RYAN EMILIANO DA SILVA

Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi*: Caracterização, Relações Filogenéticas e Diagnóstico Molecular.

São Paulo

2018

RYAN EMILIANO DA SILVA

Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi*: Caracterização, Relações Filogenéticas e Diagnóstico Molecular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Arlei Marcili

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3624
FMVZ

Silva, Ryan Emiliano da
Genes de cisteína proteases (cathepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi*:
caracterização, relações filogenéticas e diagnóstico molecular. / Ryan Emiliano da Silva.
-- 2018.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Arlei Marcili.

1. Diagnóstico molecular. 2. Leishmaniose Visceral. 3. Filogenia. 4. Cães. 5. Zoonose.
I. Título.

CERTIFIED

We certify that the Research "Genes of cysteine proteases (cathepsin L-like) of *Leishmania infantum* chagasi: heterologous expression, characterization, phylogenetic relationships and molecular diagnostics.", protocol number CEUAx 7584250216, under the responsibility Arlei Marcili, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day April 14, 2016.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Genes de Cisteína proteases (Catapsina L-like) de *Leishmania infantum* chagasi: expressão heteróloga, caracterização, relações filogenéticas e diagnóstico molecular. ", protocolado sob o CEUAx nº 7584250216, sob a responsabilidade de Arlei Marcili, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 14 de abril de 2016.

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária Executiva
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Ryan Emiliano

Título: **Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi***: Caracterização, Relações Filogenéticas e Diagnóstico Molecular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, pela oportunidade institucional da realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos de pós-graduação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arlei Marcili, pelo aceite, por todas as orientações e ensinamentos profissionais e por todas as considerações e conselhos de caráter pessoal. Serei sempre imensamente grato e terei sempre seu entusiasmo pelo “fazer ciência” como inspiração na construção de minha vida profissional.

A professora Dra. Márcia Aparecida Sperança, por ter cedido amostras de pacientes humanos, permitindo a realização das etapas do escopo metodológico deste trabalho.

Aos meus pais, Dionízia Maria Costa Emiliano e Vicente Oliveira da Silva e a minha tia mãe, Marta Lúcia Costa Emiliano, por toda entrega e esforço em garantir que eu tivesse as oportunidades que lhe foram negadas e pudesse frequentar as salas de aula do ambiente acadêmico. Todas as conquistas serão sempre para vocês.

Ao meu irmão de vida, João Trevisan, por ser meu maior exemplo e por ter compartilhado todos os momentos, desafios e conquistas. Sem sua presença tudo teria sido absolutamente mais difícil e menos feliz.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa “Filogenia, taxonomia e diagnóstico molecular de tripanossomatídeos”, em especial a Andrea Costa e Juliana Isabel, por toda a acolhida e enorme paciência.

Aos amigos de longe, por toda torcida e vibração, dentre os quais cito nominalmente Mara Andrade, Mara Thais e Tallyson Nogueira. A todos os amigos de laboratório, em especial Amália Barbieri, Amanda Sousa, Ana Beatriz, Maria Carolina e Marina Neves, pelos eventuais auxílios na realização dos protocolos e sobretudo pelos instantes vividos e risos compartilhados.

Aos amigos feitos no Instituto Método, que me auxiliaram na descoberta do prazer e do encantamento pela atividade docente.

A todos os docentes e servidores do departamento, em especial a Renato Caravieri e a Dra. Hilda Pena pelo acompanhamento e supervisão nas rotinas laboratoriais.

“Em decorrência da pobreza permanente, da inércia ampla e da
mediocridade coletiva, é que as doenças parasitárias se instalam como
endemias”

Professor David Pereira Neves

RESUMO

SILVA, R. E. **Genes de Cisteíno proteases (Catepsina L-like) de *Leishmania infantum chagasi*: Caracterização, Relações Filogenéticas e Diagnóstico Molecular**. 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* têm distribuição ubíqua. Este táxon inclui *Leishmania infantum chagasi*, agente etiológico da leishmaniose visceral nas Américas, uma zoonose negligenciada cujas metodologias diagnósticas acumulam uma série de limitações, requerendo a validação e padronização de metodologias diagnósticas satisfatórias. Vários fatores estão relacionados à patogênese causada por este protozoário, entre eles a catepsina L-like, uma cisteíno protease envolvida em processos regulatórios metabólicos e infecciosos. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do gene de catepsina L-like isoforma CPA como alvo de diagnóstico molecular e como marcador filogenético que permita a compreensão das variações intraespecíficas e elucidem a história evolutiva de *L. infantum chagasi* no Brasil. Foram utilizados 44 isolados de *L. infantum chagasi* de diferentes estados brasileiros. Os fragmentos do gene de catepsina L-like foram amplificados, purificados, sequenciados, alinhados manualmente e analisados por métodos filogenéticos de máxima parcimônia e inferência bayesiana. As sequências geradas foram usadas para pesquisar e sintetizar iniciadores a serem usados em reações específicas para o parasita alvo. O gene de catepsina L-like não mostrou variabilidade intraespecífica entre os isolados analisados, sugerindo um evento recente de introdução do mesmo nas Américas. O par de iniciadores propostos amplificou o DNA alvo de isolados de *L. infantum chagasi*, sendo efetivo na amplificação de DNA em concentrações de até 10^{-11} g / μ l. O marcador proposto não apresentou reações cruzadas com outros hemoparasitas de importância clínica. Quando utilizado para o diagnóstico em um painel de amostras clínicas de cães, obteve-se uma frequência de positividade de 49,03% (102/208), contrastando com o valor de 14,42% (30/208) obtido com o marcador para o gene do espaçador ribossomal interno ITS. Quando testado em amostras de flebotomíneos se obteve um valor de 6,25% e em amostras de pacientes humanos o valor foi de 14,28%. Os

marcadores também foram eficazes em amplificar DNA extraído de amostras de urina, de sangue fixado em papel filtro e mesmo em amostras de swab de lesões conjuntivas. Este conjunto de parâmetros permite inferir que o CatLeish-PCR é sensível e específico para o diagnóstico de *L. infantum chagasi* podendo ser aplicado tanto em pesquisas clínicas quanto em inquéritos epidemiológicos de vigilância.

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular. Leishmaniose Visceral. Filogenia. Cães. Zoonose.

ABSTRACT

SILVA, R. E. **Genes of Cysteine proteases (Cathepsin L-like) from *Leishmania infantum chagasi*: Characterization, Phylogenetic Relations and Molecular Diagnosis.** 2018. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The parasites belonging to the *Leishmania* genus have a wide distribution. This taxon includes *Leishmania infantum chagasi*, the etiologic agent of Visceral Leishmaniasis in the Americas, a neglected zoonosis that requires the validation and standardization of satisfactory diagnostic methodologies. Several factors are related to the pathogenesis caused by this protozoan, as Cathepsin L-like, a cysteine protease involved in regulatory and infectious processes. Given this information this work aimed to evaluate the effectiveness of Cathepsin L-like isoform CPA as a target for molecular diagnosis and as a phylogenetic marker that allows understanding the intraspecific variations and the evolutionary history of *L. infantum chagasi* in Brazil. We used 44 isolates of *L. infantum chagasi* from different Brazilian states. The cathepsin L-like gene fragments were amplified, purified, sequenced, manually aligned and analyzed by maximum parsimony and Bayesian inference methods. The sequences generated were researched to construction of oligonucleotide primers to be used in reactions specific to the target parasite. The Cathepsin L-like gene did not show intraspecific variability among the isolates analyzed, suggesting a recent event of introduction of the same in the Americas. The pair of proposed primers amplified the target DNA of *L. infantum chagasi* isolates, being effective in DNA amplification at concentrations of up to 10^{-11} g/μl. The proposed marker did not present cross-reactions with other hemoparasites of clinical importance. When used for the diagnosis in a panel of clinical samples of dogs obtained a positive frequency of 49.03% (102/208), against the 14.42% (30/208) to ribosomal ITS marker. Samples of sandflies obtained a value of 6.25% and in humans the value was 14.28%. The markers were also effective in blood samples fixed on filter paper and even in samples from conjunctival lesion swabs. This set of parameters allows to infer that CatLeish-PCR is a sensitive and specific marker for the diagnosis of *L. infantum chagasi* in clinical and epidemiological surveys.

Keywords: Molecular Diagnosis. Visceral Leishmaniasis. Phylogeny. Dogs.
Zoonotic Diseases.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação do delineamento experimental da diluição seriada do teste de sensibilidade.....30
- Figura 2 - Dendograma baseado nas sequências de catepsina L-*like* dos 44 isolados de *L. infantum chagasi* conjuntamente com sequências de outras espécies de *Leishmania* utilizados nas análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Valores de suporte estão apresentados nos ramos (bootstrap / probabilidade a posteriori).....34
- Figura 3 - Dendograma baseado nas sequências de catepsina L-*like* de 44 isolados de *L. infantum chagasi* utilizados nas análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Valores de suporte estão apresentados nos ramos (bootstrap / probabilidade a posteriori).....35
- Figura 4 - Representação esquemática do alinhamento das sequências de catepsina L-*like* dos isolados de *L. infantum chagasi*, com destaque para o local de anelamento dos iniciadores propostos no CatLeish-PCR.....37
- Figura 5 - CatLeish-PCR para diagnóstico de *L. infantum chagasi* baseado no gene de catepsina L-*like*. A. Análise de especificidade do CatLeish-PCR utilizando DNA oriundo de distintas espécies de hemoparasitas. B. Análise de sensibilidade do CatLeish-PCR utilizando diferentes concentrações de DNA de *L. infantum chagasi*.....39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de isolados de *Leishmania infantum chagasi* incluídos no estudo, listados de acordo com o hospedeiro e origem geográfica.....27

Tabela 2 - Percentual de positividade de amostras clínicas testadas para CatLeish-PCR com marcadores para catepsina L-like de *L. infantum chagasi*.
.....40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B – Inferência Bayesiana;

BLASTn – Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool;

C1 – Cisteíno proteases com padrão estrutural similar a papaína;

C2 – Cisteíno proteases com padrão estrutural similar a calpaína;

CatLeishF – Oligonucleotídeo iniciador na fita senso;

CatLeish-PCR – Reação em cadeia da polimerase para diagnóstico de *Leishmania* baseado no gene de catepsina;

CatLeishR – Oligonucleotídeo iniciador na fita anti-senso;

CBT – Código de identificação na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos;

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;

CPA – Isoforma A de catepsina L-like;

CPB – Isoforma B de catepsina L-like;

CPC – Isoforma C de catepsina L-like;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay);

g – Gramas;

GC – Guanina e Citosina;

gGAPDH – Proteína gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase);

gp63 – Proteína de superfície gp63;

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus);

HRM – Melting de alta resolução (High Resolution Melting);

ITS – Espaçadores ribossomais internos (Internal Transcribed Spacer);

kDNA – Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto;

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro;

MP – Máxima parcimônia;

NH₂ – Radical amino;

NCBI – National Center for Biotechnology Information;

Pb – Pares de base;

PCR – Reação em cadeia da polimerase;

RFLP – Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism);

RNA – Ácido ribonucleico;

SINAM – Sistema de Notificação e Agravos;

SNP's – Polimorfismo de único nucleotídeo (Single Nucleotide Polymorphism);

SSU rDNA – Ácido desoxirribonucleico da pequena subunidade ribossomal (Small Subunit Ribosomal Ribonucleic Acid);

°C – Graus Celsius;

ΔG – Valor de probabilidade de formação de *self dimer*;

μl – Microlitro;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	24
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos Específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Aprovação do Comitê de Ética	27
4.2. Amplificação e Sequenciamento do Gene da Catepsina L-like dos Isolados de <i>Leishmania infantum chagasi</i>	27
4.3. Alinhamento das Sequências e Inferências Filogenéticas	28
4.4. Busca de Iniciadores para Padronização do Diagnóstico Molecular	29
4.5. Análise de Sensibilidade do Diagnóstico Molecular	30
4.6. Análise de Especificidade do Diagnóstico Molecular	31
4.7. Caracterização do Diagnóstico Molecular em Pannel de Amostras Clínicas	31
5. RESULTADOS	33
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS	47

1. INTRODUÇÃO

As espécies do Gênero *Leishmania* são pertencentes à Família Trypanosomatidae (AKHOUNDI et al., 2017), que compreende protozoários flagelados da ordem Kinetoplastida (HONIBGERG, 1963). Tais parasitas apresentam uma elevada diversidade de hospedeiros, nos quais se incluem desde animais invertebrados até vertebrados de praticamente todas as ordens, de modo que, depois dos nematóides, este é o grupo de eucariotos que apresenta a maior variedade de hospedeiros, o que é acentuado por uma distribuição geográfica ubíqua (VICKERMAN, 1976; 1994; STEVENS et al., 2001; SIMPSON et al., 2004, 2006).

Os tripanossomatídeos podem ser monoxênicos ou heteroxênicos e de acordo com as formas apresentadas durante o desenvolvimento, se distribuem em quinze gêneros distintos. Onze destes gêneros compreendem protozoários monoxênicos parasitas de insetos, são eles: *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Bleptomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Paratrypanosoma*, *Rynchoidomonas*, *Sergeia*, *Strigomonas* e *Wallaceina* (PODLIPAEV, 1990; SVOBODOVA et al., 2007; BORGHESAN, 2013; GOMES, 2014; ISHEMGULOVA et al., 2017). O gênero *Phytomonas* reúne espécies heteroxênicas cujo ciclo requer a alternância entre insetos de hábito fitófago e hospedeiros vegetais (BUTLER et al., 2017).

Já as espécies cuja manutenção do ciclo requeira tanto hospedeiros vertebrados quanto hospedeiros invertebrados (geralmente artrópodes hematófagos), encontram-se distribuídas nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Endotrypanum* (WALLACE, 1966; HOARE, 1972; VICKERMAN, 1976; WALLACE et al., 1983; CAMARGO, 1998; BULAT et al., 1999).

Convém citar que os gêneros *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Leptomonas* e *Herpetomonas* são polifiléticos, portanto carecem de revisões taxonômicas (HOLLAR e MASLOV 1997; MERZLYAC et al., 2001; HUGHES e PIONTKIVSKA 2003; PIONTKIVSKA e HUGHES 2005; YURCHENKO et al., 2008).

Sob a perspectiva de Saúde Pública e de acordo com a Lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial de Saúde, ganha destaque o Gênero *Leishmania* (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017),

cuja diversidade nos ambientes neotropicais, abrange um patamar de cerca de 22 espécies e ainda alguns híbridos, resultantes de processos evolutivos de recombinação gênica (LAINSON, 2010).

O ciclo de desenvolvimento destes protozoários envolve duas formas morfológicas básicas: promastigotas e amastigotas (SADLOVA et al., 2017). As diferenças na organização celular das mesmas estão centradas na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo celular, bem como na presença ou ausência de um flagelo livre associado à membrana ondulante (HOARE, 1972; WALLACE, 1979; VICKERMAN, 1994).

A forma promastigota é diretamente associada ao artrópode vetor, no qual ocorre uma série de transições morfológicas (NASCIMENTO, 2013). A forma promastigota procíclica sofre um alongamento no interior da matriz peritrófica precedendo o aparecimento das formas nectomonas. Estas são encaminhadas para o exterior da matriz peritrófica se aderindo ao epitélio intestinal no qual completam a diferenciação nas formas leptomonas. Só então as leptomonas se diferenciam nas formas haptomonas ou em formas promastigotas metacíclicas, indivisíveis e dotadas de alta mobilidade, que passam a ser a forma infectiva para os vertebrados durante o repasto sanguíneo (ASHFORD, 2000; CHOI e LERNER, 2001).

A região do tubo digestivo do inseto na qual o parasita se desenvolve, é tida como importante característica de finalidade taxonômica. Com base neste padrão de disposição, os espécimes de *Leishmania* podem ser agrupados no subgênero *Leishmania* nas situações em que o desenvolvimento se dá exclusivamente no intestino médio e anterior do vetor, tipificando um desenvolvimento suprapilário, com exemplares distribuídos por todo mundo e no subgênero *Viannia* quando o desenvolvimento ocorre inclusive na porção posterior do intestino, delineando um padrão peripilário, sendo que seus representantes estão restritos a região neotropical (LAINSON e SHAW, 1987; SHAW, 1994).

O principal grupo de insetos tidos como vetores biológicos do referido patógeno são os flebotomíneos, taxonomicamente posicionados na ordem Diptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae (GALATI e OVALLOS, 2012; MCLNTYRE et al., 2017). Estes pequenos dípteros são holometabólicos, cujos estágios de desenvolvimento compreendem fases de

ovo, larva com seus quatro respectivos estádios, pupa e adulto, dos quais apenas as fêmeas possuem hábitos hematófagos, além de necessitarem de oferta de açúcares e ambientes com altas cargas de matéria orgânica para efetivarem a postura dos ovos (BASTOS et al., 2016; MAROLI et al., 2017).

O ciclo de desenvolvimento destes insetos pode ocorrer de maneira bastante breve, algumas espécies demandam apenas cerca de dezoito dias para o desenvolvimento das larvas, contudo fatores adversos como baixas temperaturas e clima seco retardam a transformação da larva em pupa, prolongando o tempo total de desenvolvimento (READY, 2013).

Convém destacar que um dos fatores que melhor explica o sucesso deste grupo de vetores decorre da capacidade de ocupar ambientes com características edafoclimáticas, de cobertura vegetal e disponibilidade de fauna bastante diversas (XIMENES et al., 2007; SHIMABUKURO et al., 2017), bem como ecótopos com diferentes níveis de intervenção antrópica, desde pequenos fragmentos vegetais até regiões peridomiciliares, o que acaba sendo fator determinante na incidência de casuística zoonótica (TEODORO et al., 1993; ALMEIDA et al., 2010; MOSCHIN et al., 2013; SILVA et al., 2015).

No Brasil os vetores dos protozoários do gênero *Leishmania* estão distribuídos em múltiplos gêneros, cujas principais espécies são *Bichromomyia flaviscutellata*, *Bichromomyia olmeca nociva*, *Migonemyia migonei*, *Nyssomyia anduzei*, *Nyssomyia intermedia*, *Nyssomyia umbratilis*, *Nyssomyia whitmani*, *Psychodopygus wellcomei* (READY et al., 1983; BARBOSA et al., 2008; REZENDE et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; THIES et al., 2016). Porém a *Lutzomyia longipalpis* é tida como a principal espécie de vetor envolvida na sustentação dos circuitos epidemiológicos de transmissão da forma visceral da doença, encontrando-se dispersa por todas as áreas de endemismo do país (FORATTINI et al., 1970; AMÓRA et al., 2010; GALVIS-OVALLOS et al., 2017).

Em contrapartida as formas amastigostas são encontradas internalizadas nas células fagocíticas mononucleares de hospedeiros vertebrados, dentre os quais: roedores (LAINSON e RANGEL, 2005), marsupiais do gênero *Didelphis* (TRAVI et al., 1994; LAINSON e RANGEL, 2005), morcegos (LIMA et al., 2008; CUNHA et al., 2014), felinos (SAVANI et al., 2004; DAHROUG et al., 2010; AKHTARDANESH et al., 2017), canídeos (DEANE e DEANE, 1954; DEANE e DEANE, 1955; ALENCAR, 1961;

LAINSON et al., 1969; COURTENAY et al., 2002; LAINSON e RANGEL, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008) e seres humanos (CALDAS et al., 2001; LOPES et al., 2010; LIMA et al., 2017).

A consequência da infecção dos hospedeiros vertebrados por parasitas deste gênero é o aparecimento das leishmanioses, doença de ampla diversidade clínica e epidemiológica (GONTIJO e MELO, 2004).

No Brasil as manifestações tegumentares estão associadas à *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (BITTENCOURT et al., 1989), *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MAGALHÃES et al., 1986), *Leishmania (Viannia) guyanensis* (NAIFF et al., 1988), *Leishmania (Viannia) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1991a), *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (SILVEIRA et al., 2002), *Leishmania (Viannia) naiffi* (FIGUEIRA et al., 2017) e *Leishmania (Viannia) shawi* (SHAW et al., 1991). Entretanto as repercussões clínicas provocadas por estes patógenos permitem que a doença seja sub-tipificada em leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose cutânea difusa e leishmaniose mucocutânea (LINDOSO et al., 2016). Os principais sintomas vinculados a estas manifestações em hospedeiros com susceptibilidade imunológica são pápulas eritematosas, lesões cutâneas de caráter ulcerado com possibilidade de formação de crostas e comprometimento do rebordo alveolar e demais mucosas buco-naso-faríngeas acompanhadas de processos de necrose tecidual; ao passo que nos indivíduos que elicitam eficazmente uma resposta imune inata, a infecção tende a manter-se assintomática (SILVEIRA et al., 2008; MAROVT et al., 2010; HU et al., 2012; SANTOS et al., 2013).

Quanto às formas visceralizantes da doença é possível estabelecer uma correlação com *Leishmania (Leishmania) donovani*, na Índia, Bangladesh, Nepal e Paquistão e com *Leishmania (Leishmania) infantum* na bacia do Mediterrâneo (abrangendo a porção sul da Europa e o norte da África) (LAINSON, 1983). Para as Américas na qual se inclui o Brasil, estudos definiram que o agente etiológico das formas viscerais é a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, pois múltiplas análises pautadas em biologia celular e molecular não conseguiram distinguir *Leishmania (Leishmania) infantum* e *Leishmania (Leishmania) chagasi* (RIOUX et al., 1990; DANTAS-TORRES, 2006; MARCILI et al., 2014).

Inferências filogenéticas baseadas nos genes SSUrDNA e gGAPDH de diversos isolados brasileiros e europeus, possibilitaram a separação de *L. infantum chagasi* de *L. infantum*, baseado tanto nos valores de divergência destas sequências quanto na história evolutiva de seus hospedeiros vertebrados, o que sugere um evento recente de introdução de *L. infantum* no Novo Mundo, provavelmente datado no processo de colonização ibérica iniciado com as explorações mercantis do século XV (MARCILI et al., 2014). A presente hipótese contrasta com um cenário de introdução mais antiga, no qual *L. chagasi* seria uma espécie nativa das Américas. Os argumentos utilizados para embasar essa tese estão concentrados na dificuldade de conciliar uma introdução recente do patógeno com quadros de infecção benigna ou inaparente em múltiplos canídeos selvagens. Segundo esta teoria, isto seria possível apenas mediante uma longa relação co-evolutiva do protozoário com os canídeos, que remontaria ao pleistoceno entre cerca de dois a três milhões de anos atrás no período quaternário (LAINSON e SHAW, 1978).

Para a construção de inferências filogenéticas e filogeográficas a respeito deste gênero, uma multiplicidade de outros marcadores moleculares têm sido empregada, como o espaçador interno transcrito do gene ribossômico (MAURICIO et al., 2004; KUHLS et al., 2008), mini-exon (MAURICIO et al., 2004), genes codificantes para a protease de superfície gp63 (MAURICIO et al., 2001; QUISPE TINTAYA et al., 2004), para citocromo oxidase II (IBRAHIM et al., 2001) e para diversas formas de cisteíno proteases (QUISPE TINTAYA et al., 2004).

Em cães, reportados como principal reservatório epidemiológico desta zoonose, as implicações clínicas dos quadros de comprometimento visceral provocados por *L. infantum chagasi* se caracterizam por alterações bioquímicas na urina, onicogribose, emagrecimento progressivo, formação de áreas alopecicas seguidas de descamação, presença de lesões pustulares, esfoliativas ou ulcerativas, adenite, alargamento e perda funcional no baço e fígado, possibilidade de leucocitose e neutrofilia, linfopenia e trombocitopenia (POCAI et al., 1998; KRAUSPENHAR et al., 2007; FIGUEIREDO et al., 2010; FARD et al., 2015; CÂMARA et al., 2017). Em situações pontuais são observados sinais clínicos menos usuais como nódulos em membrana ocular (EGUCHI et al., 2017), nódulos na superfície da língua (VIEGAS et al., 2012) e

alterações cardíacas acompanhadas de miocardite (TORRENT et al., 2005; MENDES et al., 2014).

Em humanos a hipergamaglobulinemia, leucopenia, tosse seca, quadros febris, anemia e hepatoesplenomegalia são as características cardiais da sintomatologia de leishmaniose visceral, sendo que nas situações em que a doença progride acentuadamente podem ser observados episódios de anemia, pancitopenia, emagrecimento progressivo, diarreia, icterícia, vômito e edema periférico, além de eventuais comorbidades infecciosas em pacientes com malária ou portadores do vírus HIV (PASTORINO et al., 2002; DESJEUX e ALVAR, 2003; QUEIROZ et al., 2004; SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2014; LINDOSO et al., 2016; PINNA et al., 2016).

Para justificar toda essa versatilidade nos mecanismos de patogênia, o parasita recorre a uma variedade de moléculas funcionais que confirmam plasticidade aos seus processos metabólicos.

Uma das principais classes proteicas envolvidas nestes processos de catálise regulatória são as proteases (GOMES et al., 2017), cujos genes responsáveis pela expressão das suas dezenas de variantes enzimáticas, encontram-se dispostos de maneira complexa ao longo do genoma, distribuindo-se por mais de vinte cromossomos distintos a depender da espécie (SILVA-ALMEIDA et al., 2014).

Biologicamente as mesmas são responsáveis por mediar a hidrólise de ligações peptídicas, podendo ser classificadas em endopeptidases e exopeptidases, sendo que esta última é subdividida em carboxipeptidases e aminopeptidases, a depender de qual seja a extremidade clivada (BARRET, 1994).

Se levado em conta a natureza química do sítio catalítico, as proteases podem ser categorizadas em metaloproteases (quando requererem a presença de um íon metálico), em serino-proteases, aspártico-proteases e cisteíno-proteases, quando possuírem respectivamente resíduos de serina, ácido aspártico e cisteína (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Dentre as citadas, as cisteíno-proteases são tidas como a família de proteases mais abundantes nos protozoários do gênero *Leishmania*, ocorrendo em maiores quantidades nos megassomos, que correspondem a volumosos lisossomos particularmente abundantes nas formas amastigotas (DUBOISE et

al., 1994). Os padrões de organização estrutural permitem agrupar as cisteíno-proteases na família C1 quando existir similitude com a papaína, ou na família C2 quando houver uma proximidade estrutural com as calpaínas (SAJID e MCKERROW, 2002).

Algumas das funcionalidades nas quais estas enzimas atuam são a manutenção de rotas metabólicas de fins regulatórios, diferenciação celular nos vertebrados e nos vetores, aspectos de patogenia e virulência como invasão celular, transposição de barreiras teciduais, degradação de hemoglobina e outras proteínas hematopoiéticas, evasão da resposta imune do hospedeiro, colonização de macrófagos, ativação de respostas inflamatórias por modulação de interleucinas e de interferon gama e morte celular programada (LEE et al., 2002; PASCALIS et al., 2003; SILVA-ALMEIDA et al., 2012; AGALLOU et al., 2017).

Estas cisteíno-proteases são ainda tipificadas em CPA, CPB e CPC (HIDE et al., 2006; VERMELHO et al., 2010), contudo uma série de experimentos utilizando silenciamento gênico e infecção em modelos murinos demonstrou que as formas CPB possuem maior relevância na deflagração dos processos de virulência (ALEXANDER et al., 1998; CASGRAIN et al., 2016).

Nesse contexto ganha ênfase a catepsina *L-like*, produto da expressão de uma família multigênica com cópias dispostas em tandem nos quais se observam eventuais SNP's polimórficos (JULIANO et al., 2004; MOTTRAM et al., 2004).

No caso específico de *L. infantum chagasi*, estudos de knockout e de transcriptômica através da inibição por mRNA antisense, revelam um perfil peculiar de expressão desta enzima, no qual a isoforma CPA não possui expressão constitutiva, sendo estritamente expressa na forma amastigota, enquanto na forma promastigota ocorre a expressão proteica da isoforma CPB (MUNDODI et al., 2005).

Estruturalmente, essas enzimas apresentam quatro domínios principais: pré-domínio (peptídeo sinal), pro-domínio, domínio central ou catalítico e uma extensão C-terminal (EAKIN et al., 1992; CAMPETELLA et al., 1992; SAJID e MCKERROW, 2002; RUSZCZYK et al., 2008). O seu processo de biossíntese prevê a formação de um precursor inativo, cuja remoção do grupamento NH₂

nos anteparos pré-lisossomais produz uma cadeia enzimática madura, que em geral é secretada para o meio extracelular (MOTTRAM et al., 1997).

As sequências de catepsina L-like têm sido utilizadas para inferir relacionamentos filogenéticos de diferentes espécies de tripanossomatídeos, conseguindo reproduzir coerentemente as deduções construídas com base nas sequências de SSU rDNA e gGAPDH (STEVENS et al., 2001; CORTEZ et al., 2006; HAMILTON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2008). O resultado da análise do gene de catepsina L-like foi útil para revelar um cenário de variabilidade intraespecífica em distintas espécies do gênero *Trypanosoma*, dentre elas *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma congolense* e *Trypanosoma vivax* (CORTEZ et al., 2009; ORTIZ et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; 2014; GARCIA et al., 2011a; 2011b; LIMA et al., 2012; VARGAS, 2014; YOKOYAMA et al., 2015).

Pensando sob a perspectiva da aplicação prática desta gama de conhecimentos gerados, há de se destacar que o gene de catepsina L-like propiciou a padronização de ferramentas de diagnóstico molecular com elevadas taxas de especificidade e sensibilidade para boa parte das espécies de *Trypanosoma* citadas anteriormente, consolidando alternativas para o diagnóstico clínico bem como para inquéritos epidemiológicos destas parasitoses (BEZERRA et al., 2008; CORTEZ et al., 2009; ORTIZ et al., 2009; SILVA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; 2014; GARCIA et al., 2011a; 2011b; LIMA et al., 2012; NAKAYMA et al., 2013; SAMPAIO et al., 2017).

No gênero *Leishmania* os estudos de diversidade e entendimento gênico foram realizados em algumas espécies, dentre elas *L. mexicana*, *L. major*, *L. aethiopica* e *L. infatum* (SAKANARI et al., 1997; ALVES et al., 2001; RAFATI et al., 2001; MUNDODI et al., 2002; ONISIH et al., 2004; JULIANO et al., 2004; MUNDODI et al., 2005; KURU et al., 2007; PIMENTEL-ELARDO et al., 2011). Entretanto, esta modalidade de cisteíno protease nunca foi caracterizada em isolados de *L. infantum chagasi*.

Outra abordagem é a síntese biotecnológica destas proteínas em sistemas recombinantes, para a produção de substratos antigênicos a serem utilizados em metodologias de diagnóstico sorológico. Essas proteínas heterólogas já foram expressas para espécies envolvidas no complexo das leishmanioses tegumentares como *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, não

havendo relatos para a *L. infantum chagasi*, espécie causadora das formas viscerais na América, o que torna necessário explorar as eventuais finalidades diagnósticas desta biomolécula (FEDELI, 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Os parasitas do gênero *Leishmania* distribuem-se em regiões de clima tropical e subtropical de todo o mundo, com exceção da Oceania (LYSENKO, 1971; ASHFORD, 2000; DESJEUX, 2004). Assim sendo, a leishmaniose visceral adquire o status de importante parasitose de caráter zoonótico, sendo uma das mais importantes doenças em saúde pública em cerca de 80 países da Ásia, África e América Latina (ASHFORD et al., 1992). Do montante total de registros, 90% se concentram em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Brasil (WHO, 2010). Sendo assim o Brasil contribui com 90% dos casos documentados no continente americano (DESJEUX, 1996).

No intervalo de 2013 a 2015, a transmissão de leishmaniose visceral foi relatada em 1339 municípios de 21 dos 27 estados; sendo que no último ano deste intervalo o coeficiente de incidência atingiu uma média anual de 1,6 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2015). No estado de São Paulo, os dados de séries epidemiológicas e as projeções estatísticas dão conta de que a doença se encontra em franca dispersão, cuja rota de difusão se dá no sentido da região metropolitana, detentora do maior contingente demográfico do país (RANGEL et al., 2013; CARDIM et al., 2016; SEVÁ et al., 2017). No âmbito particular das formas tegumentares as notificações totalizam mais de 19000 casos em 2015, difundidas por todas as unidades da federação (BRASIL, 2015).

A gravidade desta doença se justifica em parte pela virulência de seus agentes etiológicos, esta por sua vez pode ser associada a uma série de proteínas com atividade biológica sobre os hospedeiros (ARAÚJO, 2013). Dentre elas a catepsina L-like, pertencente ao grupo das cisteíno proteases, sem as quais as formas amastigota e promastigota não possuem viabilidade (SAFFARI e MOHABATKAR, 2009).

Os genes responsáveis por codificar estas enzimas são organizados em famílias multigênicas, o que pode credenciá-los para inferências filogenéticas de sequências bastante próximas (VARGAS, 2008). Além disso, o fato de se tratar de genes codificantes, permite solucionar problemas de politomia e inferências de baixo respaldo, bastante comuns quando se estuda os tripanossomatídeos a partir do DNA ribossômico e sequências de mini exón

(HAMILTON et al., 2007). Existem alguns trabalhos descrevendo estes genes em espécies de *Trypanosoma* (CORTEZ et al., 2006; MENDOZA-PALOMARES et al., 2008), contudo não existem caracterizações voltadas para isolados de *L. infantum chagasi*, o que seria de grande relevância para o entendimento do histórico evolutivo do protozoário no continente e para compreensão da diversidade intraespecífica circulante.

Um dos grandes entraves das estratégias de controle da enfermidade é a dificuldade de padronizar metodologias diagnósticas que garantam elevados valores preditivos para inquéritos em reservatórios. Algumas metodologias consagradas como a visualização direta do parasita são bastante invasivas e laboriosas (ASSIS et al., 2008), além de alcançarem baixos valores de sensibilidade (FERRER, 1999; LAURENTI, 2009).

Os ensaios sorológicos priorizados nas recomendações normativas dos órgãos oficiais também reúnem uma série de limitações de ordem técnica, como baixos valores de especificidade que remetem a reações cruzadas com outros tripanossomatídeos, diminutos índices de concordância entre diferentes testes, ausência de consenso a respeito do produto antigênico a ser empregado e ainda se o mesmo deve ser proveniente de extratos antigênicos brutos ou produtos recombinantes (BURNS et al., 1993; MANCIANTI et al., 1996; LEMOS et al., 2003; LIRA, 2005; OLIVEIRA et al., 2005; ROSARIO et al., 2005; FERROGLIO et al., 2006; ZANETTE, 2006; HIRSCHMANN et al., 2015).

No tocante as ferramentas de biologia molecular, os principais problemas relatados estão centrados na baixa sensibilidade assim como na dificuldade de padronização dos alvos gênicos e protocolos empregados (FISA et al., 2001; MANNA et al., 2004; FARIA, 2012; SILVA et al., 2017).

Em face do conjunto de problemáticas pontuadas e da severidade da enfermidade, torna-se salutar avaliar a viabilidade da catepsina L-like como componente antigênico a ser empregado no diagnóstico imunológico e do seu respectivo gene como possível marcador para reações moleculares em que se possam aferir valores de sensibilidade e especificidade.

3. OBJETIVOS

Caracterizar a catepsina L-like (forma CPA) de *Leishmania infantum chagasi*, avaliar seu gene como marcador de variabilidade intraespecífica e como alvo para diagnóstico molecular;

3.1. Objetivos Específicos;

Amplificar e sequenciar o gene de catepsina L-like (CPA) dos isolados de *L. infantum chagasi* depositados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos;

Realizar uma revisão filogenética do gênero *Leishmania* baseada nas sequências de catepsina L-like (CPA) por inferência de máxima parcimônia;

Analisar a diversidade filogenética intraespecífica de *L. infantum chagasi* no Brasil baseada em sequências de catepsina L-like, pelas inferências de máxima parcimônia e bayesiana;

Determinar um novo alvo para diagnóstico molecular de leishmaniose visceral baseado no gene de catepsina L-like, avaliar sua sensibilidade e especificidade e comparar com marcadores moleculares já conhecidos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aprovação do Comitê de Ética;

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sob número de protocolo 7584250216.

4.2. Amplificação e Sequenciamento do Gene da Catepsina L-like dos Isolados de *Leishmania infantum chagasi*;

Foram utilizados os 44 isolados de *Leishmania infantum chagasi* depositados na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob a curadoria do Dr. Arlei Marcili, reunindo isolados oriundos de distintos hospedeiros e provenientes de diversas regiões do país, conforme descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Lista de isolados de *Leishmania infantum chagasi* incluídos no estudo, listados de acordo com o hospedeiro e origem geográfica.

CBT ^a	Hospedeiro	Origem Geográfica	
01	<i>Canis familiaris</i>	Jaboticabal	São Paulo
12	<i>Canis familiaris</i>	Recreio	Rio de Janeiro
13	<i>Canis familiaris</i>	Mangaratiba	Rio de Janeiro
14	<i>Canis familiaris</i>	Ilha Grande	Rio de Janeiro
15	<i>Canis familiaris</i>	Barra da Tijuca	Rio de Janeiro
16	<i>Canis familiaris</i>	Recreio	Rio de Janeiro
17	<i>Canis familiaris</i>	Cuiabá	Mato Grosso
18	<i>Canis familiaris</i>	Ilha de Guaratiba	Rio de Janeiro
20	<i>Canis familiaris</i>	Cuiabá	Mato Grosso
22	<i>Canis familiaris</i>	Caucaia	Ceará
23	<i>Canis familiaris</i>	Fortaleza	Ceará
24	<i>Canis familiaris</i>	Jequié	Bahia
25	<i>Canis familiaris</i>	Campo Grande	Mato Grosso do Sul
26	<i>Canis familiaris</i>		Distrito Federal
27	<i>Cerdocyon thous</i>		Pará
28	<i>Canis familiaris</i>	Teresina	Piauí
29	<i>Canis familiaris</i>	Teresina	Piauí
30	<i>Canis familiaris</i>	Uruguaiana	Rio Grande do Sul
31	<i>Canis familiaris</i>	Uruguaiana	Rio Grande do Sul
34	<i>Canis familiaris</i>	Petrolina	Pernambuco
37	<i>Canis familiaris</i>	Petrolina	Pernambuco
39	<i>Canis familiaris</i>	Santarém	Pará
40	<i>Canis familiaris</i>	Santarém	Pará

(continuação da tabela 1)

CBT ^a	Hospedeiro	Origem Geográfica	
43	<i>Canis familiaris</i>	Santarém	Pará
44	<i>Canis familiaris</i>	Santarém	Pará
49	<i>Canis familiaris</i>	Campo Grande	Mato Grosso do Sul
50	<i>Canis familiaris</i>	Campo Grande	Mato Grosso do Sul
54	<i>Canis familiaris</i>	Teresina	Piauí
55	<i>Canis familiaris</i>	Teresina	Piauí
56	<i>Canis familiaris</i>	Campo Grande	Mato Grosso do Sul
57	<i>Canis familiaris</i>	Campo Grande	Mato Grosso do Sul
62	<i>Canis familiaris</i>	Petrolina	Pernambuco
96	<i>Canis familiaris</i>	Caxias	Maranhão
105	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
106	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
107	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
108	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
124	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
125	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
126	<i>Canis familiaris</i>	Natal	Rio Grande do Norte
153	<i>Canis familiaris</i>	São Domingos	Maranhão
179	<i>Canis familiaris</i>	Patos	Paraíba
211	<i>Homo sapiens</i>	Marília	São Paulo
212	<i>Homo sapiens</i>	Marília	São Paulo

^a, Código de identificação na Coleção Brasileira de Tripanossomatídeos

Os isolados selecionados foram cultivados para o aumento exponencial da quantidade de células e formação de pellets, estes tiveram seu DNA extraído através do método clássico de extração baseado em fenol-clorofórmio. Os mesmos foram submetidos a reações de amplificação do DNA do gene de catepsina L-like, utilizando iniciadores e parâmetros de reação já definidos (KURU et al., 2007).

Os produtos de amplificação foram submetidos a corridas eletroforéticas em gel de agarose 1,5%, purificados em reações com exonucleases e sequenciados em equipamento ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer) com o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer) de acordo com especificações do fabricante.

4.3. Alinhamento das Sequências e Inferências Filogenéticas;

As sequências oriundas dos dados brutos de sequenciamento foram refinadas no software SeqMan. Os alinhamentos múltiplos foram realizados no programa Clustal X, no qual houve alteração nos parâmetros relativos à inserção de “indels” (peso de inserção=1, Extensão=1) (THOMPSON et al.,

1997). Tais alinhamentos sofreram ajustes manuais através das ferramentas do software GeneDoc v. 2.6.01 (NICHOLAS et al., 1997).

As árvores filogenéticas foram inferidas pelos métodos de análise bayesiana (B) e máxima parcimônia (MP). As árvores de MP foram construídas utilizando o programa PAUP v. 4.0b10 (SWOFFORD, 1998) via busca heurística com 100 replicatas de adição aleatória dos terminais, seguida de troca de ramos ("RAS-TBR Branch-breaking"). As análises de suporte por "bootstrap" foram feitas tomando o valor de 100 replicatas, como parâmetro da amostragem randomizada.

As análises bayesianas foram executadas no programa MrBayes v.3.1.2 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003). Foram empregadas 1.000.000 gerações usando GTR como modelo de substituição. Para a construção do dendrograma final foram utilizados apenas os diagramas obtidos nas últimas 150 replicatas. Para a verificação de suporte de ramos foram utilizados os valores de probabilidade posteriormente obtidos com o programa MrBayes. O suporte de ramos foi estimado com 500 replicatas de "bootstrap" no programa RAxML. A construção das matrizes de similaridade (baseadas em distância p não corrigidas) se deu pelo programa Poit Replacer v.2.0 disponibilizado no endereço <http://www.geocities.com/alvesjmp/software.html>.

Para a realização das inferências, foram reunidas adicionalmente na plataforma do NCBI (National Center for Biotechnology Information) sequências gênicas referentes ao gene de catepsina L-like CPA de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, para a realização conjunta das análises de máxima parcimônia e inferência bayesiana.

4.4. Busca de Iniciadores para Padronização do Diagnóstico Molecular;

Foi feito a busca manual nas regiões consenso dos dados de alinhamento das sequências de catepsina L-like isoforma CPA, de forma a alcançar segmentos que reunissem o melhor conjunto de características que os tornassem alvos eficientes em reações de diagnóstico baseadas em PCR. Os critérios que foram utilizados para avaliar os diferentes segmentos gênicos foram conjuntamente a proporção de guanina + citosina (GC), formação de

4.6. Análise de Especificidade do Diagnóstico Molecular;

Para constatar a especificidade do diagnóstico, os iniciadores foram utilizados em reações com o DNA de distintas espécies do Gênero *Leishmania*, dentre elas *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Sauroleishmania) gymnodactili*, *Leishmania (Sauroleishmania) adleri*, *Leishmania (Sauroleishmania) tarentolae* e *Leishmania (Mundinia) enriettii*.

Foram feitas reações com outras espécies da família Trypanosomatidae, como *Trypanosoma dionisii*, *Trypanosoma terrestris*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma cruzi marinkellei*, *Trypanosoma theileri*, *Trypanosoma gennarii* e com outros hemoparasitas de importância clínica como *Babesia canis* e *Ehrlichia canis*.

4.7. Caracterização do Diagnóstico Molecular em Painel de Amostras Clínicas;

Foram coletadas randomicamente 208 amostras de sangue total de cães residentes em diferentes locais da Região Metropolitana de São Paulo, cujo DNA foi extraído através do kit de extração PureLink Genomic DNA da Thermofisher e quantificados em espectrofotômetro miniaturizado do tipo Nanodrop. O DNA das amostras foi utilizado em reações de PCR com o par de iniciadores para catepsina, cujo resultado foi revelado através de corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%.

O DNA destas mesmas amostras foi submetido a reações de PCR utilizando iniciadores para o gene dos espaçadores ribossomais internos ITS (SCHÖNIAN et al., 2003), de modo a se comparar numericamente os resultados de ambos os marcadores e entender o comportamento e os valores de sensibilidade do diagnóstico centrado em catepsina L-like.

Para avaliar a versatilidade do diagnóstico proposto, foram feitas reações adicionais com DNA obtido de amostras de urina e de materiais alternativos como swab conjuntival e sangue total fixado em papel filtro. Estas amostras

não convencionais foram colhidas apenas de animais com diagnóstico de leishmaniose confirmado por teste de visualização direta do parasita.

Complementarmente, os marcadores de catepsina foram testados em amostras de DNA obtidas de sangue de pacientes humanos bem como em amostras de DNA extraídas a partir de pools de flebotomíneos coletados em regiões endêmicas e não endêmicas (autorização do CEUA sob número de protocolo 6774240114).

5. RESULTADOS

Foi sequenciado o gene de catepsina L-like isoforma CPA de 44 isolados de *L. infantum chagasi*, oriundos de doze unidades da federação das cinco regiões do país. A amostragem conseguiu contemplar satisfatoriamente múltiplos biomas, com diferenciadas características edafoclimáticas, de cobertura vegetal e diversidade faunística. Do ponto de vista epidemiológico, os isolados abrangeram as diferentes áreas apontadas pelo Sistema de Notificação e Agravos (SINAM) como áreas de transmissão intensa ou moderada de leishmaniose visceral.

A análise filogenética conjunta das sequências dos isolados brasileiros com sequências oriundas de outras espécies do gênero *Leishmania* demonstrou uma nítida segregação em quatro grupos (Fig. 2): I. Espécies de *Leishmania* associadas com manifestações clínicas de leishmaniose mucocutânea, nos quais se incluíram *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (0,1% de divergência de sequências e 100% de bootstrap e 1.0 de probabilidade a posteriori). II. Espécies associadas com quadros clínicos de manifestação cutânea, nos quais ficaram agrupadas *L. pifanoi*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (0,52% de divergência de sequências e 100% de bootstrap e 1,0 de probabilidade a posteriori). III. Espécies de *Leishmania* causadoras da "ferida oriental" cutânea, representadas por *L. major* e *L. aethiopica* (1,53% de divergência de sequências e 100% de bootstrap e 1.0 probabilidade a posteriori). IV. Espécies classicamente tidas como agente causador da leishmaniose visceral, tanto no velho mundo quanto no novo mundo (0.14% de divergência de sequências e 100% de bootstrap e 1.0 de probabilidade a posteriori), separadas de acordo com a origem geográfica dos isolados.

Figura 2 – Dendograma baseado nas sequências de catepsina L-like dos 44 isolados de *L. infantum chagasi* conjuntamente com sequências de outras espécies de *Leishmania* utilizados nas análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Valores de suporte estão apresentados nos ramos (bootstrap / probabilidade a posteriori)

O produto amplificado dos isolados de *L. infantum chagasi* apresentou comprimento de cerca de 893pb e revelou no alinhamento uma total similaridade dentre todos os 44 isolados estudados, não sendo observada a presença de regiões de polimorfismo ou com variabilidade gênica. A sequência apresentou ainda um percentual de 99% de similaridade com uma sequência europeia de cisteína peptidase isoforma A de *Leishmania infantum* (XM_001465076.1).

A análise filogenética dos isolados sequenciados para o gene de catepsina L-like demonstrou a formação de um grupo monofilético com inexistência de padrões de variabilidade intraespecífica (figura 3), não sendo evidenciada nenhuma distinção de clados na topologia gerada (100% de bootstrap e 100% de probabilidade *a posteriori* e 100% de similaridade).

Figura 3 – Dendograma baseado nas sequências de catepsina L-like de 44 isolados de *L. infantum chagasi* utilizados nas análises de Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana. Valores de suporte estão apresentados nos ramos (bootstrap / probabilidade *a posteriori*)

Os resultados do delineamento *in silico* levaram a escolha da sequência **5' GACAACGGCACCGTCGGCGCCAAAATAAAAG 3'** como Iniciador CatLeishF na fita senso, tendo uma proporção de GC de 54,5% e uma temperatura de melting estimada em 66,2 °C. No tocante ao Iniciador CatLeishR na fita anti-senso, foi escolhida a sequência **5' CAGTACGGCGGTTTCGCTTGTCTGTTGAAGC 3'**. Este oligonucleotídeo apresentou uma proporção de GC correspondente a 57,6% e uma temperatura de melting presumida em 65,5 °C.

A análise *in silico* destes iniciadores demonstrou homologia apenas com sequências de *L. infantum chagasi*, não sendo observada complementaridade com sequências de outras espécies depositadas no banco de dados.

O tamanho esperado do produto de amplificação foi de 223 pb (figura 4), para tal se convencionou como condições intrínsecas do CatLeish-PCR a execução de 34 ciclos de amplificação, os quais dotados individualmente de etapas de desnaturação a 94°C por 01 minuto, de anelamento a 64°C por 01 minuto e de extensão da fita a 72°C por 45 segundos.

Figura 4 – Representação esquemática do alinhamento das sequências de catepsina L-like dos isolados de *L. infantum chagasi*, com destaque para o local de anelamento dos iniciadores propostos no CatLeish-PCR

O par de iniciadores proposto como ferramenta para o diagnóstico molecular mostrou-se satisfatório quando aplicado em reações *in vitro* com DNA dos isolados de *L. infantum chagasi*. O produto de sequenciamento destes amplificados confirmou por meio do algoritmo de busca do software BLASTn um percentual de 99% de similaridade com sequências de genes de cisteíno proteases de cepas europeias de *L. infantum* previamente depositadas (XM_001465076.1) e de 100% de similaridade com as sequências de *L. infantum chagasi* obtidas no estudo, corroborando que os iniciadores se ligaram adequadamente a porção alvo para qual foram sintetizados.

A aferição da sensibilidade demonstrou que os iniciadores promoveram a formação de bandas nítidas e detectáveis em concentrações de ácido nucleico de até 10^{-11} g/μl, valor bem inferior as usuais concentrações obtidas com as metodologias de extração descritas na literatura (figura 5).

Quando o diagnóstico molecular foi testado com outras espécies do gênero *Leishmania*, não foi observada amplificação cruzada com nenhuma espécie epidemiologicamente associada ao complexo das leishmanioses tegumentares no Brasil. Amplificações inespecíficas também não foram observadas quando o teste diagnóstico foi confrontado com outros hemoparasitas pertencentes aos gêneros *Babesia*, *Ehrlichia* e *Trypanosoma* (figura 5).

Figura 5 – CatLeish-PCR para diagnóstico de *L. infantum chagasi* baseado no gene de catepsina L-like. A. Análise de especificidade do CatLeish-PCR utilizando DNA oriundo de distintas espécies de hemoparasitas. B. Análise de sensibilidade do CatLeish-PCR utilizando diferentes concentrações de DNA de *L. infantum chagasi*

A utilização de iniciadores para o gene de catepsina em reações de PCR com amostras clínicas de sangue de cães revelou uma frequência de 49,03% de animais positivos, contrastando com os 14,42% alcançados com a utilização de iniciadores para o gene ribossomal ITS, sendo que todas as amostras positivas nas reações para o gene ITS apresentaram-se positivas em reações para o gene de catepsina, todavia nesta última não foram observadas bandas inespecíficas que frequentemente se apresentam nas corridas eletroforéticas de material amplificado em reações com iniciadores para o gene ITS.

Quando amostras oriundas de outros materiais foram testadas, se obteve um percentual de 33% de positividade nas amostras de urina, 50% nas amostras de swab de região conjuntiva e 100% nas amostras de sangue fixadas em papel filtro. Nas amostras de sangue de pacientes humanos o

percentual de positividade alcançado foi de 6,25% enquanto que nas amostras oriundas de flebotomíneos o percentual obtido foi de 14,28% (tabela 2).

Tabela 2 - Percentual de positividade de amostras clínicas testadas para CatLeish-PCR com marcadores para catepsina L-like de *L. infantum chagasi*.

Amostras (número)	Amostras positivas (%)	
	CatLeish-PCR	ITS
Sangue de cão (208)	49,03 (102)	14,42 (30)
Urina de cão (3)	33 (1)	
Swab conjuntival de cão (4)	50 (2)	
Sangue fixado em papel filtro de cão (4)	100 (4)	
Sangue humano (50)	6,25 (3)	
Flebotomíneos (21)	14,28 (3)	

6. DISCUSSÃO

As inferências filogenéticas de máxima parcimônia e bayesiana revelaram um padrão de alta similaridade para os isolados brasileiros de *L. infantum chagasi*, essa ausência de variabilidade intraespecífica corrobora o padrão de “baixa evolução” comumente descrito para este gênero (ESPINOSA et al., 2016). Outro dado que respalda o padrão encontrado para o gene de catepsina L-*like* são as inferências baseadas nos genes SSUrDNA e gGAPDH que demonstraram esta ausência de variabilidade ao analisar um número menor de isolados (MARCILI et al., 2014).

A ausência de divergência, mesmo entre isolados provenientes de biomas com características climáticas, incidências pluviométricas, cobertura vegetal e disponibilidade diferenciada de hospedeiros e artrópodes vetores, corrobora a teoria de que este parasita não é autóctone do continente americano (AKHOUNDI et al., 2016). Portanto, este achado sugere um evento recente de introdução do parasita no novo mundo, provavelmente datado no processo de colonização ibero-americana iniciado no final do século XV, através da chegada de cães e roedores infectados nas naus europeias (MAURÍCIO et al., 2000), de modo que esse curto intervalo de tempo evolutivo seria insuficiente para o aparecimento e fixação de eventuais mutações na população.

Esse cenário de recente segregação evolutiva entre *L. infantum* e *L. infantum chagasi* é previamente reforçado por uma série de achados moleculares e de natureza estrutural, que envolvem os genes do espaçador ribossomal, da proteína de superfície gp63, dos mini-exóns, de cisteíno proteases, citocromo oxidase II e dos polimorfismos em tandem avaliados por marcadores de microssatélites (IBRAHIM e BARKER, 2001; MAURICIO et al., 2004; QUISPE TINTAYA et al., 2005; LUKES et al., 2007; KUHLS et al., 2011; MARCILI et al., 2014).

Esse conjunto de resultados refuta definitivamente a hipótese de um cenário em que o parasita responsável por casos de leishmaniose visceral seria nativo das Américas (LAINSON e SHAW, 1978). Dessa forma, o argumento de que o parasita seria autóctone pelo fato de se encontrar adaptado ao parasitismo em outros reservatórios de fauna silvestre poderia ser

explicado apenas pelos ecléticos hábitos alimentares dos insetos vetores, haja vista que nas regiões de clima tropical os mesmos se encontram em bastante abundância e diversidade (TRAVI et al., 1998).

A inferência filogenética na qual as sequências de *L. infantum chagasi* foram analisadas junto a sequências de outras espécies de *Leishmania*, demonstrou a elevada similaridade dos isolados brasileiros com isolados europeus de *L. infantum*, consistindo em mais uma evidência da tese defendida por Marcili et al (2014).

A análise filogenética do gene completo de catepsina permitiu ainda um padrão de agrupamento que refletiu as características clínicas das distintas manifestações de leishmaniose de maneira similar ao apresentado nos clados propostos por Kuru et al (2007) ao analisar sequências de aminoácidos de cisteína proteases. A topologia gerada se correlaciona com os achados para os genes de citocromo B e dos espaçadores ribossômicos internos (DAVILA e MOMEN, 2000; LUYO-ACERO et al., 2004), além de corresponder a composição dos distintos complexos de *Leishmania* propostos por Croan et al (1997) ao avaliar a história evolutiva do gênero em função da comparação das sequências dos genes de DNA e RNA polimerases.

A inferência resolveu corretamente a diferenciação das espécies tidas como agente etiológico das formas tegumentares. Um dos clados agrupou *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. braziliensis*, refletindo os achados de Fornazieri et al. (2008) que ao analisar afecções otorrinolaringológicas atribuiu a *L. braziliensis* e *L. panamensis* a maior parte da etiologia da leishmaniose mucocutânea, assim como atesta os resultados de Souza et al. (1998) que estabelece um nexo causal entre a *L. guyanensis* e quadros infecciosos com comprometimento de mucosas.

Um segundo grupo reuniu *L. amazonensis* e *L. mexicana*, espécies largamente associadas com as manifestações cutâneas da leishmaniose tegumentar no novo mundo (SEIDELIN, 1912; SILVEIRA et al., 1991b; MARTÍNEZ et al., 1998; ANDRADE-NARVAEZ et al., 2005; LINDOSO et al., 2016). Nesse mesmo grupo ficaram posicionadas as sequências de *L. pifanoi*, que mesmo possuindo um menor impacto epidemiológico na transmissão da doença, pertence ao complexo de *L. mexicana* (COLMENARES et al., 2002). Portanto esse resultado corrobora o proposto por Hernández-Montes et al.,

(2012) que demonstrou a similaridade dentre as espécies deste complexo ao propor marcadores específicos para kDNA.

Esses resultados atestam que o gene de catepsina é um bom marcador para posicionamento filogenético de espécies do gênero *Leishmania*, além de sugerir que esse gene pode oferecer bons alvos para o diagnóstico clínico-molecular das leishmanioses, permitindo a diferenciação satisfatória entre as formas clínicas da doença, inclusive dentre as variantes das formas tegumentares, o que pode auxiliar na prescrição terapêutica, no prognóstico médico da enfermidade e na mitigação dos recorrentes problemas de diagnóstico específico.

Os testes baseados em genes de catepsina já mostraram excelentes resultados no diagnóstico de diferentes espécies de *Trypanosoma*, dentre elas *T. vixax* (CORTEZ et al., 2009), *T. congolense* (MENDONZA-PALOMARES et al., 2008), *T. theileri* (RODRIGUES et al., 2010), *T. cruzi* (LIMA et al., 2012) e *T. rangeli* (ORTIZ et al., 2009). Os resultados alcançados com estas espécies de *Trypanosoma* são importantes, pois atestam que mesmo este gene possuindo um baixo número de cópias no genoma, o diagnóstico molecular têm se mostrado bastante específico e consideravelmente sensível (CORTEZ et al., 2009).

O fato dos marcadores propostos terem demonstrado elevada sensibilidade e especificidade por *L. infantum chagasi* permite que o CatLeish-PCR seja usado diretamente em amostras clínicas tanto de áreas não endêmicas com casos importados quanto em áreas endêmicas em que diferentes espécies de *Leishmania* possam estar circulando, haja visto a capacidade discriminatória destes marcadores. Isto os torna eficazes para pesquisas clínicas ou epidemiológicas em hospedeiros humanos, reservatórios animais e artrópodes vetores.

Outra vantagem que contribui para a aplicação prática do CatLeish-PCR é o fato de seu protocolo metodológico dispensar etapas complementares de digestão catalítica por enzimas de restrição, de transcrição *in vitro* precedida de clonagem ou o uso de robustos e dispendiosos equipamentos de High Resolution Melting (HRM) para identificação precisa do protozoário, tornando o método menos oneroso e mais facilmente implementado quando confrontado

com outras metodologias disponíveis (SCHONIAN et al., 2003; VAN DER MEIDE et al., 2005; ZAMPIERI et al. 2016).

Quando comparado aos marcadores do gene ITS, o CatLeish-PCR demonstrou um maior valor de eficácia, corroborando a sensibilidade diagnóstica do marcador. O marcador demonstrou ser efetivo no diagnóstico de amostras positivas de lesões conjuntivais e em amostras de sangue fixadas em papel filtro, esta versatilidade é importante devido ao fato de amostras fixadas em papel filtro serem mais facilmente transportadas e armazenadas, tendo visto a sua estabilidade (EL TAI et al., 2000).

A totalidade dos resultados apresentados permitem propor que o CatLeish-PCR é uma ferramenta efetiva para o diagnóstico de leishmaniose visceral, contornando os problemas recorrentes com a baixa sensibilidade das metodologias de visualização direta, da dependência de profissionais com ampla experiência em microscopia óptica e dos elevados riscos de contaminação das metodologias de isolamento em meios enriquecidos (VAN DER MEIDE et al., 2005; COSTA et al., 2014). Outra limitação contornada pelos marcadores moleculares é o fato da eficiência dos exames de visualização direta dos fragmentos de lesão ser inversamente proporcional ao tempo de lesão, o que reduz a acurácia diagnóstica em situações nos quais a doença esteja em fase crônica (ALVES et al., 2011).

Suplementarmente, o CatLeish-PCR oferece alternativas que habilmente superam as carências exibidas por ensaios sorológicos, notadamente a diminuta especificidade diagnóstica com alta incidência de reações cruzadas com outros tripanossomatídeos (LUCIANO et al., 2009; FRAGA et al., 2016).

Oliveira et al (2005) ao testar experimentalmente o mesmo painel de amostras de soro por metodologias de imunofluorescência indireta, western-blot e ELISA, obteve valores de sensibilidade que variaram de 40% a 90%, constatando estatisticamente a baixa concordância de resultados entre os métodos sorológicos usualmente recomendados para o diagnóstico desta doença.

Esses testes sorológicos que via de regra integram o protocolo prescrito pelas autoridades oficiais de vigilância, também não demonstram boa acurácia para a detecção de animais assintomáticos, impactando negativamente no controle da doença em regiões endêmicas (PACHECO et al., 2014). É

conveniente citar que a baixa precisão dos mesmos contribui para por em prova a viabilidade técnica da eutanásia de cães soropositivos como instrumento efetivo da política nacional de saúde pública e controle de zoonoses, uma vez que essa tomada de decisão é norteada por esta gama de resultados sorológicos (MACHADO et al., 2016).

Um breve levantamento do estado da arte dos diversos marcadores descritos na literatura demonstra uma série de deficiências técnicas. Marcadores baseados em genes presentes no cinetoplasto tem grande sensibilidade, contudo a taxa de especificidade é reduzida (CECCARELLI et al., 2014; CECCARELLI et al., 2017; DANTAS-TORRES et al., 2017), o mesmo comportamento é observado em iniciadores para o gene de citocromo b (FOULET et al., 2007).

Em contrapartida os marcadores baseados nos genes ribossômicos são específicos, mas não possuem valores de sensibilidade satisfatórios (MARFURT et al., 2003). Alguns outros ensaios já devidamente descritos e padronizados como o PCR-RFLP, apresentam como principal revés a necessidade de sequenciar o produto de amplificação primária (MARFURT et al., 2003; MOHAMMADI et al., 2017). Assim sendo o CatLeish-PCR oferece alternativas que contornam estas numerosas problemáticas recorrentemente observadas na utilização de outros marcadores moleculares de finalidade diagnóstica.

Considerando a gravidade e a expansão desta zoonose é salutar a condução de estudos que investiguem os ciclos de transmissão ativos e que monitorem a introdução do parasita em novas áreas. Portanto, métodos de diagnóstico preciso são essenciais, de forma que o CatLeish-PCR consiste em uma ferramenta sensível e específica para o enfrentamento de um patógeno que ainda é emergente em muitas regiões e que sustenta elevados índices de morbidade em animais e humanos.

7. CONCLUSÃO

O gene de catepsina L-like (CPA) é um bom marcador para inferências filogenéticas para protozoários do gênero *Leishmania*.

Os isolados brasileiros de *L. infantum chagasi* não apresentaram variabilidade intraespecífica para o gene de catepsina L-like (CPA).

O diagnóstico baseado no CatLeish-PCR demonstrou sensibilidade em concentrações de DNA de até 1×10^{-11} g/μl.

O diagnóstico baseado no CatLeish-PCR demonstrou ser específico para *L. infantum chagasi*, não sendo observadas reações cruzadas com espécies associadas ao complexo das leishmanioses tegumentares nem com outros hemoparasitas de importância clínica.

O CatLeish-PCR foi útil para diagnosticar *L. infantum chagasi* em amostras de cães, de pacientes humanos e de flebotomíneos.

O CatLeish-PCR detectou DNA extraído a partir de amostras de sangue total, sangue fixado em papel filtro, urina e swab de lesões conjuntivas.

REFERÊNCIAS

- ABDI, R. D., et al. A systematic review and meta-analysis of trypanosome prevalence in tsetse flies. **Bmc Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p.1-13, 13 abr. 2017. Springer Nature.
- AGALLOU, M., et al. Identification of BALB/c Immune Markers Correlated with a Partial Protection to *Leishmania infantum* after Vaccination with a Rationally Designed Multi-epitope Cysteine Protease A Peptide-Based Nanovaccine. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p.1-27, 23 jan. 2017. Public Library of Science (PLOS).
- 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, 3 mar. 2016. Public Library of Science (PLOS).
- AKHTARDANESH, B., et al. Feline visceral leishmaniasis in Kerman, southeast of Iran: Serological and molecular study. **J Vector Borne di.** p. 96-102. mar. 2017.
- ALENCAR J. E. Profilaxia do calazar no Ceará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 1961. v 3, p. 175-180.
- ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **The Journal Of Immunology**, v. 161, n. 12, p.6794-6801, 15 dez. 1998.
- ALMEIDA, P. S., et al. Aspectos ecológicos de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em área urbana do município de Ponta Porã, estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p.723-727, nov. 2010.
- ALVES L. C., et al. S1 subsite specificity of a recombinant cysteine proteinase, CPB, of *Leishmania mexicana* compared with cruzain, human cathepsin L and papain using substrates containing non-natural basic amino acids. **Eur J Biochem**. 2001; 268(5):1206-12.
- ALVES, C. F. **Padronização de um Método Imuno-Histoquímico para Confirmação da Leishmaniose Tegumentar**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Patologia Geral, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- AMÓRA, S. S. A., et al. Monitoring of *Lutzomyia longipalpis* Lutz & Neiva, 1912 in an area of intense transmission of visceral leishmaniasis in Rio Grande do Norte, Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p.39-43, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO).
- ANDRADE-NARVAEZ, F. J., et al. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 47, n. 4, p.191-194, ago. 2005. FapUNIFESP (SciELO).

ASHFORD R. W., et al. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: identity and systematic position of the parasites from patients and vectors. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 86(4):379-80.

ASHFORD R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** 2000. 30(12-13):1269-81. Review

ASSIS, T. S. M., et al. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH[®] para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 17, n. 2, p.107-116, abr. 2008.

BARBOSA, M. G. V., et al. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p.485-491, out. 2008. FapUNIFESP (SciELO).

BASTOS, T. S. A.; LINHARES, G. F. C.; MADRID, D. M. C. Identificação morfológica de flebotomíneos capturados em área urbana. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 3, p.395-401, set. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

BEZERRA, F. S. B., et al. *Trypanosoma vivax* nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 12, p.575-582, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO).

BITTENCOURT, A., et al. *In situ* identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p.585-586, dez. 1989. FapUNIFESP (SciELO).

BORGHESAN, T. C. **Diversidade e filogenia de tripanossomatídeos parasitas de dípteros.** 2013. 51 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

BRASIL. **Guia de vigilância epidemiológica**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica, Ministério da Saúde. 2009. 7. 816.

BRASIL. **Leishmaniose Tegumentar.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 1 mai. 2015.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br>>. Acesso em: 1 mai. 2015.

BULAT S. A., et al. 1999. Classification of Trypanosomatids from Insects and plants by the UP-PCR (Universally Primed PCR) technique and cross dot blot hybridization of PCR products. **European Journal of Protistology.** 35.

BURNS J. M., et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 1993;90(2):775-779.

BUTLER, C. E.; JASKOWSKA, E.; KELLY, S. Genome Sequence of *Phytomonas françai*, a cassava (*Manihot esculenta*) latex parasite. **Genome**

Announcements, v. 5, n. 2, p.1-2, 12 jan. 2017. American Society for Microbiology.

CALDAS, A. J. M., et al. Infecção por *Leishmania (Leishmania) chagasi* em crianças de uma área endêmica de leishmaniose visceral americana na Ilha de São Luís-MA, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 5, p.445-451, out. 2001. FapUNIFESP (SciELO).

CÂMARA, C. S.; BALTAZAR, P. I.; GARCEZ, B. S.. Alterações laboratoriais renais em cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados. **Pubvet**, v. 11, n. 1, p.35-39, jan. 2017.

CAMARGO EP. 1998. *Phytomonas* and other Trypanosomatid parasites of plants and fruit. **Adv Parasit.** 42:29-112.

CAMPETELLA O., et al. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. **Mol Biochem Parasitol.** 1992;50(2):225-34.

CARDIM, M. F. M., et al. Visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil: spatial and space-time analysis. **Revista de Saúde Pública**, v. 50, p.1-12, 2016. FapUNIFESP (SciELO).

CARVALHO, M. R., et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera: Psychodidae). **Acta Tropica**, v. 116, n. 1, p.108-110, out. 2010. Elsevier BV.

CASGRAIN, P., et al. Cysteine peptidase B regulates *Leishmania mexicana* virulence through the modulation of GP63 expression. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 5, p.1-17, 18 maio 2016. Public Library of Science (PLOS).

CAVALIER-SMITH T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? **Biosystems.** 14:461-81.

CAVALIER-SMITH T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. **Microbiol Rev.** 57(4):953-94.

CAVALIER-SMITH, T. 2004. Only six kingdoms of life. **Proceedings: Biological Sciences**, 271:1251-1262.

CECCARELLI, M., et al. Detection and characterization of *Leishmania (Leishmania)* and *Leishmania (Viannia)* by SYBR green-based real-time PCR and High Resolution Melt Analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. **Plos One**, v. 9, n. 2, p.1-11, 13 fev. 2014. Public Library of Science (PLOS).

CECCARELLI, M., et al. The use of kDNA minicircle subclass relative abundance to differentiate between *Leishmania (L.) infantum* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p.1-10, 16 maio 2017. Springer Nature.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **Journal Of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p.175-182, dez. 2001.

COLMENARES, M. et al. *Leishmania pifanoi* Pathogenesis: selective lack of a local cutaneous response in the absence of circulating antibody. **Infection And Immunity**, v. 70, n. 12, p.6597-6605, 1 dez. 2002. American Society for Microbiology.

CORTEZ A. P., et al. The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**. 2006;133(2):159-169.

CORTEZ A. P., et al. Cathepsin L-like genes of *Trypanosoma vivax* from Africa and South America characterization, relationships and diagnostic implications. **Mol Cell Probes**. 2009, 23(1):44-51.

COSTA A. P., et al. Survey of *Leishmania infantum chagasi* in wild and domestic animals in urban area and atlantic rainforest fragment in northeast, Brazil. **Journal Of Biodiversity, Bioprospecting And Development**, [s.l.], v. 01, n. 02, p.1-5, 2014. OMICS Publishing Group.

COURTENAY O., et al. Low infectious ness of a wildlife host of *Leishmania infantum*: the crab-eating fox is not important for transmission. **Parasitology**. 2002. 125(Pt 5):407-14.

CROAN, D. G.; MORRISON, D. A.; ELLIS, J. T. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 89, n. 2, p.149-159, nov. 1997. Elsevier BV.

CUNHA, R. M. et al. Envolvimento do *Desmodus rotundus* no ciclo epidemiológico das leishmanioses na Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 15, n. 3, p.774-781, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

DAHROUG M. A., et al. *Leishmania (Leishmania) chagasi* in captive wild felids in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2010. 104(1):73-4.

DANTAS-TORRES, F. *Leishmania infantum* versus *Leishmania chagasi*: do not forget the law of priority. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p.117-118, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO).

DANTAS-TORRES, F., et al. Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular And Cellular Probes**, v. 31, p.65-69, fev. 2017. Elsevier BV.

DÁVILA, A. M. R.; MOMEN, H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 94, n. 6, p.651-654, set. 2000. Informa UK Limited.

DEANE L. M., DEANE M.P. Encontro de leishmanias nas vísceras e na pele de uma raposa, em zona endêmica de calazar, nos arredores de Sobral, Ceará. **Hospital**. 1954. v. 45, p. 419-421.

DEANE L.M., DEANE M.P. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatório de *Leishmania donovani* em área endêmica de Calazar no Ceará. **Hospital**. 1955. v. 48, p. 61-76.

DESJEUX P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**. 1996. 14: 417-23.

DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. 1, p.3-15, 2 out. 2003. Informa UK Limited.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004. 27(5):305-18. Review.

DUBOISE, S. M., et al. The biosynthesis, processing, and immunolocalization of *Leishmania pifanoi* amastigote cysteine proteinases. **Molecular And Biochemical Parasitology**, v. 68, n. 1, p.119-132, nov. 1994. Elsevier BV.

EAKIN A. E., et al. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem**. 1992. 15;267(11):7411-20.

EGUCHI, G. U., et al. Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 6, p.1480-1484, nov. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

EL TAI, N. O., et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 94, n. 5, p.575-579, set. 2000. Oxford University Press (OUP).

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, p.1-13, 15 dez. 2016. Cambridge University Press (CUP).

FARD, R. M. N., et al. A case report of typical leishmaniasis in dog. **Journal Of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 2, p.339-341, 3 jul. 2013. Springer Nature.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, v. 3, n. 2, p.47-57, jun. 2012. Instituto Evandro Chagas.

FERRARA, T. F. S. **Identificação, expressão recombinante e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Diaphorina citri*, inseto vetor da doença Huanglongbing**. 2014. 110 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

FERRER, Lluís M. Clinical aspects of canine leishmaniasis. p.6-10, jan. 1999.

FERROGLIO, E. et al. Evaluation of an ELISA rapid device for the serological diagnosis of *Leishmania infantum* infection in dog as compared with

immunofluorescence assay and Western blot. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 1-2, p.162-166, mar. 2007. Elsevier BV.

FIGUEIRA, L. P., et al. New human case reports of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) naiffi* in the Amazon region, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 47, n. 1, p.47-52, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

FIGUEIREDO F. B., et al. First report of natural infection of a bush dog (*Speothos venaticus*) with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 2008. 102(2):200-1.

FIGUEIREDO, F. B., et al. Relato de caso autóctone de leishmaniose visceral canina na zona sul do município do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p.98-99, fev. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

FISA, R. et al. Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniosis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 2, p.105-111, ago. 2001.

FORATTINI, O. P.; RABELLO, E. X.; PATTOLI, D. G. B. Sobre o encontro de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 4, n. 1, p.99-100, jun. 1970. FapUNIFESP (SciELO).

FORNAZIERI, M. A., et al. Manifestações otorrinolaringológicas mais Comuns das doenças granulomatosas. **Arq. Int. Otorrinolaringol**. São Paulo, v. 12, n. 3, p.362-365, 2008.

FOULET, F., et al. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time pcr assay and sequencing of the cytochrome b gene. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 7, p.2110-2115, 2 maio 2007. American Society for Microbiology.

FRAGA, D. B. M., et al. The rapid test based on *Leishmania infantum* chimeric rk28 protein improves the diagnosis of canine visceral leishmaniasis by reducing the detection of false-positive dogs. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p.1-11, 5 jan. 2016. Public Library of Science (PLoS).

GALATI, E. A. B.; OVALLOS, F. G. Description of two new sand fly species related to *Nyssomyia antunesi* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae). **Journal Of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p.238-252, 1 mar. 2012. Oxford University Press (OUP).

GALVIS-OVALLOS, F., et al. Canine visceral leishmaniasis in the metropolitan area of São Paulo: *Pintomyia fischeri* as potential vector of *Leishmania infantum*. **Parasite**, v. 24, p.1-10, 2017. EDP Sciences.

GARCIA H. A., et al. Multilocus phylogeographical analysis of *Trypanosoma (Megatrypanum)* genotypes from sympatric cattle and water buffalo populations supports evolutionary host constraint and close phylogenetic relationships with genotypes found in other ruminants. **Int J Parasitol**. 2011a, 41(13-14):1385-96.

GARCIA H. A., et al. High genetic diversity in field isolates of *Trypanosoma theileri* assessed by analysis of cathepsin L-like sequences disclosed multiple and new genotypes infecting cattle in Thailand. **Vet Parasitol.** 2011b, 25;180(3-4):363-7.

GOMES, C. B. et al. Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, v. 133, p.28-36, fev. 2017. Elsevier BV.

GOMES, A. S. G. **Estudo comparativo dos perfis proteômicos de cepas selvagem e aposimbótica de *Strigomonas culicis***. 2014. 230 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p.338-349, set. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

GRIMALDI, G., et al. Description of *Leishmania equatorensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 2, p.221-228, jun. 1992. FapUNIFESP (SciELO).

HAMILTON P. B., GIBSON W. C., STEVENS J. R. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. **Mol Phylogenet Evol.** 2007. 44(1):15-25.

HERNÁNDEZ-MONTES, O., et al. Analysis of kinetoplast DNA from mexican isolates of *Leishmania (l.) Mexicana*. **Interdisciplinary Perspectives On Infectious Diseases**, v. 2012, p.1-7, 2012. Hindawi Limited.

HIDE, M.; BRAS-GONÇALVES, R.; BAÑULS, A. L.. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. **Parasitology**, v. 134, n. 03, p.379-389, 28 nov. 2006. Cambridge University Press (CUP).

HIRSCHMANN, L. C., et al. Leishmaniose visceral canina: comparação de métodos sorológicos em cães de área indene do Rio Grande do Sul no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 1, p.33-44, 2 abr. 2015. Universidade Federal de Goiás.

HOARE C. A. The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. **Oxford: Blackwell Scientific Publications.** 1972.

HOLLAR L., MASLOV D. A. 1997. A phylogenetic view on the genus *Phytomonas*. **Mol Biochem Parasit.** 89:295-9.

HONIGBERG B. M. A contribution to systematics of the non-pigmented flagellates. In: Ludvik J, Lom J, Vavra J, editors. **Progress in Protozoology**. New York: Academic Press. p.68. 1963.

HU, R. V. P. F., et al. First Case of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Suriname. **American Journal Of Tropical**

Medicine And Hygiene, v. 86, n. 5, p.825-827, 1 maio 2012. American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

HUGHES A. L., PIONTKIVSKA H. 2003. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) Based on 18S rRNA: Evidence for Paraphyly of *Trypanosoma* and Six Other Genera. **Mol. Biol. Evol.** 20:644-652.

IBRAHIM, M. E.; BARKER, D. C. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 1, n. 1, p.61-68, jul. 2001. Elsevier BV.

ISHEMGULOVA, A., et al. Molecular mechanisms of thermal resistance of the insect trypanosomatid *Crithidia thermophila*. **Plos One**, v. 12, n. 3, p.1-15, 22 mar. 2017. Public Library of Science (PLOS).

JULIANO M. A., et al. Differences in substrate specificities between cysteine protease CPB isoforms of *Leishmania mexicana* are mediated by a few amino acid changes. **Eur J Biochem.** 2004, 271(18):3704-14.

KRAUSPENHAR, C., et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p.907-910, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO).

KUHLS K. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect.** 2005. 7(11-12):1224-34.

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, 7 jun. 2011. Public Library of Science (PLOS).

KURU T., et al. *Leishmania aethiopica*: identification and characterization of cathepsin L-like cysteine protease genes. *Exp Parasitol.* 2007 Mar;115(3):283-90.

LAINSON R., SHAW J. J., LINS C. Z. Leishmaniasis in Brazil, IV. The fox, *Cerdocyon thous* as a reservoir of *Leishmania (L.) donovani* in Pará State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1969. 63:741-745.

LAINSON, R., et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 81, n. 3, p.517-517, jan. 1987. Oxford University Press (OUP).

LAINSON R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 1983. 77(5):569-96. Review.

LAINSON R., SHAW J. J. Evolution, classification and geographic distribution. In: W Peters, R Killick-Kendrick (eds), *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. I, **Academic press**, London, 1978 e 1987. p. 1-120.

LAINSON R., RANGEL E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2005. 100(8):811-27. Review.

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

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **Bepa**, v. 67, n. 6, p.13-23, 2009.

LEE, N et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death And Differentiation**, v. 9, n. 1, p.53-64, 21 jan. 2002. Springer Nature.

LEMOS, E. M., et al. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p.36-38, 2003. FapUNIFESP (SciELO).

LIMA H., et al. Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2008.103(4):412-4.

LIMA L, et al. Repertoire, genealogy and genomic organization of cruzipain and homologous genes in *Trypanosoma cruzi*, *T. cruzi*-like and other trypanosome species. **PLoS One**. 2012;7(6):e38385.

LIMA, J. T. R., et al. Serodiagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous reserves in the Brazilian Amazon Region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 1, p.61-66, fev. 2017. FapUNIFESP (SciELO).

LINDOSO, J. A. L., et al. Leishmaniasis–HIV coinfection: current challenges. **Hiv/aids - Research And Palliative Care**, v. 8, n. , p.147-156, out. 2016.

LIRA, R. A. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: Avaliação do Desempenho dos Kits EIE-Leishmaniose Visceral Canina-Bio-Manguinhos e IFI-Leishmaniose-Visceral Canina-Bio-Manguinhos**. 2005. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Pública, Departamento de Saúde Coletiva, Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2005.

LOPES, E. G. P. et al. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p.1062-1071, out. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

LUCIANO, R. M., et al. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal Of Veterinary**

Research And Animal Science, v. 46, n. 3, p.181-187, 1 jun. 2009. Universidade de Sao Paulo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBiUSP.

LUKES, J., et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 104, n. 22, p.9375-9380, 21 maio 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences.

LUYO-ACERO, G. E., et al. Sequence variation of the Cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. **Parasitology**, v. 128, n. 5, p.483-491, maio 2004. Cambridge University Press (CUP).

LYSENKO, A. J. Distribution of leishmaniasis in the Old World. **Bull World Health Organ**, v. 44, n. 4, p.515-520, 1971.

MACHADO, C. J. S.; SILVA, E. G.; VILANI, R. M. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 25, n. 1, p.247-258, mar. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

MAGALHÃES, A. V., et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*: 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 4, p.253-262, ago. 1986. FapUNIFESP (SciELO).

MANCIANTI, F.; PEDONESE, F.; POLI, A. Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay (dot-ELISA) for the serodiagnosis of canine leishmaniosis as compared with indirect immunofluorescence assay. **Veterinary Parasitology**, v. 65, n. 1-2, p.1-9, out. 1996. Elsevier BV.

MANNA, L., et al. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p.251-262, nov. 2004. Elsevier BV.

MARCILI A., et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infect Genet Evol.** 2014; 25:44-51.

MARFURT, J., et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 46, n. 2, p.115-124, jun. 2003. Elsevier BV.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical And Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p.123-147, 27 ago. 2012. Wiley-Blackwell.

MAROVIT, M., et al. Cutaneous leishmaniasis: A case report. **Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat**, v. 19, n. 2, p.41-43, 2010.

MARTÍNEZ, E., et al. A new focus of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania amazonensis* in a Sub Andean region of Bolivia. **Acta Tropica**, v. 71, n. 2, p.97-106, set. 1998. Elsevier BV.

MASLOV D. A., SIMPSON L. Evolution of parasitism in kinetoplastid protozoa. **Parasitol Today**. 1995. 11(1).

MAURÍCIO I. L., STOTHARD J. R., MILES M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**. 2000. 16(5):188-9. Review.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. *Leishmania donovani* complex: genotyping with the ribosomal internal transcribed spacer and the mini-exon. **Parasitology**. v. 1283, p.263-267, mar. 2004.

MCINTYRE, S., et al. Species-specific ecological niche modelling predicts different range contractions for *Lutzomyia intermedia* and a related vector of *Leishmania braziliensis* following climate change in South America. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p.1-15, 24 mar. 2017. Springer Nature.

MENDES, R. S., et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p.79-84, fev. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

MENDONZA-PALOMARES C., et al. Molecular and Biochemical Characterization of a Cathepsin B-Like Protease Family Unique to *Trypanosoma congolense*. **Eukaryotic Cell**. 2008; 7(4):684-697.

MENEZES-SOUZA, D., et al. Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin I-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p.1-11, 8 jan. 2015. Public Library of Science (PLoS).

MERZLYAK E., et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids based on small subunit rRNA genes: polyphyly of *Leptomonas* and *Blastocrithidia*. **J Euk Microbiol**. 48 (2):161-9.

MOHAMMADI, M. A., et al. Comparison of three PCR-based methods for simplicity and cost effectiveness identification of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania tropica*. **Iran J Parasitol**, v. 12, n. 2, p.215-223, abr. 2017.

MOSCHIN, J. C., et al. Ecological aspects of phlebotomine fauna (Diptera, Psychodidae) of Serra da Cantareira, Greater São Paulo Metropolitan region, state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 16, n. 1, p.190-201, mar. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

MOTTRAM, J. C. et al. The Multiple cpb Cysteine Proteinase Genes of *Leishmania mexicana* encode isoenzymes that differ in their stage regulation and substrate preferences. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 272, n. 22, p.14285-14293, 30 maio 1997. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB).

MOTTRAM, J. C; COOMBS, G. H; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion In Microbiology**, v. 7, n. 4, p.375-381, ago. 2004. Elsevier BV.

MUNDODI V., KUCKNOOR A. S., GEDAMU L. Role of *Leishmania (Leishmania) chagasi* amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. **BMC Mol Biol.** 2005 3;6:3.

MUNDODI V., et al. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. **Gene.** 2002, 9;282(1-2):257-65.

NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRETT, T. V. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p.529-530, dez. 1988. FapUNIFESP (SciELO).

NAKAYIMA, J., et al. Genetic diversity among *Trypanosoma (Duttonella) vivax* strains from Zambia and Ghana, based on cathepsin L-like gene. **Parasite**, v. 20, p.1-4, 2013. EDP Sciences.

NASCIMENTO, B. W. L. **Estudo de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.** 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2013.

NEGRÃO G. N., FERREIRA M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percorso.** 2014;6(1):147-168.

OLIVEIRA, L. S., et al. A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 1, p.41-47, jan. 2005.

OLIVEIRA, J. M., et al. Mortalidade por leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p.188-193, abr. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

ONISHI K., et al. Cathepsin L is crucial for a Th1-type immune response during *Leishmania major* infection. **Microbes Infect.** 2004;6(5):468-74.

ORTIZ P. A., et al. Genes of cathepsin L-like proteases in *Trypanosoma rangeli* isolates: markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships. **Acta Trop.** 2009, 112(3):249-59.

PACHECO, L. V., et al. Comparação dos testes preconizados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do Crmv-sp.** v. 12, n. 3, p.58-58, 2014.

PASCALIS, H. et al. Th1 cell development induced by cysteine proteinases A and B in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. **Infection And Immunity**, v. 71, n. 5, p.2924-2926, 1 maio 2003. American Society for Microbiology.

PASTORINO, A. C. et al. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p.120-127, abr. 2002. FapUNIFESP (SciELO).

PIMENTEL-ELARDO S. M., et al. New tetromycin derivatives with anti-trypanosomal and protease inhibitory activities. **Drugs**. 2011;9(10):1682-97.

PINNA, R. A., et al. Malaria-Cutaneous Leishmaniasis co-infection: Influence on disease outcomes and immune response. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-15, 27 jun. 2016. Frontiers Media SA.

PODLIPAEV S. A. Catalogue of world fauna of Trypanosomatidae (Protozoa). **Proc. Zool. Inst. USSR Acad. Sci. Leningrad**. 1990. 217: 1-177.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **Jornal de Pediatria**, v. 80, n. 2, p.141-146, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

QUISPE-TINTAYA, K. W., et al. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase b and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. **The Journal Of Infectious Diseases**. v. 189, n. 6, p.1035-1043, 15 mar. 2004. Oxford University Press (OUP).

QUISPE-TINTAYA K.W., et al. Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. **J Infect Dis**. 2005. 192(4):685-92.

RAFATI S., et al. Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. **Mol Biochem Parasitol**. 2001;113(1):35-43.

RANGEL, O., et al. Classificação epidemiológica dos municípios segundo o programa de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral Americana no estado de São Paulo, para 2013. **Bepa**, v. 10, n. 111, p.3-14, 2013.

READY, P. D. et al. Presence of *Psychodopygus wellcomei* (Diptera: Psychodidae), a proven vector of *Leishmania braziliensis braziliensis*, in Ceara State. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 2, p.235-236, jun. 1983. FapUNIFESP (SciELO).

READY, Paul D., Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review Of Entomology**. v. 58, n. 1, p.227-250, 7 jan. 2013.

REZENDE, H. R., et al. Efeitos da implantação da Usina hidrelétrica de Rosal, rio Itabapoana, estados do Espírito Santo e Rio de Janeiro, sobre anofelinos, planorbídeos e flebotomíneos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.160-164, abr. 2009. FapUNIFESP (SciELO).

RIOUX, J. A. et al. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de Parasitologie Humaine Et Comparée**, v. 65, n. 3, p.111-125, 1990. EDP Sciences.

RODRIGUES A. C., et al. Cysteine proteases of *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri*: cathepsin L-like gene sequences as targets for phylogenetic analysis, genotyping diagnosis. **Parasitol Int**. 2010, 59(3):318-25.

RODRIGUES A. C., et al. Congopain genes diverged to become specific to Savannah, Forest and Kilifi subgroups of *Trypanosoma congolense*, and are valuable for diagnosis, genotyping and phylogenetic inferences. **Infect Genet Evol.** 2014, 23:20-31.

RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics.** 2003. 19. 1572-1574.

ROSÁRIO, E. Y., et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay using crude *Leishmania* and recombinant antigens as a diagnostic marker for canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p.197-203, abr. 2005. FapUNIFESP (SciELO).

SADLOVA, J., et al. *Leishmania donovani* development in *Phlebotomus argentipes*: comparison of promastigote- and amastigote-initiated infections. **Parasitology**, v. 144, n. 04, p.403-410, 23 nov. 2016. Cambridge University Press (CUP).

SAFFARI B, MOHABATKAR H. Computational analysis of cysteine proteases (Clan CA, Family C1) of *Leishmania major* to find potential epitopic regions. **Genomics Proteomics Bioinformatics.** 2009;7(3):97-95.

SAJID M, MCKERROW J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. Review. **Mol Biochem Parasitol.** 2002. 30;121(1):159.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Press.

SAMPAIO, P. H. **Técnicas sorológicas e moleculares na avaliação da efetividade do tratamento contra *trypanosoma vivax* em caprinos experimentalmente infectados.** 2017. 22 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2017.

SANTOS, M. E. S. M., et al. Leishmaniose mucocutânea facial: desafios do diagnóstico ao tratamento. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-maxilo-fac,** Camaragibe, v. 13, n. 2, p.15-20, abr. 2013.

SAVANI E. S., et al. The first record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) from Cotia county, São Paulo State, Brazil. **Vet Parasitol.** 2004. 25;120(3):229-33

SAKANARI J. A., et al. *Leishmania major*: comparison of the cathepsin L- and B-like cysteine protease genes with those of other trypanosomatids. **Exp Parasitol.** 1997;85(1):63-76.

SCHONIAN, G., et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 47, n. 1, p.349-358, set. 2003. Elsevier BV.

SEIDELIN, H., Leishmaniasis and Babesiasis in Yucatan. **Annals Of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 6, n. 2, p.295-300, 31 jul. 1912. Informa UK Limited.

SEVÁ, A. P., et al. Risk analysis and prediction of visceral leishmaniasis dispersion in São Paulo State, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p.1-17, 6 fev. 2017. Public Library of Science (PLoS).

SHAW, J. J. et al. Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, de Souza, Póvoa, Ishikawa & Silveira, in Pará State, Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine Et Comparée**, v. 66, n. 6, p.243-246, 1991. EDP Sciences.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p.471-478, set. 1994. FapUNIFESP (SciELO).

SHIMABUKURO, P. H. F.; ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **Zookeys**, v. 660, p.67-106, 8 mar. 2017.

SILVA, A. R., et al. Situação epidemiológica da leishmaniose visceral, na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p.358-364, ago. 2008. FapUNIFESP (SciELO).

SILVA, A. S., et al. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 8, p.2550-2554, nov. 2009. FapUNIFESP (SciELO).

SILVA, G. A. R., et al. First case of autochthonous human visceral leishmaniasis in the urban center of Rio de Janeiro: case report. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p.81-84, jan. 2014. FapUNIFESP (SciELO).

SILVA, L. B., et al. Flebotomíneos (Diptera, Psychodidae) em focos urbanos de leishmaniose visceral no estado do Maranhão, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 44, n. 2, p.181-193, 8 jul. 2015. Universidade Federal de Goiás.

SILVA, L. G., et al. Canine β -defensin-1 (CBD1) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p.1-7, 20 abr. 2017. Springer Nature.

SILVA-ALMEIDA, M., et al. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p.160-170, 2012. Springer Nature.

SILVA-ALMEIDA, M., et al. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p.387-394, 2014. Springer Nature.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1541-1548, 2010. FapUNIFESP (SciELO).

SILVEIRA, F. T., et al. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 1, p.18-22, fev. 1991a. FapUNIFESP (SciELO).

SILVEIRA, F. T., et al. Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil, and the significance of a negative Montenegro skin-test in human infections. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 85, n. 6, p.735-738, jan. 1991b. Oxford University Press (OUP).

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi*. sp. **Parasite**, v. 9, n. 1, p.43-50, mar. 2002. EDP Sciences.

SILVEIRA, F. T., et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p.9-20, jan. 2008.

SIMPSON A. G. B, STEVENS J. R., LUKES J. 2006. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** 22(4):168-74.

SIMPSON A. G, ROGER A. J. Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relation ships with in Euglenozoa. **Mol Phylogenet Evol.** 2004. 30:201–12.

SOUZA, I. S., et al. American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis* as an initial clinical presentation of human immunodeficiency virus infection. **Journal Of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, v. 10, n. 3, p.214-217, maio 1998. Wiley-Blackwell.

STEVENS J. R., et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasit.** 2001. 48:1-56.

SVOBODOVÁ M., et al. *Sergeia podlipaevi* gen. nov., sp. nov. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida), a parasite of biting midges (Ceratopogonidae, Diptera). **Int J Syst Evol Microbiol.** 2007. 57(2):423 -32.

SWOFFORD JR. **PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony**. Version 4b6. Sunderland: Sinauer Associates. 1998.

TEODORO, U., et al. Observações sobre o comportamento de flebotomíneos em ecótopos florestais e extraflorestais, em área endêmica de leishmaniose tegumentar americana, no norte do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 27, n. 4, p.242-249, ago. 1993. FapUNIFESP (SciELO).

THIES, S. F., et al. Frequency and diversity of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Sinop, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p.544-552, out. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

THOMPSON J. D., et al. The clustalX windons interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nulceic Acids Res.** 1997. 25 4876-4882.

TORRENT, E., et al. Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. **Journal Of Small Animal Practice**, v. 46, n. 11, p.549-552, nov. 2005. Wiley-Blackwell.

TRAVI B. L., *Didelphis marsupialis*, an important reservoir of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* in Colombia. **Am J Trop Med Hyg.** 1994. 50(5):557-65.

TRAVI, B. I., et al. Dynamics of *Leishmania chagasi* infection in small mammals of the undisturbed and degraded tropical dry forests of northern Colombia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 92, n. 3, p.275-278, maio 1998. Oxford University Press (OUP).

VAN DER MEIDE, W. F., et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of *Leishmania* parasites in skin biopsy samples. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p.5560-5566, 1 nov. 2005. American Society for Microbiology.

VARGAS, P. A. O. **Genes de cisteíno-proteases de *Trypanosoma* spp. de mamíferos: polimorfismo e relações filogenéticas.** 2014. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia da Relação Patógeno-hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VERMELHO, A. B., et al. Biological roles of peptidases in Trypanosomatids. **The Open Parasitology Journal**, 2010, v. 4, n. 1, p.5-23, 2010.

VICKERMAN K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden, WHR, Evans DA. Editors. Biology of the kinetoplastida. New York: **Academic**; Press 1976. 1-34.

VICKERMAN K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. **Int J Parasitol.** 24(8):1317-31.

VIEGAS, C., et al. Tongue nodules in canine leishmaniosis — a case report. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p.120-125, 2012. Springer Nature.

WALLACE F. G. The trypanosomatid parasites of insects and arachnids. **Exp Parasitol.** 1966; 18:124-93.

WALLACE F. G. Biology of the Kinetoplastida of Arthropods. In: Lumsden WHR, Evans DA, editors. **Biology of the Kinetoplastida**. New York: Academic Press; 1979. 213-40.

WALLACE F. G., et al. Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. **J. Protozool.** 1983. 30:308-313.

WHO. **Control of the leishmaniases:** Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22–26 March 2010. 2010. 202 p.

YOKOYAMA, N., et al. Genetic diversity in *Trypanosoma theileri* from Sri Lankan cattle and water buffaloes. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p.335-341, jan. 2015. Elsevier BV.

YURCHENKO, V. Y., et al. Morphological discordance of the new Trypanosomatid species phylogenetically associated with the genus *Crithidia*. **Protist**, v. 159, n. 1, p.99-114, jan. 2008. Elsevier BV.

XIMENES, M. F. F. M., et al. Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) e leishmanioses no Rio Grande do Norte, Nordeste do Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 1, p.128-137, fev. 2007. Springer Nature.

ZAMPIERI, R. A., et al. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of *Leishmania* species. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p.1-18, 29 fev. 2016. Public Library of Science (PLOS).

ZANETTE, M. F. **Comparação entre os métodos de ELISA, imunofluorescência indireta e imunocromatografia para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina**. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, 2006.