3
7. Hiperqueratose no focinho	Ausente	Em menos de 1/3	Em mais de 1/3
8. Lesão no focinho	Ausente	Crosta	Úlcera
9. Volume do baço	Não Palpável	Palpável	---
10. Onicogribose	Ausente	Discreto aumento	Aumento expressivo
11. Alopecia	Ausente	Focal	Em mais de 1/3
12. Dermatite seborreica	Ausente	Focal	Em mais de 1/3
13. Linfadenopatia	Ausente	Um aumentado	Dois ou mais