

DIOGO TIAGO DA SILVA

**Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por
*Leishmania (Leishmania) infantum***

São Paulo

2019

DIOGO TIAGO DA SILVA

**Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por
*Leishmania (Leishmania) infantum***

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2019

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3784
FMVZ

Silva, Diogo Tiago da
Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum* / Diogo Tiago da Silva. – 2019.
120 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2019.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientadora: Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Starcke Buzetti.

1. Leishmaniose felina. 2. Resposta imune humoral. 3. Resposta imune celular. 4. Transcriptoma. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da resposta imune de gatos e cavalos naturalmente infectados por *Leishmania* spp.", protocolada sob o CEUA nº 7627010517 (ID 004084), sob a responsabilidade de **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira e equipe; Diogo Tiago da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 13/09/2017.

We certify that the proposal "Avaliation of the immune response of cats and horses naturally infected with *Leishmania* spp.", utilizing 200 Equines (males and females), 300 Cats (males and females), protocol number CEUA 7627010517 (ID 004084), under the responsibility of **Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira and team; Diogo Tiago da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 09/13/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2017** a **04/2018**

Área: **Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses**

Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	6 a 120 meses	N:	200
Espécie:	Equídeos			Peso:	180 a 600 kg		
Linhagem:	Sem distinção de raça						
Origem:	Animais de proprietários	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	6 a 60 meses	N:	300
Espécie:	Gatos			Peso:	2500 a 6000 g		
Linhagem:	Sem distinção de raça						

Local do experimento: Partes dos experimentos dar-se-ão em campo no momento das coleta de amostras biológicas (municípios de Ilha Solteira e Andradina), após, o material biológico coletado seguirá para o laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS/UNESP), onde parte das amostras serão congeladas e outra parte utilizada para testes específicos do projeto como por exemplo ELISAs e ensaios de linfoproliferação. As últimas etapas dos experimentos serão na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP) localizada em Pirassununga.

São Paulo, 15 de abril de 2019

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

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVA, Diogo Tiago da

Título: Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania*
(*Leishmania*) *infantum*

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

Primeiramente a DEUS

Força suprema, onipresente, onisciente e onipotente que rege os meus dias de vida e povoa meus pensamentos de boas vibrações e energias fluídicas, a quem me deixa participar desse dinamismo que é a vida. Gratidão por conceder-me o sopro da existência em fluxo contínuo de idas e vindas aos planos da matéria e da espiritualidade, imbuído da imortalidade da minha consciência existencial, que só aprende a cada nova oportunidade de um amanhecer.

Aos meus pais Claudinei e Evanete

Por todo amor e zelo, pelo incentivo aos estudos e valorização da busca pelo conhecimento, pelos desdobramentos em me ajudar, pelo apoio e orações, pela persistência e fé de dias melhores sempre. Os valores ensinados refletem hoje no meu amor incondicional. Eu AMO vocês.

A minha irmã Elaine e sua família

Por toda a admiração que lhe dedico, pela facilidade em observar os lados positivos, emanando boas energias nas situações mais controversas e por todo carinho que me tens. Ao pequeno Arthur e meu cunhado Ricardo, obrigado pelo apoio. Amo vocês.

A minha irmã Heloisa (Paula Vitória)

Apesar da grande diferença de idade, sua chegada em nossa família veio trazer ensinamentos, entre eles, a como nos melhorarmos. Obrigado pequena semente.

Aos felinos deste estudo

A todos os animais utilizados nesta pesquisa, dedico-lhes meu respeito e gratidão.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

Por me aceitar como orientado, comprar a ideia de um projeto e seguir, pela confiança e por acreditar em meu trabalho, por todo aprendizado, pelas correções e pelo exemplo de profissional que alia honestidade e liderança em suas pesquisas. Por promover um ambiente de trabalho acolhedor. Tenho Gratidão em fazer parte desse time e fico feliz pelo trabalho que desenvolvemos.

À Profa. Dra. Wilma Aparecida Starcke Buzetti

Obrigado pelos anos de dedicação, desde a minha iniciação científica até aqui. Certamente com você aprendi muito e sou grato por suas orientações, conversas, desafios e pela confiança depositada. Obrigado por tudo.

À Julia Benassi

A melhor técnica de laboratório, meu muito obrigado pelas instruções, dedicação, amizade, pelo acolhimento e auxílio nas análises práticas dessa pesquisa. Seu auxílio foi de fundamental importância.

Aos meus amigos Maria Luana e Julio Spada

Obrigado por me acompanharem em todas as coletas e por demonstrarem tanto amor à profissão que escolheram. Com certeza, esse ânimo fez toda a diferença em meus dias. Obrigado por não soltar nossas mãos nas fases ruins, pelos risos frouxos com pouco motivo e pela motivação incessante. Obrigado por estarem presente nas melhores aventuras nessa parte da minha vida. Meus amigos, obrigado por tudo e contem comigo!

Às melhores estagiárias desse Brasil

Gratidão poder conviver com pessoas tão especiais e que fazem a diferença em nosso dia-a-dia. Deixo meu muito obrigado as melhores estagiárias desse Brasil, Nathália Frigo (Nitão), Vanessa Capelleti (Vanessão20\$), Carla Maciel (Carlinha) e Denise (Denisão). Que o sorriso seja largo, a vontade seja muita e a competência maior ainda. Obrigado família LIPAIS.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo – USP, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica (FMVZ) e a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA).

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal e ao Programa de Pós-graduação de Epidemiologia Experimental Aplicado às Zoonoses pela oportunidade aqui em representá-los.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa e auxílio referente ao processo 141416/2017-3.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio regular, processo nº 2016/08018-4.

À APAISA (Associação Protetora de Animais de Ilha Solteira) e a Toca dos Gatos (Recanto Feliz), em especial aos coordenadores (Marcelo Cilim, Michele Perez Viegas e Daniele Perez Viegas) pelo brilhante trabalho que desenvolvem nas Associações, e por toda disponibilidade e solicitude em ajudar-nos. Queridos, o mundo precisa de pessoas como vocês que fazem a diferença.

Aos companheiros do LMVPA (Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada), João A. F. Leonel, Geovana Viotti, Nuno W. B. Pereira e Alex Kazuo Yamaguchi por toda atenção, ajuda com as análises e empenho para resolvermos os desafios. A acolhida de vocês foi muito importante para a execução dessas atividades. Externo a vocês vibrações salutares como colheita das vossas boas ações. Muito obrigado.

À Vanda Lucia Franco de Sá e ao João A. F. Leonel pela acolhida em vossa casa sempre que precisei, sempre com muito zelo e alegria.

Aos docentes e servidores técnicos da USP de Pirassununga e São Paulo, em especial ao Danival, secretário do programa de Epidemiologia Experimental Aplicado as Zoonoses.

Ao professor Dr. Heidge Fukumasu e a técnica de Laboratório Arina Lázaro Rochetti do Laboratório de Oncologia Comparada Translacional (LOCT), pelo auxílio nas análises de citometria.

Ao professor Dr. Rodrigo Soares e Profa. Dra. Helena Lage Ferreira pela ajuda no delineamento do meu projeto ainda na qualificação.

À professora Dra. Valéria Carregaro pelos Kits de FIV e FeLV e valiosas contribuições para o aprimoramento do projeto e a sua orientada Camila, pela disponibilidade em ajudar.

Ao Comitê de Ética e Bem Estar Animal - CEUA, que avaliou a proposta e julgou procedente dentro dos conceitos de ética.

À Fundação Educacional de Andradina (FEA), Hospital Veterinário, por ceder o espaço para nossas análises hematológicas e bioquímicas.

À técnica de Laboratório Cícera Galdina da Silva Rovere e a Profa. Me. Ana Paula P. Lopes Romariz, por me auxiliar com as análises clínicas.

Aos amigos Henrique e Robinho por sempre auxiliar nas coletas de amostras biológicas, sempre de bom humor e com disposição.

Ao prof. Dr. Willian Marinho Dourado Coelho, pela disponibilidade e orientações iniciais dessa pesquisa.

À profa. Dra. Vanessa Carregaro Pereira da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela disponibilidade e orientações sobre as técnicas de citometria.

À Dra. Maria Fernanda, grande amiga e parceira de longos anos de Laboratório, por dividir seus conhecimentos e auxiliar em experimentos práticos de campo e laboratório.

À profa. Dra. Flávia Lisoni, por todas as explicações e disposição em ajudar.

Ao Departamento de Biologia e Zootecnia da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) por toda a estrutura de laboratório disponibilizada para as execuções dessa pesquisa.

Aos profs. Dr. Enes Furlani Junior (Diretor da FEIS) e ao prof. Dr. Paulo Cesar Ceresini, por disponibilizar em seus laboratórios equipamentos que foram importantes para essa pesquisa.

À Escola Técnica de Ilha Solteira, pelo ambiente de trabalho pacífico. Em especial a toda equipe gestora, por compreender as ausências e apoiar a conclusão desse estudo.

Aos professores da ETEC, pelo incentivo, pelas palavras de altruísmo e pela confiança em meu trabalho (Marli, Handerson, Valdo, Monique, Luciano, Aduino).

À Empresa BPI – Biotecnologia Pesquisa e Inovação, na pessoa do seu gestor, Caio Munhoz Theodoro, pelo auxílio e acompanhamento às análises do transcriptoma.

Aos zeladores de todas as instituições que precisei (USP, Unesp e ETEC), com vocês eu tive boas conversas e momentos de alegria genuína, obrigado.

Aos meus amigos de graduação e caminhada, que sempre estiveram comigo, incentivando a seguir a diante. Meu muito obrigado, Murilo Queiroz (Torto), Patrícia Postingel (Pati), Aline Gouveia (Pomba), Bianca Ikari Machado (Ponei), Janaina Rodrigues (Jana), Fernando Puertas (Perdido), Aparecida (Tia cida), Érica Mariana e Marli Solera.

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O “humano” que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada”.

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, D. T. **Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***. [Evaluation of the immune response of cats naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*]. 2019. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os gatos são animais que podem se infectar por parasitos do gênero *Leishmania* spp. No entanto, pouco se conhece sobre a relação das manifestações clínicas da leishmaniose felina (LF) com as respostas imunológicas desses animais. Neste trabalho, nós realizamos diagnóstico laboratorial, clínico, quantificação de IgA, IgG e IgM anti-*L. (L.) infantum*, quantificação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e análise do transcriptoma afim de identificar as diferenças das resposta imune humoral e celular de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. Foi avaliado um total de 166 gatos, onde, 15,06% (25/166) apresentaram anticorpos anti-*L. (L.) infantum* pelo ELISA e 53,61% (89/166) pela RIFI, enquanto que pela PCR convencional (cPCR), 3,61% (6/166) apresentaram DNA do protozoário *Leishmania* no sangue, com 100% de identidade à espécie *L. (L.) infantum* (GenBank: KY379078.1). Desses seis animais, três apresentaram amastigotas de *L. (L.) infantum* em esfregaços do aspirado de linfonodo e/ou medula óssea no exame parasitológico e um teve a *Leishmania* isolada em cultura de aspirado de linfonodo. Assim, os gatos com testes sorológicos, parasitológicos, moleculares e de sequenciamento positivo para *L. (L.) infantum*, compuseram nosso grupo infectado (G1), enquanto que o grupo controle (G2) foi composto por seis gatos saudáveis. De acordo com anamnese clínica observamos que a magreza, alopecias e lesões de pele estavam entre os sinais clínicos mais frequentes entre os felinos. A quantificação de IgG, IgA e IgM totais anti-*Leishmania* foram significativamente maiores no G1 em comparação ao G2, ($p = 2,966 \times 10^{-6}$; $p = 0,0002348$ e $p = 2,945 \times 10^{-5}$, respectivamente). Nos exames hematológicos dos gatos detectamos a redução das plaquetas ($p = 0,0062$, $p < 0,01$) nos gatos G1 em relação ao G2, enquanto os leucócitos foram aumentados para gatos G2 ($p = 0,014$, $p < 0,05$). Em relação aos parâmetros bioquímicos, os gatos infectados (G1) apresentaram aumento na concentração de proteína total ($p = 4,4832 \times 10^{-6}$, $p < 0,01$) com baixa albumina ($p = 0,0065$, $p < 0,01$) e baixa aspartato aminotransferase ($p = 0,0025$, $p < 0,01$) fora do intervalo de referência para a espécie. Pela citometria de fluxo observamos diferença significativa entre os linfócitos T CD4⁺ do G1 em relação ao G2 ($p = 0.0427$), entretanto, o mesmo não aconteceu para as subpopulações de

linfócitos T CD8⁺ (p = 0.06199). Pela análise do transcriptoma destacamos a “down” regulação das vias metabólicas que controlam a atividade da proteína arginina desaminase (PAD), o processo de hemopoiese, a resposta ao estresse e o desenvolvimento do sistema imunológico e a “up” regulação da via sinalizadora do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e do gene CXCR6 que participa da via sinalizadora da inflamação mediada pela sinalização de quimiocinas e citocinas. Possivelmente, a regulação negativa ou positiva dessas vias pode indicar a imunorregulação, por parte do parasita, como mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro. Em contrapartida, a “down” regulação das vias sinalizadoras de ativação das células B (gene *MAP3k2*) de ativação das células T (gene *LCP2*), dos receptores *Toll* (gene *TLR4*) associado a “down” regulação dos genes IFNAR1, IFNGR2, IL13RA1, IL10 e IL1B nos gatos infectados (G1) do nosso estudo, indicam imunorregulação por parte do sistema imune felino em controlar o parasitismo intracelular por *L. (L.) infantum*, mas que não foram suficientes para controlar a progressão da doença. Esses resultados trazem as primeiras informações para elucidação da resposta imunológica às infecções por *L. (L.) infantum* em felinos.

Palavras-chave: Leishmaniose felina. Resposta imune humoral. Resposta imune celular. Transcriptoma.

ABSTRACT

SILVA, D. T. **Evaluation of the immune response of cats naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*** [Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*]. 2019. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Cats are animals that can be infected by parasites of the genus *Leishmania* spp. However, little is known about the relationship of the clinical manifestations of feline leishmaniasis (FL) with the immunological responses of these animals. In this work, we performed laboratory, clinical, quantification of IgA, IgG and IgM anti-*L. (L.) infantum*, quantification of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and transcriptome analysis in order to identify differences in the humoral and cellular immune responses of cats naturally infected by *L. (L.) infantum*. A total of 166 cats were evaluated, where 15.06% (25/166) presented antibodies anti-*L. (L.) infantum* by ELISA and 53.61% (89/166) by RIFI, whereas by conventional PCR (cPCR), 3.61% (6/166) presented *Leishmania* protozoal DNA in the blood, with 100% identity to the species *L. (L.) infantum* (GenBank: KY379078.1). Of these six animals, three presented amastigotes of *L. (L.) infantum* in smears of the lymph node aspirate and/or bone marrow in parasitological examination and one had *Leishmania* isolated in lymph node aspirate culture. Thus, cats with serological, parasitological, molecular and positive sequencing tests for *L. (L.) infantum*, composed our infected group (G1), while the control group (G2) was composed of six healthy cats. According to clinical anamnesis we observed that thinness, alopecias and skin lesions were among the most frequent clinical signs among felines. Quantification of total anti-*L. (L.) infantum* IgG, IgA and IgM were significantly higher in G1 than in G2, ($p = 2,966 \times 10^{-6}$, $p = 0,0002348$ and $p = 2,945 \times 10^{-5}$, respectively). In the hematological examinations of cats, we detected the reduction of platelets ($p = 0.0062$, $p < 0.01$) in G1 cats compared to G2, whereas leukocytes were increased for G2 cats ($p = 0.014$, $p < 0.05$). In relation to the biochemical parameters, infected cats (G1) showed an increase in the total protein concentration ($p = 4.4832 \times 10^{-6}$, $p < 0.01$) with low albumin ($p = 0.0065$, $p < 0.01$) and low aspartate aminotransferase ($p = 0.0025$, $p < 0.01$) all outside the reference range for the species. By flow cytometry we observed a significant difference between G1 CD4⁺ T lymphocytes compared to G2 ($p = 0.0427$); however, the same did not occur for the CD8⁺ T lymphocyte subpopulations ($p = 0.06199$). By the analysis of the transcriptome we highlight the “down”

regulation of the metabolic pathways that control the activity of the protein arginine deaminase (PAD), the hemopoiesis process, the response to stress and the development of the immune system and the “up” regulation of the signaling pathway fibroblast growth factor (FGF) and the CXCR6 gene that participate in the signaling pathway of inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling. Possibly, the negative or positive regulation of these pathways may indicate the immunoregulation, by the parasite, as a mechanism to evade the immune system of the host. In contrast, “down” regulation of B cell activation (MAP3k2 gene) activation cells of T cells (LCP2 gene), Toll receptors (TLR4 gene) associated with “down” regulation of the genes IFNAR1, IFNGR2, IL13RA1 , IL10 and IL1B in the infected (G1) cats of our study indicate immunoregulation by the feline immune system to control intracellular parasitism by *L. (L.) infantum* but not sufficient to control the progression of the disease. These results provide the first information to elucidate the immunological response to *L. (L.) infantum* infections in felines.

Palavras-chave: Feline leishmaniasis. Humoral immune response. Cellular immune response. Transcriptome.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo da transmissão vetorial da *Leishmania* spp..... 24
- Figura 2.** Casos de leishmaniose visceral por UF, Brasil, 2003 a 2015..... 26
- Figura 3.** Mapa da razão Kernel representando a taxa de incidência de leishmaniose visceral humana e rodovias do Estado de São Paulo, com destaque para a Rodovia Marechal Rondon no período de 1999 a 2013. 27
- Figura 4.** Mapa do estimador de densidade de Kernel. Distribuição dos casos de LVC em cada setor no município de Ilha Solteira, SP..... 28
- Figura 5.** Kit teste para detecção do antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) e anticorpos do vírus da imunodeficiência felina (FIV). Setas vermelhas indicando reação positiva (+), setas azuis indicam reação negativa (-). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019. 40
- Figura 6.** Fotografias de lâminas de RIFI para *Leishmania (Leishmania) infantum*. A: reação positiva, na objetiva de 40x. B: reação negativa, objetiva de 40x. C: titulação de anticorpos anti-Leishmania pela técnica RIFI, a partir da diluição 1/40. Gatos positivos (N = 89). Barra = 50µm. Ilha Solteira/SP, 2019..... 53
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os iniciadores 13A/13B, obtidos pela cPCR do sangue de gatos, gerando fragmentos de 120bp. Linha 1, (L): Padrão 100 a 3.000 bp (*Kasvi, cod K9-100l*); (+): Controle positivo (*L. amazonensis*); (-): Controle negativo; P1 a P6: amostras de sangue de gatos positivos na cPCR (Grupo G1); N1 a N6: amostras de sangue de gatos negativos na cPCR (Grupo G2). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019..... 55
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os primers LIT5R/L5-8S, obtidos pela cPCR do sangue de gatos, gerando fragmentos de 300 a 350bp. Linha 1, (L Padrão 100 a 3.000 bp (*Kasvi, cod K9-100l*); (+): Controle positivo (*L. amazonensis*); (-): Controle negativo; P1 a P6: amostras de sangue de gatos positivos na cPCR (Grupo G1); N1 a N6: amostras de sangue de gatos negativos na cPCR (Grupo G2). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019..... 55
- Figura 9.** Curva de detecção para DNA de *L. (L.) infantum* em amostras de sangue de gatos. Controle positivo: Cepa de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Análise realizada pelo aparelho *LightCycler 480II da Roche*. Pirassununga, São Paulo, 2019. 56
- Figura 10.** Relatório gráfico da versão web do BLAST mostrando 100% de identidade do fragmento da PCR ITS1 dos gatos positivos sequenciados, com *L. (L.) infantum*. Ilha Solteira, São Paulo, 2019. 57

- Figura 11.** (A, B, C, e D) Esfregaços de linfonodos poplíteos de gatos, apresentando amastigotas de *L. (L.) infantum* no interior de macrófagos (seta vermelha). Barra = 50µm, objetiva 100x. Coloração: Kit Panótico Rápido®. Ilha Solteira, São Paulo, 2019. 58
- Figura 12.** Sinais clínicos observados em gatos. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 61
- Figura 13.** Alterações físico-clínicas em gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (G1). **A:** alopecia na face e corpo com eritema e crostas; **B:** linfonodo hipertrófico no qual amastigotas do parasita foram identificadas; **C:** área alopécica, eritematosa e circular; **D:** o mesmo animal com lesões no focinho; **E:** lesões de pele (ulcerações expostas); **F:** conjuntivite; **G:** alopecia e ulceração crustal na base do pavilhão direito **H:** o mesmo animal, demonstrando alopecias no rosto e no corpo. Ilha Solteira, São Paulo, 2019. 62
- Figura 14.** Avaliação da atividade funcional dos anticorpos. **A:** Mouse anti-feline CD4-FITC (*Cat. No. 8130-0, SouthernBiotech*) marcando linfócitos T CD4⁺. **B:** Mouse anti-feline CD8-FITC (*Cat. No. 8120-02, SouthernBiotech*) marcando linfócitos T CD8⁺. Objetiva 100x. Barra 50µm. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019. 65
- Figura 15.** **A e D:** população de linfócitos (ponta da seta vermelha). **B:** marcação específica para a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (circulo em vermelho). **E:** marcação específica para a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ (circulo em vermelho). **C e F:** ausência de marcação (seta vermelha), pois os testes foram isolados para cada anticorpo. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019. 66
- Figura 16.** Gráfico boxplot das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (G1) e não infectados (G2). Pirassununga, São Paulo, 2019. 68
- Figura 17.** Reatividade dos isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) anti-*Leishmania* em gatos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* (G1) em comparação aos gatos saudáveis (G2). Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 72
- Figura 18.** Comparação da reatividade dos isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) anti-*Leishmania* em gatos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* (G1) e em gatos saudáveis (G2). Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 72
- Figura 19.** Eletroferograma dos RNAs dos grupos G1 e G2. De **A-F:** RNA extraídos das PBMSc de gatos saudáveis, grupo G2. De **G-L:** RNA extraído das PBMCs de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, grupo G1. Acima de cada eletroferograma estão os valores de RIN. Os picos correspondem aos RNAs ribossomais 5S, 18S e 28S. Botucatu, São Paulo, Brasil, 2019. 77
- Figura 20.** Citrulinação catalizada pela enzima PAD (proteína-arginina deaminase). 81

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Níveis de ELISA (NE) em relação aos valores de absorvância (densidade óptica – D.O.) dos gatos avaliados utilizando o antígeno solúvel bruto de *L. (L.) infantum*. Ilha Solteira, São Paulo, 2019. 52
- Tabela 2.** Gatos infectados (G1) e não infectados (G2) para *L. (L.) infantum* selecionados para avaliação laboratorial. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2019. 59
- Tabela 3.** Comparação entre parâmetros hematológicos e bioquímicos de gatos infectados por *L. (L.) infantum* (G1) e não infectados (G2). Ilha Solteira, São Paulo, 2019..... 64
- Tabela 4.** Valores médios das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) do sangue periférico de gatos naturalmente infectados e não infectados com *L. (L.) infantum* expressos em %. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019. 67
- Tabela 5.** Descrição das principais vias metabólicas reprimidas nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididas de acordo com as categorias ontológicas. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 79
- Tabela 6.** Descrição das principais vias metabólicas ativadas nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididas de acordo com as categorias ontológicas. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 80
- Tabela 7.** Descrição dos genes “down” regulados (*Genes ontology*) nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididos de acordo com as categorias ontológicas. p-value < 0,05, FDR < 0.01. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 84
- Tabela 8.** Descrição dos genes “up” regulados (*Genes ontology*) nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididos de acordo com as categorias ontológicas. p-value < 0,05, FDR < 0.01. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 85
- Tabela 9.** Descrição dos genes de citocinas selecionados “Up” e “Down” regulados nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2. p-value < 0,05, FDR < 0.03. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019. 88

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral	22
2.2	Transmissão e ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	23
2.3	Distribuição da LV (Brasil, Estado de São Paulo, Ilha Solteira)	25
2.4	Leishmaniose felina.....	29
2.5	Respostas imunológicas da LV em cães e gatos	31
3	JUSTIFICATIVA.....	35
4	OBJETIVO.....	36
4.1	Objetivos específicos	36
5	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	37
6	MATERIAL E MÉTODOS	38
6.1	Animais e área do estudo	38
6.2	Colheita de amostras biológicas	38
6.3	Avaliação clínica	39
6.3.1	Anamnese e exame clínico.....	39
6.3.2	Hemograma completo.....	39
6.3.5	Diagnóstico para FIV/FeLV.....	40
6.4	Diagnóstico para leishmaniose.....	41
6.4.1	Exames sorológicos	41
6.4.2	Exames moleculares	42
6.4.3	Exame Parasitológico direto: Punção de Biopsia Aspirativa (PBA).....	45
6.5	Seleção de gatos positivos e negativos para avaliação da resposta imune	45
6.6	Detecção das imunoglobulinas IgA e IgM anti- <i>L. (L.) infantum</i> pelo ELISA.....	46

6.7	Determinação das subpopulações de linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) em células do sangue pela citometria de fluxo.....	47
6.8	Avaliação da resposta imune celular	48
6.8.1	Extração do RNA das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs)	48
6.8.2	Sequenciamento de alto desempenho do transcriptoma (RNA-Seq).....	48
6.8.3	Processamento de dados de RNA-Seq e análise diferencial de expressão gênica 49	
6.8.4	Bioinformática: Análise de ontologia genética	49
6.9	Delineamento estatístico	50
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
7.1	Perfil Clínico-Laboratorial da Leishmaniose Felina	51
7.2	Perfil de Linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de sangue periférico na Leishmaniose Felina	65
7.3	Padrões Isotípicos de Imunoglobulinas: IgA, IgG e IgM na Leishmaniose Felina.....	71
7.4	Análise do transcriptoma na Leishmaniose felina.....	77
7.4.1	Integridade do RNA.....	77
7.4.2	Análise das vias metabólicas na Leishmaniose Felina	78
7.4.3	Análise dos Genes diferencialmente expressos na Leishmaniose Felina.....	83
8.	CONCLUSÕES.....	93
9.	REFERÊNCIAS	95
	APÊNDICE 01	117
	ANEXOS 01	119

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as seis doenças tropicais mais importantes do mundo e podem acometer tanto humanos quanto animais (WHO, 1990). O Brasil está entre os cinco países que detém 90,0% dos casos de leishmaniose (cutânea e visceral), junto com Bangladesh, Índia, Nepal e Sudão (CARDIM, et al., 2016).

A leishmaniose visceral (LV) no Brasil é causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (sin. *L. chagasi*), e é transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, mas encontra-se em franca expansão para grandes centros (BRASIL, 2017a). O panorama epidemiológico no Brasil demonstra a amplitude geográfica da LV ao longo dos anos (WERNECK, 2010). Na década de 1990, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões, essa situação se modifica. Em 2012, a região Nordeste foi responsável por 43,1% dos casos do país, e no ano de 2015 foi a região com o maior número de casos de LV no país (1.806); seguida pelas regiões Sudeste (538); Norte (469); Centro-Oeste (157); e Sul (5) (BRASIL, 2017a,b).

A expansão das áreas de transmissão da LV levanta questionamentos sobre as estratégias de controle no Brasil. Durante muito tempo, as diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) estiveram centradas e dirigidas verticalmente para o controle do reservatório canino (inquérito epidemiológico canino e eutanásia dos cães sororreagentes), bem como para a aplicação de inseticidas para controle dos vetores e, diagnóstico e tratamento adequado dos casos humanos notificados. Entretanto, essas medidas, muitas vezes realizadas de forma isolada, não apresentavam efetividade para redução da incidência da doença. Por isso, o PVCLV tem reavaliado suas ações, cujos novos enfoques abrangem estados e municípios silenciosos como medida profilática para evitar o agravamento e expansão dessa doença em áreas sem transmissão, e, nas áreas com transmissão de LV, após estratificações epidemiológicas, as medidas de controle devem ser distintas, de acordo com a realidade de cada área. No entanto, as medidas básicas de prevenção devem ser realizadas e monitoradas constantemente (BRASIL, 2014).

Os canídeos são considerados os reservatórios de maior importância da LV quando se considera a forma zoonótica da doença, principalmente os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), pois esta espécie é responsável pela manutenção do parasita em focos endêmicos,

devido especialmente a alta prevalência da doença nesses animais, presença de formas amastigotas na pele e pela proximidade com os humanos (ALVAR et al., 2004).

Além dos canídeos, casos de leishmaniose têm sido reportados em outras espécies domésticas, como os bovinos (BHATTARAI et al., 2010; LOBSIGER et al., 2010; ROHOUSOVA et al., 2015; PAIXAO, 2017), caprinos (BHATTARAI et al., 2010;; ROHOUSOVA et al., 2015), equinos (BENASSI et al., 2018; KOEHLER et al., 2002; PAIXAO, 2017; ROLAO et al., 2005; SOARES et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2003) e felinos (SAVANI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2015; ALVES-MARTIN et al., 2017; BENASSI et al., 2017).

A leishmaniose felina (LF) é cada vez mais relatada em áreas endêmicas (MANCIANTI, 2004; COSTA et al., 2010) e ocasionalmente em áreas não endêmicas (PENNISI; PERSICHETTI, 2018), sendo naturalmente infectados pelas mesmas espécies de *Leishmania* que acometem os cães e humanos em todo o mundo (PENNISI et al., 2015a; PENNISI et al., 2015b) e também encontrados nas mesmas áreas geográficas (PENNISI et al., 2015a). Embora haja cada vez mais evidências de que os gatos são reservatórios para o parasita, seu papel no ciclo epidemiológico da doença e em questões de saúde pública requer mais investigação (SILVEIRA-NETO et al., 2015).

Desse modo, a reincidência da LF em várias regiões endêmicas, têm levado pesquisadores a estudar métodos de diagnósticos mais precisos, bem como avaliar o comprometimento físico-clínico associado aos tipos de respostas imunológicas desenvolvidas pelos felinos, para então compreender sua real participação no ciclo de vida das leishmanias e manutenção da doença.

Neste trabalho, foi realizada uma série de análises com procedimentos metodológicos validados cientificamente para a melhor compreensão desta doença em felinos. Visando contribuir com estudos mais aprofundados sobre a resposta imune humoral e celular de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral

A leishmaniose é uma enfermidade parasitária crônica, causada por protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), que infectam macrófagos de uma grande variedade de mamíferos, incluindo o homem (DE LUCA et al., 1999; NIETO et al., 1999).

A classificação da forma clínica da leishmaniose depende da complexidade de interação entre a espécie vetor, a espécie de *Leishmania* e o sistema imunológico do hospedeiro. Comumente são aceitas quatro classificações de doença clínica: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV) (KEVRIC et al., 2015).

A LV tem como agente etiológico as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* encontrada na Índia, Bangladesh e Nepal, *Leishmania (L.) infantum* de manifestação na bacia do Mediterrâneo, o chamado “Velho Mundo”, Europa, África e China, e a *Leishmania (L.) chagasi* encontrada nas Américas do Norte, Central e do Sul, o “Novo Mundo” (LAINSON; SHAW, 1987; WHO, 2002). Devido à semelhança da constituição morfológica das espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) infantum*, alguns autores compararam suas estruturas em estudos bioquímicos e moleculares e sugeriram que as espécies podem ser consideradas como uma única espécie formando um grupo monofilético dentro do complexo *Donovani*. Permitindo assim que denominem de *L. (L.) infantum* o agente etiológico desta zoonose também nas Américas (MAURÍCIO et al., 1999; MAURICIO; STOTHARD; MILES, 2000; KUHLS et al., 2011).

A ocorrência da LV em uma determinada área depende basicamente da presença do vetor susceptível e de um hospedeiro/reservatório igualmente susceptível. A possibilidade de que o ser humano, principalmente crianças desnutridas, venha em alguns casos a ser fonte de infecção pode conduzir a um aumento na complexidade da transmissão da LV (GONTIJO; MELO, 2004).

A manifestação clínica da LV de modo geral depende do sistema imunológico do hospedeiro, sua idade, condição nutricional, fatores genéticos e a espécie vetor (KEVRIC et al., 2015). Geralmente se apresenta como uma doença febril com envolvimento reticuloendotelial na forma de esplenomegalia e hepatomegalia (PRASAD et al., 2009) e

diversas alterações hematológicas, como, anemia, neutropenia, eosinopenia com linfocitose relativa e monocitose (AL-JURAYYAN et al., 1995).

Em cães, já foi reportado que a LV afeta o fígado, o baço, os linfonodos, a medula óssea e outros órgãos nos sistemas epitelial, gastrointestinal, nervoso central, genital e urinário (CHIAPELLA, 1986; BLAVIER et al., 2001; DINI Z et al., 2005; GIUNCHETTI et al., 2008; MOREIRA et al., 2016, SILVA et al., 2016), podendo apresentar sinais inespecíficos, como febre irregular por longos períodos, anemia, opacidade do pelame, perda progressiva de peso e caquexia em seu estágio final (LONGSTAFF et al., 1983; MARZOCHI et al., 1985; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997).

2.2 Transmissão e ciclo de vida da *Leishmania*

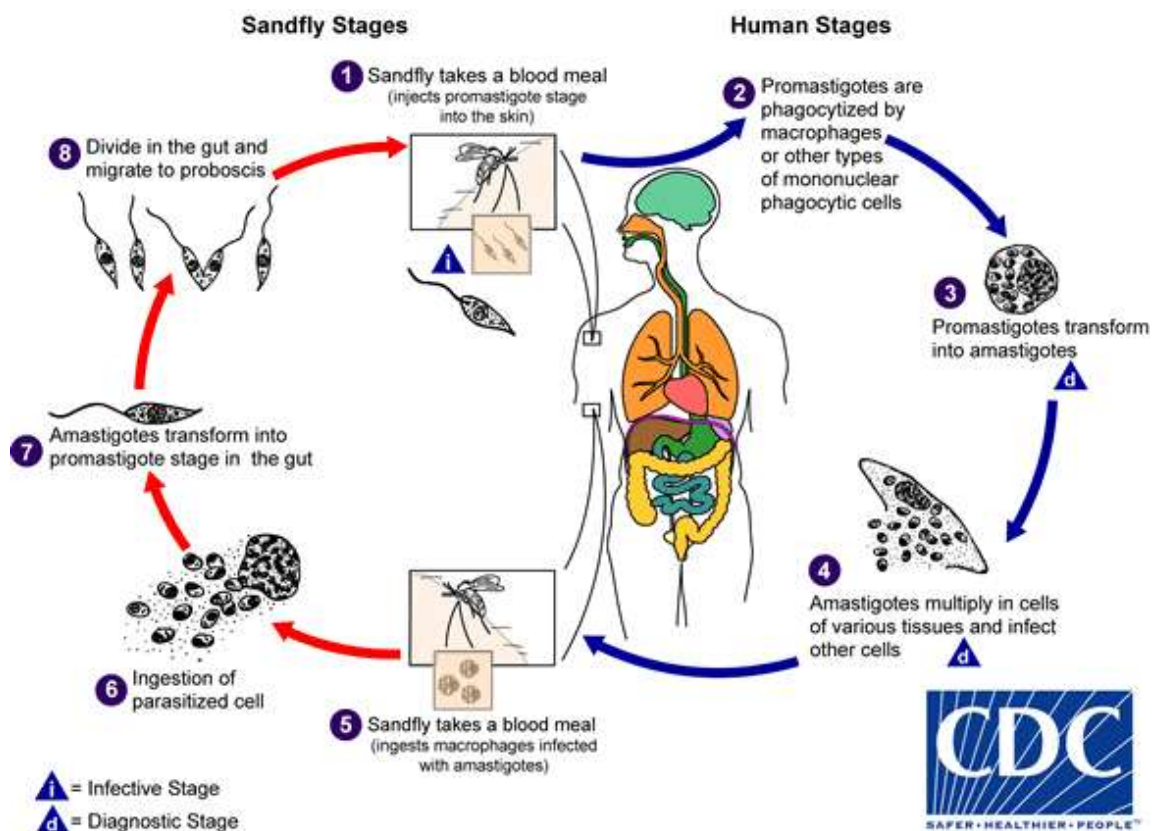
A principal forma de transmissão do parasito *L. (L.) infantum* para o homem e outros hospedeiros mamíferos é pela picada da fêmea infectada de insetos hematófagos da ordem Díptera; família Psychodidae; subfamília Phlebotominae, conhecidos popularmente como mosquitos palha, Birigui ou tatuquiras, e que consistem de espécies do gênero *Lutzomyia*, dentre as quais o *Lu. longipalpis*, de tamanho bastante reduzido, cerca de 2 a 3 mm, é o principal vetor (DEANE; DEANE, 1955; ALENCAR et al., 1991; CASTRO, 1996; RIBEIRO, 1997; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). A atividade desses vetores é crepuscular e noturna, sendo que, no intra e peridomicílio, o *Lu. longipalpis* é encontrado principalmente próximo a uma fonte de alimento (BRASIL, 2006a). As fêmeas realizam o repasto sanguíneo no período noturno, iniciando-o cerca de uma hora após o crepúsculo (CASTRO, 1996). Realiza seu ciclo larval na matéria orgânica úmida e de baixa incidência luminosa, fato que dificulta o combate desses vetores (SANTA ROSA; OLIVIERA, 1997).

Ao repousar sobre o hospedeiro vertebrado infectado, o mosquito pica-o através da pele e ingere com o sangue as formas amastigotas de *Leishmania*, onde no intestino médio sofrem divisão binária, modificam-se em promastigotas e migram para o intestino anterior. Na parede do intestino anterior, fixadas pelo flagelo sofrem multiplicação e diferenciação, transformando-se em promastigotas metacíclicas infectantes que são inoculadas na pele de outro hospedeiro pela probóscide do mosquito durante um novo repasto sanguíneo (KILLICK-KENDRICK, 2002).

Na epiderme do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação das formas promastigotas e da saliva que pode modular a resposta imune local.

Uma vez inseridas, as formas promastigotas são fagocitadas inicialmente por neutrófilos que são capazes de eliminar o parasita por uma série de mecanismos leishmanicidas. Contudo, uma pequena população parasitária pode sobreviver em seu interior e levar a perpetuação do parasita por uma importante via de escape da resposta imune inata (PEARSON; STEIGBIGEL, 1981; LASKAY et al., 2003). Quando as promastigotas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e sem flagelo. Estes parasitos multiplicam-se até que ocorra o rompimento dos macrófagos e neutrófilos inicialmente infectados, e então, as formas amastigotas liberadas infectam novos macrófagos, resultando no desenvolvimento da doença (OLIVEIRA, 2003, Figura 01).

Figura 1. Ciclo da transmissão vetorial da *Leishmania* spp.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>

No ambiente silvestre, os principais reservatórios de LV são os canídeos (*Lycalopex vetulus* e *Cerdocyon thous*) (DEANE, 1956) e marsupiais (*Didelphis albiventris* e *Didelphis marsupialis*) (SHERLOCK, 1996). Já no ambiente urbano, o cão é considerado o principal reservatório de *L. infantum* pelos registros de casos caninos serem maiores do que os casos

humanos e pelo grande número de parasitas encontrados na pele dos cães do que em humanos, sendo assim considerados importantes na epidemiologia da doença (DEANE; DEANE, 1955).

Entretanto, este cenário vem sofrendo modificações, pois, os gatos que inicialmente eram considerados hospedeiros acidentais de parasitas do gênero *Leishmania*, em alguns estudos tem demonstrado importante papel na epidemiologia da LV, como potenciais reservatórios, quando testados por xenodiagnóstico (SIMÕES-MATTOS et al., 2005; MAROLI et al., 2007, SILVA et al., 2010). A infecção por *Leishmania* sp. em gatos já foi documentada, como casos esporádicos, em países do Mediterrâneo, tanto na forma cutânea como visceral (HERVÁS et al., 1999). No Brasil, a infecção de gatos por *Leishmania* spp. já foi relatada por diversos autores (SAVANI et al., 2004; COELHO et al., 2010, ALVES-MARTIN, 2013, BENASSI et al., 2017), tanto em animais sintomáticos (COSTA et al., 2010), quanto assintomáticos (OLIVEIRA et al., 2015).

2.3 Distribuição da LV (Brasil, Estado de São Paulo, Ilha Solteira)

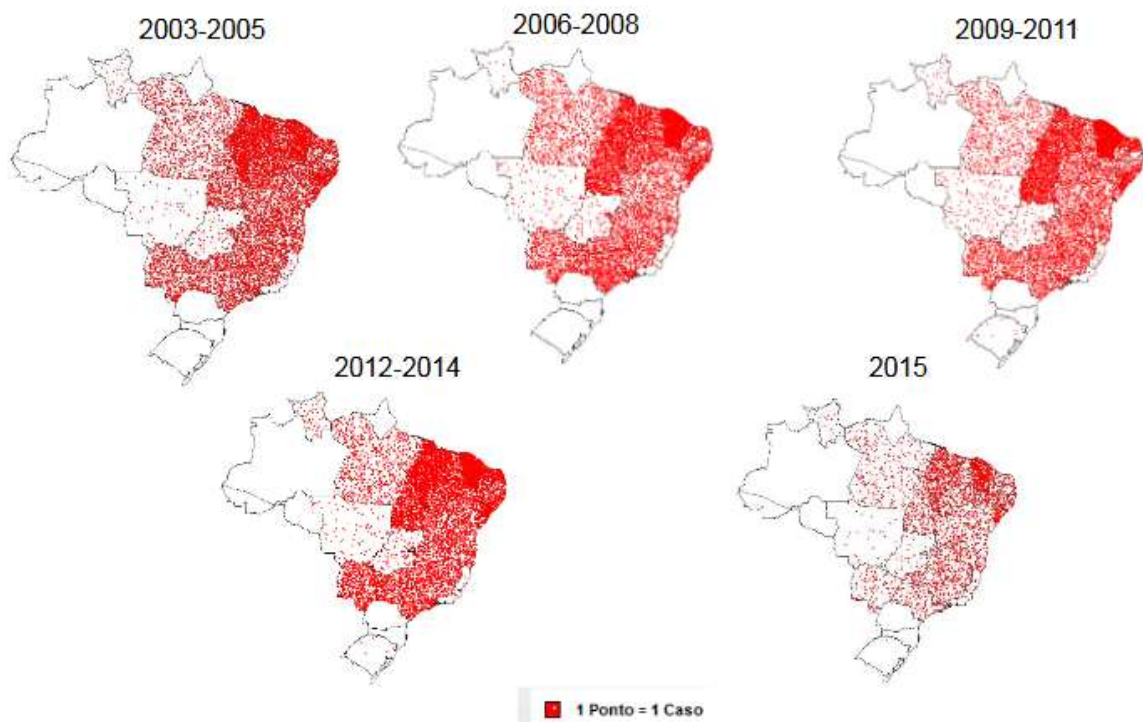
Nas Américas, a LV é endêmica em 12 países, e o Brasil é país com o maior índice dessa doença, com uma representatividade 96% dos casos registrados, no entanto, a expansão da geográfica da LV vem atingindo demais países como Argentina, Colômbia, Paraguai e Venezuela. No período de 2001-2016 foram reportados 55.530 casos humanos de LV nas Américas com uma média anual de 3.457 casos (ORGANIZAÇÃO PAN-ANAMERICANA DA SAÚDE – OPAS; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS, 2018). Além disso, no ambiente silvestre, varias espécies de *Leishmania* circulam entre sete ordens de mamíferos silvestres (Didelphiomorpha, Pilosa, Cingulata, Rodentia, Carnívoros, Primatas e Chiroptera) (ROQUE; JANSEN, 2014).

No Brasil já foram registrados casos de LV em 22 unidades da federação (UF), entre 1980 a 2016, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, sendo que, em todos eles, tem sido relatada a associação entre a existência de cães infectados e a presença do vetor (BRASIL, 2014, 2016).

No ano de 2016, foram relatados no país 3.200 casos em humanos, que resultou num coeficiente de incidência de 1,55 casos / 100.000 habitantes em 22 UF de cinco regiões brasileiras. Entre os acometidos, 66,2% eram do sexo masculino, e 39% eram crianças de 0-9 anos. Dos pacientes, 7,8% morreram. De 2003 a 2016 a distribuição e variação do número de

casos de LV sempre estiveram concentradas na região Nordeste, embora em menores proporções em relação aos anos anteriores, o Nordeste ainda é a região mais acometida por essa doença (BRASIL, 2017c, Figura 02).

Figura 2. Casos de leishmaniose visceral por UF, Brasil, 2003 a 2015.



Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS). Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/26/Modelo-Apresentacao-SVS-2018-periodo-eleitoral-CGDT.pdf> (BRASIL, 2017c).

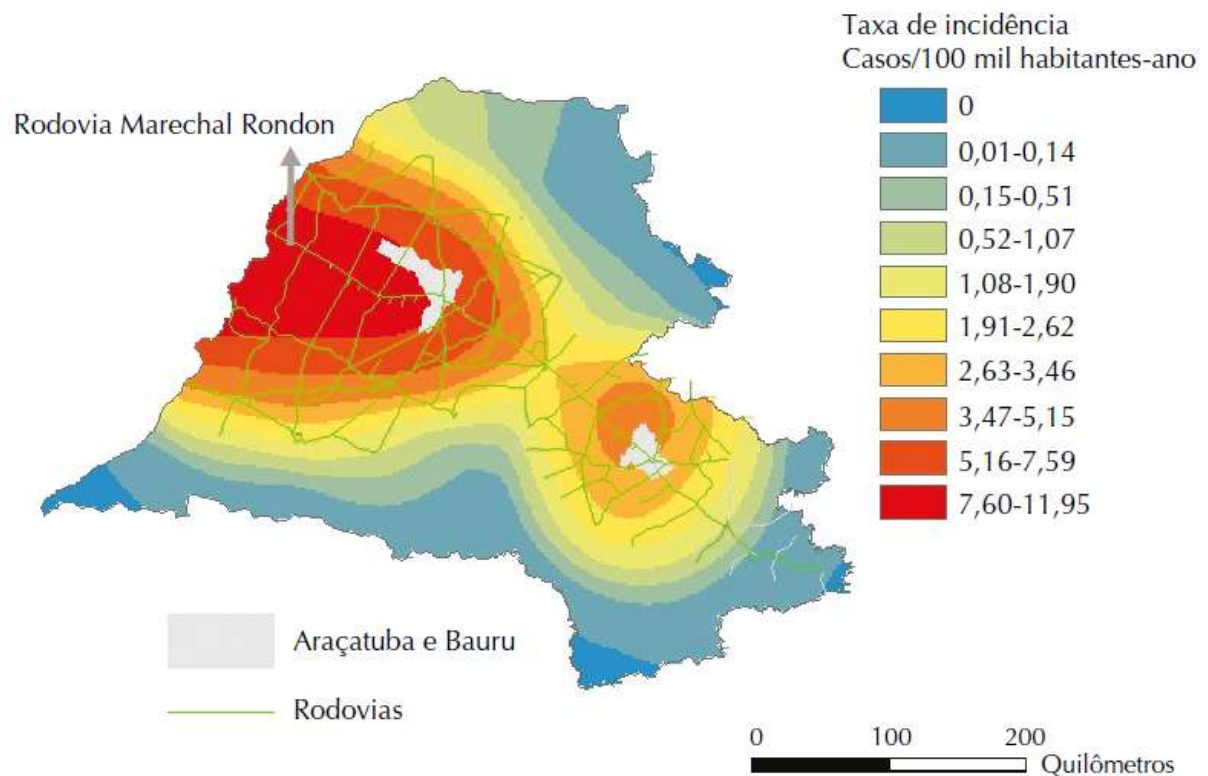
No Estado de São Paulo, a expansão da LV vem ocorrendo no sentido oeste-leste, com destaque ao papel das rodovias, especialmente a Marechal Rondon. De acordo com análises espaço-temporal foi possível detectar ciclicidade na ocorrência da doença, em diferentes períodos de tempo (1999 a 2013) e espaço. Os epicentros da LV no Estado de São Paulo se baseiam nas cidades de Araçatuba e Bauru que estão interligadas por uma malha rodoviária, tendo a rodovia Marechal Rondon como a principal rota do tráfego terrestre entre as duas regiões (CARDIM et al., 2016, Figura 03).

Segundo Rangel et al. (2015) a letalidade de LV no Estado de São Paulo no período 1999 a 2013 não apresenta significativa tendência de queda e no triênio (2011-2013) foram identificados 58 municípios com transmissão autóctone no Estado, porém a maioria desses municípios que apresentam diferentes índices de transmissão não possuem maior risco de óbitos, com exceção dos grupos regionais de vigilância epidemiológica que compreende da

região de Jales, São José do Rio Preto e Araçatuba que apresentaram maior risco de óbitos em humanos.

As infecções por protozoários do gênero *Leishmania* já foram descritas em varias cidades do interior de São Paulo nos mais diversos hospedeiros, como, cães, gatos, cavalos, bovinos e animais silvestres de vida livre e/ou mantidos em cativeiro (JUSI et al., 2011;; FEITOSA et al., 2012; SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al. , 2015; BENASSI et al., 2017).

Figura 3. Mapa da razão Kernel representando a taxa de incidência de leishmaniose visceral humana e rodovias do Estado de São Paulo, com destaque para a Rodovia Marechal Rondon no período de 1999 a 2013.

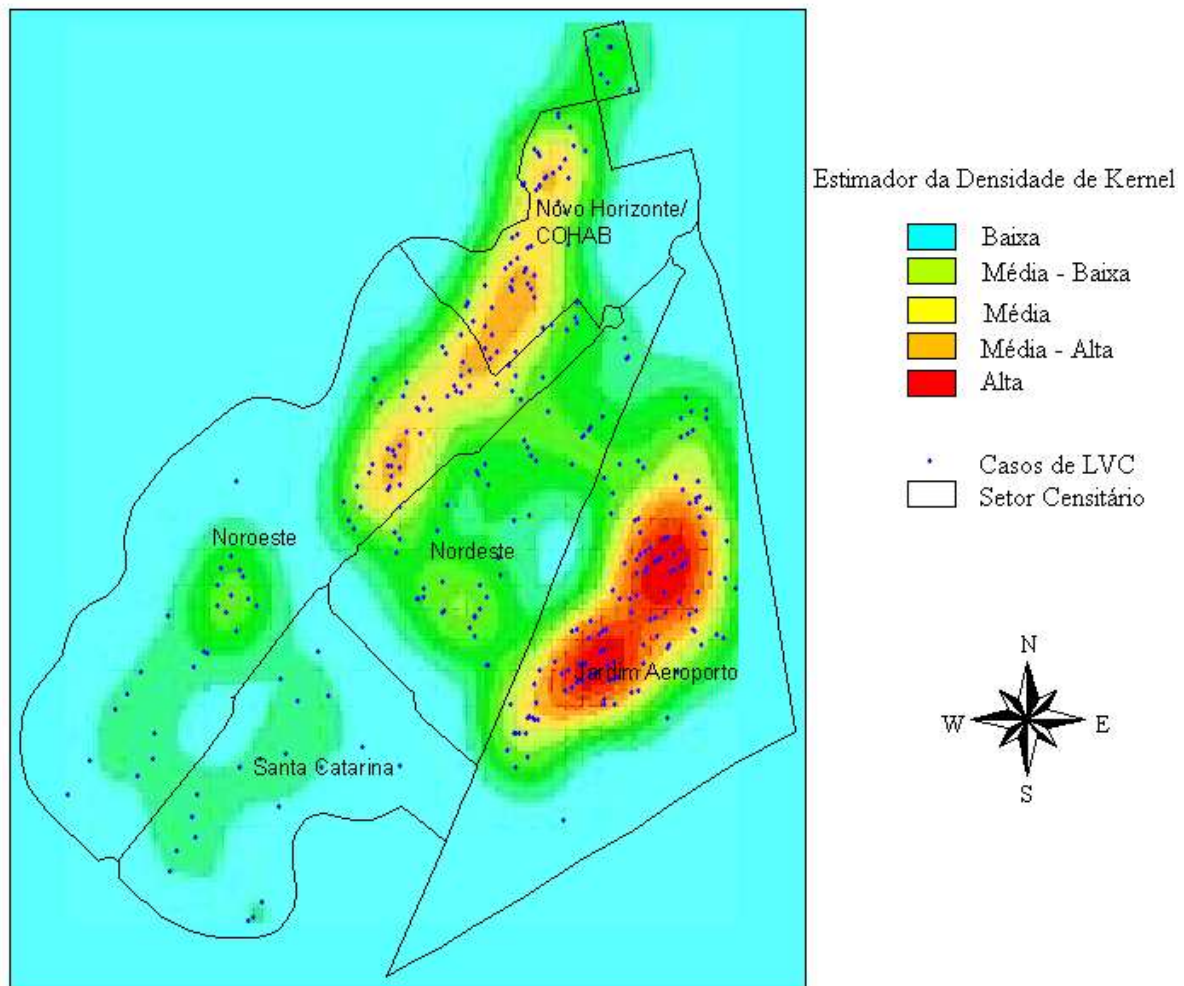


Fonte: CARDIM et al., 2016.

Entre as cidades do Estado de São Paulo com registros de LV, destaca-se o município de Ilha Solteira, local de estudo deste trabalho, que é considerada uma cidade endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) (NORONHA JUNIOR et al., 2007), cujos casos caninos já foram registrados em toda área urbana, porém, com maior intensidade nos bairros Jardim Aeroporto e Novo Horizonte/COHAB, onde a prevalência estimada foi de 14,5% e 12,4%, respectivamente (PAULAN et al., 2012, Figura 04). De forma geral, a área urbana do município apresentou taxas de prevalência para LVC de 14% (PAULAN et al., 2012) enquanto que nas áreas rurais foram de 37,7% (PAULAN et al., 2013).

Quando se trata de animais abandonados, essa prevalência é ainda maior. Em um levantamento realizado por Silva et al. (2014) em um dos abrigos para animais abandonados de Ilha Solteira a soroprevalência de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em cães foi de 89% e nos felinos do mesmo abrigo, Alves-Martin et al. (2017) relataram soroprevalencia de 72,5% pelo teste sorológico ELISA (ensaio imunoenzimático indireto). Além dos registros caninos e felinos, Benassi et al. (2018) relataram a presença do DNA de *Leishmania* em amostras de sangue e suabe conjuntival de equinos da cidade.

Figura 4. Mapa do estimador de densidade de Kernel. Distribuição dos casos de LVC em cada setor no município de Ilha Solteira, SP.



Fonte: PAULAN et al., 2012.

2.4 Leishmaniose felina

Embora os cães sejam considerados o principal reservatório da LV, e uma das espécies mais acometidas (LAURENTI et al., 2013), relatos em gatos tem sido descritos em diversos países como França, Itália, Espanha e Brasil entre outros (OZON et al., 1998; PENNISI et al., 2004; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2015, BENASSI et al., 2017; ALVES-MARTIN et al., 2017). A leishmaniose felina (LF) é cada vez mais relatada em áreas endêmicas (MANCIANTI, 2004; COSTA et al., 2010) e ocasionalmente em áreas não endêmicas (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Os felinos domésticos podem ser infectados por diversas espécies de *Leishmania*, entre essas, as que acometem os cães e humanos em todo o mundo (DANTAS-TORRES, 2006; PENNISI et al., 2015a; PENNISI et al., 2015b).

O primeiro caso relatado de gato infectado por *Leishmania* spp. ocorreu em 1912 na Argélia, onde o animal convivia com um cão e uma criança que estavam com leishmaniose visceral. O diagnóstico deu-se após sua morte, pelo registro de formas amastigotas de *Leishmania* spp. na medula óssea (SERGENT et al., 1912). Após essa primeira descrição, inúmeros outros casos já foram reportados na literatura, inclusive no Brasil, cujo primeiro registro no país foi de um gato da zona do Aurá, Estado do Pará, que apresentava ulcerações nas orelhas e no nariz e teve citologia positiva para *Leishmania* spp. (MELLO, 1940). Assim, outros trabalhos também relataram a infecção nos felinos, como por exemplo, lesão vegetativa na pata de um gato com diagnóstico molecular para *L. (V.) panamensis* (PASSOS et al., 1996); descrição do primeiro caso autóctone de *L. (L.) infantum* em gato doméstico no município de Cotia, Estado de São Paulo (SAVANI et al., 2004); formas amastigotas visíveis no exame parasitológico direto do aspirado de linfonodo poplíteo de um felino com sorologia ELISA reagente e PCR positivo para o gênero *Leishmania* (COELHO et al.; 2010); DNA de *Leishmania* em amostras de suabe conjuntival de gatos de área endêmica e não endêmica para LV (OLIVEIRA et al., 2015; BENASSI et al., 2017).

Segundo alguns autores, algumas características comportamentais dos felinos, como, caça predatória noturna e, trânsito de até 1,5 Km de distância de suas residências, coabitando áreas silvestres e domésticas, podem favorecer a infecção e disseminação do parasito *Leishmania* spp. (UNDERHILL-DAY, 2005; DA SILVA et al., 2008).

Os gatos podem manter-se infectados por *L. infantum* sem apresentarem manifestações clínicas da doença durante anos ou mesmo durante toda a vida, assim como os cães (MORENO; ALVAR, 2002; DANTAS-TORRES, 2006) e podem estar envolvidos no ciclo

de transmissão do parasito como reservatórios secundários ou podem ser hospedeiros acidentais (MANCIANTI, 2004; MAROLI et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2011).

Mesmo com o crescente número de registros da LV em felinos, as informações que se tem sobre os aspectos clínicos e sua importância epidemiológica ainda são incipientes (PENNISI et al., 2015a). No geral, os felinos apresentam menos sinais clínicos do que cães, por esse motivo são menos comuns de serem detectados, no entanto, quando apresentam manifestações clínicas essas podem ser através de sinais cutâneos e/ou sistêmicos (CHATZIS et al., 2014); que incluem lesões nodulares ou ulceradas, mais frequentemente localizadas na cabeça, incluindo pálpebras, nariz e lábios, ou nas partes distais dos membros, aumento de linfonodos, alopecias, lesões oculares (principalmente uveíte), lesões mucocutâneas ulcerativas ou nodulares e síndrome gengivoestomatite crônica felina (PENNISI et al., 2015a; CRAIG et al., 1986; BONFANTE-GARRIDO, et al., 1996, MANCIANTI, 2004). Além disso, podem apresentar o envolvimento do sistema linfático e do sangue, possibilitando a disseminação do parasita por todos os outros órgãos (MANCIANTI, 2004; ALVES-MARTIN, et al., 2013).

A LV felina pode ser promovida por coinfeções imunossupressoras, como, FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) e FeLV (*Feline Leukemia Virus*), que podem prejudicar a resposta imune celular e permitir a multiplicação ativa do parasita e a disseminação visceral (GREVOT et al., 2015), portanto, sempre que se pretende avaliar a imunidade de gatos com leishmaniose são necessários maiores cuidados e estudos quanto a infecções secundárias (SILVEIRA-NETO et al., 2015).

De acordo com alguns trabalhos realizados em países do Velho Mundo, as taxas de prevalência de infecção felina por *L. infantum* em pesquisas sorológicas ou moleculares variam de 0% a mais de 60% (PENNISI et al., 2015a), enquanto no Brasil as taxas de prevalência por essas técnicas variam de 0,5% a 72,5% (SILVEIRA-NETO et al., 2015, ALVES-MARTIN et al., 2017), respectivamente. Essa variação pode ser justificada devido à utilização de diferentes protocolos de diagnósticos, divergências quanto ao ponto de corte, características da população felina e níveis de endemicidade da região (PENNISI et al., 2015a). Além disso, correlação fraca do coeficiente *Kappa* observado entre técnicas sorológicas de detecção indireta como ELISA e RIFI e de detecção direta como citologia e imuno-histoquímica (SOBRINHO et al., 2012; VIDES et al., 2011; ALVES-MARTIN, et al., 2017) indicam a necessidade de mais estudos quanto ao diagnóstico da LF.

2.5 Respostas imunológicas da LV em cães e gatos

Acredita-se que os felinos infectados com protozoários do gênero *Leishmania* spp. tenham um alto grau de resistência natural relacionado a fatores genéticos dos próprios felinos, e não um fator exclusivo da imunidade mediada por células (MANCIANTI, 2004). De acordo com Solano-Galego et al. (2007) e Pennisi et al. (2015a) os felinos apresentam uma resposta imunológica diferente dos cães. A iniciar pela resposta imune humoral, onde os gatos infectados podem apresentar títulos de anticorpos anti-*Leishmania* menor do que cães ou manterem-se soronegativos durante muito tempo (PENNISI et al., 2015a). Mesmo assim, ainda faltam estudos específicos sobre a imunidade celular em gatos para explicar o porquê de existir menor prevalência da infecção e de sintomas clínicos nestes animais do que em cães, que vivem na mesma área (ALVES-MARTIN et al., 2017). Desse modo, devido à carência de estudos sobre as respostas imunológicas de felinos com LV, faremos aqui uma prospecção das respostas imunológicas encontradas em cães e outros modelos experimentais, frente às infecções naturais e/ou experimentais por *Leishmania* spp.

Em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, a evolução clínica da LV promove alterações nos parâmetros imunológicos, parasitológicos e bioquímico-hematológicos. Considerando o quadro hematológico, foi relatada anemia normocítica e normocrômica, com diminuição de hematócrito, hemácias e concentração de hemoglobina principalmente nos cães sintomáticos (REIS et al. 2006a) e os níveis de isotipos de imunoglobulinas (Ig) apresentaram-se como importantes biomarcadores para monitoramento do prognóstico do estado clínico e da densidade parasitária tecidual, onde o aumento dos níveis de IgG1, IgG3 e IgG4 foram associados a forma clínica assintomática e a baixa carga parasitária tecidual, enquanto a que a forma clínica sintomática foi caracterizada por apresentar alta carga parasitária e níveis elevados de IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE anti-*Leishmania* (NIETO et al., 1999; REIS et al., 2006b). Desse modo, o acionamento da resposta humoral, refletida pela elevação nos níveis de classes e subclasses de Ig(s) é frequentemente associado à progressão clínica da doença, e o estabelecimento da imunidade efetiva anti-LVC pode ser dependente da imunidade celular específica (PINELLI et al., 1994, REIS et al., 2006a). Assim, o diagnóstico da LVC em inquéritos epidemiológicos, exames de rotina, e monitoramento clínicos de animais acometidos em diferentes estágios da doença são realizados por meio da caracterização dos níveis de Ig(s) no plasma do sangue (PALTRINIERI et al., 2010).

As infecções experimentais e/ou naturais por *Leishmania* spp. em camundongos e cães podem propiciar uma ativação específica da resposta imunológica nesses hospedeiros. Vários tipos celulares que atuam diretamente sobre o parasito podem aumentar em detrimento do aumento de células T CD4⁺, apresentando um perfil de citocinas Th1 (*T helper 1*), Th2 (*T helper 2*) ou Th17 (*T helper 17*) (HOLZMULLER et al., 2006; REIS et al., 2006c; HOSEIN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015). A resistência à infecção por *Leishmania* foi associada ao desenvolvimento de células T CD4⁺ com respostas Th1 e Th17. A resposta Th1 está relacionada à produção de IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (REIS et al., 2006c). Essas citocinas são importantes para a ativação clássica de macrófagos, capacitando-os para produção de maiores quantidades de reativos intermediários de oxigênio (ROI) e de nitrogênio (RNI), que conseqüentemente, são responsáveis pela morte intracelular das leishmanias (LIEW; MILLOTT, 1990; MURRAY; NATHAN, 1999). Já a resposta Th17 foi associada à proteção logo no início da infecção de cães por *L. infantum*, por meio da produção de IL-17A, IL-17F e IL-22, que são citocinas responsáveis por desencadear atividades pró-inflamatórias no início da infecção, ativando células epiteliais, endoteliais e fibroblastos que recrutam neutrófilos para os sítios de infecção (HOSEIN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015).

Associado ao aumento da resposta Th1 de cães com LV ocorre a resposta do tipo Th2 e a ação dos linfócitos T regulatórios (Treg) por meio da produção das citocinas imunorreguladoras IL-10 e TGF- β . Ambas citocinas atuam na regulação das funções efetoras dos macrófagos, de modo a reduzir os danos teciduais devido ao excesso de estímulos pró-inflamatórios desencadeados pela resposta Th1. Embora seja necessária, a ação da IL-10 e TGF- β inibe as ações microbicidas dos macrófagos o que possibilita a proliferação de formas amastigotas de *Leishmania* intracelular nos hospedeiros e conseqüentemente o agravamento da doença (LITTMAN; RUDENSKY, 2010; MENEZES-SOUZA et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2013). Ao que tudo indica, existe uma expressão concomitante de citocinas mistas, sem a necessidade de um perfil polarizado absoluto, que podem inclinar o sistema imune para uma resposta progressiva (Th2) ou protetora na LVC (Th1/Th17) (MENEZES-SOUZA et al., 2011).

A expressão de IFN- γ em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) estimuladas com antígeno solúvel de *L. infantum* de cães experimentalmente infectados e assintomáticos foram elevadas em relação aos cães não infectados conforme relataram Chamizo et al. (2005) e também em relação aos cães polissintomáticos (CARRILLO et al., 2007). Similarmente, no passado, altos níveis de TNF- α também tinham sido relatados em

cães infectados assintomáticos quando comparados a cães sintomáticos (PINELLI et al. 1994). Além disso, o TNF- α foi associado na indução do IFN- γ em animais com leishmaniose (TUMANG et al., 1994). De acordo com Strauss-Ayali et al. (2005), a IL-12 também pode induzir o aumento da produção de IFN- γ , reforçando a importância dessa citocina na manutenção de uma forma assintomática na LVC, entretanto, ao adicionarem IL-10 no ensaio de PBMCs estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (LSA), os autores relataram a inibição da proliferação e produção de IFN- γ pelas PBMCs.

Nos linfonodos de cães sintomáticos com elevado parasitismo, verificou-se um acúmulo das citocinas IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) que contribuíram para o estabelecimento da infecção (ALVES et al., 2009). O mesmo foi observado em pele de cães sintomático com LV, indicando a associação dessas citocinas na supressão da resposta imune celular após a infecção (MENEZES-SOUZA et al., 2011). Complementando, Brachelente et al., (2005) observaram um aumento da expressão de IL-4 em peles lesionadas de cães com LV associando-o com a gravidade dos sinais clínicos e a alta carga parasitária.

Segundo Alvar et al. (2004) a redução das células T CD4⁺ acompanhada da progressão da doença em cães com LV permite que flebotomíneos, vetores da *Leishmania*, tenham maiores chances de infectar-se durante a hematofagia. Esse fato se explica devido à ausência de uma resposta imune efetiva por parte do hospedeiro no sentido de eliminar o parasito, favorecendo a disseminação do mesmo para outros tecidos (ALVAR et al., 2004).

Em um estudo experimental com camundongos da linhagem BALB/c comparando a correlação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ para as espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, Carvalho (2012) observou que na evolução da infecção, as células T CD4⁺ aumentaram em camundongos infectados com *L. braziliensis*, e concomitantemente uma regressão da infecção parasitária. Já os camundongos infectados com *L. amazonensis* as células T CD4⁺ mantiveram-se estáveis. Dados similares foram obtidos quando se analisou a presença de células CD8⁺ na evolução da infecção por *L. braziliensis*, porém, os camundongos infectados com *L. amazonensis* apresentaram uma grande redução de linfócitos T CD8⁺.

A infecção intradérmica de *L. infantum* em ratos demonstrou que as células T CD8⁺ participavam do controle desses parasitas na pele (AHMED et al., 2003). Outro estudo mostrou também que as células T CD8⁺ obtidas de ratos infectados com *L. infantum* expressavam IFN- γ e TNF- α , e exibiam atividade citotóxica contra células expressando antígenos de *Leishmania* (TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2003). Assim, as células T CD8⁺ participam diretamente na produção de IFN- γ e na regulação da produção de IFN- γ

pelas células T CD4⁺ (HERATH; KROPF; MÜLLER, 2003). No entanto, o papel protetor das células T CD8⁺ durante infecções por *Leishmania* têm sido controverso, principalmente por causa da discrepância entre as infecções por diferentes espécies de *Leishmania*. Cada espécie pode apresentar um tropismo diferente e, sua diversidade se reflete nas várias manifestações clínicas que elas induzem (STÄGER; RAFATI, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

A LV é uma zoonose disseminada e com altas taxas de prevalência no Brasil, onde várias espécies animais foram incriminadas como hospedeiras do parasito. Os gatos são animais que se infectam com o parasita *Leishmania (Leishmania) infantum*, no entanto, muitas vezes esses animais não desenvolvem os sintomas da LV e, quando desenvolvem, nem sempre apresentam uma resposta imune humoral detectável por meio de técnicas sorológicas, sugerindo o predomínio de uma resposta imune celular. Na literatura existe uma carência de trabalhos que elucidam os mecanismos de defesa imunológico apresentados por gatos quando infectados por *L. (L.) infantum*, e diante ao aumento de casos de LV por todo o país é preocupante o envolvimento desta espécie com a epidemiologia e manutenção da doença, principalmente em áreas endêmicas. No intuito de contribuir com os avanços na pesquisa para melhor compreender a LV em felinos, o presente trabalho se justifica por avaliar parâmetros da resposta imune humoral e celular de gatos naturalmente infectados por espécies de *Leishmania* spp.

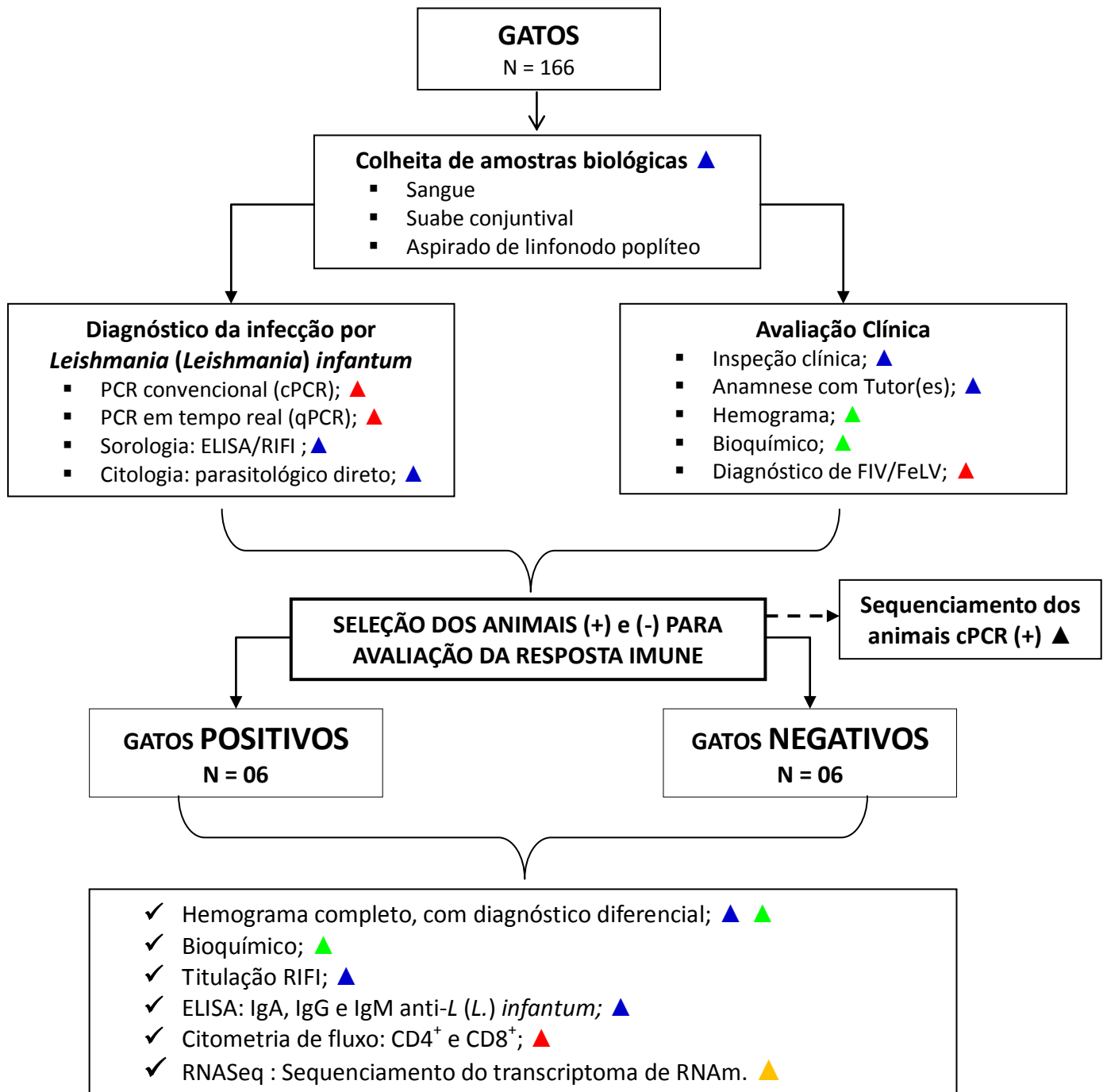
4 OBJETIVO

Estudar a resposta imune humoral e celular de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

4.1 Objetivos específicos

1. Realizar diagnóstico físico-clínico e laboratorial de gatos confinados em abrigos para identificar animais infectados por *L. (L.) infantum*;
2. Avaliar o perfil da imunidade humoral associada às respostas das imunoglobulinas IgA, IgG e IgM anti-*L. (L.) infantum*.
3. Avaliar a dinâmica das populações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) entre as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) dos gatos infectados
4. Analisar o transcriptoma do RNA mensageiro de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de gatos com e sem infecção por *L. (L.) infantum* para avaliar perfis da resposta imune.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



Legenda

- ▲ Etapa desenvolvida em Ilha Solteira;
- ▲ Etapa desenvolvida em Pirassununga;
- ▲ Etapa desenvolvida em Andradina
- ▲ Etapa desenvolvida em São Paulo
- ▲ Etapa desenvolvida em Botucatu;

- (+) Positivo para *Leishmania infantum*.
- (-) Negativo para *L. infantum*.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais e área do estudo

Foram escolhidos gatos sem raça definida (N = 166), confinados em abrigos de associações protetoras de animais, localizadas no município de Ilha Solteira, SP, (51° 06' 35" O; e 20° 38' 44" S), região endêmica para LV. As coletas de amostras biológicas foram autorizadas por meio do termo de consentimento livre esclarecido assinado pelos tutores responsáveis pelos abrigos (ANEXO 01). Em cada gato foi realizada avaliação clínica, coletas de sangue periférico por punção da veia jugular externa; coleta de *swab* conjuntival e punção aspirativa de linfonodo poplíteo.

6.2 Colheita de amostras biológicas

Para a colheita de sangue dos gatos foi realizada a captura com puçá e contenção química, na dosagem de 11 mg/kg de cetamina + 1,1 mg/kg de xilazina, associados na mesma seringa. Após a sedação, a venopunção foi realizada via veia jugular externa de onde se coletou de 3 a 5 ml de sangue por animal. O sangue colhido foi armazenado a 4°C em tubos a vácuo sem anticoagulante para a obtenção do soro imune e em tubos com anticoagulante (EDTA) para preservação do sangue.

Amostras de células epiteliais da conjuntiva ocular (dos olhos direito e esquerdo) foram coletadas com auxílio de *swabs* estéreis produzidos para o isolamento bacteriológico. Na conjuntiva inferior de ambos os olhos se esfregou os *swabs* para a coleta de células esfoliativas. Os *swabs* foram acondicionados em microtubos de 1,5ml livres de DNase e RNase e armazenados a 4°C até o momento da extração de DNA, para realização de exames moleculares.

Para a colheita de aspirados de linfonodos poplíteo direito e/ou esquerdo dos gatos, foi demarcada a área a ser puncionada e fixada manualmente. A punção foi executada com uma agulha hipodérmica 25 x 7mm acoplada a uma seringa descartável de 5 ml. A agulha é retirada da seringa, o êmbolo repuxado e a agulha novamente acoplada à seringa para então despejar o material em lâminas de vidro, distribuído com ajuda de outra lâmina no formato de *squashes*.

6.3 Avaliação clínica

6.3.1 Anamnese e exame clínico

Antes da coleta do material biológico, todos os animais passaram por anamnese médica veterinária. Para não repetir amostras os animais foram fotografados e identificados em fichas individuais, sendo que cada animal tinha uma numeração. Na ficha foram descritas informações do animal, tais como, características físicas (sexo, cor, pelagem e tamanho), aspectos clínicos (escore corporal, inspeção da pele, palpação de linfonodos, coloração de mucosas e presença de gengivite), localização, animais contactantes, etc (APÊNDICE 1). A condição do escore corporal dos gatos foi de acordo com o preconizado por Laflamme (1997).

6.3.2 Hemograma completo

O sangue obtido durante a coleta de material biológico foi processado em analisador hematológico automático (*Sysmex poch-100iVTM*), para obtenção do valor de leucócitos totais, eritrócitos, hemoglobina e plaquetas. O valor do volume globular (VG) foi obtido pela leitura de microcapilar, após centrifugação do sangue total em microcentrífuga (*Microline[®], Laborline*). Os índices hematimétricos como volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculados a partir dos valores de VG, hemoglobina, eritrócitos e comparados com valores normais para gatos.

6.3.3 Diagnóstico diferencial de esfregaço sanguíneo

Após a coleta do sangue, uma gota foi inserida em lâminas de vidro, em duplicata, para realização de esfregaço sanguíneo, e posteriormente, uma lâmina foi corada com Giemsa (4%) e outra com Kit panótico rápido[®] (CÓD: 657- LAB HOUSE). A leitura do material foi realizada sob microscopia óptica.

6.3.4 Perfil bioquímico

O sangue de gatos foi centrifugado após a formação do coágulo, em centrífuga, a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro obtido foi levado ao analisador automático (*Cobas c111[®]*,

Roche) para determinação da função hepática por meio das dosagens de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina. As concentrações de proteínas totais, albumina e fosfatase alcalina (FA) também foram avaliadas. Cada análise foi determinada utilizando-se kits específicos, seguindo a metodologia estabelecida de acordo com o fabricante.

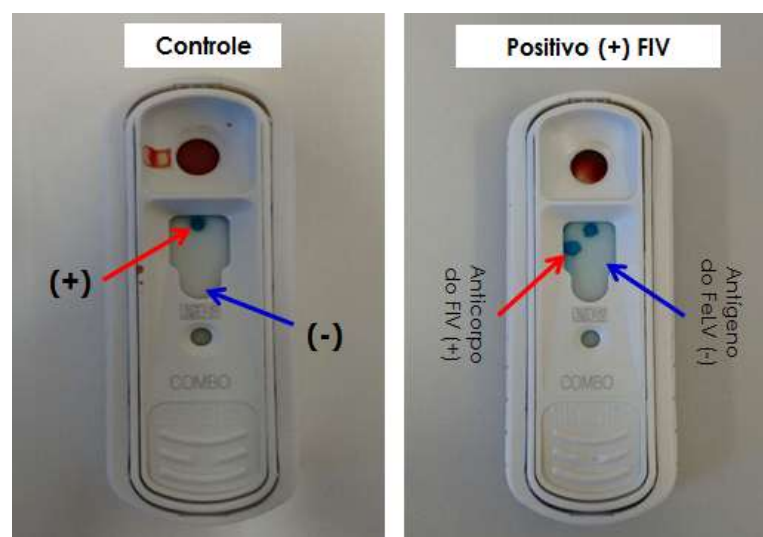
6.3.5 Diagnóstico para FIV/FeLV

Os gatos foram avaliados para FIV e FeLV por meio do Kit (*Feline Leukemia Virus Antig-Feline / Immunodeficiency Virus Antibody Test*, REF 99-08354, Lot MM813), produzido pela IDEXX Laboratories, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA.

O teste SNAP Combo FeLV Ag/FIV Antibody® consiste num imunoensaio rápido para a detecção simultânea do antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) e dos anticorpos do vírus da imunodeficiência felina (FIV) no soro, plasma ou sangue total dos felinos. A presença do antígeno p27 do FeLV representa o diagnóstico de infecção pelo FeLV, e a presença de anticorpos específicos do FIV é indicativo de que um gato foi exposto ao FIV e pode apresentar uma infecção pelo FIV ativa (Figura 05).

Os Kits foram verificados quanto ao prazo de validade e os procedimentos foram de acordo com as normas instrutivas do fabricante.

Figura 5. Kit teste para detecção do antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) e anticorpos do vírus da imunodeficiência felina (FIV). Setas vermelhas indicando reação positiva (+), setas azuis indicam reação negativa (-). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: Do próprio autor, 2019.

6.4 Diagnóstico para leishmaniose

6.4.1 Exames sorológicos

6.4.1.1 ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

O teste ELISA indireto para diagnóstico da leishmaniose em felinos foi realizado segundo a técnica preconizada por Costa et al., (2010), com adaptações. Em cada poço da placa de poliestireno foram adicionados 100µl do antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* na concentração 10 µg/ml, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS) 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T). As placas foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 10% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por duas horas. Após quatro lavagens com PBS-T, para a retirada da solução de bloqueio, adicionou-se 100 µl por poço, em duplicata, as amostras de soros dos controles positivos, controles negativos e das amostras séricas diluídas 1/400 em PBS-T acrescida de soro fetal bovino a 10%. As placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente e posteriormente lavadas quatro vezes com PBS-T. Em seguida foi colocado 100 µl do anticorpo secundário conjugado com a peroxidase, sendo, anti-IgG total de felino na diluição 1:40.000, seguindo-se de uma nova incubação em câmara úmida a 37°C por 45 minutos. Após as lavagens, foram adicionados 100 µl da solução de Tetrametilbenzindina dihidroclorada (TMB) em cada cavidade da placa, com posterior incubação da placa por 30 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando-se a cada poço, 50 µl de ácido sulfúrico 0,5N e a densidade óptica (D.O) foi determinada em leitor ELISA (*Universal Microplate Reader – EL 800 – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC*), utilizando-se filtro de 450nm.

Os valores de densidade óptica média (D.O.) dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variam de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média das D.O. dos animais negativos para *L. infantum*, acrescido de dois desvios padrão. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, e o ponto de corte do teste de ELISA corresponde a duas

vezes e meia o valor médio das D.O. dos soros de referência negativos, conforme preconizado por Voller et al. (1980) e Oliveira et al., (2008).

A atividade imunológica de cada soro testado foi calculada mediante a determinação do valor A/P (amostra em relação ao positivo), considerando-se os soros de referência negativos e positivos de acordo com a seguinte equação:

$$A/P = \frac{\text{Absorbância média da amostra} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}{\text{Absorbância média do soro de referência positivo} - \text{Absorbância média do soro de referência negativo}}$$

6.4.1.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

O diagnóstico sorológico de detecção de anticorpos anti-*Leishmania (L.) infantum* pela RIFI foi de acordo com a metodologia descrita por Vides et al. (2011) e o ponto de corte estabelecido foi 1:40.

6.4.2 Exames moleculares

6.4.2.1 Extração do DNA

A extração de DNA das amostras de *swabs* conjuntivais de gatos foi pela técnica de *salting-out* descrita por John et. al (1991) e modificada por Lahiri; Nurnberger (1991). Para a extração de sangue foi utilizado o kit comercial “*DNeasy® Blood & Tissue, Quiagen (cat.nº 69506)*”, conforme recomendações do fabricante.

6.4.2.2 Controles Positivos e Negativos

Como controles positivos das reações de PCR foram utilizados amostras padrão de DNA de *Leishmania (L.) infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481 e *L. amazonensis* IFLA/BR/1967/pH8 cedidas pelo Laboratório do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, e como controle negativo água deionizada estéril. Para a avaliação do limite de

detecção na qPCR foi realizada uma curva padrão (fator de diluição 10) com quantidades conhecidas de DNA genômico de *L. (L.) infantum*.

6.4.2.3 Reação em cadeia pela polimerase em tempo real (q-PCR)

A reação de q-PCR foi realizada conforme descrito por Francino, et al. (2006). Foi utilizada a sonda TaqMan (FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-BHQ-1) para a detecção de um segmento conservado do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., juntamente com os oligonucleotídeos LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3') e LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3'), que são pequenas modificações dos oligonucleotídeos 13A e 13B descrito por Rodgers et al. (1990) para a adaptação dos ensaios com a sonda TaqMan. Para a reação de qPCR foi utilizado o kit *LightCycler® 480 Probes Master* (Roche®, Life Science, Brasil) em volume 20µl sendo 10µl de 2x concentrado PCR Mix contendo *FastStart Taq DNA Polymerase*, tampão de reação, dNTP mix e 6,4nM MgCl₂, 1,8µl de cada oligonucleotídeo (900nM de cada oligonucleotídeo), 0,4µl de sonda (200nM) e 1µl de DNA (amostra) foi utilizado. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador *LightCycler 480 II* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) com ciclos de: 95°C (10 min.); 50 ciclos a 95°C por 15 seg., 50°C por 1 min. e 72°C (1 seg.). Os produtos da qPCR foram analisados com o programa específico do equipamento e a eficiência de cada reação foi determinada baseada na curva padrão. Os valores foram expressos em *Cycle Threshold (Ct)*, ou seja, o valor que a amostra atinge a linha *Threshold* determinada após o cálculo da eficiência de cada reação. A especificidade, a qual foi definida pela equação $\sigma = (1 + \varepsilon) \Delta Ct$, foi avaliada utilizando amostras de DNA referência *L. (L.) infantum* e (100 pg/ml).

6.4.2.4 PCR convencional (c-PCR) da região de ITS1- rDNA – Detecção de Tripanossomatídeos

A PCR para detecção de DNA de tripanossomatídeo foi realizada em todas as amostras como descrito por El Tai et al. (2000). Isso foi feito através da amplificação da região ITS1 do rDNA, utilizando os primers LITSR (5'-CTGGATCATTTTCCGATG-3') e L5.8S (5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'), que se anelam nas sequências conservadas

SSU e 5.8S. Para a mistura da PCR utilizamos: tampão de PCR (50mM KCl, 10mM de Tris-HCl), 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de DNTPs, 2U de Taq-polimerase (*Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen®*), 400mM de cada iniciador e 5µl da amostra de DNA. Água ultrapura foi utilizada como controle negativo. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial em um ciclo de 95°C por quatro minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C durante 30s, 53°C durante 30s e 72°C durante um minuto e uma extensão final de 72°C durante cinco minutos. O produto gerado é de 300 a 350 pb, dependendo da espécie envolvida, os quais serão visualizados em gel de agarose a 1,5%.

6.4.2.5 c-PCR para detecção de *Leishmania* spp.

Para a detecção de *Leishmania* spp. a mistura para a reação foi preparada do seguinte modo: 2,5µl de tampão (200mM Tris-HCl; 500mM KCl, pH 8,4), 0,75µl de MgCl₂ (1,5mM), 0,5µl de dNTP's (10mM cada), 1,5µl de cada *primer* (10pmol/µl), 0,15µl de *Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen®)* (5U/µl), quantidade suficiente de água Milli-Q para completar 22,5µl e 2,5µl de DNA (10ng/µl), totalizando um volume final de 25µl. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador com ciclos de: Desnaturação Inicial: 94°C (3 min.); e 35 ciclos: D: 94°C (40 seg.); A: 56°C (30 seg.); E: 72°C (30 seg.); E final: 72°C (5 min.). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a detecção de *Leishmania* spp. foram o 13A: (5'-GTG GGG GAG GGG CGT TCT-3'), 13B: (5' -ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT-3'), descritos por Rodgers et al. (1990). O produto final amplificado da reação positiva é de 120pb.

6.4.2.6 Sequenciamento

Após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, os produtos de PCR foram retirados do gel e purificados usando o *kit Ilustra GFX PCR DNA & Gel Band Purification (GE Healthcare, New York, USA)*, de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando 20 ng/ul de produto purificado da PCR e 5µM de cada *primer*. As amostras foram enviadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - Instituto Biológico (IB) da Universidade de São Paulo (USP).

Os cromatogramas obtidos com os *primers* senso e anti-senso foram analisados no *software Sequence Scanner 2 v2.2*, quanto a sua integridade. A seguir, as sequências foram estruturadas, comparadas no *Clustal W*, e alinhadas (*software BioEdit Sequence Alignment Editor, versão 7.1.11, Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA*). A sequência consenso obtida após o alinhamento dos *primers* foi submetida ao BLAST para o alinhamento de sequências disponíveis no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

6.4.3 Exame Parasitológico direto: Punção de Biopsia Aspirativa (PBA)

Para o exame parasitológico pela punção de biopsia aspirativa uma agulha (25x8mm) foi introduzida no linfonodo poplíteo direito e/ou esquerdo, e o material biológico puncionado foi depositado sobre lâminas de vidro (Invicta, Brasil) limpas e desengorduradas, e, com o auxílio de outra lâmina foi realizado uma extensão da amostra biológica formando o esfregaço. Em seguida, os esfregaços foram corados pelo kit Panótico rápido® (CÓD: 657-LAB HOUSE) conforme as recomendações do fabricante. Brevemente, as lâminas foram submergidas durante 10s sob discreta agitação na solução fixadora (Triarilmetano 0,1%). Depois de escorridas foram submergidas por 08s sob agitação na solução de corante básico (xantenos 0,1%) e, por fim, submergidas também por 12s sob agitação na solução de corante ácido (tiazinas 0,1%). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e secadas à temperatura ambiente. Após secas, estavam prontas para o exame direto ao microscópio ótico.

Esfregaços sanguíneos também foram montados e corados conforme descrito acima. Foi considerado positivo o esfregaço que apresentou alguma forma do parasito, e negativo se o parasita não foi visualizado em pelo menos 100 campos visuais.

6.5 Seleção de gatos positivos e negativos para avaliação da resposta imune

Após avaliação clínica e diagnóstica para a infecção por *L. (L.) infantum*, os gatos foram selecionados e divididos em dois grupos contendo seis animais cada. Os critérios de cada grupo estão a seguir:

Grupo Infectado (GI) = constituído por gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*; com sorologia ELISA e RIFI reagente, cPCR / qPCR e/ou PBA positivo, sequenciamento com 100% de identidade para a espécie de *L. (L.) infantum* e negativo para FIV e FeLV.

Grupo Controle (GC) = constituído por gatos saudáveis, com diagnóstico negativo para a infecção por *L. (L.) infantum* pelos testes sorológicos (ELISA e RIFI), moleculares (cPCR e qPCR), PBA e negativos para FIV e FeLV.

6.6 Detecção das imunoglobulinas IgA e IgM anti-*L. (L.) infantum* pelo ELISA

A detecção das imunoglobulinas IgA e IgM anti-*L. (L.) infantum* em amostras séricas de gatos infectados e não infectados por *Leishmania* spp. foi por meio da técnica ELISA conforme protocolo descrito por REIS et al. (2006b) com adaptações. Brevemente, placas de poliestireno (*Nunc Denmark, Maxi Sorp*), com 96 poços foram sensibilizadas com 100µl do antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* na concentração 5 µg/ml, diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio (TCBS) 0,05M, pH 9,6. Após a incubação da placa por 18 horas em câmara úmida a 4°C, o excesso de antígeno foi removido por quatro lavagens consecutivas, com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 0,01M, pH 7,4, contendo 0,05% de *Tween* 20 (PBS-T20). As placas foram bloqueadas com PBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado, em câmara úmida, a 37°C por 90 minutos, seguida de quatro lavagens com PBS-T20. Então, as amostras de soro foram adicionadas (100 µl/poço, em duplicata) na diluição 1:100 (para IgA) e 1:400 (para IgM) em PBS-T e incubadas por uma hora a 37°C. Subsequentemente foram lavadas quatro vezes com PBS-T e um volume de 100 µl de anticorpo anti-IgA e anti-IgM de gato conjugados com a peroxidase, nas concentrações 1:20.000 e 1:50.000, respectivamente, foram adicionados aos poços das placas. Após incubação a 37°C durante 45 minutos em câmara úmida, os poços foram lavados novamente como descrito acima. Então, 100µl do substrato TMB (Solução de tetrametilbenzidina Dihidroclorada – COD 55214 – *BD Biosciences Pharmigen, San Diego, USA*) foram adicionados em cada poço e incubados à temperatura ambiente na ausência de luz para desenvolvimento da cor por 30 minutos. A reação foi interrompida com solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5N com 50 µl/poço. A absorbância foi mensurada usando filtros de 450 nm, em espectrofotômetro, modelo EL 800 (*Universal Microplate Reader – BIO-TEK INSTRUMENTS, INC*).

6.7 Determinação das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) em células do sangue pela citometria de fluxo.

Alíquotas das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram analisadas pela citometria de fluxo para investigar a expressão dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Para essa análise, amostras de sangue, aproximadamente 3ml foram coletadas diretamente da veia jugular utilizando seringa com agulha (0,7 x 25mm) de gatos. O sangue coletado foi acondicionado em tubos com EDTA (anticoagulante) e armazenado a fresco (4°C). Alíquotas de 200µl do sangue periférico de felino foram transferidos para tubos falcon de 15ml contendo 3ml de solução salina fosfatada 0,01 M e pH 7,4 (PBS) esterilizada e a amostra foi centrifugada a aproximadamente 1.300 rpm por cinco minutos em refrigeração de 4°C, para lavagem das PBMCs, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, esse procedimento foi realizado duas vezes. Em sequência, 1ml de tampão de lise foi adicionado a amostra, incubada por dois minutos para lise completa das hemácias e centrifugada por dois minutos a 1.500 rpm a 4°C, seguida de duas lavagens, como descrito acima. Após descartar o sobrenadante, 100µl de PBS estéril foram adicionados para ressuspender as células, e então adicionados à amostra os anticorpos (*Mouse anti-feline CD4⁺*, Cat. No. 8130-0 e *Mouse anti-feline CD8⁺*, No. 8120-02, ambos os anticorpos da *SouthernBiotech*) na concentração de 1µg/10⁶ células e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente na ausência da luz. Novamente, as PBMCs foram lavadas uma vez como descrito acima, e ressuspensas em 400µl de PBS estéril, seguindo diretamente para análise no citômetro. Como controle negativo da reação utilizamos água deionizada esterilizada no lugar dos anticorpos em uma amostra de PBMCs preparada conforme descrito acima. A seleção das subpopulações celulares das amostras foi analisada por meio de protocolos de aquisição já pré-estabelecidos (BYRNE, et al., 2000). A atividade funcional dos anticorpos quanto a marcação das células T (CD4⁺ e CD8⁺) por fluorescência foi avaliada em microscópio óptico equipado para fluorescência.

6.8 Avaliação da resposta imune celular

6.8.1 Extração do RNA das Células Mononucleares de Sangue Periférico (PBMCs)

O RNA total da amostra foi extraído através do *Kit Quick-RNA™ MiniPrep (R1054)* de acordo com protocolo do fabricante.

O RNA foi quantificado por fluorescência através do equipamento *Qubit 3.0 Fluorometer*, utilizando o *kit Qubit RNA BR Assay (ThermoFisher – Q10210)* e sua qualidade foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose e *Bioanalyzer (Agilent Technologies)*. Amostras cujo número de integridade do RNA (RIN) $\geq 5,00$ são indicadas para o sequenciamento. O RNA extraído foi mantido à temperatura de -80°C até o momento do ensaio.

6.8.2 Sequenciamento de alto desempenho do transcriptoma (RNA-Seq)

A metodologia de RNA-Seq (sequenciamento de RNA) emprega tecnologias de sequenciamento maciço e de alto rendimento recentemente desenvolvidas para mapear e quantificar os transcritos, sendo considerado um método revolucionário, pois possui alta sensibilidade e pode ser usado para caracterizar o transcriptoma completo de um organismo (SILVA, 2012; VARUZZA, 2013).

O processo de sequenciamento no *Illumina NextSeq* consiste de três etapas: preparo das bibliotecas, geração de clusters e sequenciamento.

6.8.2.1 Preparo e Quantificação da Biblioteca, geração de cluster e sequenciamento

O preparo da biblioteca foi por meio do *kit Sure Select Strad Specific RNA Libery Prep (Agilent Technologies – cat. 5190-6410)* de acordo com protocolo do fabricante, no qual o RNA mensageiro foi purificado e tagmentado, seguido pela síntese de cDNA e amplificação inserindo os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras.

As bibliotecas geradas foram submetidas a etapas de purificação utilizando bead magnética *Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter)*, para remoção fragmentos muito

pequenos da população total de moléculas e restos de primers. Após realizou-se a quantificação pela metodologia PCR Tempo Real no equipamento *QuantStudio3* (*ThermoFisher*) utilizando *Kit KAPA Library Quantification Kit - Illumina/Universal* (*Roche - KK4824*) e todas as bibliotecas estavam de acordo com protocolo do fabricante.

Um *pool* equimolar foi gerado, através da normalização de todas as amostras, para realização do sequenciamento, o qual foi conduzido utilizando-se o sistema *Illumina NextSeq* de sequenciamento de nova geração (*Illumina® Sequencing*).

6.8.3 Processamento de dados de RNA-Seq e análise diferencial de expressão gênica

A plataforma CLC Genomics Workbench 7.01 foi usada para remover o adaptador e avaliar a qualidade das leituras a partir das leituras brutas.

Filtragem e normalização usando a média aparada de valores M (*Trimmed mean of M values - TMM*) foram conduzidos através de edgeR pacote (ROBINSON et al. 2010) construído em Bioconductor (HUBER et al., 2015). O pacote de Limma (RITCHIE et al., 2015) realizou modelagem linear e *Bayes* empíricos para avaliar a expressão diferencial (DE) entre os grupos. Os genes que apresentaram alterações absolutas de *log fold* > 1 e valor de p ajustado menor que 0,05 e absoluto foram considerados significativos. A visualização e plotagem dos dados da análise de componentes principais (PCA) foram realizadas em R, bem como o agrupamento hierárquico suportado pelo pacote pvcust (SUZUKI; SHIMODAIRA 2006).

6.8.4 Bioinformática: Análise de ontologia genética

A análise de ontologia genética foi realizada para as listas de genes de expressão diferencial (DE) identificadas, utilizando o *DAVID Bioinformatics Resources 6.8* (<https://david.ncifcrf.gov>). O teste exato de Fisher foi considerado como método estatístico (p-valor < 0,05) e o método de Benjamin e Hochberg (BENJAMIN; HOCHBERG 1995) para correção de FDR (< 0,05).

A empresa BPI Biotecnologia, Botucatu-SP foi contratada para realizar o sequenciamento dos transcritos de RNA, bem como a as análises de bioinformática após o sequenciamento.

6.9 Delineamento estatístico

Os métodos estatísticos foram realizados de acordo com a natureza dos dados: os paramétricos foram avaliados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste-t de *Student*, quando avaliamos dois grupos (G1 e G2) ou o teste de *Tukey* para comparação de médias com mais de três parâmetros. Para os testes estatísticos foi respeitado o intervalo de confiança de 95% ($p \leq 0,05$). O índice de concordância entre os métodos diagnósticos foi avaliado pelo índice *Kappa* (κ) e interpretado de acordo com (Landis e Koch, 1977), $\kappa < 0,4$ é considerado fraca concordância; $0,41 \leq \kappa \leq 0,6$ é aceito como concordância moderada; $0,61 \leq \kappa \leq 0,80$ é considerado boa concordância; e $\kappa > 0,8$ é aceito como excelente concordância. Todas as análises estatísticas foram geradas no programa R, versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Perfil Clínico-Laboratorial da Leishmaniose Felina

Cento e sessenta e seis gatos foram analisados sorologicamente por ELISA e RIFI e, molecularmente, por meio da cPCR de DNA extraído de *swab* conjuntival e sangue para o diagnóstico da infecção por *Leishmania* spp. Destes, 15,06% (25/166) apresentaram anticorpos contra *L. (L.) infantum* pelo ELISA e 53,61% (89/166) pela RIFI, dos quais 12,04% (20/166) foram positivos tanto para RIFI como para ELISA. O ponto de corte para o ELISA foi (D.O. = 0,220, NE \geq 3). Desse modo, os níveis de anticorpos dos gatos positivos variaram entre D.O. = 0,222 a 0,973 e NE = 3 a 7 (Tabela 01), em alguns gatos a D.O foi até 4 vezes maior que o ponto de corte, como observado anteriormente (SOLANO-GALLEGO et al., 2007; VIDES et al., 2011).

A infecção por *Leishmania* spp. em gatos tem sido cada vez mais recorrente na literatura (ALVES-MARTIN et al., 2017; COELHO et al., 2010; COSTA et al., 2010; MARTÍN-S ÁNCHEZ et al., 2007; OLIVEIRA et al. , 2015; PENNISI E PERSICHETTI, 2018; PENNISI, 2015; PENNISI et al., 2015(a,b), 2004; MANCIANTI, 2004), e cinco espécies do gênero *Leishmania* já foram identificadas nesses animais, sendo: *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (PENNISI et al., 2015), entretanto, o diagnóstico da LF ainda é controverso em termos de sensibilidade e especificidade. A falta de conhecimento dos mecanismos de resposta imune humoral e celular dos felinos infectados requer o uso de diversas técnicas (sorológicas, parasitológicas e moleculares) para o fechamento do diagnóstico conclusivo da infecção e/ou doença (ANTUNES et al., 2016; COELHO et al., 2011; COURA et al., 2018; SPADA et al., 2013). Por esta razão, o diagnóstico da LF neste estudo foi baseado em diferentes métodos, sendo nossos pontos de referência, os gatos com exames moleculares/parasitológico e sequenciamento positivo para *L. (L.) infantum*.

Pela RIFI, os gatos positivos apresentaram variações de títulos de anticorpos, entre 1:40 (27/89); 1:80 (32/89); 1: 160 (19/89); 1: 320 (7/89); 1: 640 (1/89) e 1: 1280 (2/89) (Figura 06), corroborando e complementando estudos anteriores cujos títulos em gatos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* variaram até 1: 320 (ALVES-MARTIN et al.,

2017; SILVA et al., 2008; VIDES et al., 2011). Embora três gatos tivessem altos títulos de anticorpos para *L. (L.) infantum*, variando de 1: 640 a 1: 1280, não foram positivos nos testes moleculares.

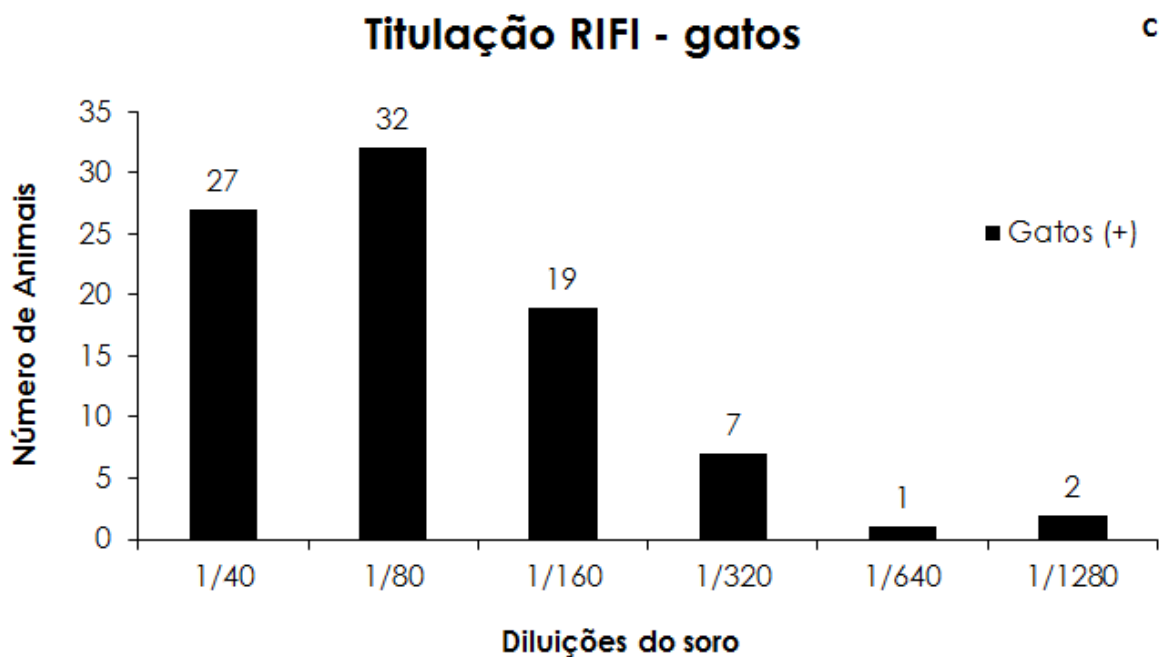
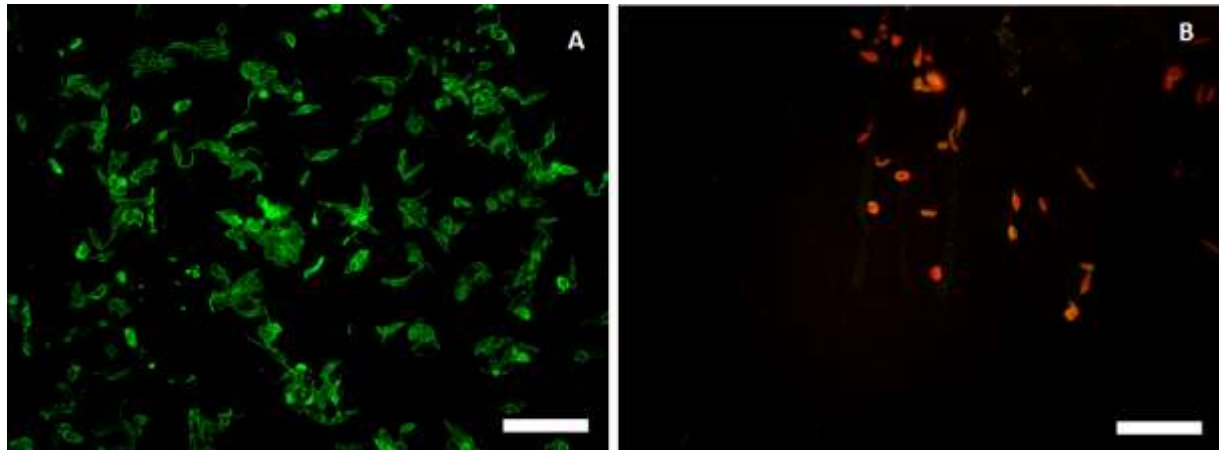
Tabela 1. Níveis de ELISA (NE) em relação aos valores de absorvância (densidade óptica – D.O.) dos gatos avaliados utilizando o antígeno solúvel bruto de *L. (L.) infantum*. Ilha Solteira, São Paulo, 2019.

Classificação dos níveis de anticorpos anti-<i>L. infantum</i> pelo ELISA		
Níveis ELISA	Intervalo D.O.	Quantidade de felinos
0	0 - 0,119	117
1	> 0,119 - 0,161	14
2	> 0,161 - 0,217	9
3	> 0,217 - 0,293	11
4	> 0,293 - 0,396	5
5	> 0,396 - 0,535	4
6	> 0,535 - 0,723	3
7	> 0,723 - 0,976	3
8	> 0,976 - 1,318	0
9	> 1,318	0

Fonte: (SILVA, 2019).

Nota: Ponto de corte (D.O. = 0,220, NE = ≥ 3).

Figura 6. Fotografias de lâminas de RIFI para *Leishmania (Leishmania) infantum*. A: reação positiva, na objetiva de 40x. B: reação negativa, objetiva de 40x. C: titulação de anticorpos anti-*Leishmania* pela técnica RIFI, a partir da diluição 1/40. Gatos positivos (N = 89). Barra = 50µm. Ilha Solteira/SP, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

O número de gatos soropositivos observados no presente estudo foi semelhante ao encontrado em felinos analisados anteriormente na mesma área (ALVES-MARTIN et al., 2017). Pela RIFI, detectamos um elevado número de gatos com anticorpos anti-*Leishmania* (53,61%), no entanto, alguns desses gatos apresentavam sinais clínicos inespecíficos para LF, porque são similares àqueles observados em outras doenças, comumente encontradas nessa espécie, e outros gatos soropositivos eram assintomáticos. Para Pennisi et al. (2015) e

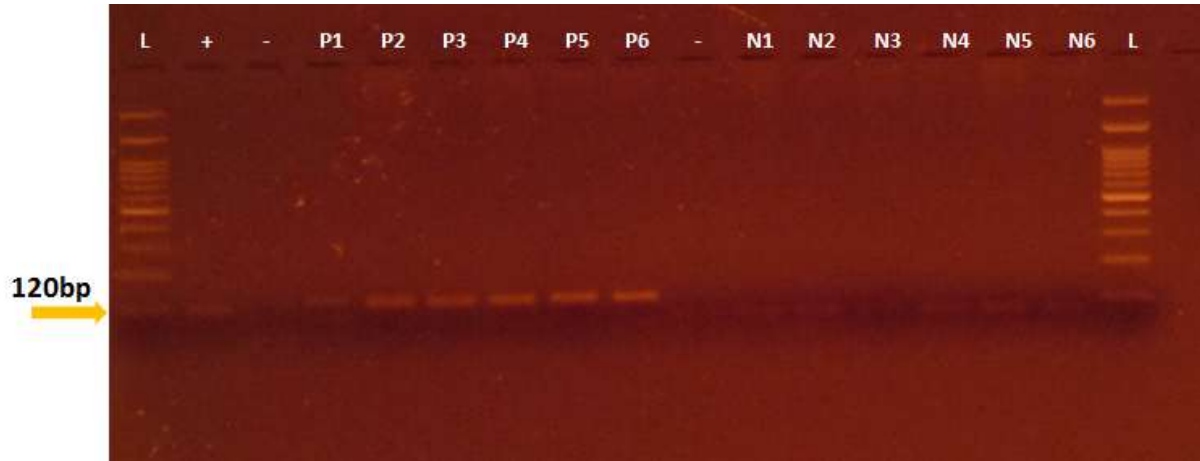
colaboradores as infecções felinas subclínicas são comuns em áreas endêmicas para leishmaniose canina, e as taxas de soroprevalência de infecção felina com *L. (L.) infantum* em pesquisas, variam de 0% a mais de 68%.

Além disso, observamos uma concordância fraca entre as condições ELISA x RIFI ($k = 0,1513$) e RIFI x PCR ($k = 0,0628$) e moderada ELISA x PCR ($k = 0,4015$). Resultados semelhantes foram relatados por Sobrinho et al. (2012) em uma população de gatos de uma área endêmica para LVC. Embora as técnicas sorológicas (ELISA vs. RIFI) em geral mostrem boa concordância e alta sensibilidade no diagnóstico da LVC (SILVA et al., 2014), em gatos, ainda não obtivemos o mesmo consenso quando usamos antígenos solúveis brutos. No diagnóstico de LF, diferentes técnicas nem sempre corroboram os resultados, e as concordâncias podem variar de fracas a moderadas (ALVES-MARTIN et al., 2017). Segundo Pennisi et al. (2015) os diferentes valores encontrados pela mesma técnica podem ocorrer devido aos diferentes níveis de endemismo, características específicas dos animais estudados e diferenças na metodologia diagnóstica.

Nos exames moleculares, 3,61% (6/166) apresentaram DNA do protozoário *Leishmania* spp. no sangue pelo cPCR, aos iniciadores genéricos 13A e 13B (RODGERS et al., 1990, Figura 07) e assim também foi para os iniciadores LITSR e L5.8S da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* spp. (EL TAI et al., 2000, Figura 08). Todas as amostras positivas para cPCR apresentaram anticorpos anti-*Leishmania* por ELISA e RIFI e foram retestadas pela PCR quantitativa em tempo real (qPCR) usando os iniciadores LEISH-1 e LEISH-2 (FRANCINO ET AL., 2006) confirmando mais uma vez a infecção pelo parasita (Figura 09).

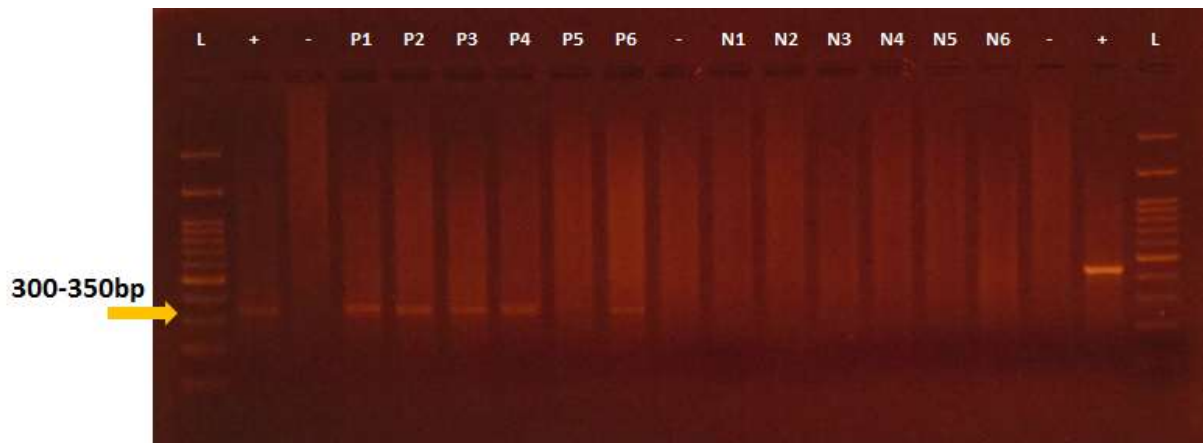
Normalmente, a investigação molecular do DNA de *Leishmania* em gatos não difere em termos metodológicos para o diagnóstico canino (PENNISI et al., 2015), mas em áreas endêmicas para LVC, a taxa de positividade molecular em gatos é sempre menor quando comparada a cães (OTRANTO et al., 2015; PENNISI et al., 2015). Assim, também observamos em nossos dados, uma taxa menor de infecção por *L. (L.) infantum* diagnosticadas pela PCR em amostras de sangue e *swab* conjuntival de gatos, do que a taxa de infecção canina observada na mesma área, pelas mesmas técnicas (PEREIRA et al.; 2016).

Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 2,0% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados utilizando os iniciadores 13A/13B, obtidos pela cPCR do sangue de gatos, gerando fragmentos de 120bp. Linha 1, (L): Padrão 100 a 3.000 bp (*Kasvi, cod K9-100l*); (+): Controle positivo (*L. amazonensis*); (-): Controle negativo; P1 a P6: amostras de sangue de gatos positivos na cPCR (Grupo G1); N1 a N6: amostras de sangue de gatos negativos na cPCR (Grupo G2). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.



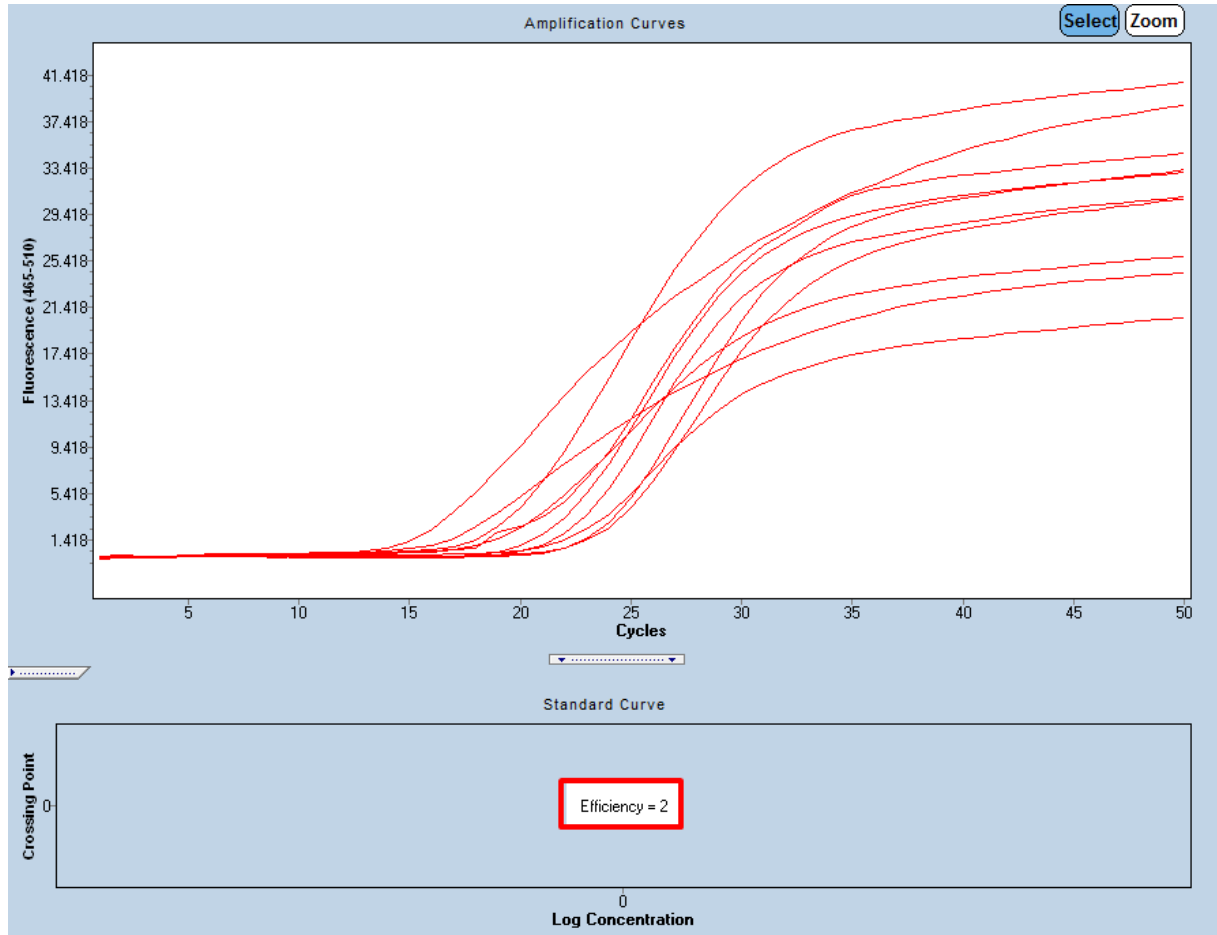
Fonte: (SILVA, 2019).

Figura 8. Eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v) corado com SYBR® Safe (Invitrogen®), de fragmentos amplificados da região ITS-1 de rDNA utilizando os *primers* LIT5R/L5-8S, obtidos pela cPCR do sangue de gatos, gerando fragmentos de 300 a 350bp. Linha 1, (L Padrão 100 a 3.000 bp (*Kasvi, cod K9-100l*); (+): Controle positivo (*L. amazonensis*); (-): Controle negativo; P1 a P6: amostras de sangue de gatos positivos na cPCR (Grupo G1); N1 a N6: amostras de sangue de gatos negativos na cPCR (Grupo G2). Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Figura 9. Curva de detecção para DNA de *L. (L.) infantum* em amostras de sangue de gatos. Controle positivo: Cepa de *L. infantum* MCAN/BR/1984/CCC-17.481, cedida pelo Laboratório de Leishmanioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Análise realizada pelo aparelho *LightCycler 480II da Roche*. Pirassununga, São Paulo, 2019.



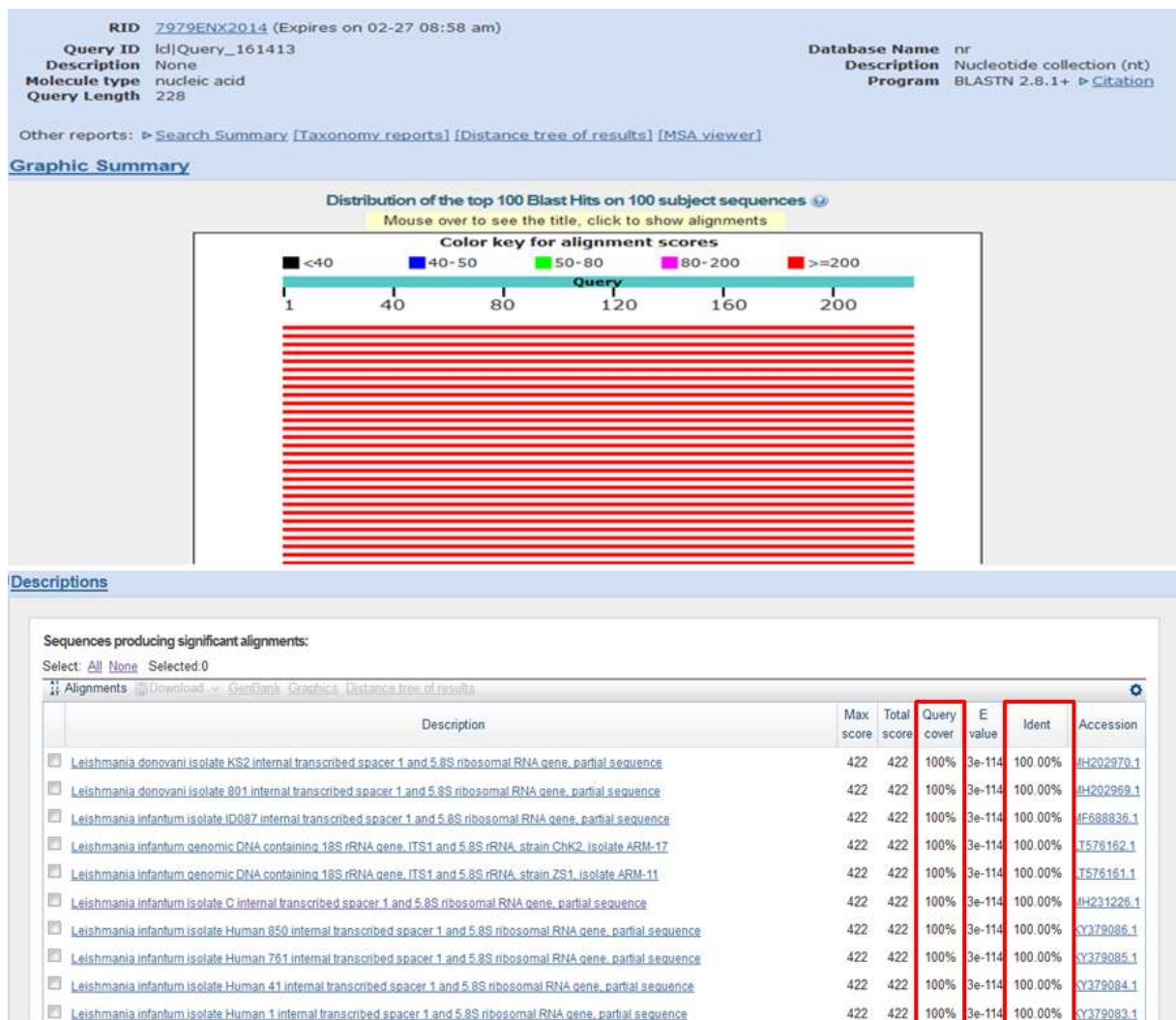
Fonte: (SILVA, 2019).

A frequência de amostras conjuntivais de gatos positiva pela cPCR foi baixa ($N = 1/166$) em comparação com o sangue e técnicas sorológicas, e esse um gato foi concomitante positivo pelo suabe conjuntival e sangue. Chatzis et al. (2014) também encontraram uma baixa frequência de positivos em amostras conjuntivais de gatos sintomáticos de regiões endêmicas em comparação com biópsias da pele e da medula óssea. Especulamos que a detecção de *Leishmania* spp. nos tecidos conjuntivais dos gatos pode ser relativo à carga parasitária no hospedeiro. Oliveira et al. (2015) detectaram o DNA do parasito em 13,5% (7/52) das amostras conjuntivais e Benassi et al. (2017) relataram boa concordância entre a qPCR e a cPCR realizada em amostras de sangue e conjuntiva de gatos de áreas não endêmicas. Embora existam trabalhos que relatem a detecção de *Leishmania* spp. por meio de

suabes conjuntivais de felinos, são necessários mais estudos para afirmar a efetividade dessa técnica no diagnóstico da LF.

Os produtos de PCR amplificados para 300 a 350 pb por meio dos iniciadores da região ITS-1 dos seis gatos positivos na cPCR foram purificados e sequenciados. O sequenciamento direto e a análise dos *amplicons* revelaram que todas as amostras apresentaram 100% de identidade com *L. (L.) infantum* (número de acesso do GenBank: KY379078.1) (Figura 10).

Figura 10. Relatório gráfico da versão web do BLAST mostrando 100% de identidade do fragmento da PCR ITS1 dos gatos positivos sequenciados, com *L. (L.) infantum*. Ilha Solteira, São Paulo, 2019.



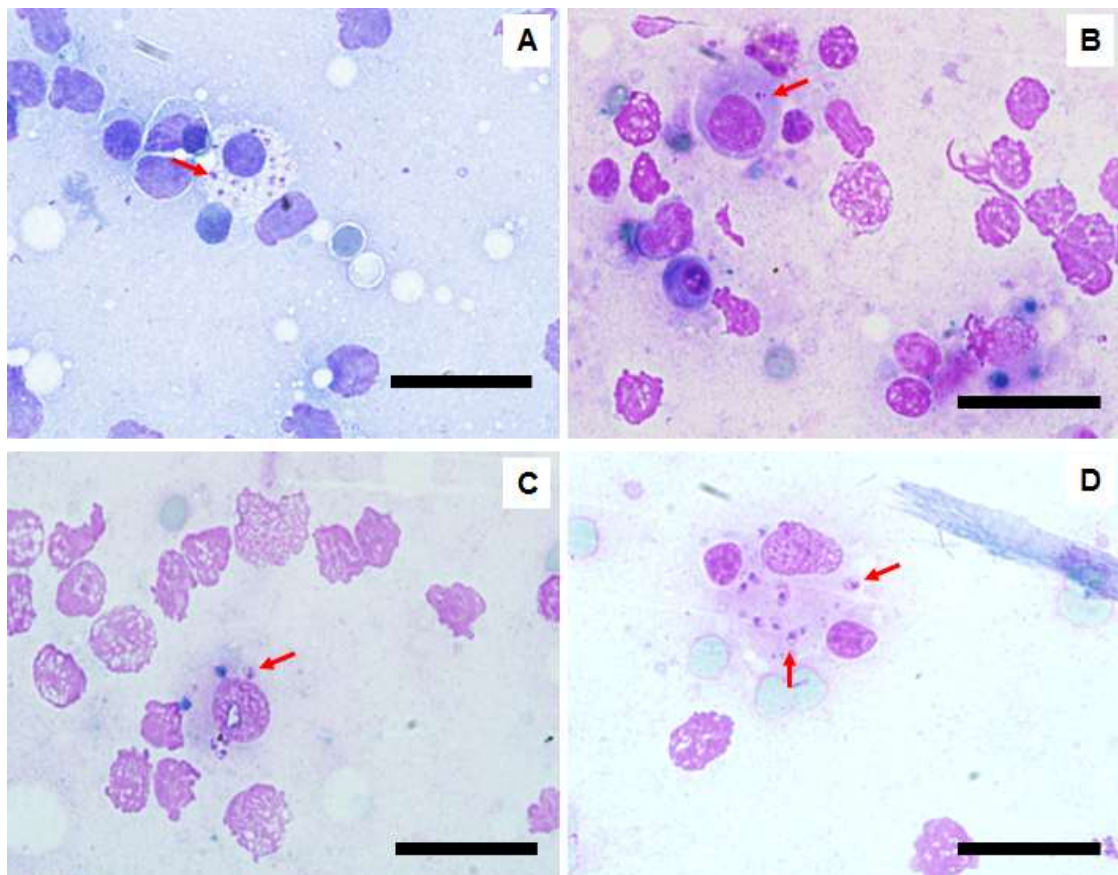
Fonte: (SILVA, 2019).

Desses seis animais, três apresentaram amastigotas de *L. (L.) infantum* em esfregaços do aspirado de linfonodo e/ou medula óssea no exame parasitológico (Figura 11) e um teve a

Leishmania isolada em cultura de aspirado de linfonodo. Assim, os gatos com testes sorológicos, parasitológicos, moleculares e de sequenciamento positivo para *L. (L.) infantum*, compuseram nosso grupo infectado (G1). O grupo controle (G2, não infectado) foi composto por seis gatos saudáveis com diagnóstico negativo para LF em todos os testes (Tabela 2).

Além disso, para formar os grupos G1 e G2, tomamos o cuidado em selecionar apenas animais sem coinfeções por retrovírus que pudessem modificar o padrão de resposta da leishmaniose felina. No diagnóstico de FIV e FeLV, quatro gatos foram positivos para FIV e nenhum para FeLV. A associação do vírus da imunodeficiência felina (FIV), ou vírus da leucemia felina (FeLV) com a *Leishmania* spp. em gatos, tem sido relatada na literatura (VIDES et al., 2011; PENNISSI et al., 2015; SOBRINHO et al., 2012; SPADA et al., 2013), onde a coinfeção desses agentes pode causar uma imunossupressão da resposta imune felina, levando à disseminação e visceralização do parasita *Leishmania* nos animais (MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007).

Figura 11. (A, B, C, e D) Esfregaços de linfonodos poplíteos de gatos, apresentando amastigotas de *L. (L.) infantum* no interior de macrófagos (seta vermelha). Barra = 50µm, objetiva 100x. Coloração: Kit Panótico Rápido®. Ilha Solteira, São Paulo, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Tabela 2. Gatos infectados (G1) e não infectados (G2) para *L. (L.) infantum* selecionados para avaliação laboratorial. Ilha Solteira, SP, Brasil, 2019.

Gatos selecionados para compor os grupos: G1 (infectados) e G2 (controle)									
Grupos	Gatos	Sinais Clínicos	Exames sorológicos		Exames moleculares			PA	Sequencia
			NE	RIFI	LITSR / L5.8S	13A / 13B	qPCR		
G1	01	Linfonodos hipertróficos, perda de peso (escore 01), lesão na ponta da orelha, alopecia, lesões de pele.	+ / 6	+ / 1:80	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
	02	Lesão do nariz, perda de peso (escore 01), lesões de pele no corpo.	+ / 3	+ / 1:80	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
	03	Linfonodos hipertróficos, perda de peso (escore 01), lesões de pele e infecção ocular.	+ / 4	+ / 1:320	+	+	+	N	<i>L. infantum</i>
	04	Perda de peso (escore 01) e lesões de pele na face e no corpo.	+ / 6	+ / 1:80	+	+	+	N	<i>L. infantum</i>
	05	Lesão no nariz e perda de peso (escore 01)	+ / 5	+ / 1:40	+	+	+	+	<i>L. infantum</i>
	06	Perda de peso (escore 01), alopecia	+ / 3	+ / 1:80	+	N	NA	N	<i>L. infantum</i>
G2	01	Assintomático	N / 3	N	N	N	N	N	Negativo
	02	Assintomático	N / 2	N	N	N	N	N	Negativo
	03	Assintomático	N / 2	N	N	N	N	N	Negativo
	04	Assintomático	N / 1	N	N	N	N	N	Negativo
	05	Assintomático	N / 0	N	N	N	N	N	Negativo
	06	Assintomático	N / 0	N	N	N	N	N	Negativo

Nota: (+): positivo; (N): negativo; (NE): Nível ELISA (ensaio imunoenzimático); (RIFI): teste de imunofluorescência indireta; NA: não avaliado; qPCR: PCR quantitativo em tempo real; PA: diagnóstico parasitológico; NA: Não avaliado. Fonte: (SILVA, 2019).

Embora os felinos sejam considerados naturalmente resistentes à infecção por *L. (L.) infantum* (MANCIANTI et al, 2004; PENNISI et al., 2013), o que explica as variações nos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* (ALVES-MARTIN et al., 2017; COURA et al. , 2018) e a ausência de sinais clínicos sistêmicos e ausência do parasito em amostras de aspirados e biópsias de pele e medula óssea (COURA et al., 2018), acredita-se que em alguns gatos a patogenicidade de *L. (L.) infantum* parece superar a resistência natural desses animais, comprometendo-os clinicamente e aumentando a probabilidade de detecção do parasita por exames moleculares (PCR) e parasitológicos (CHATZIS et al., 2014). Isto parece esclarecer a relação dos nossos gatos sintomáticos e o diagnóstico positivo no sangue por cPCR e qPCR, cuja concordância entre as duas técnicas moleculares foi excelente ($k = 1,0$).

Em 54,8% (91/166) dos gatos observamos sinais clínicos que podem ou não estar associados à LF (Figura 12), em contrapartida, 45,1% (75/166) eram assintomáticos. E em relação aos gatos do grupo G1 observamos o agravamento da condição físico-clínica em três deles, que foram a óbito de modo natural por complicações da doença. No entanto, todos os gatos do G1 apresentavam múltiplos sinais clínicos, como: magreza, escore corporal 1, (100%, 6/6); alterações cutâneas (pápulas, nódulos, úlceras, eritema, alopecia) no corpo e lesões com envolvimento cefálico (pele da face, focinho ou orelha) (83,3%, 5/6); linfonodos hipertróficos (40%, 2/6); e um animal apresentava conjuntivite (Tabela 02, Figura 13). Alterações dérmicas e aumento dos linfonodos são os sinais clínicos mais frequentes de leishmaniose em gatos, independentemente das espécies de *Leishmania* que causaram a infecção (PENNISI et al., 2015; SILVEIRA NETO et al., 2015). Além disso, a cabeça em particular, as orelhas externas e o focinho, são as áreas mais afetadas, presumivelmente devido à habilidade dos flebotomíneos em picar áreas com pouco pelos (SILVEIRA NETO et al., 2015; SIMÕES-MATTOS et al., 2004).

Figura 12. Sinais clínicos observados em gatos. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Figura 13. Alterações físico-clínicas em gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (G1). **A:** alopecia na face e corpo com eritema e crostas; **B:** linfonodo hipertrófico no qual amastigotas do parasita foram identificadas; **C:** área alopécica, eritematosa e circular; **D:** o mesmo animal com lesões no focinho; **E:** lesões de pele (ulcerações expostas); **F:** conjuntivite; **G:** alopecia e ulceração crustal na base do pavilhão direito **H:** o mesmo animal, demonstrando alopecias no rosto e no corpo. Ilha Solteira, São Paulo, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Os resultados dos parâmetros hematológicos e bioquímicos são apresentados na Tabela 3 e basicamente podemos observar uma redução das plaquetas ($p = 0,0062$, $p < 0,01$) e aumento dos eritrócitos ($p = 0,0063$, $p < 0,01$) nos gatos G1 em relação ao G2, enquanto os leucócitos foram aumentados para gatos G2 ($p = 0,014$, $p < 0,05$), especificamente neutrófilos ($p = 0,04107$, $p < 0,05$) e linfócitos ($p = 0,04951$, $p < 0,05$), mas apenas plaquetas estavam fora do intervalo de referência para a espécie. Similarmente, Basso et al. (2016) também relataram redução de plaquetas em um gato sintomático e infectado por *L. (L.) infantum*. Em cães com leishmaniose, a trombocitopenia é um sinal típico e pode estar associada ao estágio clínico da doença e à presença de anticorpos anti-plaquetários IgM e IgG (BRAZ et al., 2015; CIARAMELLA et al., 2005; CORTESE et al., 2009; TERRAZZANO et al., 2006). Assim, a trombocitopenia na LVC pode resultar de alterações na parede do vaso devido à vasculite causada pela deposição de imunocomplexos, que pode estar ligada à presença de imunoglobulinas anti-plaquetárias, ou por alterações na trombocitopoiese, além de estar relacionada à insuficiência renal ou hepática em animais sintomáticos (SLAPPENDEL E FERRER 1998; CIARAMELLA et al., 2005; TERRAZZANO et al., 2006). Em gatos, o diagnóstico de trombocitopenia mediada por anticorpos ainda é desconhecido, principalmente pela falta de um ensaio sensível e específico para a detecção de anticorpos antiplaquetários. Por essa razão, ainda não podemos extrapolar se existe alguma atividade de ligação do anticorpo antiplaquetário significativa entre gatos infectados (G1) *versus* saudáveis (G2).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os gatos infectados apresentaram aumento na concentração de proteína total ($p = 4,4832e-06$, $p < 0,01$) com baixa albumina ($p = 0,0065$, $p < 0,01$) e baixa aspartato aminotransferase ($p = 0,0025$, $p < 0,01$), todos fora do intervalo de referência para a espécie. A hiperproteinemia é comumente observada em casos sintomáticos de LVC devido à alta produção de anticorpos, principalmente IgG anti-*Leishmania* e, associada à hipoalbuminemia, consistem em indicadores da doença para cães residentes em áreas endêmicas para LV (BRAZ et al., 2015; FREITAS et al., 2012; MEDEIROS et al., 2008; MONTARGIL et al., 2018), assim, à medida que a doença progride, é acompanhada por uma forte resposta humoral de regulação positiva bem como uma supressão da resposta imune celular (PINELLI et al., 1994).

Tabela 3. Comparação entre parâmetros hematológicos e bioquímicos de gatos infectados por *L. (L.) infantum* (G1) e não infectados (G2). Ilha Solteira, São Paulo, 2019.

Média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos gatos				
Parâmetros	Referência	G1	G2	p- value
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{l}$)	5 – 10	8.07 ± 0.51^a	7.03 ± 0.46^b	$p < 0.01$
HCT (%)	24 – 45	33.76 ± 3.21^a	32.26 ± 2.30^a	0.3927
Hemoglobina (g/dl)	8 – 15	10.14 ± 0.69^a	10.36 ± 0.24^a	0.4708
MCV (fl)	39 – 55	44.32 ± 4.29^a	46.00 ± 4.49^a	0.5444
MCHC (%)	30 -36	30.1 ± 0.87^a	32.26 ± 2.64^a	0.1154
Plaquetas ($10^3/\mu\text{l}$)	230 – 680	122.4 ± 16.07^b	265.5 ± 88.25^a	$p < 0.01$
Leucócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	5.5 -19	13.78 ± 4.09^b	21.25 ± 4.03^a	$p < 0.05$
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	0 -1.5	0.98 ± 0.50^a	1.73 ± 0.22^a	0.06332
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{l}$)	2.5 - 12.5	10.17 ± 3.37^b	14.15 ± 2.21^a	$p < 0.05$
Linfócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	1.5 – 7	2.58 ± 1.04^b	5.11 ± 2.54^a	$p < 0.05$
Monócitos ($10^3/\mu\text{l}$)	0 - 0.85	0.40 ± 0.36^a	0.25 ± 0.24^a	0.4293
Ureia (mg/dl)	42.8 - 64.2	97.6 ± 16.51^a	97 ± 14.01^a	0.9494
Creatinina (mg/dl)	0.8 - 1.8	1.04 ± 0.21^a	1.46 ± 0.36^a	0.05226
ALP (U/L)	7 – 80	15.78 ± 1.56^a	13.97 ± 2.50^a	0.1957
ALT (U/L)	06 – 83	36 ± 12.94^a	39.5 ± 20.63^a	0.7506
AST (U/L)	26 – 43	21.6 ± 4.97^b	38 ± 7.56^a	$p < 0.01$
Proteína Total (g/L)	54 – 78	92.6 ± 3.28^a	72.5 ± 3.50^b	$p < 0.01$
Albumina (g/dl)	2.1 - 3.3	1.54 ± 0.11^b	2.26 ± 0.44^a	$p < 0.01$

Fonte: (SILVA, 2019).

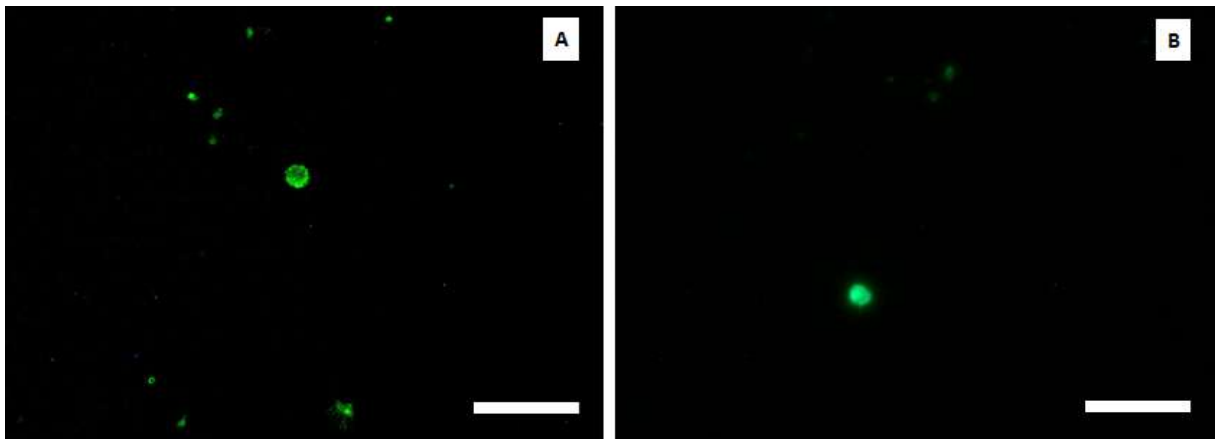
Nota: HCT: hematócrito; MCV: volume celular médio; MCHC: concentração média de hemoglobina corpuscular; ALP: fosfatase alcalina; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase. Valores de referência como proposto por Feldman et al. (2000) e Kaneko et al. (2008). Comparação de médias pelo teste T. Diferentes letras minúsculas (a / b) indicam diferença estatística entre colunas a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

7.2 Perfil de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de sangue periférico na Leishmaniose Felina

A padronização da citometria de fluxo para linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de gatos deu-se após inúmeros testes. Testamos cinco diferentes protocolos em dois laboratórios distintos, primeiro, no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, onde não conseguimos resultados satisfatórios como padrão da técnica, por conta disso, reavaliamos os mesmos e outros protocolos no Laboratório de Oncologia Comparada Translacional (LOCT) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP de Pirassununga. O protocolo padronizado é o mesmo descrito no item 6.7.

A atividade funcional dos anticorpos quanto a marcação das células T (CD4⁺ e CD8⁺) por fluorescência foi avaliada em microscópio óptico equipado para fluorescência. Entretanto, ambos os anticorpos para CD4⁺ e CD8⁺ de felinos são conjugado a FITC (isoticianato de fluoresceína), portanto, os testes para cada anticorpo foi realizado isoladamente. Na Figura 14 é mostrada a reatividade dessas marcações.

Figura 14. Avaliação da atividade funcional dos anticorpos. **A:** Mouse anti-feline CD4-FITC (*Cat. No. 8130-0, SouthernBiotech*) marcando linfócitos T CD4⁺. **B:** Mouse anti-feline CD8-FITC (*Cat. No. 8120-02, SouthernBiotech*) marcando linfócitos T CD8⁺. Objetiva 100x. Barra 50µm. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

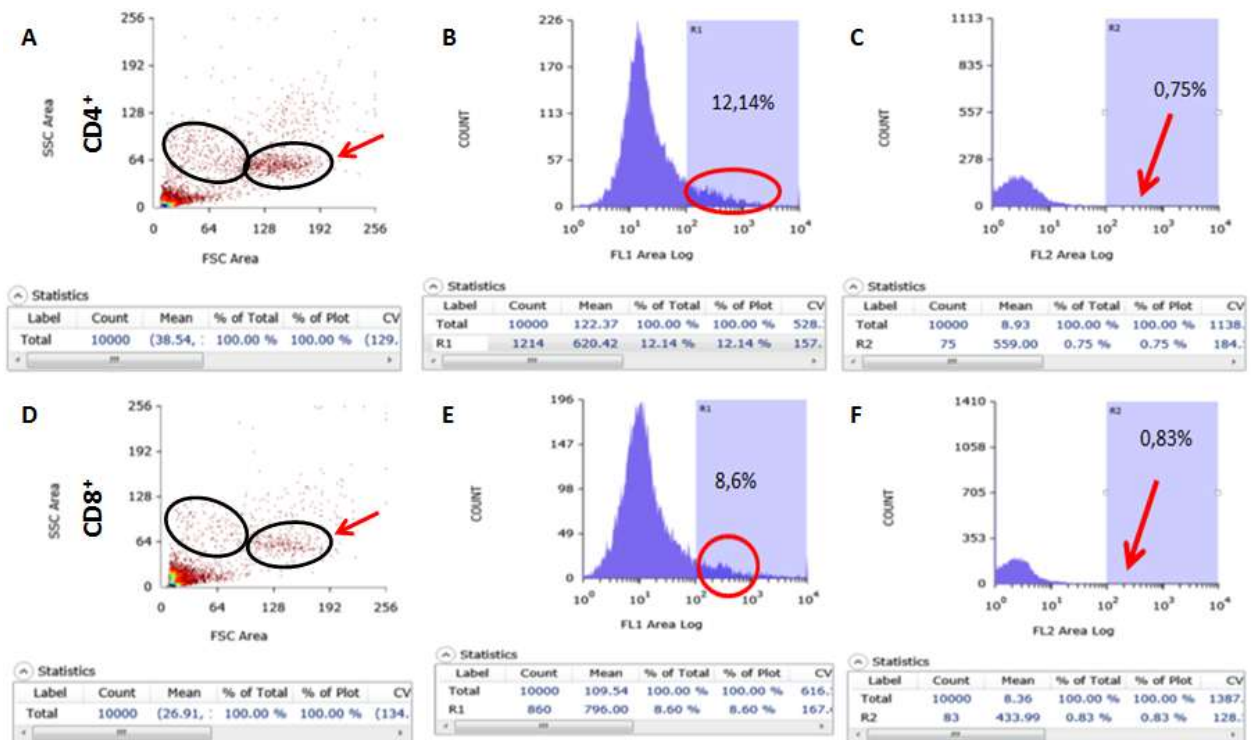
A concentração ótima dos anticorpos foi testada em 0,5µg/10⁶, 1µg/10⁶ e 2µg/10⁶ células. As concentrações 1µg/10⁶ e 2µg/10⁶ células apresentaram valores semelhantes, por isso, padronizamos para 1µg/10⁶ células a concentração do anticorpo a ser utilizada.

A ideia de fixar as PBMCs e postergar as análises de citometria por até uma semana após a coleta do sangue seria uma condição vantajosa em nosso estudo, em função disso, testamos a fixação das PBMCs em paraformaldeído 4% e após dois dias armazenados em geladeira a 4°C, seguimos conforme protocolo padronizado a partir da adição do anticorpo,

mas, não obtivemos bons resultados para esse teste, devido ao aumento de reações inespecíficas. No entanto, observamos que os resultados da citometria para amostras de sangue fresco e após 24 horas armazenada a 4°C, sem paraformaldeído, não apresentaram alterações nos valores, permitindo assim, que as amostras de sangue sejam armazenadas na geladeira a 4°C por até 24 horas sem prejuízo nas análises.

A detecção e quantificação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de gatos foram realizadas separadas, e de acordo com a fluorescência um “gate” foi selecionado na população de células, cujas características morfológicas são representativas de linfócitos, como, tamanho e complexidade (Figura 15). As análises de citometria foram realizadas apenas nos gatos selecionados (G1 e G2).

Figura 15. A e D: população de linfócitos (ponta da seta vermelha). **B:** marcação específica para a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (círculo em vermelho). **E:** marcação específica para a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ (círculo em vermelho). **C e F:** ausência de marcação (seta vermelha), pois os testes foram isolados para cada anticorpo. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

De acordo com a Tabela 04 e Figura 16, observamos diferença significativa entre a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ do grupo G1 em relação ao grupo G2 ($p = 0.0427$), porém, o mesmo não foi observado para as subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (G1 foi similar a G2, $p = 0.06199$). No G1, a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ no sangue esteve aumentada significativamente em relação à porcentagem de linfócitos T CD8⁺ ($p = 0,002177$), enquanto

que nos gatos do G2 a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ não diferiram entre si (p = 0,09923) (Tabela 04).

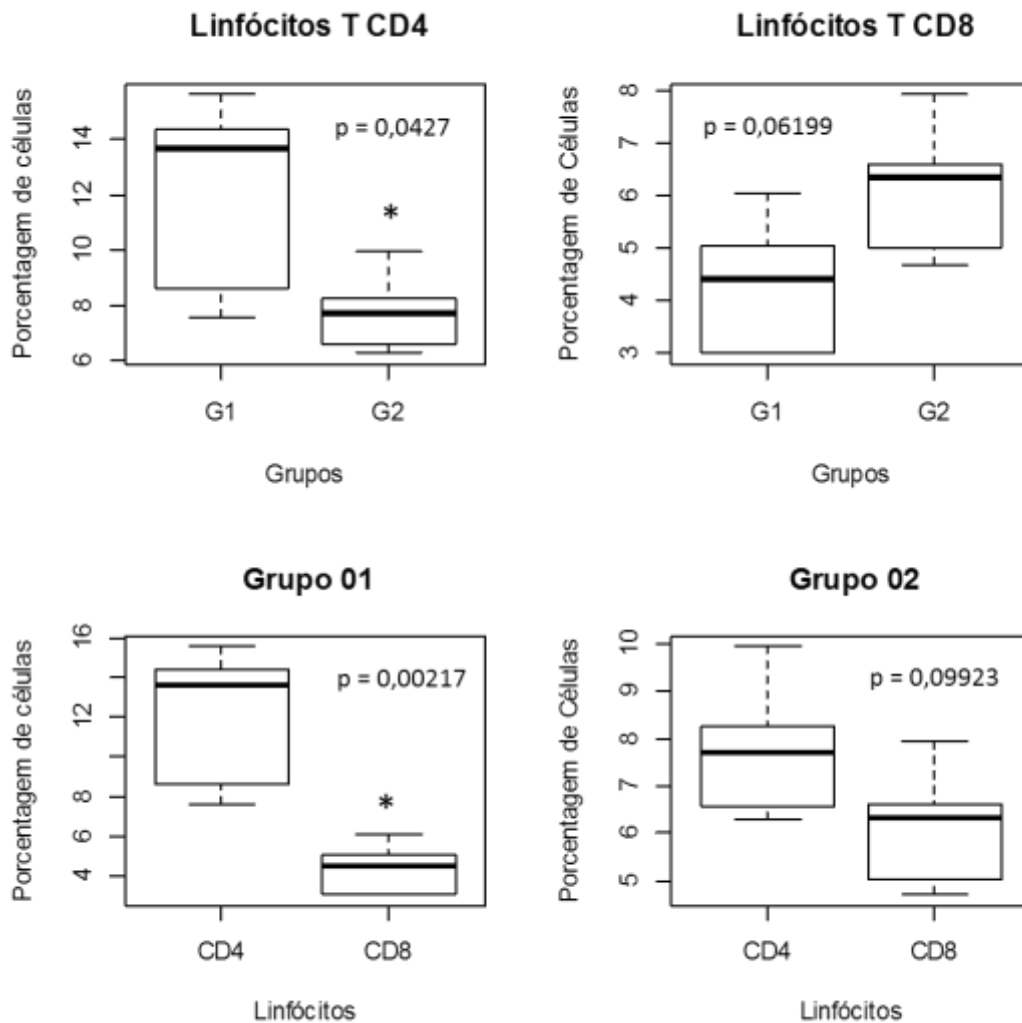
Tabela 4. Valores médios das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) do sangue periférico de gatos naturalmente infectados e não infectados com *L. (L.) infantum* expressos em %. Pirassununga, São Paulo, Brasil, 2019.

Média e Desvio Padrão da Porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de gatos			
Células	G1	G2	Valores de p
CD4⁺	11,964 ± 3,62 ^{aA}	7,756 ± 1,46 ^{bA}	0,0427
CD8⁺	4,306 ± 1,33 ^{aB}	6,116 ± 1,30 ^{aA}	0,06199
Valor de p	0,002177	0,09923	

Fonte: (SILVA, 2019).

Nota: Comparação de médias pelo teste-T. Letras minúsculas diferentes (a/b) indicam diferença estatística entre colunas e letras maiúsculas (A/B) indicam diferença estatísticas entre linhas, ambas a 5% de probabilidade (p ≤ 0,05). Programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Figura 16. Gráfico boxplot das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (G1) e não infectados (G2). Pirassununga, São Paulo, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

A imunidade mediada por células tem um papel importante no controle da *Leishmania* em relação ao hospedeiro. Muitas subpopulações celulares estão envolvidas na resposta imune a esse parasita, incluindo linfócitos que são ativados por citocinas inflamatórias e que irão atuar em conjunto com outras células (ABBAS; LICHTMAN, 2003), como por exemplo, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, estudados neste trabalho.

Em modelos experimentais, como camundongos e cães o papel desempenhado pelos linfócitos T CD4⁺ na leishmaniose esta relacionada a diferenciação nas respostas (Th1, Th2 ou Th17) que pode ser influenciada por vários fatores, como, a predisposição imunológica e genética do hospedeiro, a natureza do antígeno, o sítio de inoculação, a saliva de algumas espécies de flebotomíneos, o tipo de célula apresentadora de antígeno (APC), e ao perfil de

citocinas presente durante a fase proliferativa inicial de ativação das células T (LIEW et al., 1990; LIEW et al., 1991; STENGER et al., 1994; ROGERS et al., 2002; GUMY; LOUIZ; LAUNOIS, 2004; HOLZMULLER et al., 2006; REIS et al., 2006c; HOSEIN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015). Sabe-se que por indução de várias citocinas as respostas Th1 e Th17 representam importantes vias de eliminação do parasito e de modo inverso, a resposta do tipo Th2 tende a perfilhar a susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp. (REIS et al., 2006c; HOSEIN et al., 2015; NASCIMENTO et al., 2015). Neste estudo, o aumento significativo na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico dos gatos infectados (G1) em relação ao grupo controle, G2 ($p \leq 0,05$, Figura 16), associado a detecção do parasita nos aspirados de linfonodos em 50% dos felinos do G1 (Figura 11) e a presença de sinais clínicos da LF (Figura 13), nos sugere a concluir que os gatos do G1 apresentam respostas imunológicas condizentes a susceptibilidade à infecção por *L. (L.) infantum*.

No entanto, por se tratar de animais naturalmente infectados, não temos como mensurar como foi o início da infecção, por quanto tempo esses animais permaneceram assintomáticos, e ainda não compreendemos se existe variação no padrão da resposta imune celular ao longo da infecção, como por exemplo, se o início da infecção é marcado por uma resposta Th1 e, em função da ação das células T regulatórias, citocinas imunorreguladoras e os mecanismos de evasão do próprio parasita, a resposta muda para Th2, permitindo a progressão da doença, ou até mesmo, se as repostas Th1/Th2 são mistas. Em cães, a progressão da LV foi associada com uma resposta imune predominantemente Th2 humoral que não é capaz de controlar a infecção (PINELLI et al. 1994; BRACHELENTE et al. 2005; BARBIÉRI, 2006 e CRUZ-CHAN et al. 2014). Da mesma forma, Carvalho et al. (2012) também relataram que camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis* apresentaram uma resposta Th2 relacionada à suscetibilidade ao parasito, enquanto camundongos da mesma linhagem quando infectados experimentalmente com *L. (Vianna) brasiliensis* desencadearam uma resposta imune celular Th1 na pele associada à resistência ao parasito, evidenciando ainda, que diferentes espécies de *Leishmania* induzem respostas imunológicas diferentes em seu hospedeiro.

A participação dos linfócitos T CD8⁺ no controle da *Leishmania* spp. nos tecidos de ratos (AHMED et al., 2003) e de cães (RUITENBERG et al., 2001) já foram relatadas. Semelhante aos linfócitos T CD4⁺, eles são classificados em dois subconjuntos de células efetoras citolíticas com padrões distintos de citocinas, denominados linfócitos T citotóxicos 1 (Tc1) e T citotóxicos 2 (Tc2). As células Tc1 secretam um padrão de citocinas do tipo Th1, incluindo IL-2 e IFN- γ , melhorando a atividade citotóxica celular contra *Leishmania* spp.,

enquanto as células Tc2 produzem citocinas do tipo Th2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-10, favorecendo a persistência do parasita (DELFS et al., 2001; OHTA, et al., 2004).

Em cães assintomáticos experimentalmente infectados por *L. (L.) infantum*, Pinelli et al. (1995) demonstraram o envolvimento de linfócitos CD8⁺ na resistência, com subsequente lise dos macrófagos infectados pelas leishmanias. Em contraste, os cães sintomáticos mostraram uma resposta linfoproliferativa reduzida à estimulação antigênica específica, resultando em uma menor capacidade dos linfócitos T CD8⁺ em lisar os macrófagos infectados. Nos gatos infectados (G1), todos sintomáticos, a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico foi sutilmente reduzida em relação aos gatos saudáveis (G2), porém, sem diferença estatística, e significativamente reduzida ($p \leq 0,05$) em relação aos linfócitos T CD4⁺ (Figura 16). De acordo com esses resultados é possível sugerir duas interpretações distintas, a primeira, é que a progressão da doença nos felinos infectados (G1) pode ser acompanhada da ausência de uma expressão ativa dos linfócitos T CD8⁺ se diferenciando em Tc1. A segunda, é que simplesmente os linfócitos T CD8⁺ não regulam a infecção por *L. (L.) infantum* em gatos. O papel protetor dos linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose tem sido controverso na literatura, principalmente entre as infecções por diferentes espécies de *Leishmania*, onde, cada espécie pode apresentar um tropismo diferente e, sua diversidade se reflete nas várias manifestações clínicas que elas induzem (STÄGER; RAFATI, 2012).

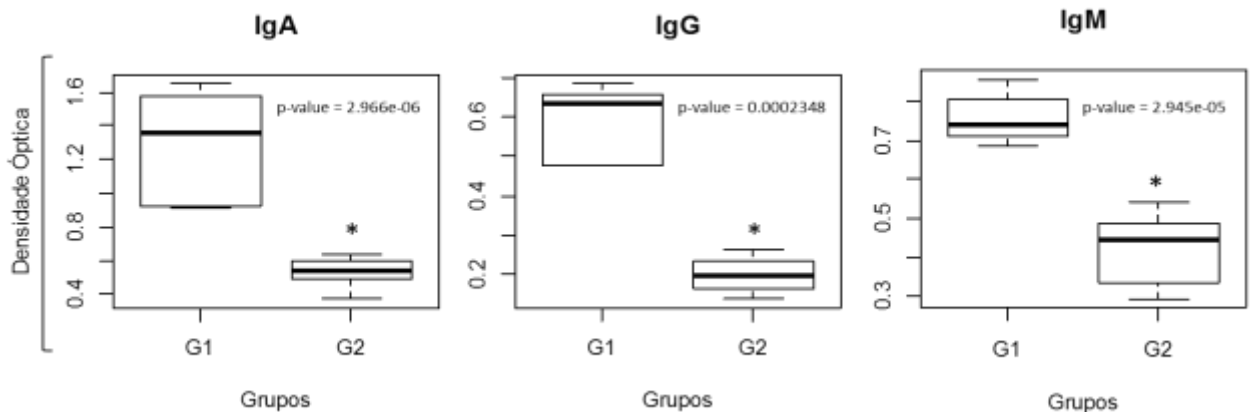
Naturalmente os felinos se mostram mais resistentes às infecções por *L. (L.) infantum* em relação aos cães que vivem na mesma área, apresentando baixa prevalência de infecção e sinais clínicos mais brandos (PENNISI et al., 2015; ALVES-MARTIN et al., 201). Mancianti (2004) explica que essa resistência se deve mais aos fatores genéticos dos próprios felinos, do que a uma resposta imune mediada por célula. No entanto, vale ressaltar que o desequilíbrio de citocinas mediadas por Th1 / Th2 e Tc1 / Tc2 tem sido de importância patogênica em várias doenças (OHTA et al., 2004). Nesse sentido, acreditamos que ambos os fatores (genética do hospedeiro e sua resposta imune celular) estão intimamente relacionados. A variação celular observada entre os dois grupos G1 *versus* G2, associado às alterações clínicas/laboratoriais desses animais, permite-nos sugerir que o tipo de resposta imune celular também tem associação com o desenvolvimento e/ou a resistência da doença, no entanto, são necessários mais estudos para aprofundar o papel dos marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e aos status clínicos quanto à infecção natural por *L. (L.) infantum*.

7.3 Padrões Isotípicos de Imunoglobulinas: IgA, IgG e IgM na Leishmaniose Felina

O ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção dos isotipos de imunoglobulina sérica IgA e IgM foram padronizados em nosso laboratório. Os testes de padronização foram realizados em blocos, onde avaliamos as diluições ótimas do antígeno solúvel total de *L. (L.) infantum* nas concentrações de 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml e 20µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), os soros de referencia, controles positivos e negativos nas diluições de 1/50, 1/100, 1/200 e 1/400 em tampão de solução salina fosfatada 0,01 M e pH 7,4 (PBS), contendo 0,05% de Tween 20 (PBS Tween 20) e, o conjugado constituído de IgA ou IgM de cabra anti-IgA de felino ou anti-IgM de felino, ambos acoplados à peroxidase, diluídos a 1:4.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 e 1:50.000 em PBS-Tween 20. As diluições ótimas padronizadas foram descritas no item 6.6. As análises dos isotipos de imunoglobulina sérica IgA, IgG e IGM anti-*Leishmania* foram realizadas apenas nos gatos selecionados dos grupos G1 e G2.

Os níveis de IgA, IgG e IgM totais anti-*Leishmania* de gatos naturalmente infectados (G1) foram estatisticamente mais elevados em comparação aos gatos saudáveis (G2) ($p \leq 0,01$, Figura 17). Ao observar o comportamento das imunoglobulinas dentro de cada grupo, observamos que os níveis de IgA nos gatos infectados (G1) foram significativamente maiores em relação a IgG e IgM ($p \leq 0,05$), enquanto que essas duas últimas Igs não diferiram entre si. No grupo controle (G2) os níveis de todas as imunoglobulinas apresentaram diferenças entre si (IgA > IgM > IgG, $p \leq 0,05$, Figura 18) porém, em menores quantidades em relação ao G1.

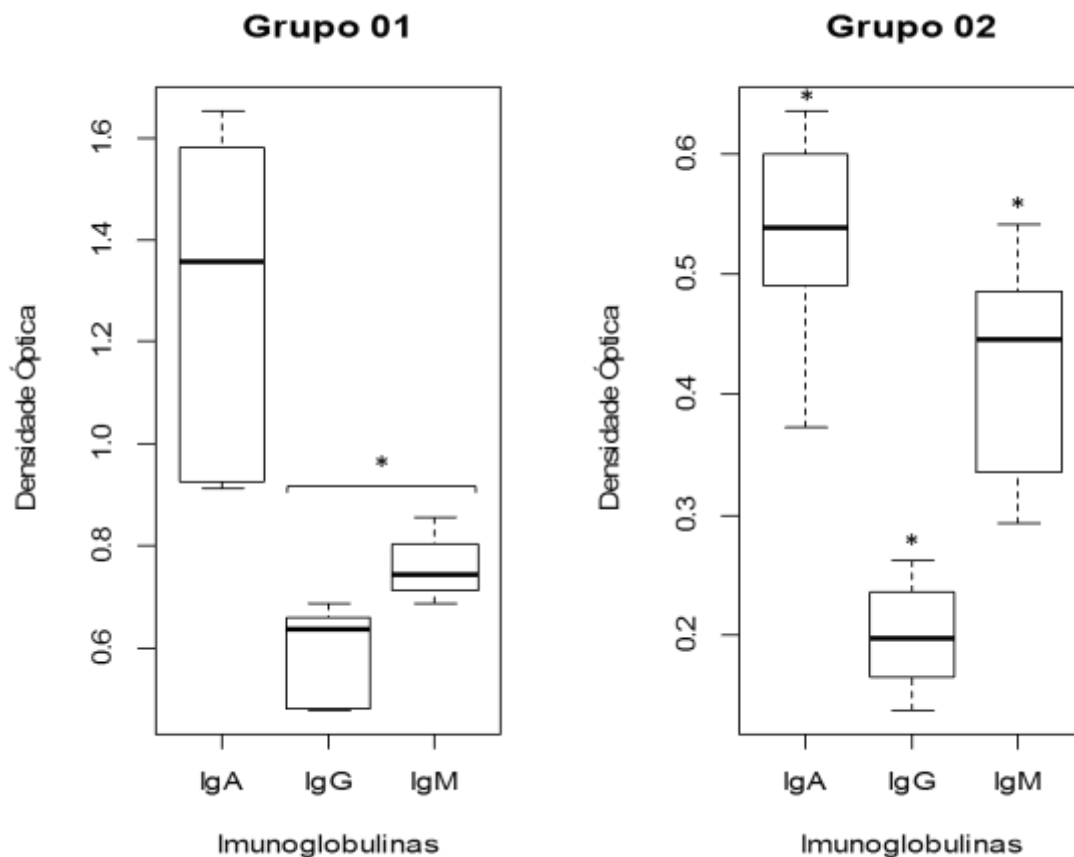
Figura 17. Reatividade dos isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) anti-*Leishmania* em gatos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* (G1) em comparação aos gatos saudáveis (G2). Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Nota: Diferenças significativas em $p \leq 0,01$ foram identificadas pelo símbolo “*”. Teste-T, Programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

Figura 18. Comparação da reatividade dos isotipos de imunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) anti-*Leishmania* em gatos naturalmente infectados com *L. (L.) infantum* (G1) e em gatos saudáveis (G2). Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Nota: Diferenças significativas em $p \leq 0,05$ foram identificadas pelo símbolo “*”. Teste Tukey, Programa R versão 3.1.1 (R CORE TEAM, 2014).

O aumento significativo dos isotipos IgA, IgG e IgM em felinos infectados com *L. (L.) infantum* (G1) em relação ao grupo controle (G2) indicam a participação da resposta imune humoral na LF. Na LVC os níveis de IgA, IgG, IgG1, IgG2, IgE e IgM foram descritos como aumentados em cães sintomáticos quando comparado a cães não infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2001; QUINNELL et al., 2003; REIS et al., 2006, RODRIGUEZ et al., 2006).

Os isotipos de IgA são anticorpos monoméricos, compostos de glicopeptídeos que estão presente no soro e secreções corpóreas. São excretados ativamente nas mucosas do trato respiratório, geniturinário, intestinal e glândulas mamárias e oculares. Atua prevenindo a adesão e absorção de antígenos às mucosas, impedindo a instalação de processos infecciosos, sem ativar o sistema complemento, e impedindo também a inflamação (TIZARD, 2009; NEVES et al., 2017). Sua produção é mediada pelos linfócitos B, porém, dependente da influência de TGF- β liberada por linfócitos Th2 ou células T regulatórias (Treg) (MURPHY, 2012). Desse modo, um aumento de IgA pode estar associado a uma resposta imune celular mediado por células Th2 e Treg, pouco eficientes no controle do parasitismo por *L. (L.) infantum*.

As imunoglobulinas do tipo A também assumem formas diméricas ou poliméricas, e quando isso acontece passam a ser chamadas de IgA secretoras. Essa transformação geralmente ocorre nas células epiteliais, onde a proteína T se liga a moléculas de IgA, impedindo que elas sejam destruídas pelas secreções e auxiliam em seu transporte através da mucosa, e a proteína J permite a união de duas moléculas de IgA pela porção Fc. As IgA secretoras geralmente estão presentes na saliva, mucosas do trato intestinal e urinário e glândulas exócrinas (NEVES et al., 2017, TIZARD, 2009, MESTECKY et al., 1991; MILETIC et al., 1996). Essa imunoglobulina atua na defesa de superfície das mucosas, podendo ser secretada por órgãos que facilmente são parasitados por amastigotas do parasita *Leishmania* spp., como o trato gastrointestinal, fígado, rins e sistema reprodutor (MESTECKY et al., 1991; NIETO et al., 1992; SILVA et al., 2016).

Em cães naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* e sintomáticos, os isotipos de IgA anti-*Leishmania* estiveram aumentados antes do tratamento clínico da doença, seguido do seu declínio após o tratamento, evidenciando que a imunidade da mucosa expressa por IgA desempenha um papel na resposta imunológica canina frente a infecções por esse parasita (RODRIGUEZ et al., 2006). Além disso, níveis de IgA anti-*Leishmania* na urina de cães infectados foi descrita e correlacionada significativamente com a relação proteína/creatinina na urina e com parâmetros bioquímicos séricos, como G-globulinas, ureia e creatinina. A presença de IgA específica ao parasito na urina denuncia o comprometimento da filtração da

barreira glomerular, possivelmente devido a lesão renal, e sugere que a produção desse tipo de isotipo pode refletir em uma proteção local do trato urinário (TODOLÍ et al., 2009). Outros estudos apontam que os níveis aumentados de IgA anti-*Leishmania* estão positivamente correlacionada com o agravo do quadro clínico da LVC, com a densidade parasitária da pele, medula óssea, baço e fígado, e associada a glomerulonefrite observada na LVC em função dos depósitos de IgA identificados nos rins (NIETO et al., 1992; REIS et al., 2006b). Neste trabalho, nos gatos infectados (G1), os níveis de IgA no soro foram significativamente mais expresso do que a IgG e IgM (Figura 18), sugerindo a participação protetora das mucosas com secreção de IgA em casos sintomáticos de LF, possivelmente para impedir a disseminação do parasita para outros órgãos, no entanto, mais estudos com felinos em diferentes estágios clínicos da doença, envolvendo a avaliação da IgA secretora presente no sangue, saliva, urina, mucosa intestinal, entre outros, são necessários para melhor elucidar a participação das IgAs no controle e/ou manutenção do parasitismo da LF.

A IgG é a imunoglobulina mais abundante no soro, capaz de ativar a via clássica do sistema complemento e com maior tempo de circulação. Em função disso, é amplamente utilizada no diagnóstico das infecções por espécies de *Leishmania* spp. em diferentes espécies hospedeiras. A associação das subclasses de IgG e a condição clínica na LVC apresenta divergências na literatura quando se busca por marcadores prognósticos, por exemplo, as subclasses IgG1, IgG3 e IgG4 foram associadas a forma clínica assintomática e a baixa carga parasitária nos tecidos caninos com leishmaniose, enquanto que elevados níveis de IgG total e a subclasse IgG2 e/ou misto de subclasses de IgG foi associado a forma clínica sintomática, com alta carga parasitária e em cães vacinados para leishmaniose (NIETO et al., 1999; REIS et al., 2006b; OLIVEIRA et al., 2009). No entanto, outros pesquisadores apontam que os altos níveis de IgG2 estão associados a formas assintomáticas de LVC ou então em cães vacinados para Leishmaniose, enquanto os níveis de IgG1 se correlacionam melhor com a doença sintomática (BOURDOISEAU e t al., 1997; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; QUINNELL et al., 2003). Desse modo, é possível concluir que todas as subclasses de IgG participam da LVC. Além disso, altas concentrações de IgG anti-*Leishmania* na urina e em tecidos de cães infectados, associado a reatividade da IgA anti-*Leishmania*, permitiu que esse isotipo (IgG) fosse considerado como a ferramenta mais adequada e específica para avaliar as lesões renais severas e o parasitismo global dos tecidos na LVC (SOLANO-GALLEGO et al., 2003; REIS et al., 2006b; TODOLÍ et al., 2009).

Nos gatos infectados (G1), os níveis de IgG total anti-*Leishmania* pelo ELISA foram significativamente elevados em relação ao controle (G2), e pela RIFI os títulos de anticorpos desses animais variaram de 1:40 a 1:320 (Tabela 3). Quando comparamos esses valores com

os de cães infectados da mesma área (SILVA, 2015), observamos que esses títulos são menores. Esses dados corroboram com investigações anteriores, que mostraram que os títulos de IgG total anti-*Leishmania* em felinos tendem a ser menores do que os detectados em casos de LVC (MAIA; CAMPINO, 2011; OLIVEIRA et al., 2015).

A elevação dos níveis de IgG total anti-*Leishmania* na LVC tem correlação positiva com a sintomatologia clínica, conforme descrito em estudos prévios (PINELLI et al., 1994; SOLANO-GALLEGO et al., 2001; REIS et al., 2006b; SILVA et al., 2014), sugerindo que os depósitos de imunocomplexos desencadeado por uma forte expressão de IgG e suas subclasses sejam mais um fator responsável pelo agravamento do comprometimento clínico nos cães com leishmaniose. Na LF, elevados títulos de anticorpos anti-*Leishmania* estiveram relacionados aos sinais clínicos da doença (PENNISI et al., 2004, RÜFENACHT et al., 2005). Complementando, Basso et al. (2016) relataram alto título anti-*Leishmania* (1:1.280) em um gato naturalmente infectado por *L. (L.) infantum* que apresentava lesões cutâneas ulcerativas e nodulares graves nos membros posteriores. E após 18 meses de tratamento com alopurinol combinado com antimonialto de N-metil-glucamina, observaram declínio gradual nos títulos de anticorpos anti-*Leishmania* seguido de reestabelecimento e cura clínica do animal. Todas essas informações aliadas aos nossos dados permitem concluir que a resposta imune humoral mediada pela IgG participa da LF, e, embora esses dados sugiram uma associação positiva entre os níveis aumentados dessa imunoglobulina e a susceptibilidade felina na infecção por *L. (L.) infantum*, acreditamos que mais pesquisas desse âmbito são necessárias para extrapolar essa ideia.

A IgM é a primeira imunoglobulina secretada pelos linfócitos B ativados, e independem do auxílio de linfócitos T para sua produção, por conta disso, estão sempre presentes em maiores quantidades na fase aguda da infecção, no entanto, depois que os linfócitos B mudam de classe com auxílio das células T *helpers*, outros isotipos aparecem, e os níveis de IgM tendem a reduzir (MURPHY, 2012). Na LVC, os níveis de IgM foram detectados precocemente após o primeiro mês da infecção aguda, porém, persistiram em menor intensidade durante as infecções crônicas, e independente do estado clínico dos animais, apresentou correlação positiva com a densidade de parasita em diferentes tecidos (GENARO et al., 1992; REIS, et al., 2006b; RODRÍGUEZ et al., 2006). Neste trabalho, em função dos gatos do grupo G1 terem sido naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, é difícil prever quanto tempo esses animais estavam em contato com as formas amastigotas do parasita, porém, a julgar pelos tipos e níveis de imunoglobulinas detectáveis, sugerimos que no momento das coletas de amostras biológicas (sangue e plasma), esses gatos estivessem no estágio pós-fase aguda e início da infecção crônica, pois, o níveis de IgM, indicativo da fase

aguda, estão significativamente elevados em relação ao grupo controle (G2), e aliado a isso, também detectamos níveis aumentados de IgA e IgG, que são imunoglobulinas secundárias a IgM, e que estão relacionadas a cronicidade da doença em cães. Além disso, não podemos descartar a hipótese de que esses felinos sofram constantes reinfecções de *L. (L.) infantum* por vias naturais, permitindo assim a manutenção constante dos níveis de IgM na circulação, vistos que os gatos do grupo G1 são oriundos de área endêmica para LVC, com exposição diária aos flebotomíneos que comprovadamente coabitam com esses animais (SPADA et al., 2014; ALVES, 2016).

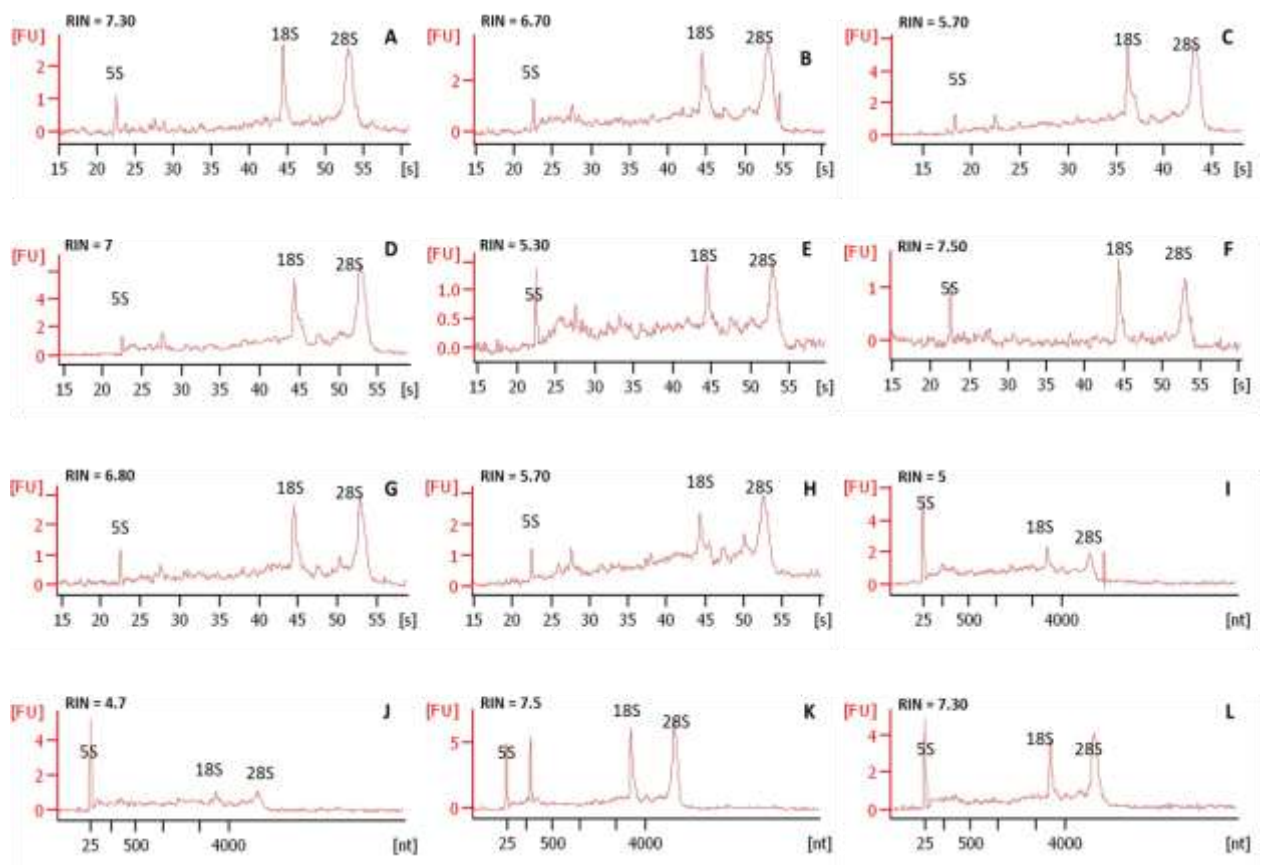
Adicionalmente, o emprego das técnicas ELISA e RIFI usando antígeno solúvel total de *L. (L.) infantum* na detecção de anticorpos IgM anti-*Leishmania* se mostraram como uma proposta complementar ao diagnóstico da LVC (CARVALHO et al., 2009). Pelo observado em nosso estudo, todos os isotipos aqui testados (IgA, IgG e IgM) apresentaram dados convincentes para apoiar o diagnóstico da LF, em especial as IgA específica para *Leishmania*, no entanto, um estudo amostral com número maior de felinos sabidamente infectados deve ser testado para confirmar.

7.4 Análise do transcriptoma na Leishmaniose felina

7.4.1 Integridade do RNA

Os resultados da análise de integridade dos RNAs dos grupos G1 e G2 podem ser visualizados na Figura 19, nos quais a quantidade de fluorescência das amostras é correlacionada com a quantidade de RNAs ribossômicos (rRNA) de diferentes tamanhos, e então, representadas por picos referentes aos rRNAs 5S, 18S e 28S.

Figura 19. Eletroferograma dos RNAs dos grupos G1 e G2. De **A-F**: RNA extraídos das PBMSc de gatos saudáveis, grupo G2. De **G-L**: RNA extraído das PBMCs de gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, grupo G1. Acima de cada eletroferograma estão os valores de RIN. Os picos correspondem aos RNAs ribossomais 5S, 18S e 28S. Botucatu, São Paulo, Brasil, 2019.



Fonte: (SILVA, 2019).

Os valores de RIN (*RNA integrity number*) são calculados a partir de um algoritmo que leva em consideração as razões 28S:18S dos rRNAs extraídos. Assim, quanto maior o valor de RIN, maior é a sua integridade, sendo seu máximo igual a 10 (SCHROEDER et al., 2006). Neste trabalho o menor RIN obtido foi de 4,7. Embora estivesse abaixo do recomendado que é 5, a integridade do RNA dessa amostra permitiu a construção adequada da sua biblioteca. Desse modo um total de 12 bibliotecas de RNASeq foram sequenciadas, correspondente aos dois grupos analisados (G1 e G2). A corrida no geral deu mais de 150 milhões de leituras “reads” de aproximadamente 100 pb (pares de bases) que passaram nos filtros de qualidade. Após remover as “reads” que bateram em outros genomas e considerando as “reads” que anelaram em um único gene, obtivemos um total de 2 a 5 milhões de “reads” filtradas por amostra.

7.4.2 Análise das vias metabólicas na Leishmaniose Felina

Das vias metabólicas diferencialmente expressas no grupo G1 em relação ao G2, observamos que suas sequências estiveram associadas a 56 termos de *Gene Ontology* (GO), sendo que 31 desses termos GO estiveram relacionados com vias metabólicas reprimidas ou “Down” reguladas nos animais do grupo G1, possivelmente em função da infecção por *L. (L.) infantum*, enquanto que 25 desses termos se relacionavam com vias metabólicas ativadas ou “Up” reguladas pela infecção.

O número de termos GO, atribuídos as categorias ontológicas: processo biológico (GO:PB), função molecular (GO:FM) e componente celular (GO:CC), podem ser observados na Tabela 05, para as vias metabólicas “Down” reguladas, e na Tabela 06 para as vias metabólicas “Up” reguladas.

Tabela 5. Descrição das principais vias metabólicas reprimidas nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididas de acordo com as categorias ontológicas. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.

Vias metabólicas reprimidas nos gatos infectados por <i>L. (L.) infantum</i>			
GO:FM			
Nº	Vias Metabólicas	Term ID	Padj
01	Protein serine/threonine kinase activity	GO:0004674	2.590 x 10 ⁻²
02	Protein-arginine deiminase activity	GO:0004668	3.762 x 10 ⁻²
GO:PB			
01	Regulation of protein metabolic process	GO:0051246	2.700 x 10 ⁻⁵
02	Intracellular signal transduction	GO:0035556	4.397 x 10 ⁻⁴
03	Cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	7.794 x 10 ⁻⁴
04	Regulation of cellular protein metabolic process	GO:0032268	1.570 x 10 ⁻³
05	Organitrogen compound metabolic process	GO:1901564	2.302 x 10 ⁻³
06	Protein modification process	GO:0036211	3.262 x 10 ⁻³
07	Cellular protein modification process	GO:0006464	3.262 x 10 ⁻³
08	Positive regulation of biological process	GO:0048518	3.376 x 10 ⁻³
09	Positive regulation of cellular process	GO:0048522	3.713 x 10 ⁻³
10	Regulation of metabolic process	GO:0019222	3.860 x 10 ⁻³
11	Protein metabolic process	GO:0019538	5.445 x 10 ⁻³
12	Macromolecule modification	GO:0043412	8.729 x 10 ⁻³
13	Positive regulation of metabolic process	GO:0009893	1.112 x 10 ⁻²
14	Protein phosphorylation	GO:0006468	1.422 x 10 ⁻²
15	Regulation of macromolécula metabolic process	GO:0060255	1.512 x 10 ⁻²
16	Regulation of signaling	GO:0023051	1.567 x 10 ⁻²
17	Cytokine production	GO:0001816	2.027 x 10 ⁻²
18	Positive Regulation of protein metabolic process	GO:0051247	2.624 x 10 ⁻²
19	Hemopoiesis	GO:0030097	3.010 x 10 ⁻²
20	Regulation of cellular metabolic process	GO:0031323	3.134 x 10 ⁻²
21	Positive regulation of macromolecule metabolic process	GO:0010604	3.412 x 10 ⁻²
22	Regulation of catalytic activity	GO:0050790	3.612 x 10 ⁻²
23	Positive regulation of cellular metabolic process	GO:0031325	3.924 x 10 ⁻²
24	Positive regulation of nitrogen compound metabolic process	GO:0051173	3.943 x 10 ⁻²
25	Response to stress	GO:0006950	4.389 x 10 ⁻²
26	Immune system development	GO:0002520	4.895 x 10 ⁻²
GO:CC			
01	Cytoplasm	GO:0005737	3.881 x 10 ⁻²
02	Intracellular	GO:00056422	4.464 x 10 ⁻²
03	Intracellular part	GO:0044424	4.476 x 10 ⁻²

Fonte: (SILVA, 2019). Nota: Padj – valor de P ajustado

Tabela 6. Descrição das principais vias metabólicas ativadas nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididas de acordo com as categorias ontológicas. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.

Vias metabólicas ativadas com a infecção por <i>L. (L.) infantum</i>			
GO:FM			
Nº	Vias Metabólicas	Term ID	Padj
01	Structural constituent of nuclear pore	GO:0017056	1.659×10^{-3}
02	DNA insertion or deletion binding	GO:0032135	4.990×10^{-2}
GO:PB			
01	DNA-dependent DNA replication	GO:0006261	7.058×10^{-4}
02	DNA replication	GO:0006260	1.605×10^{-3}
GO:CC			
01	Nuclear part	GO:0004428	1.360×10^{-7}
02	Membrane-enclosed lumen	GO:0031974	7.622×10^{-6}
03	Intracellular organelle lumen	GO:0070013	7.622×10^{-6}
04	Organelle lumen	GO:0043233	7.622×10^{-6}
05	Nuclear lumen	GO:0031981	1.649×10^{-5}
06	Nucleus	GO:0005634	2.340×10^{-5}
07	Kinetochore	GO:0000776	7.181×10^{-4}
08	Intracellular organelle part	GO:0044446	8.837×10^{-4}
09	Chromosome	GO:0005694	1.135×10^{-3}
10	Organelle part	GO:0044422	1.847×10^{-3}
11	Protein-containing complex	GO:0032991	2.875×10^{-3}
12	Nuclear pore	GO:0005643	4.440×10^{-3}
13	Chromosome, centromeric region	GO:0000775	3.458×10^{-3}
14	Chromosomal part	GO:0044427	6.712×10^{-3}
15	Nucleoplasm	GO:0005654	7.022×10^{-3}
16	Condensed chromosome	GO:0000793	8.218×10^{-3}
17	Condensed chromosome, centromeric region	GO:0000779	8.701×10^{-3}
18	Condensed chromosome Kinetochore	GO:0000777	9.691×10^{-3}
19	Intracellular membrane-bounded organelle	GO:0043231	9.871×10^{-3}
20	Chromosomal region	GO:0098687	1.259×10^{-2}
21	Nuclear pore outer ring	GO:0031080	1.424×10^{-2}

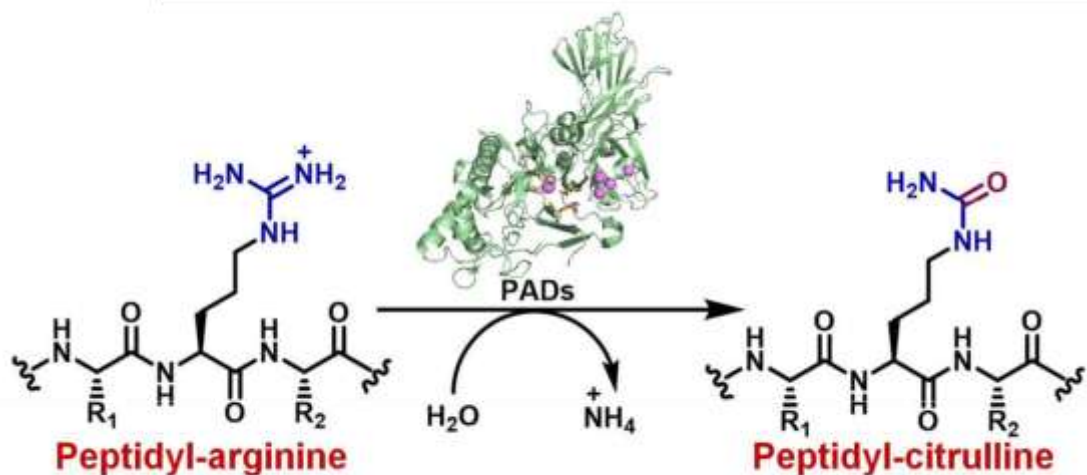
Fonte: (SILVA, 2019). Nota: Padj – valor de P ajustado

A identificação dessas vias metabólicas mostra que a infecção dos felinos pelo protozoário *L. (L.) infantum* promove alterações complexas nos hospedeiros. Tais alterações metabólicas podem nos ajudar a melhor compreender como são os mecanismos de defesa desempenhada pelas respostas imunológicas desses animais. Dentre as vias metabólicas reprimidas nos gatos infectados (G1) destacamos aquelas que podem exercer influência sobre

o parasitismo, como: as vias da atividade da proteína arginina deaminase (PAD), da produção de citocinas, do processo de hemopoiese, da resposta ao estresse e do desenvolvimento do sistema imunológico.

A proteína arginina deaminase é uma enzima, também conhecida como PAD que catalisa uma modificação pós-translacional da molécula de arginina denominada citrulinação. A atuação da PAD é dependente da proteína L-arginina e água, onde a hidrólise do grupo guanidino da arginina produz a L-citrulina e a perda de uma amônia (NH_4) (ROHRBACH et al., 2012; MONDAL et al., 2018, Figura 20). Diferentes tipos de PAD são expressos em mamíferos, e a principal diferença entre essas isoenzimas parece ser a sua localização nos tecidos. As PADs 1, 2 e 4 são as únicas expressas na linhagem hematopoiética e, portanto, são especialmente de interesse imunológico (ROHRBACH et al., 2012).

Figura 20. Citrulinação catalizada pela enzima PAD (proteína-arginina deaminase).



Fonte: (MONDAL et al., 2018).

A PAD do tipo 4 (PAD4) é expresso em granulócitos e é essencial para a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) por meio da via clássica, sendo formada quando os neutrófilos entram em processo de morte programada. Para a ativação das NETs extrusadas de neutrófilos é necessário a associação das cromatinas com proteínas citosólicas, que capturam e matam microrganismos. Esse mecanismo microbicida é denominado de netose clássica e é dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela NADPH oxidase, da elastase neutrofílica, da mieloperoxidase e também da descondensação da cromatina dependente das enzimas PAD4 (ROHRBACH et al., 2012; ROCHAEL et al., 2015).

Na infecção por espécies de *Leishmania* a netose se configura como uma resposta inata que pode contribuir para diminuir a carga parasitaria no local da inoculação das leishmanias (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009). As próprias leishmanias podem induzir a netose classica, via produção de NETs logo após a infecção em função da presença da elastase e da PAD4. No entanto, a medida que essas enzimas foram inibidas experimentalmente, foi observado a diminuição da indução de netose por *Leishmania*, com consequente redução dos mecanismos de destruição do parasita (ROCHAEL et al., 2015). Em nosso estudo, a via metabólica da PAD foi reprimida nos gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, e isso, provavelmente reduziu a indução de netose clássica sobre esses parasitas contribuindo para a fixação e permanência dos mesmos nos felinos.

O mecanismo pelo qual ocorreu a redução das atividades da PAD nos gatos infectados (G1) ainda não é bem compreendido, porém, como as atividades metabólicas das PADs são dependentes do peptídeo L-arginina para a citrulinização, uma redução desse peptídeo influenciaria diretamente a atividade metabólica dessa enzima. A L-arginina tem sido descrita como um aminoácido essencial para o cultivo e crescimento de formas promastigotas in vitro e também para a sobrevivência de formas amastigotas de *Leishmania* no hospedeiro (KRASSNER; FLORY, 1971; WANASEN et al., 2007; MUNDER et al., 2009; MANDAL et al., 2016), onde altos níveis da atividade da arginase tem se correlacionado com o aumento do parasitismo e até mesmo com ausência de cicatrização das lesões de leishmaniose (MUNDER et al., 2009), e a ausência de L-arginina extracelular, leva o parasita a morte celular tipo apoptose (MANDAL et al., 2016). Nesse sentido, sugerimos novos estudos a fim de investigar se a L-arginina envolvida na atividade da PAD são desviadas pelo parasita por meio de uma absorção complexa para se autopromover, reprimindo então, a via metabólica das PADs. De acordo com Mandal et al. (2016) a via metabólica da L-arginina pode ser um provável alvo para controlar o crescimento de parasitas de *Leishmania* e a patogênese da doença. Assim também acreditamos que ocorra com a LF, e sugerimos que a regulação das atividades mediadas via PAD seja uma das primeiras vias para predizer o sucesso ou controle do parasitismo.

As vias metabólicas da hematopoiese e da resposta ao estresse também foram reprimidas nos gatos infectados (G1) do nosso estudo, e isso pode explicar mais um mecanismo sobre o parasitismo na LF. A hemopoiese é responsável pela progressão dos sistemas de órgãos / tecidos mielóides e linfóides derivados do sangue, como por exemplo, a formação, desenvolvimento e maturação das células do sistema imunológico, dentre elas as células-tronco hematopoiéticas são responsáveis pela geração de todas as células sanguíneas (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, entre outras), onde desempenham importante papel na

resposta do hospedeiro às infecções (NAKAGE, SANTANA, 2006, ALBIDIN et al 2017). As células-tronco hematopoiéticas normalmente são ativadas em resposta ao estresse que estimula a produção de mais células sanguíneas para ajudar o corpo a eliminar o patógeno invasor (ALBIDIN et al., 2017). Em nosso estudo, a repressão da via metabólica de resposta ao estresse, possivelmente favoreceu a não ativação da hemopoiese para a produção de células de interesse imunológico, o que explicaria a diminuição significativa de plaquetas e leucócitos observada nos gatos do G1 em relação ao grupo controle, G2 (Tabela 03). De acordo com Albidin et al. (2017) a *L.(L.) donovani* consegue ativar eficientemente as células-tronco hematopoiéticas, orientando-as a produzir um grande número de células sanguíneas específicas, que são suscetíveis à infecção, no entanto, em camundongos, nos quais a ativação das células-tronco hematopoiéticas não pode ser sustentada pelo parasita, ocorreu uma diminuição da atividade hematopoiética que esteve correlacionada com a diminuição do número de parasitas. Em posse dessas informações, agora, nos resta saber se a repressão das vias metabólicas citadas acima em felinos doentes foi induzida pelo próprio parasita, para se defender das células imunológicas, por não conseguir regular a hemopoiese em seu benefício ou se trata de um mecanismo de defesa do hospedeiro.

7.4.3 Análise dos Genes diferencialmente expressos na Leishmaniose Felina

Pela análise de genes ontológicos (GO) significativamente diferentes nos gatos do G1 em relação aos gatos do G2, detectamos 66 termos de GO, desses, 40 termos GO estavam “down” regulados e 26 “up” regulados nos gatos infectados (G1). Possivelmente, tanto a repressão como a ativação desses genes sejam em função da infecção por *L. (L.) infantum*. Dos genes “down” regulados, 07 genes foram associados a GO:FM, 09 genes a GO:PB e 24 genes participavam dos caminhos de sinalização das vias metabólicas (GO:PATHWAY) (Tabela 07). Já os genes “up” regulados, 05 genes foram associados GO:FM, 11 genes a GO:PB e 10 genes a GO:PATHWAY (Tabela 08).

Tabela 7. Descrição dos genes “down” regulados (*Genes ontology*) nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididos de acordo com as categorias ontológicas. p-value < 0,05, FDR < 0.01. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.

Genes “Down” regulados nos gatos infectados por <i>L. (L.) infantum</i>			
GO:FM			
Nº	Genes	Term ID	Nº genes
01	Binding	GO:0005488	11
02	Catalytic activity	GO:0003824	14
03	Molecular function regulator	GO:0098772	4
04	Molecular transducer activity	GO:0060089	2
05	Structural molecule activity	GO:0005198	1
06	Transcription regulator activity	GO:0140110	1
07	Transporte activity	GO:0005215	2
GO:PB			
01	Biological regulation	GO:0065007	12
02	Cell proliferetion	GO:0008283	1
03	Cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	3
04	Cellular process	GO:0009987	4
05	Developmental process	GO:0032502	3
06	Localilzation	GO:0051179	2
07	Locomotion	GO:0040011	1
08	Metabolic process	GO:0008152	9
09	Response to stimulus	GO:0050896	4
GO:PATHWAY (Vias Sinalizadoras)			
01	5HT2 type receptor mediated signaling pathway	P04374	1
02	Adrenaline and noradrenaline biosynthesis	P00001	1
03	Alzheimer disease-presenilin pathway	P00004	3
04	Angiogenesis	P00005	1
05	B cell activation	P00010	1
	Gene: MAP3k2 (Mitogen-activated protein kinase Kinase 2)		
06	Dopamine receptor mediated signaling pathway	P05912	1
07	EGF receptor signaling pathway	P00018	1
08	FAS signaling pathway	P00020	1
09	FGF signaling pathway	P00021	1
10	Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway	P06664	1
11	Histamine H1 receptor mediated signaling pathway	P04385	1
12	Huntington disease	P00029	1
13	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	P00031	2
	Gene: PLCD1 (Phosphoinositide phospholipase C)		
	Gene: LC101085650 (Uncharacterized protein)		
14	Integrin signaling pathway	P00034	1
15	Interferon-gamma signaling pathway	P00035	1
16	Interleukin signaling pathway	P00036	1
17	Notch signaling pathway	P00045	1
18	Oxytocin receptor mediated signaling pathway	P04391	1
19	PDGF signaling pathway	P00047	1
20	Parkinson disease	P00049	1
21	Plasminogen activating cacade	P00050	1
22	T cell activation	P00053	1
	Gene: LCP2 (Lymphocyte cytosolic protein 2)		
23	Thyrotropin-releasing hormone receptor signaling pathway	P04394	1
24	Toll receptor signaling pathway	P00054	1
	Gene: TLR4 (Tool-like receptor 4)		

Fonte: (SILVA, 2019). Nota: FDR: *False discovery rate*.

Tabela 8. Descrição dos genes “up” regulados (*Genes ontology*) nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2, divididos de acordo com as categorias ontológicas. p-value < 0,05, FDR < 0.01. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.

Genes “UP” regulados nos gatos infectados por <i>L. (L.) infantum</i>			
GO:FM			
Nº	Genes	Term ID	Nº genes
01	Binding	GO:0005488	05
02	Catalytic activity	GO:0003824	04
03	Molecular function regulator	GO:0098772	1
04	Molecular transducer activity	GO:0060089	2
05	Transporte activity	GO:0005215	2
GO:PB			
01	Biological adhesion	GO:0022610	1
02	Biological regulation	GO:0065007	05
03	Cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	02
04	Cellular process	GO:0009987	03
05	Developmental process	GO:0032502	01
06	Localilzation	GO:0051179	1
07	Locomotion	GO:0040011	1
08	Metabolic process	GO:0008152	2
09	Multicellular organism process	GO:0032501	1
10	Response to stimulus	GO:0050896	1
11	Signaling	GO:0023052	1
GO:PATHWAY (Vias Sinalizadoras)			
01	FGF signaling pathway	P00021	1
02	Huntington disease	P00029	1
03	Inflamnation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	P00031	2
	Gene: CXCR6 (C-X-C motif chemokine receptor 6)		
04	Ionotropic glutamate receptor pathway	P00037	1
05	Metabotropic glutamate receptor group I pathway	P00041	1
06	Metabotropic glutamate receptor group III pathway	P00039	1
07	Muscarinic acetylcoline receptor 1 and 3 signaling pathway	P00042	1
08	Pyridoxal-5-phosphate biosynthesis	P02759	1
09	Serine glycine biosynthesis	P02776	1
10	Vitamin B6 metabolism	P02787	1

Fonte: (SILVA, 2019). Nota: FDR: *False discovery rate*.

A classificação ontológica GO:PATHWAY (*Genes Ontology Pathway*) indica vias sinalizadoras pelas quais genes participam desempenhando funções específicas para formar seus produtos dentro de uma rota metabólica. Entre os genes “down” regulados GO:PATHWAY, destacamos algumas vias sinalizadoras que possam indicar relação com a infecção por *L. (L.) infantum*, como por exemplo, a via de ativação das células B, as vias da inflamação mediada pela sinalização de quimiocinas e citocinas, via de sinalização do interferon-gama (IFN- γ), vias de ativação das células T e vias de sinalização do receptor *Toll* (Tabela 7).

Uma análise mais aprofundada sobre o gene “down” regulado na via sinalizadora de ativação de células B, apontou para o gene *MAP3k2* (*Mitogen-activated protein Kinase Kinase 2*). Na infecção de macrófagos por *L. mexicana*, membros da cascata da proteína quinase ativada por mitógenos (MAP) são importantes para o estabelecimento da infecção e estão envolvidos no controle do comprimento flagelar do parasita, onde provavelmente estejam envolvidos na diferenciação do estágio pró-amastigotas do parasita. Além disso, a clonagem e caracterização de LmxPK4, um homólogo de MAP quinase de *L. mexicana*, sugerem que o LmxPK4 está envolvido no processo de virulência da *L. mexicana* e seja essencial para estabelecer a infecção de macrófagos (KUHN; WIESE, 2005). Em gatos infectados a baixa regulação do gene *MAP3k2* precisa ser melhor estudado afim de compreender se essa regulação gênica se trata de um mecanismo de resistência do hospedeiro para dificultar o processo de infecção de macrófagos pelos parasitas.

Pela via de ativação das células T, detectamos o gene *LCP2* (*Lymphocyte cytosolic protein 2*) com baixa regulação nos gatos infectados. O gene *LCP2* pode desempenhar um importante papel no desenvolvimento e ativação de células T (NCBI, Gene <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3937#gene-expression>). A baixa regulação desse gene pode explicar a baixa regulação gênica de uma série de citocinas dependentes de linfócitos T, como por exemplo, os IFN- γ , IL-1, IL-10, IL-13 que se apresentaram “down” regulados nos gatos infectados. Adicionalmente a via de sinalização do interferon-gama (IFN- γ) que apresentam relação com a ativação dos linfócitos T também estava “down” regulada nos gatos infectados.

Outra descoberta interessante que sugere um mecanismo da resposta imune celular dos gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*, foi a baixa regulação do gene *TLR4* (*Toll-like receptor 4*) nos animais do G1. Estudos anteriores revelaram que os receptores *Toll like* (TLR2 e TLR4) contribuem para o reconhecimento da espécie de *Leishmania major* e para a resposta imune subsequente (FLANDIN et al., 2006; RIBEIRO-GOMES et al., 2007). Desse modo, espécies de *Leishmania* podem se ligar tanto ao TLR2 como ao TLR4 para entrar nas células do hospedeiro (FLANDIN et al., 2006; CEZÁRIO et al., 2011). Vários TLRs são estimulados durante a infecção por *Leishmania* e podem ter consequências opostas sobre o resultado da infecção, dependendo da espécie de parasita e do momento da estimulação. A estimulação do TLR4 pós-infecção promove a produção de TNF-alfa (Fator de Necrose Tumoral-alfa) e NO (Óxido Nítrico), aumentando o número de parasitos, enquanto que estimulação antes da infecção promove a produção de IL-10, favorecendo a persistência do parasita (ROSSI; FASEL, 2017). Nos gatos infectados a “down” regulação do TLR4, pode

sugerir estágios de latência do parasita no hospedeiro em resposta a uma estratégia imune do próprio hospedeiro para dificultar a manutenção intracelular do parasita.

As vias da inflamação mediada pela sinalização de quimiocinas e citocinas, e as vias sinalizadoras para FGF (*Fibroblast growth factor*) estiveram “down” e “up” reguladas nos gatos infectados (G1) deste trabalho. Isso é possível, porque vários genes de quimiocinas e citocinas ou ligados ao fator de crescimento dos fibroblastos podem participar dessas vias, enquanto uns foram menos expressos, outros foram mais ativos. Nas vias de inflamação, o gene CXCR6 que é um receptor cognato de CXCL16, esteve “up” regulado no grupo G1. O CXCL16 é uma quimiocina multifuncional que é altamente expressa por macrófagos e outras células imunes em resposta a patógenos bacterianos, virais e também na presença de cepas virulentas de *L. dovonani*. A capacidade de macrófagos derivados da medula óssea em promover a migração de células que expressam CXCR6 foi aumentada com a infecção por *L. donovani* de maneira dependente de CXCL16 e LPG (lipofosfoglicano), e isso permite especular que o aumento da expressão do eixo CXCL16-CXCR6 por células imunes foi induzido pelo parasita *Leishmania* para ajudar a atrair as células imunes que são subsequentemente infectadas e, então, promover a disseminação do patógeno (CHAPARRO et al., 2019).

Do mesmo modo, a expressão inapropriada de FGF e a ativação inadequada dos receptores de FGF estão associadas a várias condições patológicas, crescimento celular desregulado e tumorigênese (TEVEN et al., 2014). De acordo com Osório et al. (2014) por meio de estudos com macrófagos de *hamsters* experimentalmente infectados com *L. donovani*, as vias de sinalização do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF), juntamente com as vias das citocinas, promovem a expressão da arginase na LV experimental, permitindo a sobrevivência do parasita intracelular e a própria doença. Sendo assim, a “up” regulação do gene CXCR6 e da via FGF em nossos animais infectados (G1), podem indicar mecanismos de imunorregulação por parte do parasita *L. (L.) infantum* para se autopromover na LF.

Em contrapartida, a regulação positiva da via sinalizadora do metabolismo da vitamina B6 nos gatos infectados (G1), pode indicar mais um mecanismo de defesa dos felinos no auxílio das respostas imunológicas. A vitamina B6 (piridoxina) faz parte dos nutrientes essenciais e está associada às funções dos sistemas nervoso, imunológico e endócrino, além de participar dos processos metabólicos de proteínas, lipídios e carboidratos (AHMAD et al., 2013).

Além da análise de GO significativamente diferente entre os grupos estudados, realizamos uma busca específica aos genes que expressam as seguintes citocinas: IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, TNF- α , TGB- β , IFN- γ , e a diferenciação para

células Th17. Na literatura, todos os elementos citados acima já foram envolvidos com a resistência ou susceptibilidade às infecções por diferentes espécies de *Leishmania* em modelos murinos e caninos. Na Tabela 09 são apresentados os resultados dessa busca e quais genes foram *down* e *up* regulados nos gatos infectados, no entanto, alguns genes codificadores das citocinas acima não apresentaram diferença entre os grupos.

Tabela 9. Descrição dos genes de citocinas selecionados “*Up*” e “*Down*” regulados nos gatos infectados do grupo G1 em relação ao grupo controle G2. p-value < 0,05, FDR < 0.03. Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 2019.

Genes “ <i>Down</i> ” regulados nos gatos infectados por <i>L. (L.) infantum</i>			
Gene	log-fold	p-value	Descrição
ENSFCAG00000024242	-1.673346277	0.002680046	Interferon-induced transmembrane protein 1-like
IFNAR1	-0.683543506	0.001091856	Interferon alpha and beta receptor subunit 1
IFNGR2	-0.922729819	0.006380875	Interferon gamma receptor 2
IL1RAP	-1.6693308	2.35E-05	Interleukin 1 receptor accessory protein
IRF2BP2	-0.6663997	0.00181641	Interferon regulatory factor 2 binding protein 2
TNIP3	-2.0290345	0.00449664	TNFAIP3 interacting protein 3
IL13RA1	-0.8077168	0.01190961	Interleukin 13 receptor subunit alpha 1
IRAK3	-1.1263282	0.01248568	Interleukin 1 receptor associated Kinase 3
IL10	-2.518209511	0.015305272	Interleukin 10
IL1B	-1.166964114	0.017494904	Interleukin 1 beta
IFITM5	-1.088378502	0.011115208	Interferon induced transmembrane protein 5
Genes “ <i>Up</i> ” regulados nos gatos infectados por <i>L. (L.) infantum</i>			
Gene	log-fold	p-value	Descrição
TNFRSF25	1.1267259	0.00853646	TNF receptor superfamily member 25
TNFSF11	1.43584673	0.00127666	TNF superfamily member 11
IL22RA2	2.16790476	0.0015828	Interleukin 22 receptor subunit alpha 2
ISG202	2.816273189	0.0427584	Interferon stimulated exonuclease gene 20 like 2

Fonte: (SILVA, 2019).

Os interferons (IFNs) tipo I são glicoproteínas naturais de sinalização celular que pertencem à classe das citocinas. Atuam através de um único receptor de superfície celular composto pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2 e duas tirosina quinases citoplasmáticas, e são produzidos pelos leucócitos e fibroblastos para interferir na replicação de microrganismos patogênicos, vírus e células tumorais (HALLER et al., 2007; UZE et al., 2007). Os IFNs tipo I têm numerosas funções imunomoduladoras, como a ativação e inibição de macrófagos, células dendríticas, células naturais Killer, linfócitos T e células B (BOGDAN et al., 2004; GONZALEZ-NAVAJAS et al., 2012). Nas infecções por *Leishmania*, os IFNs apresentam papéis importantes que variam desde a mediação da resistência até a patologia e a promoção da doença, dependendo da espécie de *Leishmania* e a espécie hospedeira (KIMA; SOONG, 2013; SCHLEICHER et al., 2018).

Em nosso estudo, os genes do receptor um do interferon alpha (IFNAR1) e do receptor dois do interferon gama (IFNGR2) estavam “down” regulados nos gatos infectados por *L. (L.) infantum*. Em um estudo prévio, esses genes endógenos (IFNAR1 e IFNGR2) foram associados com a supressão da resposta inflamatória e a sobrevivência intracelular de *Leishmania* na LVC (BATISTA, 2016). Adicionalmente, camundongos 129Sv deficientes de IFNAR1 e infectados experimentalmente com *L. amazonensis* apresentaram lesões atenuadas e reduziram as respostas imunológicas específicas de antígenos após infecção. Os camundongos deficientes de IFNAR1 apresentaram um aumento do recrutamento e morte de neutrófilos, o que, por interação com macrófagos, facilitou a morte de parasitas (XIN et al., 2010). Além disso, na infecção experimental de *L. major* em camundongos C57BL/6 e BALB/c, a sinalização mediada por IFN- β e IFNAR1 foi dispensável para uma resposta imune curativa, e irrelevante para o desenvolvimento da doença, respectivamente nas duas linhagens de camundongos (SCHLEICHER et al., 2018). De acordo com essas informações, observamos que a atividade da IFNAR1 sozinha não é crucial para o controle do parasitismo de *Leishmania* em diferentes espécies/linhagem de hospedeiro, muito pelo contrário, a ausência da expressão de IFNAR1 se mostrou mais benéfica ao controle. Desse modo, a “down” regulação de IFNAR1 e IFNGR2 nos animais do G1, sugere mais um mecanismo de defesa da resposta imune felina mediada pela infecção de *L. (L.) infantum*. No entanto, a capacidade dos IFN- γ em ativar a resposta imune adaptativa mediada por células contra o parasita no estágio inicial da infecção, precisa ser mais explorada. Priolo et al. (2019) relataram a produção de IFN- γ por células sanguíneas de felinos de áreas endêmicas para LVC, após estimulação com antígeno solúvel de *L. (L.) infantum*.

A “down” regulação dos genes que codificam a subunidade alfa 1 do receptor da interleucina 13 (IL13RA1), da interleucina 10 (IL10) e da interleucina 1 beta (IL1B) nos gatos

infectados (G1) também pode nos predizer informações importantes a cerca da imunidade celular mediada na LF. O gene IL13RA1 codifica uma proteína que é uma subunidade do receptor da IL-13. Esta proteína é capaz de formar um complexo receptor com o receptor alfa de IL-4, se tornando uma subunidade compartilhada pelos receptores de IL-13 e IL-4. Na infecção por *L. major* em camundongos BALB/c deficientes da IL-13 ou IL-4/IL-13 foi observado uma resistência notoriamente aumentada nos camundongos, indicando que as funções mediadas por essas citocinas (IL-4 e IL-13) parecem contribuir para o fenótipo susceptível de camundongos na infecção por *L. major*, no entanto, na leishmaniose crônica, essas citocinas parecem desempenhar um papel protetor (MATTHEWS et al., 2000; BOMBACHER, 2000). Desse modo, a regulação do gene IL13RA1, podem controlar os receptores de IL-4 e IL-13, que em baixa expressão, conferem resistência à infecção por *L. major* em camundongos.

Similiar a atividade da IL-13, a IL-10 também demonstrou facilitar a disseminação de parasita de *Leishmania*. Camundongos BALB/c deficientes de IL-10 controlaram a progressão da doença e apresentaram lesões relativamente pequenas com redução de 1.000 vezes da carga parasitária no interior dos camundongos. Além disso, a IL-10 produzida por macrófagos infectados impediu a ativação de outros macrófagos e diminuiu a produção de IL-12 e TNF- α , que são duas citocinas importantes na regulação do parasitismo (KANE; MOSSER, 2001; BELKAID e al., 2001; SCHWARZ et al., 2013). Na LVC, a IL-10 esteve aumentada no fígado de cães infectados com *L. (L.) chagasi* sinônimo de *L. (L.) infantum* em relação ao grupo controle, e isso foi independente da classificação e manifestação clínica (assintomático/sintomático), porém em cães sintomáticos a expressão de IL-10 foi mais acentuada (MICHELIN et al., 2011; ROSÁRIO et al., 2018). Mesmo assim, de acordo com Solano-Gallego et al. (2016) a IL-10 não parece ser um marcador de gravidade da doença.

A IL-1 é uma importante citocina pró-inflamatória que atua na indução e manutenção da imunidade inata. Entre os subtipos de IL-1, a IL-1 β parece ser a forma dominante, sendo produzida por monócitos, macrófagos, células de *Langerhans* e células dendríticas, enquanto que a IL-1 α predomina nas células epiteliais (MIZUTANI et al., 1991; XIN et al., 2007). O papel da IL-1 na leishmaniose em modelos murinos varia de acordo com as espécies de parasitas envolvidas e os tipos de tratamentos. Camundongos BALB/c suscetíveis e submetidos a infecção por *L. major* e sem um dos genes da IL-1 (IL-1 α ou IL- β), apresentaram um atraso no desenvolvimento da doença e respostas inflamatórias sistêmicas mais atenuadas, e quando esses mesmos animais foram submetidos a níveis fisiológicos e supra-fisiológicos de IL-1 no microambiente, eles apresentaram uma forma exacerbada da

doença, enquanto doses sub-fisiológicas de IL-1 induziram uma doença menos progressiva (VOROV et al., 2010).

Além disso, a ativação de células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. major* foram maiores após a adição de IL-1 β e isso permitiu a iniciação das células T CD4⁺. No entanto, a adição de IL-1 β não pode corrigir/suprir os defeitos intrínsecos das células dendríticas infectadas por *L. amazonensis* em produzir uma resposta Th patogênica, mas pode potencializá-la. Desse modo, o tratamento local com IL-1 β em camundongos C57BL/6 infectados com promastigotas de *L. amazonensis*, seja no momento de iniciação das células T ou durante o curso de expansão das células T, apresentou aumento da infecção por *L. amazonensis*, correlacionado com a expansão das citocinas IFN- γ , de IL-10 e de IL-17, o que acelerou o desenvolvimento das lesões. Isto quer dizer que o tratamento com IL-1 β potencializa a ativação e expansão de células Th patogênicas específica de *L. amazonensis* in vivo que foram ativadas previamente por células dendríticas e acelera as lesões cutâneas (XIN et al., 2007). Na LVC, a expressão gênica positiva de IL-1 β e TNF- α no sistema nervoso central de cães infectados *L. (L.) infantum* sugerem a participação dessas citocinas no desenvolvimento de um estado pró-inflamatório no ambiente nervoso desses cães (MELO, et al., 2013).

Baseados em modelos murinos, observamos que atividades pouco expressas dos genes: IFNAR1, IFNGR2, IL13RA1, IL10 e IL1B, conferiram proteção adicional a esses animais frente às infecções por espécies de *Leishmania*. Desse modo, podemos sugerir que a “down” regulação desses genes nos gatos infectados (G1) do nosso estudo, indicam mecanismos de regulação positiva do sistema imune dos felinos em controlar o parasitismo por *L. (L.) infantum*.

Na literatura não encontramos correlação dos genes: TNFSF25 (Membro da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral 25), TNFSF11 (Membro da superfamília do ligante do fator de necrose tumoral 11), IL22RA2 (subunidade alfa 2 do receptor de interleucina 22) e ISG202 (interferon que estimula o gene da exonuclease 20) com infecções por espécies de *Leishmania*. Estes genes estiveram “up” regulados em nossos gatos infectados e podem sinalizar mecanismos adicionais à LF, portanto, estudos adicionais envolvendo esses genes precisam ser realizados para sua melhor compreensão com a doença.

As respostas imunes dos felinos frente às infecções por *L. (L.) infantum* são complexas, e demonstram várias facetas para o controle do parasitismo que em contrapartida estão sujeitas às estratégias de evasão imune do parasita. Podemos dizer que a resposta imunológica dos felinos para a *Leishmania* foge do dogma com uma resposta polarizada Th1

ou Th2, mediada por uma série de citocinas em favor da resistência e/ou susceptibilidade do parasita. Possivelmente, a regulação de ambas as respostas Th sem polarização seja um caminho da imunidade felina na leishmaniose visceral. As várias vias metabólicas e genes “*up*” ou “*down*” regulados aqui mostrados necessitam de estudos complementares e isolados em gatos infectados e controlados em laboratório para sustentar a participação de cada um desses mecanismos na complexidade da imunidade anti-*Leishmania* nos felinos.

8. CONCLUSÕES

1. Os dados hematológicos e bioquímicos aqui descritos mostram uma associação entre infecção por *L. (L.) infantum* e redução plaquetária e hiperproteinemia com baixa albumina. Em áreas enzoóticas, alterações significativas descritas podem ser sugestivas da infecção por *L. (L.) infantum* em gatos e testes específicos devem ser recomendados.
2. O diagnóstico de LF em áreas endêmicas utilizando técnicas sorológicas parece ser independente da condição clínica dos animais, ou seja, a infecção em gatos saudáveis ou com sinais clínicos é similarmente detectada, porém, o comprometimento clínico aumenta as chances de detecção por testes parasitológicos e moleculares.
3. O aumento significativo de linfócitos T CD4⁺ e ausência de uma expressão ativa de Linfócitos T CD8⁺ em gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum* (G1), quando comparado aos gatos saudáveis (G2), sugere a participação do sistema imune mediado por células CD4 + na progressão da doença.
4. O aumento significativo dos isotipos IgA, IgG e IgM em felinos infectados com *L. (L.) infantum* (G1) em relação ao grupo controle (G2) indicam a participação da resposta imune humoral na LF.
5. A “down” regulação das vias metabólicas que controlam a atividade da proteína arginina desaminase (PAD), o processo de hemopoiese, a resposta ao estresse e o desenvolvimento do sistema imunológico e a “up” regulação da via sinalizadora do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) e do gene CXCR6 que participa da via sinalizadora da inflamação mediada pela sinalização de quimiocinas e citocinas, foram significativos ($p < 0,05$) em gatos naturalmente infectados por *L. (L.) infantum*. Possivelmente, a regulação negativa ou positiva dessas vias pode indicar a imunorregulação, por parte do parasita, como mecanismo de evasão do sistema imune do hospedeiro.
6. Em resposta à infecção por *L. (L.) infantum*, a “down” regulação das vias sinalizadoras de ativação das células B (gene *MAP3k2*) de ativação das células T (gene *LCP2*), dos

receptores *Toll* (gene *TLR4*) associado a “*down*” regulação dos genes IFNAR1, IFNGR2, IL13RA1, IL10 e IL1B nos gatos infectados (G1) do nosso estudo, indicam imunorregulação por parte do sistema imune felino em controlar o parasitismo intracelular por *L. (L.) infantum*, mas que não foram suficientes para controlar a progressão da doença.

7. Os mecanismos de evasão do sistema imune felino por amastigotas de *L. (L.) infantum* precisam ser mais estudados, a fim de compreender como a patogenicidade desse parasita se sobressai à imunidade felina.
8. Além disso, estudos adicionais com felinos infectados por *L. (L.) infantum* em diferentes estágios clínicos (assintomático/ sintomáticos) se fazem necessários e podem contribuir com maiores informações acerca da resistência felina frente às infecções por *L. (L.) infantum*

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and molecular immunology**. 5. ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

AHMED, S.; COLMENARES, M.; SOONG, L.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; MUNSTERMANN, L.; MOLINA, R.; MCMAHON-PRATT, D. Intra-dermal infection model for pathogenesis and vaccine studies of murine visceral leishmaniasis. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 71, p. 401-410, 2003.

AHMAD, I.; MIRZA, T.; QADEER, K.; NAZIM, U.; VAID, F. H. M. Vitamin B6: Deficiency diseases and methods of analysis. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26,n.5,p. 1057-1069,2013.

ALBIDIN, B. M.; HAAMMAMI, A.; STÄGER, S.; HEINONEN, K. M. Infection-adapted emergency hematopoiesis promote visceral leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, p.1-26, 2017.

ALENCAR, J. E.; NEVES, J.; DIETZE, R. Leishmaniose visceral (Calazar). In: VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 8.ed. p. 716-717. 1991.

AL-JURAYYAN, N. A.; AL-NASSER, M. N.; AL-FAWAZ, I. M.; AL-AYED, I. H.; AL-HERBISH, A. S.; AL-MAZROU, A.M.; AL-SOHAIBANI, M. O. The hematological manifestations of visceral leishmaniasis in infancy and childhood. **Journal Tropical Pediatric**, v.41, n.3, p. 143-148, 1995.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ALVAR, J.; CANAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, London, v. 57, p. 1-88, 2004.

ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F.; MOURA, E. P.; RIBEIRO, R. R.; ALVES, C.F.; MICHALICK, M. S.; KALAPOTHAKIS, E.; BRUNA-ROMERO, O.; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, M. M.; MELO, M. N. Expression of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and TGF-beta in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Journal Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349-58, Apr 15 2009.

ALVES-MARTIN, M. F. **Avaliação diagnóstica para *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* em gatos domésticos procedentes da associação protetora dos animais do Município de Ilha Solteira, SP, Brasil**. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina, campus de Botucatu. Programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, Botucatu, 2013.

ALVES-MARTIN, M. F. **Deteção de tripanosomatídeos em gatos domésticos de região endêmica para leishmaniose visceral por técnicas parasitológicas, sorológicas e moleculares**. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina, campus de Botucatu. Programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, Botucatu, 2017.

ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; SILVA, D.T.; TENÓRIO, M. S.; ALVES, M. L.; STARKE-BUZETTI, W.A.; PEREIRA, V.B.R.; LUCHEIS, S.B. Detection of *Leishmania* spp. using parasitological, serological and molecular assays in asymptomatic and sick cats from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. **Asian Pacific Journal Tropical Diseases**, v.7, n. 11, p. 659-664, 2017.

ALVES, M. L. **Ocorrência da leishmaniose visceral em cães e gatos em abrigos de animais de Ilha Solteira, SP**. [Dissertação]. 2016. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2016.

ANTUNES, T. R.; VALENCOELA, R. A. P.; OLIVEIRA, B. B.; et al. Detection of *Leishmania infantum* in Peripheral Blood Smear and Lymph Node of a Domestic Feline. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. Suppl 1, p. 162, 2016.

ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F. Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP. Jaboticabal. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 17-25, 2010. PMID:20385055. <http://dx.doi.org/10.4322/rbpv.01901004>

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 7, p. 329-337, 2006. PMID:16842269.

BASSO, M. A.; MARQUES, C.; SANTOS, M.; DUARTE, A.; PISSARRA, H.; CARREIRA, L. M.; GOMES, L.; VALÉRIO-BOLAS, A.; TAVARES, L.; SANTOS-GOMES, G.; FONSECA, I. P. Successful treatment of feline leishmaniasis using a combination of allopurinol and N-methyl-glucamine antimoniate. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v.2, n. 1, p. 2055116916630002, 2016.

BATISTA, L. F. S. **Identificação de marcadores genéticos associados às imunidades celular, humoral e ao status clínico e de infecção natural pela *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. Tese [Doutorado]. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2016, 177p.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497-1506, 2001.

BENASSI, J. C. **Deteção de *Leishmania* spp. por PCR em tempo real em amostras de suabe conjuntival de cães, gatos e equinos**. 2015.74f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2015.

BENASSI, J. C., BENVENGA, G. U., FERREIRA, H. L., PEREIRA, V. F., KEID, L. B., SOARES, R., OLIVEIRA, T. M. F. DE S. Detection of *Leishmania infantum* DNA in conjunctival swabs of cats by quantitative real-time PCR. **Experimental Parasitology**, v. 177, p.93–97, 2017. doi:10.1016/j.exppara.2017.04.004

BENASSI, J. C., BENVENGA, G. U., FERREIRA, H. L., SOARES, R. M., SILVA, D. T., PEREIRA, V. F., RUIZ, V. L. A., OLIVEIRA, T. M. F. DE S. Molecular and serological

detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p.1058–1063, 2018. doi:10.1590/1678-5150-pvb-5214.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 57, n. 01, p. 289-300, 1995.

BENVENGA, G. U. **Ocorrência de *Leishmania* spp. em cães, gatos e equinos no Estado de São Paulo**. 2013. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2013.

BHATTARAI, N.R., VAN DER AUWERA, G., RIJAL, S., PICADO, A., SPEYBROECK, N., KHANAL, B., DE DONCKER, S., DAS, M.L., OSTYN, B., DAVIES, C., COOSEMANS, M., BERKVEN, D., BOELAERT, M., DUJARDIN, J.C. Domestic animals and epidemiology of visceral leishmaniasis, Nepal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, 231–237., 2010 doi:10.3201/eid1602.090623

BLAVIER, A.; KEROACK, S.; DENEROLLE, P.; GOY-THOLLOT, I.; CHABANNE, L.; CADORE, J. L.; BOURDOISEAU, G. Atypical forms of canine leishmaniosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 162, n. 2, p. 108-120, 2001.

BOGDAN, C.; MATTNER, J.; SCHLEICHER, U. The role of type I interferons in non-viral infections. **Immunology Review**, v. 202, p. 33-48, 2004.

BOMBACHER, F. The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy. **BioEssays**, v. 22, p. 646-656, 2000.

BONFANTE-GARRIDO, R.; VALDIVIA, O.; TORREALBA, J.; GARCÍA, M. T.; GARÓFALO, M. M.; URDANETA, I.; URDANETA, R.; ALVARADO, J.; COPULILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI-JUNIOR, G. Cutaneous leishmaniasis in cats (*Felis domesticus*) caused by *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*. **Revista Científica FCV-LUZ**, n. 6, p. 187-190, 1996.

BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum* – infected treated and untreated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 59, p. 21-30, 1997.

BRACHELENTE, C.; MÜLLER, N.; DOHERR, M. G.; SATTLER, U.; WELLE, M.; Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response. **Veterinary Pathology**, v.42, n.2, p.166-75, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral: Normas e Manuais Técnicos**. Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 120p. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministerio da Saude, 120p. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas, 1990 a 2013.** 2014. Disponível em: <<http://u.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Casos.pdf>>. Acesso em: 09 de março de 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde.** v.3, 1. ed. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a. Disponível em: http://www.hc.ufu.br/sites/default/files/tmp//volume_3_guia_de_vigilancia_em_saude_2017.pdf. Acesso em 08 de Outubro de 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção. 2017b.** Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>. Acesso em: 29 de Janeiro de 2018.

BRASIL, Ministérios da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. **Leishmaniose Visceral 2016.** 2017c. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/26/Modelo-Apresentacao-SVS-2018-periodo-eleitoral-CGDT.pdf>. Acessos em 04 de Janeiro de 2019.

BRAZ, P. H.; SARTORETTO, M. C.; SOUZA, A. S.; MELO, F. M. G. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por leishmania spp. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 9, n. 1, p. 87–90, 2015.

BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.

CARDIM, M. F. M.; GUIRADO, M. M.; DIBO, M. R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo, Brasil: análise espacial e espaço-temporal. **Revista de Saúde Pública**, v.50, n.48, 2016.

CARRILLO, E.; AHMED, S.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; NIETO, J.; OSORIO, Y.; TRAVI, B.; MORENO, J.; MCMAHON-PRATT, D. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.25, p.1534–1543, 2007.

CARVALHO, A. K. **Correlação do perfil das células dendríticas com a resposta imune celular T CD4+ e T CD8+ na infecção experimental do camundongo BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonenses* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** 2012. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Fisiopatologia Experimental, São Paulo, 2012.

CARVALHO, A. K.; SILVEIRA, F. T.; PASSERO, L. F. D.; GOMES, C. M. C.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 8-9, p. 395-403, 2012.

CARVALHO, D.; OLIVEIRA, T. M. F.S.; BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgM antibodies against *Leishmania chagasi* in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 120-124, 2009.

CASTRO, A.G. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar) – **Normas técnicas**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, p.88. 1996.

CEZÁRIO, G. A. G.; OLIVEIRA, L. R.C.; PERESI, E.; NICOLETE, V.C.; POLETTINI, J.; LIMA, C. R. G.; GATTO, M.; CALVI, S. A. Analysis of the expression of toll-like receptors 2 and 4 cytokine production during experimental *Leishmania chagasi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 05, 2011.

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

CHAPARRO, V.; LEROUX, L.P.; ZIMMERMANN, A.; JARDIM, A.; JOHNSTON, B.; DESCOTEAUS, A.; JARAMILLO, M. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan increases macrophage-dependent chemotaxis of CXCR6-expressing cells via CXCL16 induction. **American Society for Microbiology: Infection and Immunity**, 2019. DOI: **0.1128/IAI.00064-19**.

CHATZIS, M. K.; LEONTIDES, L.; ATHANASIOU, L. V.; PAPADOPOULOS, E.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; RALIS, T.; KOUTINAS, A. F.; ANDREADOU, M.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. **Experimental Parasitology**, v. 147, p. 54-59, 2014.

CHATZIS, M. K.; ANDREADOU, M.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M.; KOUTINAS, A. F.; RALLIS, T.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Cytological and molecular detection of *Leishmania infantum* in different tissues of clinically normal and sick cats. **Veterinary Parasitology**, v. 202, n. 3-4, p. 217–225, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.02.044>>.

CHIAPELLA A. Diagnosis and management of chronic colitis in the dogs and cat. In: Kirk R. **Current Veterinary Therapy: IX Small Animal Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1986. p. 896-993.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L.; PERO, M. E.; CORONA, M.; LOMBARDI, P.; AVALLONE, L.; PERSECHINO, A. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Journal**, v. 169, n. 3, p. 465–467, 2005.

COELHO, W. M. D.; LIMA, V M. F.; AMARANTE, A. F. T.; LANGONI, H.; PEREIRA, V. B. R.; ABDELNOUR, A.; BRESCIANI, K. D. S. Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brasil: case report. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 256-258, 2010.

COELHO, W. M. D.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; LANGONI, H.; BRESCIANI, K. D. S. Molecular detection of *Leishmania* sp. in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São

Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 2-3, p. 281–282, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.052>>.

CORTESE, L.; SICA, M.; PIANTEDOSI, D.; RUGGIERO, G.; PERO, M. E.; TERRAZZANO, G.; MASTELLONE, V.; CIARAMELLA, P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Record**, v. 164, n. 25, p. 778–782, 2009.

COSTA, T. A. C.; ROSSI, C. N.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. A. D.; VIDES, J. P.; SOBRINHO, L. S. V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 212, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26858>>.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da Leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Belo Horizonte, v. 34, p. 223-228, 2001.

COSTA, T. A. C.; ROSSI, C. N.; LAURENTI, M. D.; GOMES, A. A. D.; VIDES, J. P.; SOBRINHO, L. S. V.; MARCONDES, M. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal Veterinary and Research Animal Science**, v. 47, n.3, p. 213-217, 2010.

COURA, F. M.; PASSOS, S. K. P.; PELEGRINO, M. DE O. F. LEME, F. O.P.; PAZ, G. F.; GONTIJO, C.M. F.; COSTA-VAL, A. P.I. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 570–574, 2018.

CRAIG, T. M.; BARTON, C. L.; MERCER, S. H.; DROLESKEY, B. E.; JONES, L. P. Dermal leishmaniasis in a Texas cat. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n.35, p. 1100-1102, 1986.

CRUZ-CHAN J. V.; AGUILAR-CETINA, A. D. C.; VILLANUEVA-LIZAMA, L. E.; MARTINEZ-VEJA, P. P.; RAMÍREZ-SIERRA, M. J.; ROSADO-VALLADO, M. E.; GUILLERMO-CORDERO, J. L.; DUMONTEIL, E. A canine model of experimental infection with *Leishmania (L.) mexicana*. **Parasites & Vectors**, v.7, n.361, 2014.

DANTAS-TORRES, F. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**. 2006. (3): 537-541.

DA SILVA, A.V; DE SOUSA, C.C.D.; DE PITA, P.D.; BRAZIL, R.P.; CARREIRA, J.C. The first Record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropical**. V. 105, n. 1, p.92-94, 2008.

DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Leishmaniose visceral urbana (no cão e no homem) em Sobral, Ceará. **O Hospital**, v. 47, p. 75-87, 1955.

DEANE, L.M. **Leishmaniose visceral no Brasil. Estudos sobre reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará**. Tese de Livre Docência. Faculdade de Medicina 1956; USP, São Paulo, 162 pp.

DELFS, M. W.; FURUKAWA, Y.; MITCHELL, R. N.; LICHTMAN, A. H. CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. **Transplantation**, v. 71, n. 5, p. 606-610, 2001. PMID:11292288.

DE LUCA, P. M., MAYRINK, W.; ALVES, C. R.; COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; BERTHO, A. L. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Vaccine**, v.17, p.1179-1185, 1999.

DINIZ, S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. In the semen of naturally infected dogs. **Veterinary Pathology**, v. 42, p. 650-658, 2005.

EL-TAI, N. O.; OSMAN, O. F.; FARI, M. EL; PRESBER, W.; SCHÖNIAN, G. 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, 2000.

FEDELI, C. E.C.; FERREIRA, J. H. L.; MUSSALEM, J. S.; LONGO-MAUGÉRI, I. M.; GENTIL, L. G.; SANTOS, M. R. M.; KATZ, S.; BARBIÉRI, C. L. Partial protective responses induced by a recombinant cysteine proteinase from *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 153-158, 2010.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p

FEITOSA, F. L. F.; LEAL, J.; MENDES, L. C. N.; PEIRÓ, J. R.; PERRI, S. H. V.; LIMA, V. M. F.; MARCONDES, M. Estudo soropidemiológico de leishmaniose em equinos na região de Araçatuba-SP, Brasil, área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.49, p500–502, 2012.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v.36, p. 411-420, 2006.

FRANCINO, O.; ALTET, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; RODRIGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; SÁNCHEZ, A.; ROURA, X. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n.3-4, p.214-221, 2006.

FREITAS, J. C. C. DE; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LOPES-NETO, B. E.; SANTOS, G. J. L.; ABREU, C. R. A.; BRAGA, R. R.; CAMPOS, R. M.; OLIVEIRA, L. F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 24–29, 2012.

GAMA, A.; ELIAS, J.; RIBEIRO, A. J.; ALEGRIA, SCHALLIG, H. D. F. H.; SILVA, F.; SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; COTOVIO, M. Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal. **Veterinary Parasitology**, v. 200, p. 189-192, 2014.

GARCIA-NAVARRO, C.E.K.; PACHALY, J.R. **Manual de Hematologia Veterinária**. Rio de Janeiro, Varela, p.169, 1994.

GENARO, O.; RASO, P.; DA COSTA, C.A.; CARVALHO, M.D.; AMARAL, F.; BOTELHO, A.C.C.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; MAYRINK, W. Montenegro skin tests in dogs experimentally infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p.163–164, 1992.

GENARO, O. **Leishmaniose visceral canina experimental**. Tese (Doutorado) – Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte, 202 p. 1993.

GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; MARQUES, M.J.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A.B. Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, n.1-2,, p. 23-33, 2008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>. PMID:17723246.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n.3, 2004.

GONZALEZ-NAVAJAS, J. M.; LEE, J.; DAVID, M.; RAZ, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 2, p. 125-135, 2012.

GREVOT, A.; JAUSSAUD-HUGUES, P. MARTY, P.; PRATLONG, F.; OZON, C.; HAAS, P.; BRETON, C.; BOUDOISEAU, G. Leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in a FIV and FeLV positive cat with a squamous cell carcinoma diagnosed with histological, serological and isoenzymatic methods. **Parasite**, v. 12, n.3, p. 271-275, 2005.

GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; FROMENT, G. S.; SOARES, R. P. P.; MORGADO, F. N.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - PENAS**, v. 106, n. 16, 2009.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic background. **International Journal for Parasitology**, London, v. 34, n. 4, p. 433-444, 2004.

HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. Interferon, Mx, and viral countermeasures. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.18, n. 5-6, p.425-433, 2007.

HERATH, S.; KROPF, P.; MÜLLER, I. Cross-talk between CD8(+) and CD4 (+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 25, n. 11-12, p. 559-567, 2003.

HERVÁS, J.; CHACÓN-M DE LARA, F.; SÁNCHEZ-ISARRIA, M. A.; PELLICER, S.; CARRASCO, L.; CASTILHO, J. A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS, J. C. Two cases of feline visceral and cutaneous leishmaniosis in Spain. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, n. 1, p. 101-105, 1999.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, London, v. 132, p. S19-S32, 2006.

HOSEIN, S.; RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; BLAKE, D. P.; ALLENSPACH, K.; ALBEROLA, J.; SOLANO-GALLEGO, L. Transcription of Toll-Like Receptors 2, 3, 4 and 9, FoxP3 and Th17 Cytokines in a Susceptible Experimental Model of Canine *Leishmania infantum* Infection. **Plos One**, v. 10, n.10, 2015.

HUBER, W.; CAREY, V. J.; GENTLEMAN, R.; ANDERS, S.; CARLSON, B. S.; BRAO, H. C.; DAVIS, S.; GATTO, L.; GIRKE, T.; GOTTARDO, R.; HAHNE, F.; HANSEN, K. D.; IRIZARRY, R. A.; LAWRENCE, M.; LOVE, M. I.; MACDONALD, J.; OBENCHAIN, V.; OLÉS, A. K.; PAGÈS, H.; REYES, A.; SHANNON, P.; SMYTH, G. K.; TENENBAUM, D.; WALDRON, L.; MORGAN, M. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. **Nature Methods**, v. 12, p. 115-121, 2015.

JOHN S.W., WEITZNER G., ROZEN R., SCRIVER C.R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, v.19, n. 2, p. 408, 1991.

JUSI, M. M. G.; STARKE-BUZETTI, W. A.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; TENÓRIO, M. S.; SOUSA, L. O.; MACHADO, R. Z. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in captive wild animals from Ilha Solteira, SP, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, p.219–222, 2011. doi:10.1590/S1984-29612011000300008

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic, 2008. 916p.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1141-1147, 2001.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections a Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v.33, p. 579-593, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>

KILLICK-KENDRICK, R. The life cycle of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, 2002. Sevilla. **Proceeding**. Sevilla, p. 57-68, 2002.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in Leishmaniasis. **Frontiers Immunology**, 2013.

KIRKPATRICK, C. E.; FARRELL, J. P.; GOLDSCHMIDT, M. H. *Leishmania chagasi* and *L. donovani*: experimental infection in domestic cats. **Experimental parasitology**, v. 58, p.125-131, 1984.

KOBAYASHI H, SUGIYAMA C, MORIKAWA Y, HAYASHI M, SOFUNI T. Acomparision between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun** 3:103-115. (1995).

KOEHLER, K.; STECHELE, M.; HETZEL, U.; DOMINGO, M. SCHÖNIAN, G.; ZAHNER, H.; BURKHARDT, E. Cutaneous leishmaniasis in a horse insouthern insouthern Germany caused by *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p.9–17, 2002.

KRASSNER, S. M.; AND FLORY, B. Essential amino acids in the culture of *Leishmania tarentolae*. **The Journal of Parasitology**, v. 57, n. 4, p. 917-920, 1971.

KUHLS, K.; ALAM, M. Z; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, G. E. M.; MAURICIO, I. L.; ODDONE, R. 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: e1155, 2011.

KUHN, D.; WIESE, M. LmxPk4, a mitogen-activated protein kinase kinase homologue of *Leishmania mexicana* with a potential role in parasite differentiation. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1169-1182, 2005.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. **Canine Practice**, Santa Barbara, v. 22, n. 3, p. 10-15, 1997.

LAHIRI D.K., NURNBERGER J.I. JR., A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research** v.19, p.5444-5444, 1991.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. KILLICK-KENDRICK, R. The Leishmaniasis in biology and medicine. New York: **Academic Press**, v. 1, p. 291-363, 1987.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; DA MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; SECUNDINO, N. F. C.; PIMENTA, P. F. P.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, v. 196, n. 3-4, p.296-300, 2013.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210-214, 2003.

LIEW FY, LI Y; MILLOTT, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**, v.71, p.556–559, 1990.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MOSS, D.; PARKINSON, C.; ROGERS, M. V.; MONCADA, S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 21, p. 3009-3014, 1991.

LIMA, V.M.F., BIAZZONO, L., SILVA, A.C., CORREA, A.P.F.L., LUVIZOTTO, M.C.R.. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 25, p. 215–218, 2005.

LITTMAN, D. R.; RUDENSKY, A. Y. Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 845-858, 2010.

LOBSIGER, L., MÜLLER, N., SCHWEIZER, T., FREY, C.F., WIEDERKEHR, D., ZUMKEHR, B., GOTTSTEIN, B. An autochthonous case of cutaneous bovine leishmaniasis in Switzerland. **Veterinary Parasitology**, 169, 408–414, 2010. doi:10.1016/j.vetpar.2010.01.022

LONGSTAFF, J. A.; JEFFERIES, A. R.; KELLY, D. F.; BEDFORD, P. G. C.; HERRTAGE, M. E.; DARKE, P. G. G. Leishmaniasis imported dogs in the United Kingdom: a potential human health hazard. **Small Animal Practice**, v. 24, p. 23-30, 1983.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends in parasitology**, v. 27, n. 8, p. 341-344, 2011.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parasitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MANDAL, A.; DAS, S.; ROY, S.; GHOSH, A. K.; SARDAR, A. H.; VERMA, S.; SAINI, S.; SINGH, R.; ABHISHEK, K.; KUMAR, A.; MANDAL, C.; DAS, P. Deprivation of L-arginine induce oxidative stress mediated apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes: contribution of the polyamine pathway. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-26, 2016.

MAROLI, M.; PENNISI, M. G.; DI MUCCIO, T.; KHOURY, C.; GRADONI, L.; GRAMICCIA, M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v.145, n.3-4, p.357-360, 2007.

MARTÍN-SÁNCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUÑOS-PÉREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLAS-MÁRQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v. 30, n. 145, p. 267-273, 2007.

MARZOCHI, M. C. A.; COUTINHO, S. G.; SABROZA, P. C.; SOUZA, M. A.; SOUZA, P. P.; TOLEDO, L. M.; RANGEL-FILHO, F. B. Leishmaniose visceral canina no Rio de Janeiro – Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 1, n. 4, p. 432-446, 1985.

MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. J. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 1458-1462, 2000.

MAURÍCIO, I. L.; HOWARD, M. K.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex. **Parasitology**, v. 119, p. 237-246, 1999.

MAURICIO I. L., STOTHARD J. R., MILES M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today** v.16, p.188–189, 2000.

MEDEIROS, C. M. DE O.; MELO, A. G. C.; LIMA, A. K. F.; et al. Perfil Hematológico De Cães Com Leishmaniose Visceral No Município De Fortaleza, Ceará. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 43–50, 2008.

MELLO, G.B. Verificação da infecção natural do gato (*Felix domesticus*) por um protozoário do gênero *Leishmania*. **Brasil Médico**, v.54, n. 12, 180p, 1940.

MELO, G. D.; SERAGUCI, T. F.; SCHWEIGERT, A.; SILVA, J. E. S.; GRANO, F. G.; PEIRÓ, J. R.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. Pro-inflammatory cytokines predominate

in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, v. 192, p. 57-66, 2013.

MENEZES-SOUZA, D.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GUERRA-SÁ, R.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, G.C.; REIS, A.B. Cytokine and transcription factor profiles in the skin of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v.177, p. 39-49, 2011.

MESTECKY, J.; LUE, C.; RUSSEL, M. W. Selective transport of IgA. Cellular and molecular aspects. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 441-471, 1991.

MICHELIN, A. F.; PERRI, S. H. V.; LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasites density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 373-383, 2011.

MILETIC, I. D.; SCHIFFMAN, S. S.; MILETIC, V. D.; SATTELY-MILLER, E. A. Salivary IgA secretion rate in young and elderly persons. **Physiology & Behavior**, v. 60, n.1, p. 243-248, 1996.

MIZUTANI, H.; BLACK, R.; KUPPER, T. S. Human Keratinocytes produce but not process pro-interleukin-1 (IL-1) beta. Different strategies of IL-1 production and processing in monocytes and keratinocytes. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 87, n. 3, p. 1066-1071, 1991.

MONDAL, S.; PARELKAR, S.S.; NAGAR, M.; THOMPSON, P. R. Photochemical control of Protein Arginine Deiminase (PAD) activity. **ACS Chemical Biology**, v. 13, n. 14, p. 1057-1065, 2018.

MONTARGIL, S. M. A.; CARVALHO, F. S.; OLIVEIRA, G. M. S.; et al. Clinical, Hematological and Biochemical Profiles of Dogs with *Leishmania infantum*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 46, n. 1, p. 1-7, 2018.

MOREIRA, P. R. R.; FRANCISCATO, D. A.; ROSSIT, S. M.; MUNARI, D. P.; VASCONCELOS, R. O. Influence of apoptosis on liver and spleen resistance in dogs with visceral leishmaniasis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v.23, n.3, p. 342-347, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016054>. PMID:27580400.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399-405, 2002.

MUNDER, M.; CHOI, B. S.; ROGERS, M.; KROPF, P. L-Arginine deprivation impairs *Leishmania major*-specific T-cell responses. **European Journal of Immunology**, v.39, p. 2161-2172, 2009.

MURPHY, K. **Janeway's immunobiology**. 8 ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC., 2012.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F.; Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of experimental medicine**, v.189, p.741-746, 1999.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Hematopoietic stem cells in dogs. **Ciência Rural**, v.36, n. 1, p. 325-329, 2006.

NASCIMENTO, P. R. P.; MARTINS, D. R. A.; MONTEIRO, G. R. G.; QUEIROZ, P.V.; FREIRE-NETO, F. P.; QUEIROZ, J. W.; LIMA, A.L. M.; JERONIMO, S. M. B. Association of pro-inflammatory cytokines and iron regulatory protein 2 (IRP2) with *Leishmania* burden in canine visceral leishmaniasis. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-10, 2013.

NASCIMENTO, M. S.; ALBUQUERQUE, T. D.; NASCIMENTO, A. F.; CALDAS, I. S.; DO-VALE-MATTA, M. A.; SOUTO, J. T.; TALVANI, A.; BAHIA, M. T.; GALVÃO, L. M. CÂMARA, A. C.; GUEDES, P. M. Impairment of Interleukin-17A Expression in Canine Visceral Leishmaniasis is Correlated with Reduced Interferon- γ and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. **Journal of Comparative Pathology**, v.153, n. 4, p.197-205, 2015.

NEVES, C. P. P.; BORGES, D. A.; HERR, F. C.; FELIX, C. S.; ABOUD-DUTRA, A. E. Presença de imunossupressão de imunoglobulina A (IgA) em cães atópicos. **Medvop Dermatol – Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v.4, n. 13, p. 21-30, 2017.

NIETO, C. G.; NAVARRETE, I.; HABELA, M. A.; SERRANO, F.; REDONDO, E. Pathological changes in kidneys of dogs with natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 45, n. 1-2, p. 33-47, 1992.

NIETO C.G., GARCÍA-ALONSO M., REQUENA J.M., MIRÓN C., SOTO M., ALONSO C., NAVARRETE I. Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 2, p. 117-130, 1999.

NORONHA JUNIOR, C. F. et al. Leishmaniose Visceral Canina (LVC) em cães do município de Ilha Solteira, SP, Brasil. **Ciência Agronômica e Saúde FEA**, Andradina, v. 7, p. 32-36, 2007.

OHTA, N.; FUKASE, S.; FUSE, T.; AOYAGI, M. Th1, Th2, Tc1 and Tc2 cells of patients with otolaryngological diseases. **Allergology International**, v. 53, n. 3, p. 199-203, 2004.

OLIVEIRA, G. C.; PAIZ, L. M.; MENOZZI, B. D.; LIMA, M. S.; MORAES, C. C. G.; LANGONI, H. Antibodies to *Leishmania* spp. in domestic felines. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 4, p. 464-470, 2015.

OLIVEIRA, R. S.; MACIEL, J. N. Aspectos socioeconômicos da leishmaniose visceral em João Pessoa Paraíba – Brasil. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 7, n. 1, p. 63-70, 2003.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; FURUTA, P. I.; CARVALHO, D.; MACHADO, R. Z. A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for *Leishmania* sp., *Babesia canis* and *Ehrlichia canis* in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.

OLIVEIRA, T. M. F. S.; MINEO, T. W.; BASON, M.; DIA, M. J.; MACHADO, R. Z. IgG subclasses profile of serum antibodies to *Leishmania chagasi* in naturally infected and vaccinated dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 162, n. 1-2, p.16-22, 2009.

OLIVEIRA, T. M. F. DE S.; PEREIRA, V. F.; BENVENGA, G. U.; MARTIN, M. F. A.; BENASSI, J. C.; SILVA, D. T. DA; STARKE-BUZETTI, W. A. Conjunctival swab PCR to detect *Leishmania* spp. in cats. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 220–222, Jun. 2015.

ORGANIZAÇÃO PAN-ANAMERICANA DA SAÚDE – OPAS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. **Informe epidemiológico das Américas**. Informe de Leishmanioses, nº 06, 2018.

OSORIO, E. Y.; TRAVI, B.L.; CRUZ, A. M.; SALDARRIAGA, O. A.; MEDINA, A. A.; MELBY, P.C. Growth Factor and Th2 Cytokine Signaling Pathways Converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental leishmaniasis. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 6, e1004165, 2014.

OTRANTO, D. Diagnostic challenges and the unwritten stories of dog and cat parasites. **Veterinary Parasitology**, v. 212, n. 1-2, p. 54–61, 2015.

OZON, C.; MARTY, P.; PRATLONG, F.; BRETON, C.; BLEIN, M.; LELIÈVRE, A.; HAAS, P. Disseminated feline leishmaniosis due to *Leishmania infantum* in Southern France. **Veterinary Parasitology**, v. 75, n. 2-3, p. 273–277, 1998.

PALATNIK-DE SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇANSILVA, J. C.; COSTA R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impacto of canine control in the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Deerfield, v. 65, p. 510-517, 2001.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A.; LUBAS, G.; GRADONI, L.; CASTAGNARO, M.; CROTTI, A.; MAROLI, M.; OLIVA, G.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1184-1191, 2010.

PAIXAO, M.S. **Análise Espacial e Detecção de Tripanosomatídeos em Animais de Produção de Região Endêmica para Leishmaniose Visceral**. Tese [Doutorado]. Universidade Estadual Paulista – Faculdade de Medicina, campus de Botucatu. Programa de pós-graduação em Doenças Tropicais, Botucatu, 2017.

PASSOS, V.; LASMAR, E. B.; GONTIJO, C. M.; FERNANDES, O.; DEGRAVE, W. Natural infection of a domestic cat (*Felis domesticus*) with *Leishmania* (*Viannia*) in the metropolitan region of Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 19-20, 1996.

PAULAN, S. C.; SILVA, H. R.; LIMA, E. A. C. F.; FLORES, E. F.; TACHIBANA, V. M.; KANDA, Z. C.; NORONHA-JUNIOR, S. C. F.; DOBRE, P. R. Spatial distribution of Canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Engenharia Agrícola**, v. 32, n. 4, p.765-774. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69162012000400016>

PAULAN, S. C.; LINS, A. G. S.; TENÓRIO, M. S.; SILVA, D. T.; PENA, H. F. J.; MACHADO, R. Z.; GENNARI, S. M.; STARKE-BUZETTI, W. A. Seroprevalence rates of

antibodies against *Leishmania infantum* and other protozoan and rickettsial parasites in dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n.1, p. 162-166, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612013000100031>

PEARSON, R. D.; STEIGBIGEL, R. T. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 127, n. 4, p. 1438-1443, 1981.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update. **Veterinary Parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 35–47, 2015. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.023>>.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA G.; SOLANO-GALLEGO, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 302, 2015a.

PENNISI, M. G.; HARTMANN, K.; ADDIE, D. D.; LUTZ, H.; GRUFFYDD-JONES, T.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; HORZINEK, M. C.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; MARSILIO, F.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; MÖSTL, K. Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 17, n. 7, p. 588-593, 2015b.

PENNISI, M. G.; LLORET, A.; MÖSTL, K.; et al. Leishmaniosis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 638–642, 2013.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog? **Veterinary parasitology**, v. 251, p. 131-137, 2018.

PENNISI, M. G.; VENZA, M.; REALE, S.; VITALE, F.; GIUDICE, S. Case report of Leishmaniasis in four cats. **Veterinary Research Communications**, v. 28, p. 363–366, 2004.

PEREIRA, V. F.; BENASSI, J. C.; STARKE-BUZETTI, W. A.; et al. Detection of canine visceral leishmaniasis by conjunctival swab PCR. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 1, p. 104–106, 2016.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, e45, 2001.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v.62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P.; RUTTEN, V. P.; GEBHARD, D.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, E. J. *Leishmania infantum*-specific T cell lines derived from asymptomatic dogs that lyse infected macrophages in a major histocompatibility complex-restricted manner. **European Journal of Immunology**, v. 25, n.6, p. 1594-1600, 1995. PMID:7614987.

PRASAD, R.; MUTHUSAMI, S.; PANDEY, N.; TILAK, V.; SHUKLA, J.; MISHRA, O. P. Unusual Presentations of Visceral Leishmaniasis. **Clinical Brief – Indian Journal of Pediatrics**, v.76, 2009.

PRIOLO, V.; MATÍNEZ-ORELLANA, P.; PENNISI, M. G.; MASUCCI, M.; PRANDI, D.; IPPOLITO, D.; BRUNO, F.; CASELLI, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmania infantum-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in áreas where canine leishmaniosis is endemic. **Parasites & Vectors**, v. 12, n.133, 2019.

QUEIROZ, N. M. G. P.; ASSIS, J.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; MACHADO, R.Z.; NUNES, C.M.; STARKE-BUZETTI, W.A. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunistoquímica e PCR em tecidos cutâneos e associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.1, p.32-38, 2010. PMID:20385057. <http://dx.doi.org/10.4322/rbvp.01901006>.

QUINNELL, R. J. COURTENAY, O.; GARCEZ, L. M.; KAYE, P. M.; SHAW, M. A.; DYE, C.; DAY, M.J. IgG subclass responses in a longitudinal study of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 91, n. 3-4, p.161-168, 2003.

RAMOS-VARA, J. A.; ORTIZ-SANTIAGO, B.; SEGALÉS, J.; DUNSTAN, R. W. Cutaneous Leishmaniasis in Two Horses. **Veterinary Pathology**, V. 33; P. 731-734, 1996.

RANGEL, O.; OLIVEIRA, S. S.; FRANÇA, A. C.; CIARAVOLO, R. M.; HENRIQUES, L. F. Leishmaniose visceral no estado de São Paulo: Tendência geral de letalidade entre 1999 e 2013 e o risco de óbitos por estratificação epidemiológica dos municípios e regionais de Vigilância Epidemiológica entre 2011 e 2013. **Boletim Epidemiológico Paulista – BEPA**, v. 12, n. 143, p.1-8, 2015.

R CORE TEAM (2018). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. Available from: <http://www.R-project.org/>

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M.G.; MAYRINK, W.; FRANCA-SILVA, J.C.; GIUNCHETTI, R.C.; GENARO, O.; CORREA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v.81, p. 68-75. 2006a.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, C. R.; MAYRINK, W.; GUERRA, L. L.; ANDRADE, R. A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 102-116, 2006b.

REIS, L. C.; BRITO, M. E. F.; SOUZA, M. A.; PEREIRA, V. R. A. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, São Paulo, v.35, n. 2, p. 103-115, Maio/Ago. 2006c.

RIBEIRO, V.M. Leishmanioses. **Revista do Conselho de Medicina Veterinária**, v.3, n.11, p.13-14, 1997.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; DIAS, W. B.; LOPES, M. F.; NUNES, M. P.; LUNGARELLA, G.; REIS, G. A.

Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **Journal of Immunology**, v.179, n.6, p. 3988-3994, 2007.

RITCHIE, M. E.; PHIPSON, B. WU, D.; HU, Y.; LAW, C. W.; SHI, W.; SMYTH, G. K. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarrays studies. **Nucleic acids research**, v. 43, e47, 2015.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J. Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010.

ROCHAEL, N. C.; GUIMARÃES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, M. T. C.; SOUZA-VIEIRA, T. S.; OLIVEIRA, M. P.; SOUZA, L. F. G.; OLIVEIRA, M. F.; SARAIVA, E. M. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. **Scientific Reports**, v. 5, n. 18302, 2015.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**. San Diego. v.3, n.71, p.267-275, 1990.

RODRÍGUEZ, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; OJEDA, A.; QUINTANA, J.; RIERA, C.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Dynamics of leishmania-specific immunoglobulin isotypes in dogs with clinical leishmaniasis before and after treatment. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, p. 495-498, 2006.

ROGERS, K.A.; DEKREY, G.K.; MBOW, M.L.; GILLESPIE, R.D.; BRODSKYN, C.I.; TITUS, R.G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, n.1, p.1-7, 2002.

ROHOUSOVA, I., TALMI-FRANK, D., KOSTALOVA, T., POLANSKA, N., LESTINOVA, T., KASSAHUN, A., YASUR-LANDAU, D., MAIA, C., KING, R., VOTYPKA, J., JAFFE, C.L., WARBURG, A., HAILU, A., VOLF, P., BANETH, G. Exposure to *Leishmania* spp. and sand flies in domestic animals in northwestern Ethiopia. **Parasites and Vectors**, v.8, p.1–10, 2015. doi:10.1186/s13071-015-0976-1

ROHRBACH, A. S.; SLADE, D. J.; THOMPSON, P. R.; MOWEN, K. A. Activation of PAD4 in NET formation. **Frontiers Immunology**, v. 3, 2012.

ROQUE, A.L.R.; JANSEN, A.M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology**. Parasites Wildl. v. 3, p.251–262, 2014. doi:10.1016/j.ijppaw.2014.08.004

ROSÁRIO, C. J. R. M.; DOMINICI, M. F.; BRAGA, M. S. C. O.; LIMA, C. A. A.; PEREIRA, J. G.; MELO, F. A. Evaluation of INF- γ and IL-10 in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* with and without clinic events. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, 2018.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **Internation Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103-111, 2017.

ROSS, R. (1) note on the bodies recently described by *Leishmania donovani* and (2) Further notes on Leishman's bodies. **British Medical Journal**, v.2 p.1261-1401, 1903.

RÜFENACHT, S.; SAGER, H.; MULLER, N.; SCHAERER, V.; HEIER, A.; WELLE, M. M.; ROOSJE, P. J. Two cases of feline leishmaniosis in Switzerzerland. **VetRecord**, v. 156, n. 17, p. 542-545, 2005.

RUITENBERG, E. J.; SOLANO-GALLEGO, L.; MONEN, J.; PINELLI, E.; RUTTEN, V. P. M. G. Immune responses in canine leishmaniasis. In: INTERNATIONAL CANINE LEISHMANIASIS FORUM, Greece, 2001. **Sumaries of Presentation...** Greece: [s.n.], 2001. p. 32-36.

SANTA ROSA, I.C.A.; OLIVEIRA, I.C.S. Leishmaniose visceral: breve uma visão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.2, n.11, p.24-28, 1997.

SAVANI, E. S.; DE OLIVEIRA-CAMARGO, M. C.; DE CARVALHO, M. R.; ZAMPIERI, R. A.; DOS SANTOS, M. G.; D'AURIA, S. R.; SHAW, J. J.; FLOETERWINTER, L. M. 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. **Veterinary Parasitology**, v. 120, n. 3, p. 229–233, 2004.

SERGEANT, E.; SERGENT, E.; LOMBAARD, J.; QUILICHINI, M. La Leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la meme habitation. **Bulletin de Societé de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.

SCHLEICHER, U.; LIESE, J.; JUSTIES, N.; MISCHKE, T.; HAEBERLEIN, S.; SEBALD, H.; KALINKE, U.; WEISS, S.; BOGDAN, C. Type I interferon signaling is required for CpG-Oligodesoxynucleotide-Induced control of *Leishmania major*, but not for spontaneous cure of subcutaneous primary or secondary *L. major* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 79, 2018.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 3, p. 1-14, 2006.

SCHWARZ, T.; REMER, K. A.; NAHRENDORF, W.; MASIC, A.; SIEWE, L.; MÜLLER, W.; ROERS, A.; MOLL, H. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. **Plos Pathogens**, v.9, n. 6, e1003476, 2013.

SHERLOCK, I. A. Ecological interactions of visceral Leishmaniasis in the State of Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 671-683, 1996.

SILVA, A. V. M.; CÂNDIDO, C. D. S.; PITA, D. P.; BRAZIL, R. P.; CARREIRA, J. C. A. The first record of American visceral leishmaniasis in domestic cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 92–94, 2008.

SILVA, D. T. **Estudo das células mononucleares e polimorfonucleares no intestino de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*** [Dissertação]. 2015. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2015.

SILVA, D. T.; NEVES, M. F.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SPADA, J. C. P.; ALVES, M. L.; FLÓRO E SILVA, M.; COELHO, W. M. D.; PANOSSO, A. R.; NORONHA-JUNIOR, A. C. F.; STARKE-BUZETTI, W.A. Correlation study and histopathological description of intestinal alterations in dogs infected with *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n.1, p.24-36, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016009>. PMID:26982556.

SILVA, D. T.; STARKE-BUZETTI, W. A.; ALVES-MARTIN, M. F.; PAIXÃO, M. S.; TENÓRIO, M.S.; LOPES, M. L. M. Comparative evaluation of several methods for Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p.179–186, 2014.

SILVA, J. T. **Genetic transcript analyzer – ferramenta computacional para análise de transcrição gênica por RNA-seq**, 2012,64f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Universidade do Paraná, Curitiba.

SILVA, S.M.; RABELO, P.F.; GONTIJO, N.F.; RIBEIRO, R.R.; MELO, M. N.; RIBEIRO, V. M.; MICHALICK, M. S. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 150–154, 2010. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.005>>.

SILVEIRA-NETO, L.; MARCONDES, M.; BILSLAND, E.; MATOS, L.V. S.; VIOL, M. A.; BRESCIANI, K.D. S. Clinical and epidemiological aspecto f feline leishmaniasis in Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.36, n.3, p. 1467-1480, 2015.

SIMÕES-MATTOS, L.; BEVILAQUA, C. M. L.; MATTOS, M. R. F.; POMPEU, M. M. D. L. Feline Leishmaniasis: uncommon or unknown? Leishmaniose Felina: rara ou desconhecida? **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 99, n. 550, p. 79–87, 2004.

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

SLAPPENDEL, R. J.; GREENE, C. E. Leishmaniasis. In: GREENE, C.E. Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia: **W.B. Saunders**, p.450-458, 1990.

SOARES, C. S. A.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What do we know about feline leishmaniasis? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 6, p. 435–442, 2015.

SOARES, I. R. **Avaliação clínica e laboratorial de equinos sororreagentes para *Leishmania* sp. no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**. 2012. 133fls. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG. 2012.

SOARES, I. R.; SILVA, S. O.; MOREIRA, F. M.; PRADO, L. G.; FANTINI, P.; MARANHÃO, R. P.; DA SILVA FILHO, J. M.; MELO, M. N.; PALHARES, M. S. First evidence of autochthonous cases of *Leishmania (Leishmania) infantum* in horse (*Equus*

caballus) in the Americas and mixed infection of *Leishmania infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary parasitology**, v. 197, n. 3, p. 665-669, 2013.

SOBRINHO, L. S.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; BRAGA, E. T.; GOMES, A. A.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H.; GENEROSO, D.; LANGONI, H.; LEUTENEGGER, C.; BIONDO, A. W.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, n. 1-2, p. 302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; et al. Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 9, p. 706–717, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.06.004>>.

SOLANO-GALLEGO, L.; FERNÁNDEZ-BELLON, H.; SERRA, R.; GÁLLEGO, M.; RAMIS, A.; FONDEVILA, D.; FERRER, L. Cutaneous leishmaniasis in three horses in Spain. **Equine Veterinary Journal**, v. 35, p.320–323, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 86, 2011. BioMed Central Ltd. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/86>>.

SOLANO-GALLEGO, L.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; ORDEIX, L.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P. *Leishmania infantum*-specific production of IFN- γ and IL-10 stimulated blood from dogs with clinical leishmaniasis. **Parasites & Vector**, v. 3, n. 317, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; RIERA, C.; ROURA, X.; INIESTA, L.; GALLEGO, M.; VALLADARES, J.E.; FISA, R.; CASTILLEJO, S.; ALBEROLA, J.; FERRER, L.; ARBOIX, M.; PORTUS, M. *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p.265–276, 2001.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRÍGUEZ, A.; INIESTA, L.; ARBOIX, M.; PÓRTUS, M.; ALBEROLA, J. Detection of Anti-*Leishmania* immunoglobulin G antibodies in Urine specimens of dogs with leishmaniasis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 849-855, 2003.

SOLANO-GALLEGO, L.; RODRIGUEZ-CORTES, A.; INIESTA, L.; QUINTANA, J.; PASTOR, J.; ESPADA, Y.; PORTÚS, M.; ALBEROLA, J. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 676-680, 2007.

SPADA J. C. P.; SILVA, D. T.; MARTINS, K. R. R.; RODAS, L. A. C.; ALVES, M. L.; FARIA, G. A.; BUZUTTI, M. C.; SILVA, H. R.; STARKE-BUZETTI, W. A. Occurrence of *Lutzomyia longipalpis* (Phlebotominae) and canine visceral leishmaniasis in a rural area of Ilha Solteira, SP, Brazil. **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p.456-462, 2014.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in *Leishmania* infections: friends or foes? Artigo de revisão. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 3, p. 1-8, 2012.

STENGER, S.; THURING, H.; RÖLLINGOFF, M.; BOGDAN, C. Tissue expression in inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 180, p. 783-789, p. 1994.

STRAUSS-AYALI, D.; BANETH, G.; SHOR, S.; OKANO, F.; JAFFE, C.L. Interleukin-12 augments a Th1-type immune response manifested as lymphocyte proliferation and interferon gamma production in *Leishmania infantum*-infected dogs. **International Journal for Parasitology**. v. 35, 63–73, 2005.

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. PvcIust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v. 22, p. 1540-1542, 2006.

TERRAZZANO, G.; CORTESE, L.; PIANTEDOSI, D.; ZAPPACOSTA, S.; DI LORIA, A.; SANTORO, D.; RUGGIERO, G.; CIARAMELLA, P. Presence of anti-platelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 331–337, 2006.

TEVEN, C. M.; FARINA, E. M.; RIVAS, J.; REID, R. R. Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. **Genes Disease**, v. 1, n. 2, p. 199-213, 2014.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**. 8ª edição. Editora Elsevier. p. 587. 2009.

TODOLÍ, F.; SOLANO-GALLEGO, L.; OJEDA, A.; QUINTANA, J.; LLORET, A.; ROURA, X.; ALBEROLA, J.; RODRÍGUEZ-COTÉS, A. Anti-*Leishmania* IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 159, n. 1, p. 17-23, 2009.

TRUPPEL, J. H.; OTOMURA, F.; TEODORO, U.; MASSAFERA, R.; COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; CATARINO, C. M.; DALAGRANA, L.; FERREIRA, M. E. M. C.; THOMAZ-SCOCOL, V. Can Equids Be a Reservoir of *Leishmania braziliensis* in Endemic Areas?. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e93731, 2014.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8⁺ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Chichester, v. 25, p. 569-579, 2003

TUMANG, M.C.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L.L.; HELFGOTT, D.C.; TEITELBAUM, R.; HARIPRASHAD, J.; MURRAY, H.W. Role and effect of TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v.153, p. 768–775, 1994.

UNDERHILL-DAY, J. C. A literature review of urban effects on lowland heaths and their wildlife. **English Nature Research Reports Number** , n. 623, 2005.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNCAN, J. L.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Leishmanioses**. In: _____. Parasitologia veterinária. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 191-192.

UZE G, SCHREIBER G, PIEHLER J, PELLEGRINI S. The receptor of the type I interferon family. **Current Topics in Microbiology Immunology**., v. 316, p. 71-95, 2007.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração**. Versão 2.0.1. 2013, 76p.

VIDES, J. P.; SCHWARDT, T.F.; SOBRINHO, L. S. V.; MARINHO, M. LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from in endemic area visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, p. 22-28, 2011.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassay. In: ROSE, N.R.; FRIEDMAN, H. (Ed.). **Manual of clinical immunology**. 2.ed. Washington: American Society for Microbiology, p.399-371, 1980.

VON STEBUT, E.; EHRCHEN, J. M.; BELKAID, Y.; KOSTKA, S. L.; MOLLE, K.; KNOP, J.; SUNDERKOTTER, C.; UDEY, M. C. Interleukin 1 α promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 2, p. 191-199, 2003.

VOROV, E.; DOTAN, S.; GAYVORONSKY, L.; WHITE, R. M.; COHEN, I.; KRELIN, Y.; BENCHETRIT, F.; ELKABETS, M.; HUSZAR, M.; EL-ON, J.; APTE, R. N. IL-1 induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. **International Immunology**, v. 22, n. 4, p. 245-257, 2010.

XIN, L.; LI, Y.; SOONG, L. Role of interleukin-1 β the CD11c^{high} CD45RB-Dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*-specific CD4⁺ T Cells in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, p. 5018-5026, 2007.

XIN, L.; VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; RAIMER, S. S.; KELLY, B. C.; HU, J.; ZHU, L.; SUN, J.; SOONG, L. Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. **Journal of Immunology**, v. 184, n. 12, p. 7047-7056, 2010.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-arginine and cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 75, p.2802–2810, 2007.

WEIBLEN, C. **Soroprevalência da Pitiose equina no Rio Grande do Sul, Diagnóstico e controle da pitiose em modelo experimental**. 2015. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria. Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, 2015.

WERNECK, G. L. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 644-645, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Leishmaniasis. **Technical Report Series**, v. 793, p. 50-52, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record**, v.77, n. 44, p. 365-372, 2002.

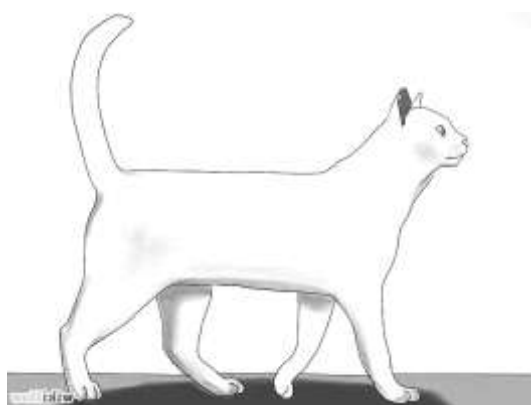
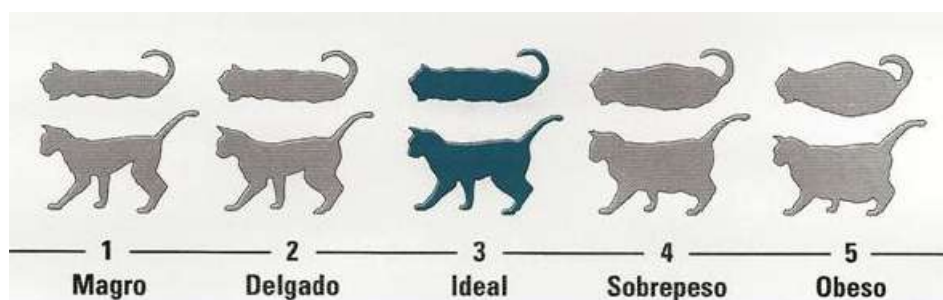
APÊNDICE 01



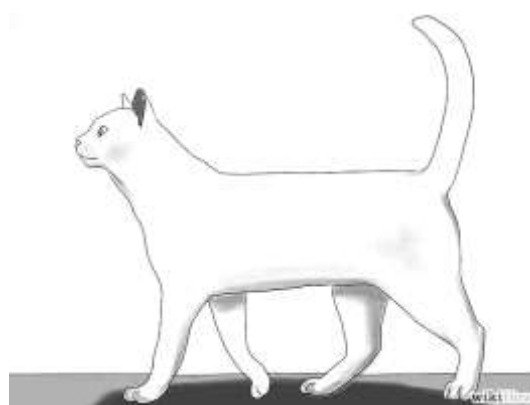
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO INDIVIDUAL – FELINOS

Data:		Número:	
Nome:	Sexo: () M () F	Pelagem: () curto () longo () sem pelos	
Idade:			
Proprietário:			
Endereço:			
Cidade:		Estado:	
Telefone:			



Lado direito



Lado esquerdo

Observações:

ANAMNESE E AVALIAÇÃO CLÍNICA:**Cidade de procedência:****Contactantes:****Possui cães com leishmaniose no convívio:****Possui histórico de cães eutanasiados com leishmaniose:** () sim () não**Animal fica:** () zona rural () zona urbana**Realiza algum tratamento no animal:** () sim () não

Qual: _____

Presença de ectoparasitas:**Vermifugação:****Vacinas:****Temperatura (°c):** **FC (bpm):** **FR (mpm):****Mucosas oculares:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Mucosas genitais:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Mucosas orais:** () hipocorada () normocorada () hiperacorada**Lesões (especialmente de pele):****Outras informações:****Responsável pelo preenchimento:**

ANEXOS 01



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FELINOS

Seu (s) felinos (s) está (ão) sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa. O Sr. (Sra.) como responsável pelo animal (is), após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do professor responsável. Em caso de recusa o Sr. (Sra.) não será penalizado de forma alguma.

Título da pesquisa: Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Nome do pesquisador responsável: Trícia Maria Ferreira de Sousa Oliveira

1. **Natureza da pesquisa:** o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu (s) animal (is) nesta pesquisa com a finalidade de detectar *Leishmania* spp. em quinos e felinos.
2. **Envolvimento da pesquisa:** ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o pesquisador utilize o soro sanguíneo do animal, sangue e suabe conjuntival e oral retirado por veterinários capacitados, para realizar exames laboratoriais. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal.
3. **Sobre os dados necessários:** identificação do proprietário e do(s) animal(is) e data da coleta da amostra.
4. **Riscos e desconforto:** Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Conselho Nacional no Controle de Experimentação Animal (CONCEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008, não oferecem riscos e causam muito pouco desconforto aos animais.
5. **Confidencialidade:** todas as informações coletadas neste estudo são confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados individuais dos animais.
6. **Benefícios:** esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a existência de *Leishmania* spp. em felinos e nos comprometemos a divulgar os resultados obtidos no meio científico.
7. **Pagamento:** o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Consentimento da participação do Animal

Eu, _____,
RG: _____, CPF _____, abaixo assinado responsável, permito que meu
(s) felino (s) participe (em) do estudo: Avaliação da resposta imune de gatos e cavalos
naturalmente infectados por *Leishmania* spp. Avaliação da resposta imune de gatos
naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*

Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação do animal na pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso leve à qualquer penalidade ou interrupção do meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data:

Nome:

Assinatura do responsável:

Endereço:

Bairro:

CEP:

Cidade:

Telefone: