



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOYCE CARVALHO PEREIRA

APLICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE LBK39 E SEUS
RESPECTIVOS PEPTÍDEOS PepLi379 e PepLi409 SINTÉTICOS NO
DIAGNÓSTICO E PROTOCOLOS VACINAIS DAS LEISHMANIOSES

CURITIBA

2020

JOYCE CARVALHO PEREIRA

APLICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE LBK39 E SEUS
RESPECTIVOS PEPTÍDEOS PepLi379 e PepLi409 SINTÉTICOS NO
DIAGNÓSTICO E PROTOCOLOS VACINAIS DAS LEISHMANIOSES

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Vanete Thomaz Soccol.

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

P436a Pereira, Joyce Carvalho
 Aplicação do antígeno recombinante Ibk39 e seus respectivos peptídeos PepLi379 e
 PepLi409 sintéticos no diagnóstico e protocolos vacinais das leishmanioses [recurso
 eletrônico] / Joyce Carvalho Pereira. – Curitiba, 2020.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Vanete Thomaz Soccol.

1. Leishmaniose visceral. 2. Peptídeos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Soccol, Vanete
Thomaz. III. Título.

CDD: 616.9364

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JOYCE CARVALHO PEREIRA** intitulada: **APLICAÇÃO DO ANTÍGENO RECOMBINANTE LBK39 E SEUS RESPECTIVOS PEPTÍDEOS PepLi379 e PepLi409 SINTÉTICOS NO DIAGNÓSTICO E PROTOCOLOS VACINAIS DAS LEISHMANIOSES**, sob orientação da Profa. Dra. VANETE THOMAZ SOCCOL, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 28 de Novembro de 2020.

Assinatura Eletrônica
28/11/2020 19:06:05.0
VANETE THOMAZ SOCCOL
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
28/11/2020 19:50:50.0
ALINE KUHN SBRUZZI PASQUALI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica
30/11/2020 09:23:30.0
LIGIA MORAES BARIZON DE SOUZA
Avaliador Externo (LMBS LABORATÓRIO VETERINÁRIO)

Assinatura Eletrônica
30/11/2020 14:01:14.0
ELIEZER LUCAS PIRES RAMOS
Avaliador Interno Pós-Doc (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
28/11/2020 19:40:47.0
CRISTINE RODRIGUES
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Aos meus pais, Fatima e Reginaldo,

e ao meu namorado, Renan.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fatima e Reginaldo, pelo amor e apoio, que apesar da distância e das dificuldades ao longo desses três anos, me ajudaram a passar por mais essa etapa. AMO VOCÊS!!

Ao meu namorado Renan, pelo apoio, cuidado, amor e, por aturar minhas reclamações diárias. Te amo.

À minha segunda família, Denise, Luiz Carlos, Dona Noêmia e Ronaldo por me tratarem como da família e, me socorrerem nos pontos tomados e nos pés quebrados.

À minha amiga Anna Paula, por ter me dado a honra de ser dinda do Pietro, e por entender minhas visitas anuais, devido aos 886 km que nos separam.

À minha orientadora Vanete Thomaz Soccol, pela orientação e apoio nos projetos.

Ao professor João Minozzo diretor do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos por permitir que os experimentos fossem feitos naquela instituição e por todo apoio dado.

Ao senhor Paulinho e Emeline pelo apoio no cuidado diário com os animais dos experimentos e, pela colaboração, ambos do CPPI.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES.

“Felicidade pode vir de várias formas: na companhia de bons amigos, no sentimento que você tem quando consegue fazer os sonhos de alguém se realizarem, ou na promessa de esperança renovada. Está tudo bem em se deixar ser feliz, porque você nunca sabe se esse sentimento vai passar.” –

One Tree Hill

RESUMO

A Leishmaniose visceral possui importância mundial por ser uma zoonose. Esta doença possui como reservatório principalmente os cães e é causada *Leishmania infantum*. Os cães possuem papel importante na manutenção do parasito e infecção em humanos. Esses animais são capazes de se moverem por diversas regiões, o que contribui para a dispersão do parasito. Há cerca 1,3 milhão de novos casos/ano, ocasionando de 20 a 30 mil mortes. Os testes diagnósticos utilizados atualmente apresentam baixa sensibilidade e especificidade, e não são capazes de detectar presença da doença em fases assintomáticas, apresentando falsos negativos. Para contribuir com a melhoria e acesso ao diagnóstico nosso grupo desenvolveu previamente um novo antígeno recombinante relacionado à cinesina de *Leishmania braziliensis*, a Lbk39, no qual mostrou 59% de aminoácidos idênticos à *L. infantum*. A proteína foi testada como antígeno em diagnóstico de leishmaniose visceral canina. A Lbk39 foi sintetizada utilizando o vetor pLEXSY-sat2 e transfectada em células de *Leishmania tarentolae* por eletroporação. No presente trabalho, tanto a Lbk39 quanto seus peptídeos PepLi379 e PepLi409 foram utilizados como antígenos e determinadas a sensibilidade e especificidade dos mesmos. A Lbk39 apresentou 100% de sensibilidade e 96,1% de especificidade, e seus peptídeos, PepLi379 e PepLi409, 95% e 87,8% de sensibilidade, e 100% e 95% de especificidade, respectivamente. Mostrando que ambos os antígenos têm potencial para serem utilizados em testes para diagnóstico em cães. Com isso, tanto a Lbk39 quanto seus peptídeos apresentaram potenciais para serem utilizados em diagnóstico de leishmaniose visceral canina. Em relação a leishmaniose humana visceral, os peptídeos, PepLi379 e PepLi409, obtiveram 41,7 e 83,3% de sensibilidade e 95,8% e 100% de especificidade. Já para leishmaniose cutânea humana, apresentaram 42,9 e 93,5% de sensibilidade e 91,7 e 87,5% de especificidade. Mostrando que apenas o PepLi409 apresenta potencial para uso diagnóstico, tanto para leishmaniose visceral humana quanto para cutânea. A partir desses resultados, foi estudado o potencial vacinal destes peptídeos. Foram utilizados camundongos BALB/c, os quais receberam duas doses de imunização por via intranasal, com intervalo de 7 dias entre elas. Após 7 dias da última dose da vacina, os animais foram desafiados com 2×10^6 promastigota de *L. infantum* no coxim plantar da pata direita via subcutânea. O perfil clínico da doença foi verificado pela observação física e integridade dos animais. A carga parasitária do baço, do linfonodo poplíteo e do fígado foram quantificados pela técnica de diluição limitante nos dias 60 e 90 pós-desafio, com a eutanásia dos animais. O perfil das citocinas foi avaliado com o plasma dos camundongos. O grupo que recebeu as composições PepLi409 e Mix dos peptídeos, apresentaram diferença significativa na carga parasitária dos órgãos em relação ao seu controle e aos demais grupos vacinais e, a análise do perfil de citocinas no soro dos animais, mostrou um aumento da produção de IFN- γ . Esses resultados sugerem que estas composições são candidatos ideias para uso vacinal contra leishmaniose humana.

Palavras-chaves: Leishmaniose visceral canina 1. Leishmaniose visceral 2. Leishmaniose cutânea 3. ELIS 4. Proteína recombinante 5. Peptídeos sintéticos 6.

ABSTRACT

Visceral Leishmaniasis has worldwide importance because it is a zoonosis. This disease has as a reservoir mainly dogs and is caused by *Leishmania infantum*. Dogs play an important role in maintaining the parasite and infection in humans. These animals are able to move through different regions, which contributes to the dispersion of the parasite. There are about 1.3 million new cases / year, causing 20 to 30 thousand deaths. The diagnostic tests currently used have low sensitivity and specificity, and are not able to detect the presence of the disease in asymptomatic phases, presenting false negatives. To contribute to the improvement and access to diagnosis, our group developed a new recombinant antigen related to *Leishmania braziliensis* kinesin, Lbk39, in which it showed 59% of amino acids identical to *Leishmania infantum*. The protein was tested as an antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Lbk39 was synthesized using the vector pLEXY-sat2 and transfected into *Leishmania tarentolae* cells by electroporation. In the present work, both Lbk39 and its peptides PepLi379 and PepLi409 were used as antigens and their sensitivity and specificity were determined. Lbk39 showed 100% sensitivity and 96.1% specificity, and its peptides, PepLi379 and PepLi409, showed 95% and 87.8% sensitivity, and 100% and 95% specificity, respectively. Showing that both antigens have the potential to be used in diagnostic tests in dogs. Thus, both Lbk39 and its peptides showed potential to be used in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. In relation to human visceral leishmaniasis, the peptides, PepLi379 and PepLi409, obtained 41.7, 83.3% sensitivity, 95.8%, and 100% specificity. As for human cutaneous leishmaniasis, they had 42.9, 93.5% sensitivity, and 91.7 and 87.5% specificity. Showing that only PepLi409 has potential for diagnostic use, both for human visceral and cutaneous leishmaniasis. From these results, the vaccine potential of these peptides was studied. BALB / c mice were used, which received two doses of immunization intranasally, with an interval of 7 days between them. 7 days after the last dose of the vaccine, the animals were challenged with a 2×10^6 *L. infantum* promastigote in the footpad of the right leg, subcutaneously. The clinical profile of the disease was verified by the physical observation and integrity of the animals. The parasitic load of the spleen, popliteal lymph node and liver were quantified by the limiting dilution technique on days 60 and 90 post-challenge, with the euthanasia of the animals. The cytokine profile was evaluated with the plasma of the mice. The group that received the PepLi409 and Mix peptide compositions showed a significant difference in the parasitic load of the organs in relation to their control and the other vaccine groups, and the analysis of the cytokine profile in the animals' serum showed an increase in IFN- γ production. These results suggest that these compositions are ideal candidates for vaccine use against human leishmaniasis.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis 1. Visceral leishmaniasis 2. Cutaneous leishmaniasis 3. ELIS4. Recombinant Protein 5. Synthetic peptides 6.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA OCORRÊNCIA DA <i>LEISHMANIA</i> NAS AMÉRICAS -----	27
FIGURA 2 - FORMAS PROMASTIGOTA E AMASTIGOTA DE <i>LEISHMANIA SP.</i> _____	34
FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DE PARASITO DO GÊNERO <i>LEISHMANIA SP.</i>	36
FIGURA 4 - FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS -----	74
FIGURA 5 - ESQUEMA DA PADRONIZAÇÃO DO ELISA LBK39 -----	78
FIGURA 6 - ESQUEMA DA PADRONIZAÇÃO DO ELISA LBK39 -----	85
FIGURA 7 - MÉTODOS ESQUEMÁTICOS DAS IMUNIZAÇÕES DOS ANIMAIS E DESAFIOS COM <i>L. INFANTUM</i> -----	88
FIGURA 8 - EXPRESSÃO DA LBK39 PURIFICADA POR SDS-PAGE -----	93
FIGURA 9 - COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DO ELISA DE SORO CANINO CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39 -----	96
FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DO ELISA DE SORO CANINO CONTRA A LBK39 EM SOROS COM CULTURA POSITIVA E, DA DISTRIBUIÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS NOS DIFERENTES GRUPOS _____	98
FIGURA 11 - ANÁLISE DE REAÇÃO-CRUZADA COM LBK39 CONTRA <i>TOXOPLASMA GONDII</i> _____	101
FIGURA 12 - SEQUÊNCIA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39 -----	102
FIGURA 13 - CURVA ROC PEPLI379 -----	106
FIGURA 14 - ANÁLISE DA REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI379 -----	108
FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DA ABSORBÂNCIA E CURVA ROC DO PEPLI379 PARA LEISHMANIOSE HUMANA -----	110
FIGURA 16 - CURVA ROC PEPLI409 -----	113
FIGURA 17 - ANÁLISE DA REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI409 -----	114
FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DA ABSORBÂNCIA E CURVA ROC DO PEPLI409 PARA LEISHMANIOSE HUMANA -----	115
FIGURA 19 - CULTURA DE MØ, PEPTÍDEOS E <i>L. INFANTUM</i> -----	118

FIGURA 20 - ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS, IFN- γ E IL-10, PRESENTE NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE MØ	119
FIGURA 21 - DESENVOLVIMENTO DA LESÃO NA PATA-----	121
FIGURA 22 - AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA PÓS VACINAÇÃO NA INFECÇÃO POR <i>L. INFANTUM</i> -----	123
FIGURA 23 - ANÁLISE DA CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS IFN- γ E IL-10 PRESENTES NO PLASMA DOS ANIMAIS VACINADOS-----	125

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESUMO DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE <i>LEISHMANIA</i> DOS PAÍSES DAS AMÉRICAS 2020.....	27
TABELA 2 – TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i>	29
TABELA 3 – CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO CANINO	77
TABELA 4 – CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO CANINO.....	83
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO HUMANO.....	84
TABELA 6 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 56 AMOSTRAS DE CÃES COM CULTURA POSITIVA, DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (COM OU SEM SINAIS CLÍNICOS)	97
TABELA 7 – COMPARAÇÃO ENTRE O ANTÍGENO LBK39 E OUTROS MÉTODOS (TR-DPP, ELISA E CULTURA EM MEIO ARTIFICIAL), COM 78 AMOSTRAS DE CÃES POSITIVAS E 75 CONTROLES NEGATIVOS	99
TABELA 8 – COMPARAÇÃO ENTRE O ANTÍGENO LBK39 E O TR-DPP PARA AS 78 AMOSTRAS UTILIZADAS COMO CONTROLE POSITIVO, DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO (COM OU SEM SINAIS CLÍNICOS).....	100
TABELA 9 – PEPTÍDEOS REATIVOS NA IMUNODETECÇÃO E ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i>	104
TABELA 10 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 40 AMOSTRAS, POSITIVAS E NEGATIVAS, DE CÃES.....	106
TABELA 11 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, AUC E YODEN J DO TESTE PARA LEISHMANIOSE HUMANA.	110
TABELA 12 – SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 40 AMOSTRAS, POSITIVAS E NEGATIVAS, DE CÃES.....	113

TABELA 13 – SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, AUC E YOUDEN J DO TESTE PARA LEISHMANIOSE HUMANA.	116
TABELA 14 – COMBINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS PEPTÍDEOS.	117
TABELA 15 – RAZÃO DE PRODUÇÃO DE IFN- γ /IL-10.....	126

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AE	– Estenose aórtica
Ag	– Antígeno
ATP	– Adenosina trifosfato
BHI	– <i>Brain Heart Infusion</i>
BOD	– <i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BSA	– Albumina sérica bovina
CD	– Células dendríticas
CP	– Cisteínas proteinases
cPCR	– PCR convencional
CPPI	– Centro de Produção e Pesquisa De Imunobiológicos
DAT	– Teste de aglutinação direta
DP	– Desvio padrão
DTH	– Teste de hipersensibilidade tardia
EAE	– Encefalomielite autoimune experimental
ECL	– Enfisema lobar congênito
EDTA	– Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	– Ensaio de imunoabsorção enzimática.
FAST	– Teste rápido de rastreio de aglutinação
FeLV	– Vírus da leucemia felina
FMOC	– 9-florenyl-methoxy-carbonyl
gp-63	– Glicoproteína-63
GTP	– Guanosina trifosfato

H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
IFAT	– Teste de anticorpos para imunofluorescência
IFN-γ	– Interferon gamma
IL	– Interleucina
IL	– Intralesional
IM	– Intramuscular
IN	– Intranasal
iNOS	– Óxido nítrico induzido
ITS-1	– Espaçador transcrito interno-1
IV	– Intravenosa
kDa	– Quilodalton
kDNA	– Kinetoplasta do DNA da <i>Leishmania</i>
<i>L.</i>	– <i>Leishmania</i>
LAMP	– Amplificação mediada por loop
LC	– Leishmaniose cutânea
LCD	– Leishmaniose cutânea difusa
LM	– Leishmaniose mucosa
LPG	– Lipofosfoglicano
LTA	– Leishmaniose tegumentar americana
LV	– Leishmaniose visceral
LVC	– Leishmaniose visceral canina
MDP	– Dipeptídeo muramil
MERCOSUL	– Mercado Comum do Sul
MG/KG	– Miligramas por kilo

MHC I	– Complexo principal de histocompatibilidade classe I
MHC II	– Complexo principal de histocompatibilidade classe II
Mø	– Macrófagos
Na ₂ CO ₃	– Carbonato de sódio
Na ₂ PO ₄	– Fosfato de Sódio Dibásico
NaCl	– Cloreto de Sódio
NADPH	– Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NaHCO ₃	– Bicarbonato de sódio
NdR	– Números de registros
NETs	– Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NK	– Células natural killer
NM	– Nanômetro
NNN	– Novy, Neal e Nicolle
NO	– Óxido nítrico
NOX2	– NADPH oxidase 2
NTC	– Antibiótico de estreptotricina Nourseothricin
O ₂ ⁻	– Superóxido
OPD	– O-phenylenediamine dihydrochloride
PAHO	– Organização de saúde Pan-Americana
PAGE	– Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBMC	– Células mononucleares do sangue periférico
PBS	– Tampão fosfato-salino
PCR	– Reação em cadeia de polimerase
PD-1	– Proteína de morte celular programada 1
PD-L1	– Ligante de morte programado 1

PKDL	– Leishmaniose dérmica pós Kala-azar
POC	– <i>New point-of-care</i>
PR	– Paraná
PVC	– Policloreto de Vinila
qPCR	– PCR quantitativo
RI	– Resposta imune
rK39	– Proteína recombinante K39
RNS	– Espécies reativas de nitrogênio
ROS	– Espécies reativas de oxigênio
RPM	– Rotação por minuto
RPMI	– <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	– RNA ribossomal
Sb ⁺⁵	– Antimoniais pentavalentes
SC	– Sistema complemento
SDS	– Dodecil-sulfato de sódio
SFB	– Soro fetal bovino
SI	– Sistema imunológico
SICOM	– Complexo imunoestimulador
SOD	– Superóxido dismutase
sp.	– Espécies
SUS	– Sistema único de Saúde
TCD4 ⁺	– Linfócito TCD4
TCD8 ⁺	– Linfócito TCD8
TGF-β	– Fator de transformação do crescimento
TA	– Temperatura ambiente

- Th – Linfócito T helper
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
- TrDPP – *Dual Path Platform*
- Treg – Célula T reguladora
- UVZ – Unidade de Vigilância em Zoonoses
- VLPs – Partículas semelhantes a vírus
- VP – Vacúolos parasitóforos

LISTA DE SÍMBOLOS

©	- copyright
®	- marca registrada
μl	- microlitro
μg	- micrograma
γ	- gama
β	- beta
α	- alfa
x	- vezes
H	- hora
M	- molar
Min	- minuto
ML	- mililitro
Mol	- molar
N	- número

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	25
1.1	CONTEXTO E PROBLEMA.....	25
1.2	OBJETIVOS	30
1.2.1	Objetivo Geral.....	30
1.2.2	Objetivos Específicos	30
1.3	JUSTIFICATIVA	32
2	REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA.....	33
2.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS.....	33
2.2	TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA.....	33
2.3	TIPOS DE LEISHMANIOSE	36
2.3.1	LC.....	36
2.3.2	Leishmaniose Visceral.....	38
2.4	FISIOPATOLOGIA DA <i>LEISHMANIA</i>	39
2.5	IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE	41
2.5.1	Infecção Humana	41
2.5.2	Infecção Canina por <i>Leishmania</i>	46
2.5.3	Infecção Murina	47
2.6	CONTROLE E PREVENÇÃO	50
2.7	TRATAMENTO	51
2.6	TESTES DIAGNÓSTICOS	57
2.9	TIPOS DE VACINAS.....	66
2.9.1	Vacinas inativadas.....	66
2.9.2	Vacinas atenuadas	66
2.9.3	Vacinas de subunidades e separação dos produtos naturais.....	67
2.9.4	Vacinas de ácido nucléicos	68
2.9.5	Vacinas de proteínas e subunidade recombinante	68
2.10	PEPTÍDEOS EM USO VACINAL	70
3.	METODOLOGIA.....	73
3.1	FLUXOGRAMA	73

i.	Produção da proteína recombinante LBK39	75
ii.	Purificação da proteína recombinante LBK39.....	75
iii.	SDS PAGE LBK39.....	76
3.2.1	PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ELISA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39	77
3.2.2	PRODUÇÃO ANTÍGENOS SINTÉTICOS	79
3.2.2.1	ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO	79
3.2.2.2	ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> E SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS	80
3.2.2.3	SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS	80
3.2.2.4	DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS	81
3.2.2.5	CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS COM BSA	81
3.2.3	ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DOS PEPTÍDEOS	82
3.2.3.1	COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS CANINAS.....	82
3.2.3.2	COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS.....	83
3.2.3.3	PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ELISA PEPTÍDEOS	84
3.2.3.3	AVALIAÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA FRENTE AOS PEPTÍDEOS... 86	
3.2.4	TESTES DOS PEPTÍDEOS COMO IMUNÓGENOS	86
3.2.4.1	PARASITOS.....	86
3.2.4.2	ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	87
3.2.4.3	ANIMAIS	87
3.2.4.4	NOMENCLATURA DOS GRUPOS	88
3.2.4.5	IMUNIZAÇÃO.....	88
3.2.4.6	DESAFIO COM <i>L. INFANTUM</i>	89
3.2.4.7	ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS.....	89
3.2.4.8	COLETA DE SANGUE E DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS.....	90
3.2.4.9	CARGA PARASITÁRIA	90
3.2.4.10	DETECÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO ELISA.....	91
3. 3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	91
4	RESULTADOS.....	92

4.1	PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39.....	92
4.2	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ELISA PARA A PROTEÍNA LBK39.....	94
4.3	ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA LBK39 COMO ANTÍGENO DEMONSTROU ALTA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DA LVC	95
4.4	COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA ENTRE OS GRUPOS.....	97
4.5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE SOROLÓGICO USANDO A PROTEÍNA LBK39, TR-DPP, CULTURA E ELISA EXTRATO BRUTO	99
4.6	TESTE DE REAÇÃO CRUZADA PARA LBK39	101
4.7	PEPTÍDEOS: IMUNODETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPO, ANÁLISE <i>IN SÍLICO</i> E SÍNTESE QUÍMICA	102
4.8	PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ELISA USANDO OS PEPTÍDEOS COMO ANTÍGENOS.....	105
4.9	USO DO PEPLI379 PARA SORODIAGNÓSTICO POR ELISA DE LVC	106
4.10	TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI379 COM <i>T.GONDII</i>	108
4.11	USO DO PEPLI379 PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVH E LCH ..	109
4.12	USO DO PEPLI409 COMO ANTÍGENO PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVC.....	112
4.13	TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI409 COM <i>T. GONDII</i>	114
4.14	USO DO PEPLI409 PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVH E LCH ..	115
4.15	AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE <i>IN VITRO</i> DOS PEPTÍDEOS	117
4.16	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MØ ESTIMULADOS POR PEPTÍDEOS E INFECTADOS POR <i>L. INFANTUM</i>	119

4.17	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS COMO ANTÍGENO PARA USO VACINAL	120
4.18	ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DOS GRUPOS VACINADOS	122
4.19	ANÁLISE DO PERFIL DAS CITOCINAS DOS GRUPOS VACINADOS	124
5	DISCUSSÃO	127
6	CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES.....	138
	REFERÊNCIAS.....	139
	APÊNDICE 1 – PATENTE	191
	APÊNDICE 2 – PATENTE	193
	ANEXO 1 – ARTIGO.....	195

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTO E PROBLEMA

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial estando entre as sete doenças tropicais negligenciadas mais importantes doenças tropicais (ANDRADE-NARVAEZ et al., 2005; VARGAS-MARTÍNEZ et al., 2013), estando presente em 98 países (ALVAR et al., 2012). Há cerca 1,3 milhão de novos casos/ano e, estima-se que mais de 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair pelo menos uma de suas formas (DESJEUX, 2004), ocasionando de 20 a 30 mil mortes por ano (WHO, 2015; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Nas Américas, a doença está presente em 19 países, sendo o Brasil o país mais afetado, com cerca de 96% dos casos reportados no Brasil (PAH, 2019). Em países como Colômbia e Venezuela, a transmissão da doença é considerada estável, entretanto, na Argentina, no Brasil e no Paraguai há expansão em novos territórios afetados pela doença (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; PAH, 2019).

Em 2012, Alvar e colaboradores, reportaram que o número de casos de leishmaniose visceral (LV) era de 0,2-0,4 milhão de pessoas por ano, sendo mais de 90% na Índia, Bangladesh, Sudão, Etiópia e Brasil, apresentando taxa de morte estimada em 10 a 20%, especialmente em áreas pobres.

Além da LV em humanos, existe a forma de leishmaniose visceral canina (LVC) que ocorre principalmente em regiões endêmicas, no qual há alta prevalência de cães infectados, e pode chegar a mais de 60% em algumas regiões brasileiras (DE FREITAS et al., 2010). Thomaz-Soccol et al. (2017) mostrou que aproximadamente 24% dos cães em Foz do Iguaçu apresentam LVC. A prevalência de LVC no Brasil ocorre em várias regiões, como de 6,7% a 29,3% no Nordeste; de 47,8% a 59,3% no Norte; de 10-44,2% no Sudeste; de 9,3% a 65% no Centro-Oeste (MAIA-ELK HOUR et al., 2008; FELIPE et al., 2011; BARATA et al., 2013; CARDIM et al. 2013; TEIXEIRA et al. 2013; PEIXOTO; OLIVEIRA; ROMER, 2015; SILVA; MADEIRA; FIGUEIREDO, 2015; BRAZIL, 2016). A soroprevalência varia na população em geral, incluindo cães com e sem

sinais clínicos, entre 3,4% e 40%, revelando o potencial de vigilância da infecção canina como um marcador da transmissão e dos desafios emergentes (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; DE ALMEIDA et al., 2009; DO PRADO et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No Brasil, estima-se que a população canina é de 28 milhões, incluindo mais de 22 milhões de cachorros não domiciliados (STEVENSON, 2004). Porém, não há dados oficiais sobre o número total de cães infectados. Como medida de redução da disseminação da doença, visto que o cão é um dos principais reservatórios do parasito, uma das estratégias é monitorar e controlar os casos de LCV (GRIMALDI et al., 2012).

As leishmanioses são causadas por parasitos intracelulares, pertencente ao gênero *Leishmania*. A *Leishmania* é transmitida para humanos pela picada do flebotomíneo, principalmente pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, presentes no Velho Mundo (Europa, África do Norte, Oriente médio, Ásia) e *Lutzomyia* presente em parte da América do Sul (VERA-IZAGUIRRE et al., 2006). Os reservatórios da doença são várias espécies de animais selvagens e domésticos (REISEN, 2010).

Há três formas clínicas da doença: leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM), e a LV. A LV é a maior causadora das mortes em pacientes não diagnosticados precocemente, devido à ausência de um teste diagnóstico rápido ou pelo longo tempo de tratamento (ARENAS et al., 2017). Cerca de 75% dos casos de LC ocorrem em países das Américas, destacando a relevância epidemiológica do continente (READY, 2014).

As leishmanioses são causadas por 53 diferentes espécies (*sp.*) do parasito, no qual 20 tem a capacidade de infectar humanos (AKHOUNDI et al., 2016). Compreender essa variedade de espécies é relevante pelo fato de algumas serem associadas à forma clínica da doença e à resistência aos tratamentos convencionais (AREVALO et al., 2007; DOWNING et al., 2011; MOUTTAKI et al., 2014). O continente americano representa um cenário especial para a doença, não só devido à grande quantidade de casos, mas pela diversidade de espécies diferentes em um mesmo país, alcançando até dez espécies diferentes em um mesmo território (RAMÍREZ et al., 2016; MONTALVO et al., 2017). A distribuição do parasito nas Américas é mostrada na FIGURA 1.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA OCORRÊNCIA DA *LEISHMANIA* NAS AMÉRICAS



FONTE: “Um banco de dados interativo da distribuição de espécies de *Leishmania* nas Américas”. Herrera et al., (2020).

A TABELA 1 mostra a resumo das informações clínicas e epidemiológicas de leishmaniose nas Américas em 2020.

TABELA 1 - RESUMO DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DE LEISHMANIOSE NAS AMÉRICAS EM 2020

País	N de sp.	*NdR	NdR por biópsia	NdR da pele	NdR pelo sangue	NdR por inseto	NdR por aspirado
------	----------	------	-----------------	-------------	-----------------	----------------	------------------

Argentina	7	38	7	15	3	7	6
Belice	2	7	7	--	--	--	--
Bolívia	6	58	22	1	3	11	21
Brasil	15	470	229	13	159	60	9
Colômbia	10	264	105	105	29	24	1
Costa Rica	3	20	1	--	--	--	19
Equador	11	99	59	12	--	28	--
Guatemala	2	5	2	--	--	3	--
Honduras	2	10	3	--	--	--	7
México	9	138	100	3	12	5	18
Nicaragua	4	51	17	6	--	--	28
Panamá	4	6	2	1	--	--	3
Peru	11	236	145	39	3	28	21
Suriname	5	14	9	--	--	5	--
Uruguai	1	1	1	--	--	--	--
Venezuela	8	81	45	9	8	16	3
Total		1502	756	204	217	189	136

FONTE: Adaptado de “ Um banco de dados interativo da distribuição de espécies de *Leishmania* nas Américas”. Herrera et al., (2020). *NdR: Números de registros.

Em relação a epidemiologia, nas Américas, o total de 940.396 novos casos de LC e LM, e 59.769 de LV foram reportados nos países endêmicos, de 2001-2017, com média anual de 55.317 e 3.516 casos, respectivamente. Em 2017, 49,959 foram reportados pela Organização de saúde Pan-Americana destes, 72,6% casos foram no Brasil (17,526), sendo 3,78% (1,882) de LM. Já 4.329 novos casos de LV foram reportados, com aumento regional de 28% de casos no Brasil (PAHO/WHO, 2017).

De acordo com os dados do Sistema único de Saúde (SUS) do Brasil, a taxa de morbidade hospitalar por região de internação, no ano de 2020, foi de: 15, 303.76 de LM, 52, 514.64 de LC, 181, 603.78 de LV, e 21, 033.64 de leishmaniose não especificada, sendo as regiões nordeste e sudeste com a maior incidência de casos (SUS, 2020).

A LV, conhecida como Kala-azar, é a forma mais grave da doença, caracterizada por disseminação do parasito pelo fígado e baço, sendo fatal se não tratada. A *L. infantum* (sin *L. chagasi*) (MORENO et al., 1986; THOMAZ-

SOCCOL, 1993) e *L. donovani* são as principais causadoras da LV na Europa, África e Ásia (velho mundo), e *L. infantum/L. chagasi* nas Américas (novo mundo) (MURRAY et al., 2005). As principais espécies e suas formas das doenças estão representadas na TABELA 2.

TABELA 2 - TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Região	Complexos	Espécies	Manifestações clínicas
Velho Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	LC, LV, PKDL, LM (raro)
		<i>L. infantum</i>	LC, LV (criança), PKDL, LM (raro)
	<i>L. tropica</i>	<i>L. chagasi</i>	
		<i>L. tropica</i>	LC, LM (raro), LV (raro)
		<i>L. major</i>	LC, LM (raro)
Novo Mundo	<i>L. mexicana</i>	<i>L. aethiopica</i>	LC, LCD
		<i>L. mexicana</i>	LC, LCD (raro)
		<i>L. amazonensis</i>	LC, LCD, LV (raro), PKDL (raro), LM
	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. venezuelensis</i>	LC, LCD (raro)
		<i>L. braziliensis</i>	LC, LV, LM
		<i>L. guyanensis</i>	LC, LM
		<i>L. paramensis</i>	LC, LM
	<i>L. peruviana</i>	LC	

FONTE: adaptado de “Infecção de *Leishmania* no novo e velho mundo. Uma revisão prática” (2015). Abreviações: LC (Leishmaniose cutânea); LV (Leishmaniose visceral); PKDL (Leishmaniose dérmica pós Kala-azar); LM (Leishmaniose mucosa); LCD (Leishmaniose cutânea difusa).

De todas as formas da doença, a LC é a forma mais comum, podendo apresentar úlceras na pele, no local de picada do flebotomíneo, ou cicatrizes altamente desfigurantes. É causada pela *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, (Velho Mundo) e *L. braziliensis* (Novo Mundo), dentre outras espécies (KAYE; SCOTT, 2011; SCOTT; NOVAIS, 2016). LC pode levar a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e LM, que são as formas mais severas da doença, caracterizadas pela migração do parasito para locais secundários, e formação de lesões metastáticas (ADAUI et al., 2016; BOURREAU et al., 2016). Essas lesões secundárias, algumas vezes, apresentam baixo número de parasitos, mas são acompanhadas por inflamações exageradas que provocam destruição dos

tecidos. Essa disseminação e reativação da infecção em locais secundários podem ocorrer anos depois da infecção primária e, são observadas, principalmente, nas infecções por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. aethiopica*. Geralmente, a LM está associada com as condições socioeconômicas, condições precárias habitacionais, sistema imunológico debilitado, e desnutrição (WHO, 2015).

As leishmanioses afetam principalmente pessoas de países em desenvolvimento, no qual, dentro destes, a população afetada são as de menor nível socioeconômico, e não possuem capacidade de assumir os custos da doença, como, diagnóstico, hospitalização e tratamento (THAKUR, 2000). A migração, desflorestamento, mudanças na susceptibilidade do hospedeiro, urbanização, e mudanças no ambiental natural, são fatores de risco que contribuem para a prevalência da leishmaniose (DESJEUX, 2001), e vem se espalhando rapidamente, para áreas não endêmicas do mundo, devido a globalização, aumento de viagens internacionais (WEINA et al., 2004), dificuldade de controlar os vetores (CLABORN, 2010), falta de vacinas eficazes (ZOFOU et al., 2014).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial aplicação do antígeno recombinante Lbk39 e seus peptídeos sintéticos, PepLi379 e PepLi409, no diagnóstico e em protocolos vacinais da Leishmaniose.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho do crescimento de *L. tarentolae* transfectada com o plasmídeo contendo a sequência da proteína recombinante Lbk39 em cultura;

- Padronizar o método ELISA para validação do potencial diagnóstico da proteína recombinante Lbk39, e seus peptídeos;
- Realizar, pelo método de ELISA, o sorodiagnóstico de animais e humanos infectados com leishmanioses;
- Comparar método ELISA com TrDPP e cultura;
- Imunodeteção de peptídeos antigênicos da Lbk39 em membrana;
- Realizar análise *in silico* dos peptídeos da Lbk39;
- Avaliar por testes *in vitro* os peptídeos;
- Avaliar o potencial vacinal dos peptídeos *in vivo* para humanos.

1.3 JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose continua sendo um grande problema de saúde em quatro regiões eco epidemiológicas no mundo: Nas Américas, na África ocidental, no Norte da África, Ásia Ocidental e Sudeste Asiático. Há 4 principais formas da doença, como a LV, a leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL), a LC e LM. Enquanto LC é a forma mais comum da doença, LV é a mais grave e quase sempre fatal, principalmente em crianças (WHO, 2018).

Ao longo dos anos, muitos estudos têm sido realizados tentando compreender a fisiopatologia da *Leishmania*, como este parasito é capaz de evadir a resposta imune (RI), e como estes são capazes de se tornarem resistentes à diversas drogas.

Os testes diagnósticos utilizados atualmente apresentam baixa sensibilidade e especificidade, e não são capazes de detectar presença da doença em fases assintomáticas, apresentando falsos negativos. Por esse fator, a presente tese aplica o antígeno LBK39 e peptídeos derivados na plataforma ELISA para diagnóstico de leishmaniose visceral humana (LVH), leishmaniose cutânea humana (LCH) e LVC, pois já foi observado que a Lbk39 é um potencial antígeno para uso no diagnóstico de LVH e LCH (de SOUZA et al., 2019).

Até o presente momento não há vacinas contra leishmaniose aprovadas para uso em humano, apesar dos tratamentos com a quimioterapia serem eficazes, estes apresentam diversos efeitos adversos, fazendo com que o tratamento não seja facilmente administrado. Não há também uma terapia que seja ideal e funcional contra a leishmaniose. Com isso, resolvemos avaliar o potencial vacinal dos peptídeos sintéticos da proteína recombinante Lbk39 contra a leishmaniose visceral murina.

2 REVISÃO TEÓRICO-EMPÍRICA

2.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS

De acordo com o Guia de Vigilância em Saúde (2017) têm sido registrados surtos frequentes de LV. Inicialmente, sua ocorrência estava limitada a áreas rurais, e pequenas localidades urbanas. A leishmaniose está em constante expansão para os grandes centros, acometendo 21 estados das cinco regiões, devido aos aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados. Nos anos 90, 90% dos casos eram apenas na região Nordeste do Brasil, hoje em dia, os dados mostram a Peri urbanização e urbanização da LV, que são áreas de colonização (zoonoses de matas residuais) que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (antropozoonoses), destacando-se as cidades do Sudeste, como Rio de Janeiro (Rio de Janeiro), Belo Horizonte (Minas Gerais) e Araçatuba (São Paulo). A doença é mais frequente em crianças com menos de 10 anos (41,9%), e o sexo masculino é o mais afetado (61,8%). As crianças são as mais afetadas devido a maior suscetibilidade que estas apresentam, devido a relativa imaturidade imunológica, agravado pela desnutrição, além da maior exposição ao vetor peridomicílio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

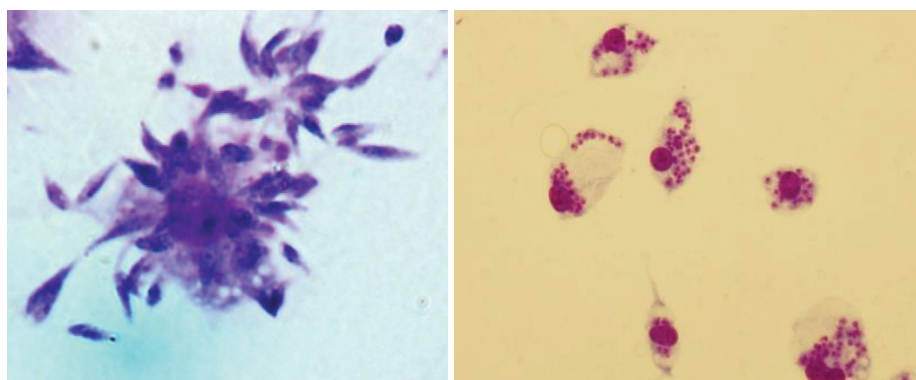
A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresentou mudança no seu comportamento. Antigamente, era considerada zoonose de animais silvestres, que acometia pessoas que tinham contato com florestas, ocorrendo principalmente em zonas rurais e periurbanas. Devido a fatores como garimpos, expansão de fronteiras agrícolas e extrativismo, a LTA apresentou aumento no crescimento da endemia, hoje sendo encontrada em todos os estados do Brasil. A grande maioria dos casos são encontrados no Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

2.2 TRANSMISSÃO E CICLO DE VIDA

A Leishmaniose é causada por várias espécies do protozoário digenético, da ordem kinetoplasta, que pertence à família tripanossomatidae e é do gênero *Leishmania*, no qual afeta humanos e animais (LAINSON; SHAW, 1987).

Existem vários tipos de hospedeiros vertebrados, os mamíferos tais como roedores, cães, marsupiais, carnívoros, primatas e humanos (PISCOPO; AZZOPARDI, 2007), e invertebrados, os insetos vetores. Os vetores são insetos fêmeas, denominados de flebotomíneos, da ordem *Díptera*, da família *Psychodidae* e gênero *Phlebotominae*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Dependendo da localização no qual são encontradas no Brasil, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (REY, 2001a; COURA, 2005; GRIMALDI; TESH, 1993; MIRANDA et al., 2011). Cerca de 700 espécies de flebotomíneos têm sido descritos, dos quais, destes, aproximadamente 30 espécies são vetores do parasito, e mais de 40 espécies são suspeitas de agirem como vetores (AKHOUNDI et al., 2016). A *Leishmania* apresenta duas formas de vida: a forma promastigota (FIGURA 2A), no qual possui flagelo livre em sua porção anterior, e é encontrada no tubo digestivo do vetor, e a forma amastigota (FIGURA 2B), as quais são encontradas dentro dos macrófagos (M ϕ) dos hospedeiros vertebrados. As formas amastigotas são esféricas ou ovais, e medem cerca de 2,5-5,0 μm em diâmetro, já as promastigotas alongadas, com cerca de 5,0-15,0 μm de comprimento (BATES; ROGERS, 2005).

FIGURA 2 – FORMAS PROMASTIGOTA E AMASTIGOTA DE *LEISHMANIA SP.*



(A) Promastigota

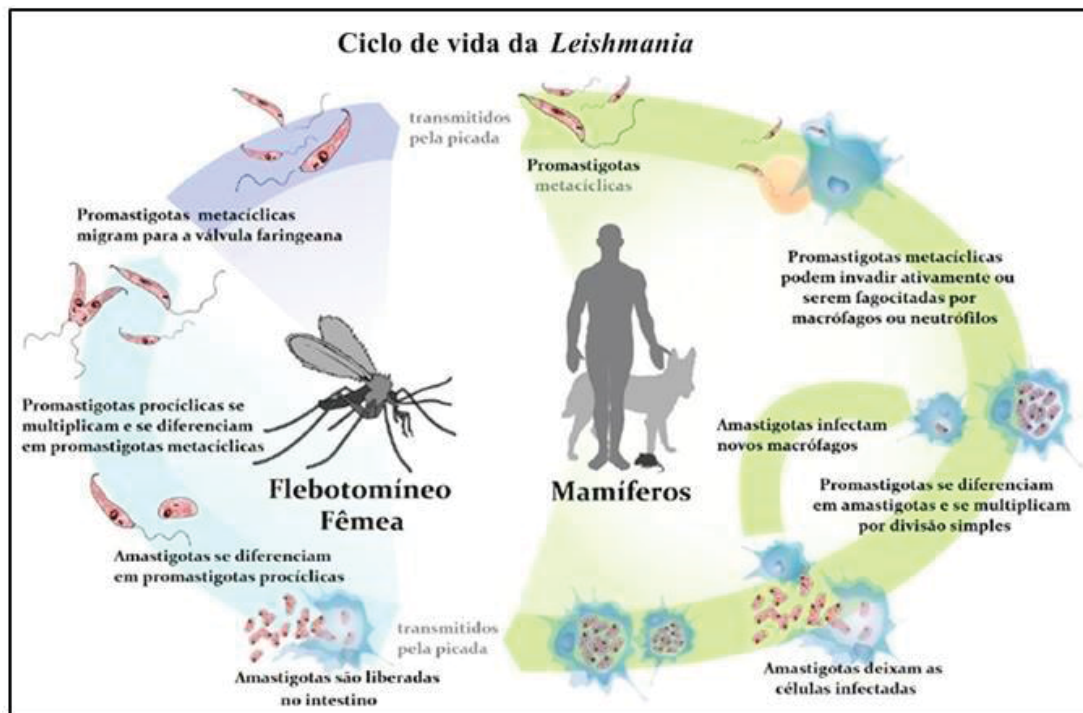
(B) Amastigota

FONTE: (A) Foto experimentação (B) Pereira et al., 2017.

As formas amastigotas possuem um kinetoplasto localizado próximo do núcleo e podem se multiplicar dentro do sistema mononuclear fagocítico dos hospedeiros vertebrados. Assim, como apresentado na FIGURA 3, a fêmea do flebotomíneo torna-se infectada durante a alimentação do sangue ou de linfa interticial contendo macrófagos parasitados por amastigotas de *Leishmania* (BATES; ROGERS, 2005).

No trato digestivo do inseto, a amastigota se diferencia em promastigota, que possuem kinetoplastos localizados entre o núcleo e a extremidade anterior. Ainda no trato digestivo do vetor, a promastigota sofre os estágios procíclico, nectomonato, leptomonato, haptomonato, até eles tornarem-se promastigotas metaclínicas, que é a forma infectante da doença (BATES; ROGERS, 2005).

Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, as promastigotas são internalizadas pelos Mø e, dentro dos vacúolos parasitóforos (VP), elas se transformam em amastigotas, no qual se replicam intensivamente até a lise da célula parasitada. Assim, as amastigotas infectam outros Mø, e o ciclo começa novamente (DE MENEZES et al., 2016). Vários mecanismos de adaptação têm sido desenvolvidos pelos parasitos do gênero *Leishmania* para garantir sua sobrevivência, no hospedeiro, em diferentes ambientes que eles enfrentam durante o seu ciclo de vida. Lidam com as condições digestivas presentes no flebotomíneos, e impedem sua destruição pelo sistema imunológico (SI) do hospedeiro vertebrado, o que garante sua sobrevivência dentro dos Mø (CUNNINGHAM, 2002).

FIGURA 3 - CICLO DE VIDA DE PARASITO DO GÊNERO *LEISHMANIA* SP.

FONTE: (<https://labvet.com.br/laboratorio-veterinario/41/2/19/Leishmaniose-canina-%E2%80%93-desafios-diagnosticos,-tratamento-e-prevencao>). 2019.

2.3 TIPOS DE LEISHMANIOSE

(A) LC

A LC é endêmica na América Central e do Sul, África do Norte, Oriente Médio e partes da Ásia, e são estimados 1 milhão de novos casos por ano. A LC é a forma mais comum das leishmanioses, ocorrendo em 90% dos pacientes (VON STEBUT, 2015). Semanas ou meses após a infecção, nódulos se desenvolvem e crescem ao longo de semanas, causando lesões arredondadas com bordas elevadas e centro granulomatoso, podendo eventualmente ulcerar, dependendo da espécie do parasito. Estas podem torna-se dolorosas caso haja superinfecção ou quando está sobreposta a uma articulação (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As lesões geralmente cicatrizam a partir do centro, em um

período de meses, e podem deixar cicatrizes com um halo hiperpigmentado (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006; AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007).

A LC pode apresentar formas atípicas, como eritematosa, eczematosa, ou lesões endurecidas. Os locais mais afetados são as áreas expostas da pele (rosto, pescoço, braços, pernas). A *Leishmania* pode se manter nas cicatrizes e nos linfonodos da LC curada, mesmo com tratamento. O que pode resultar em reativação da doença em período de imunossupressão (BOGDAN, 2012). Essa doença pode levar a leishmaniose recorrente (que pode ocorrer até oito anos após o tratamento) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), com lesões disseminadas e não ulceradas (VON STEBUT, 2015).

A LCD (conhecida como leishmaniose anérgica ou virchowiana) é a forma mais grave de LC, com incidência de 2,4% no Brasil. Nesta forma há ausência de imunidade celular específica, com resposta terapêutica geralmente fraca e, portanto, ocorre recidivas com mais frequências (FRANKE et al., 1990; ZERPA; CONVIT, 2009). A doença é crônica, e é caracterizada por pápulas ou nódulos disseminados na pele, não apresenta ulceração, mas podem apresentar lesões verrucosas, e não causam viscerilização (LUPI et al., 2009). Outra gravidade que a doença apresenta, é a negatização do teste Montenegro. Porém, podem ser detectadas por histopatologia e em exames de distinção, no qual apresentam numerosas formas amastigotas (MACHADO-PINTO et al., 2006).

Uma outra forma de LC, é a leishmaniose Mucosa (LM), também conhecida como LM “metastática”, a qual afeta aproximadamente 5% dos pacientes com leishmaniose, e geralmente está associada com tratamento inadequado ou ineficiente da infecção primária, sendo os homens os mais afetados (VON STEBUT, 2015).

Os primeiros sintomas são congestão nasal persistente e hemorrágica, e rouquidão (LUPI et al., 2009). Geralmente, o eritema e edema progridem para ulceração com exsudato mucoso purulento (SCHWARTZ; HATZ; BLUM, 2006; LUPI et al., 2009). De 2 a 10 anos pós infecção, há severa destruição do tecido, começando no septo nasal com perfuração potencial, atingindo nariz, boca, garganta e tecidos circundantes. Estudos mostram que a progressão da LM, não tratada, desenvolve-se em cerca de 2-10% dos casos de LC causada pela *L.*

braziliensis no novo mundo (PEREZ-AYALA et al., 2009; JIRMANUS et al., 2012).

(B) Leishmaniose Visceral

A doença é conhecida como Kala-azar e caracterizada por longos períodos de febre recorrente, aumento do baço e fígado (hepatoesplenomegalia), linfadenopatia, perda de peso, anorexia, fraqueza, palidez, tosse, retardo do crescimento de crianças (MALTEZIY et al., 2000), pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal (IgG e IgM) (BADARO et al., 1986). A hipoalbuminemia está associada com edema e outros fatores de desnutrição. Diarréia pode ocorrer como resultado de infecção dos parasitos no intestino e ulceração. Com o tempo, quando a LV não é tratada, causa severa caquexia e graves sangramentos devido à trombocitopenia. A perda de trombócitos pode resultar em hemorragia de mucosa grave que pode facilitar a sepse. E, devido a eventual perda de leucócitos, os pacientes tornam-se imunossuprimidos, ficando vulneráveis à infecções bacterianas são causa comum de morte nos casos letais por LV (KUMAR; NYLÉN, 2012).

Na PKDL, há o surgimento de máculas difusas hipopigmentadas, eritema malar, pápulas e nódulos em todas as partes do corpo (MALTEZOU et al., 2000; AKILOV; KHACHEMOUNE; HASAN, 2007; WHO, 2014), e quando não tratada, é fatal dentro de 2 anos (WHO, 2014). Também pode causar a linfadenopatia com infiltrados inflamatórios em macrófagos e plasma celular, e lesões na pele, que são os principais sinais observados (de ALMEIDA et al., 2012; LIMA et al., 2004). Alves (2009) mostrou a presença de formas amastigotas nos linfonodos caninos naturalmente infectados com *L. infantum* (*sin L. chagasi*). Hipertrofia/hiperplasia do linfonodo ocorre principalmente em cães sem sinais clínicos, enquanto atropia é predominante em cães com sinais clínicos (GIUNCHETTI et al., 2008). Apesar do estado clínico, a pele e o baço são os principais locais de alta densidade parasitária durante o curso da LVC (REIS et al., 2009). Anemia, uremia, hiperproteinemia e hiperglobulinemia são anormalidades hematológicas e bioquímicas comuns observadas na LV.

Anormalidades clínicas dignas de nota incluem linfadenopatia, alterações cutâneas, anorexia, onicogribose, emagrecimento, mucosas pálidas, oftalmopatias, febre e diarreia (FEITOSA et al., 2000; MAGALHÃES et al., 2012).

2.4 FISIOPATOLOGIA DA *LEISHMANIA*

A resposta contra o parasito é determinada pela resposta imunológica (RI) do hospedeiro, e vários polimorfismos genéticos relacionados ao SI têm sido associados à gravidade da doença. *Leishmania* sendo um parasito obrigatoriamente intracelular, eles precisam rapidamente localizar suas células hospedeiras. A RI envolve uma complexa gama de células. Após o flebotômico realizar a hematofagia, células fagocíticas são recrutadas para o local que foi feita a hematofagia. Para estabilizar a infecção, algumas espécies de *Leishmania* recrutam monócitos inflamatórios, M ϕ e neutrófilos, para o local da infecção. Uma vez dentro da célula hospedeira, a *Leishmania* é capaz de modular o SI a seu favor e se propagar no organismo e sobreviver. Assim, a *Leishmania* desenvolve diferentes estratégias para moldar a RI desde o início da infecção, afetando tanto a imunidade inata quanto a adaptativa para promover sua sobrevivência (ROSSI; FASEL, 2018). Células como as células dendríticas (CD), neutrófilos e eosinófilos, são essenciais na regulação da entrada do parasito. Eles estão envolvidos não só na prevenção da entrada do parasito mas, são responsáveis pelo controle da multiplicação pela produção de citocinas (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; NATHAN; SHILOH, 2000; GREGORY; OLIVIER, 2005; BHATTACHARYA; ALI, 2013; ROSSI; FASEL, 2018).

Nos mamíferos, a *Leishmania* é localizada principalmente nos M ϕ residentes, aonde eles são diferenciados das formas promastigotas para as formas amastigotas, e então sobrevivem em organelas, como os fagolisossomos (ROSSI; FASEL, 2018).

Para que isso aconteça, as primeiras horas após a infecção são cruciais para que o parasito seja capaz de infectar fagócitos e colonizar o hospedeiro. No estágio inicial, as propriedades pro-inflamatórias da saliva do flebotômico tem papel importante para determinar o curso da infecção (CHAGAS et al., 2014), e essa fase é afetada pelo duplo papel do sistema complemento (SC), pois a lise

mediada por ele elimina os parasitos, enquanto a opsonização, realizada pelo fagócitos, promove a fagocitose da *Leishmania*, o que favorece a infecção. O lipofosfoglicano (LPG), que é o glicoconjugado majoritário da superfície de *Leishmania*, e protege a *Leishmania* da lise mediada pelo SC e, ao mesmo tempo, induz ativação deste, promovendo assim a fagocitose do parasito (FRANCO et al., 2012), porém, atrasa da formação do fagolisossomo e permite que os parasitos se diferenciem em amastigota (VINET et al., 2009).

O maior efeito da resposta anti-*Leishmania* dos Mø é pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (ILES; FORMAN, 2002; FANG, 2004), processo regulado para matar qualquer patógeno sem causar danos na célula hospedeira. Esse processo é ativado pela fagocitose e envolve diversas enzimas, como a fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase 2 (NOX2) e síntese de óxido nítrico induzido (iNOS), a qual produz superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO), respectivamente (AKTAN, 2004; PANDAY et al., 2015). Porém, a *Leishmania* é capaz de interferir nesse processo, através do LPG que as protegem dos ROS, RNS e do NO, o que interfere na produção de NOX2 e O_2^- (CARNEIRO et al., 2018). Estudos têm mostrado que a *L. braziliensis* e *L. amazonensis* tem aumentado a expressão de superóxido dismutase (SOD), através da indução de interferon tipo-I, favorecendo a sobrevivência do parasito (KHOURI et al., 2009).

As formas promastigotas e amastigotas podem ser capturados pelos neutrófilos que são rapidamente recrutados nos locais da infecção, onde produzem “armadilhas extracelulares de neutrófilos” (NETs), que são estruturas constituídas de componentes intracelulares, como fibras de cromatina e proteínas derivadas de grânulos citoplasmáticos. As NETs são liberadas em resposta a vários estímulos, tais como de microrganismos, citocinas e complexos antígeno-anticorpo, e estes possuem o papel de capturar microrganismos e até mesmo matá-los. Mesmo tendo vida muito curta, os neutrófilos são altamente expandidos durante uma inflamação. Porém, o impacto dos neutrófilos no resultado da leishmaniose provavelmente é específico da espécie (HURRELL et al., 2016). *L. amazonensis* são eficientemente destruídas por NETs, *L. donovani* e *L. infantum* são mais resistentes e podem até se beneficiar com a formação de NETs (GABRIEL et al., 2010). Em estudos realizados por Guimarães-Costa et

al. (2009), as NETs demonstraram ser capazes de capturar as *L. amazonensis*, e tais parasitas quando capturados por estas estruturas apresentavam sinal de dano celular e morte do parasita. A adição de um anticorpo anti-histona aumentou a sobrevivência de tais parasitas capturados pelas NETs em até 42%, e o efeito letal das histonas sobre os parasitas foi confirmado incubando histonas purificadas e promastigotas de *L. amazonensis*, onde 38% dos parasitas continuaram vivos (GUIMARAES-COSTA et al., 2009). Além disso, o rápido recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *L. mexicana* contribui para a progressão e cronicidade da doença (HURRELL et al., 2015).

Após as células hospedeiras terem sido infectadas, a *Leishmania* provavelmente é transformada em amastigota nos linfonodos drenantes mais próximos, no qual depende do tipo de microambiente, para disseminar a infecção e replicação, assim como o desenvolvimento da resposta imune adaptativa composta por células B e T (CD4, CD8 e células T duplo negativo) (MURRAY et al., 2005; KAYE; SCOTT, 2011).

A diferença genética dos hospedeiros pode levar a resposta efetiva induzida ou falha destas, e determinar o maior desenvolvimento da doença ou patologia (BACELLAR et al., 2002; CASTELLUCI et al., 2006; DUTRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

2.5 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE

(A) Infecção Humana

Devido à complexidade da infecção por *Leishmania* em humanos a mesma não é tão bem caracterizada como as infecções experimentais em camundongos. A resposta à infecção envolve os papéis de citocinas, das moléculas co-estimulatórias, e da saliva do flebotomíneo (ROGERS et al., 2002). Em todas as formas de leishmaniose, a RI das células T e a diferença entre a resistência e a susceptibilidade estão relacionadas com o nível de expansão de células T-helper (Th) -1 e -2 (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002). Inicialmente, na infecção em humanos é observada a polarização Th1 e Th2, e

as citocinas produzidas pelas células T são responsáveis pela eliminação do parasito e a consequente cura (DA CRUZ et al., 1994; COUTINHO et al., 1996; COUTINHO et al., 1998), ou pelo desenvolvimento da doença (CARVALHO et al., 1985; BOFIM et al., 1996; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998), ou pela eliminação do parasito (MENDONCA *et al.*, 1995).

As células Natural Killer (NK), na leishmaniose humana, estão associadas de maneira inversa com a manifestação da doença, onde elas se apresentam em grandes quantidades na melhora da infecção (BOGDAN, 2012), e são importantes na produção de interferon gamma (IFN- γ), o qual executa efeito microbicida realizada por M ϕ . Os neutrófilos são encontrados em lesões iniciais na infecção por *L. major* em camundongos, e são detectáveis pela histopatologia em várias formas de leishmaniose humana (NC et al., 2008; CARNEIRO et al., 2018).

A infecção em LCD é caracterizada pela ausência da produção de IFN- γ , quando avaliado por estímulo *in vitro* com Antígeno (Ag) de *Leishmania* em cultura de linfócitos isolados de pacientes, devido a falha na expressão de receptores interleucinas (IL)-2, e pela alta produção de citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4 (KEVRIC et al., 2015), IL-10 e Fator de transformação do crescimento (TGF- β), (BOMFIM et al., 1996). Na LM, o local da infecção apresenta exacerbada RI celular (BACELLAR et al., 2002), Th1 e Th2; apresenta reação de Montenegro positiva (PIRMEZ et al., 1993; FARIA et al., 2005; CONVIT et al., 1993), há altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ (FARIA et al., 2005), e IL-4, e baixos níveis de IL-10 e TGF- β , o qual explica a destruição crônica e severa do tecido, escassez de parasitos na lesão e regulação (AMATO et al., 2003).

Na LC há uma mistura de citocinas inflamatórias e regulatórias nos tecidos. As TCD4⁺, na fase inicial da infecção, são as maiores fontes produtoras de IFN- γ (BOTTREL et al., 2001; ANTONELLI et al., 2005), e junto com o TNF- α , são capazes de controlar a multiplicação do parasito. O TNF- α é produzido por diferentes tipos de células, incluindo M ϕ e linfócitos (ANTONELLI et al., 2004). A IL-10 é produzida por diversas células, como M ϕ , T reguladora (Treg), TCD8⁺, dentre outras, e entretanto, estudos mostram que a IL-10 poderia atuar como inibidora dos possíveis efeitos protetores causados pelo IFN- γ , no qual

atuaria bloqueando a secreção de IL-12 por Mø e CD (GAAFAR et al., 1999; BOURREAU et al., 2002; GOMES-SILVA et al., 2007). A IL-10 atuaria na homeostase, regulando a produção exacerbada do IFN- γ . Isso foi observado em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com a forma cutânea da doença (BACELLAR et al., 2002), no qual a IL-10 auxiliou no controle da RI dos pacientes com LC, porém, auxiliou na patologia da doença, diminuindo o mecanismo de morte do Mø e levando a persistência do parasito (CAMPANELLI et al., 2006; CARNEIRO et al., 2009). Franca-Costa (2012) mostrou que as promastigotas de *L. amazonensis* obtidas a partir de pacientes portadores de LM e LC, revelaram que os parasitos derivados da LM tendem a formar grandes VPs com forte infecção nos Møs, sugerindo uma correlação positiva entre a virulência do parasito e os tamanhos dos VPs. As amastigotas de *L. amazonensis* são mais resistentes aos efeitos leishmanicidas derivados de neutrófilos ou Mø comparados às amastigotas de outras espécies (MUKBEL et al., 2007; WANG et al., 2011).

O aspecto imunológico da LV não é bem definido. Nesse caso, o paradigma Th1-resistente e Th2-susceptível pode ser uma banalização de uma rede de interações muito mais complexa, dado que altos níveis de anticorpos são observados nesta forma da doença (BHATTACHARYA; ALI, 2013). Estudos mostram que as citocinas Th1, IFN- γ e IL-12 permanecem com produções suprimidas em LV ativa (MONDAL et al., 2010; SAHA et al., 2007). Entretanto, os níveis de IFN- γ no soro permanece alto, sugerindo que as fontes deste pode ser os órgãos linfoides onde o parasito se prolifera (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; KHOSHDEL et al., 2009; MONDAL et al., 2010). De fato, estudos confirmaram a alta expressão de mRNA de IFN- γ em medula óssea, linfonodo e aspirados de baço (KARP et al., 1993; NYLÉN et al., 2007).

A *Leishmania* modula ativamente as células Treg para seu sustento nos tecidos locais, e induz um estado de competência imune ao reconectar a sinalização do Mø hospedeiro, alterando, por exemplo, o equilíbrio do microambiente do tecido na proporção de IL-12 pró-inflamatória para IL-10 anti-inflamatória. Esse ambiente de tecido transformado, por sua vez, alteraria o equilíbrio das funções das células T CD4⁺, regulando negativamente as citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α . Além disso, o parasita subverte a

sinalização de IFN- γ que é necessária para a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que lisaria os parasitas. Então, a modulação das redes de citocinas das células mieloides e linfóides em interação pelo parasita desempenha papel fundamental na prevenção da resposta imune produtiva necessária para a eliminação do parasita (FALEIRO et al., 2014; IIZUKA-KOGA et al., 2017). As Tregs naturais tímicas, as quais constituem quase 5% das células T CD3⁺, funciona para preservar a tolerância central e periférica. As células Treg bloqueiam a ativação exagerada dos subconjuntos de células Th para manter a autotolerância (SAKAGUCHI et al., 2008). A função e identidade das células Treg são moduladas pelo fator de transcrição *forkhead box protein 3* (FoxP3) que, por sua vez, é regulado pela metilação do promotor e modificação pós-tradução (FALEIRO et al., 2014; IIZUKA-KOGA et al., 2017; MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014; DENG et al., 2019). As Tregs são identificadas por sua co-expressão de CD25^{hi} e CTLA-4⁺ junto com a expressão de FoxP3. CD25 é o IL-2R α (receptor de IL-2) de alta afinidade que é super expresso nas Tregs. A receptividade reduzida de IL-7 (CD127^{low}) é outra marca registrada das células Treg, principalmente em humanos (KONDĚLKOVÁ et a., 2010; YU et al., 2012). Com isso, a IL-2 e a IL-7 desempenham um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e função dessas populações. A diversidade de células Treg em termos de origem, fenótipo, tecidos residentes e seu papel na leishmaniose é recente e continua sendo estudada. A *L. major* recruta e expande células T CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ (nTregs) para os locais de infecção durante CL experimental e são encontrados extensivamente nas lesões de pele de pacientes com CL. A origem desses nTregs pode ser o *pool* desses Tregs encontrados na pele e em outros tecidos epiteliais que fornecem proteção mais geral contra exposições regulares a patógenos evasivos (NYLEN; GAUTAM, 2010.). Já em pacientes com LV foi relatado que estes apresentam uma abundância dessas Tregs em sua medula óssea e inibem a ativação de células T de maneira dependente de IL-10, levando à persistência do parasita (RAI et al., 2012).

Ao longo dos anos vem se dado atenção especial para o papel da Th17 na RI contra a leishmaniose. Essas células são diferenciadas a partir da TCD4⁺ *naïve* na presença de TGF- β and IL-6, e secreta citocinas como IL-21, IL-17 e IL-22, no qual opera nos processos inflamatórios, e atuam em LV (ANSARI; SALUJA;

SALOTRA, 2006). Entretanto, o papel específico dessas células na leishmaniose ainda permanece inconclusivo, dado estudos controversos como eles contribuem para resistência ou susceptibilidade à infecção (NASCIMENTO et al., 2014; TERRAZAS et al., 2016). Korn (2009) e Anderson (2005) mostraram que os fenótipos Th17 e Treg parecem possuir importantes funções, tanto na indução quanto no controle da resposta inflamatória, respectivamente. As células Treg CD4⁺ são divididas em duas categorias: as células Treg natural CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺, que são produzidas no timo, e células Treg induzidas pelos antígenos, que são geradas na periferia, como o Th3, que pode ou não expressar FOXP3. Essa é fonte de IL-10 e participa na resposta regulatória, impedindo dano tecidual, e alguns estudos mostram que a falta dessa célula está relacionada às doenças autoimunes (KANE; MOOSER, 2001). Na doença em humanos, as Treg TCD4⁺ CD25⁺ são encontradas nas lesões cutâneas, e já as células FOXP3⁺ e IL-10 intralesionais está associada com à falta de resposta ao tratamento nas infecções causadas pela *L. amazonensis* (BOURREAU et al., 2009).

Outro tipo de RI é dado pelas quimiocinas, as quais são mediada por células que exibe atividade antileishmanicida através do recrutamento de diferentes células imunes no local da infecção (fígado e baço). Na leishmaniose, citocinas e quimiocinas interagem fortemente juntas na defesa do hospedeiro contra o parasito (BHATTACHARYA; ALI, 2013).

Já a citocina IL-27 é expressa em altos níveis no sangue periférico e em tecidos de pacientes LM e LC (TRINCHIERI, 2003; YOSHIMURA et al., 2006; MURUGAIYAN et al., 2009). Estudos mostram que a TCD8⁺ tem papel importante no controle de patógenos intracelular, incluindo protozoários e infecções virais. Em alguns estudos, as TCD8⁺, em cooperação com as TCD4⁺, parecem estar envolvidas na indução de imunidade do hospedeiro contra a infecção primária (MULLER et al., 1993; HERATH; KROPF; MULLER, 2003; TSAGOZIS; KARAGOUNI; DOTSIKA, 2003), e tem papel importante na proteção depois da reinfeção (da SILVA SANTOS & BRODSKYN, 2014), produzindo altas quantidades de IFN- γ (SANTOS et al., 2013) e disparando sua atividade citotóxica (DA CONCEIÇÃO-SILVA et al., 1994)

Diferente das TCD8⁺, as TCD4⁺ não são capazes de fazer citólise das células infectadas, não sendo encontrada, portanto, correlação entre células TCD4⁺ e imunopatologia/tamanho da lesão (SANTOS et al., 2013). A maioria dos humanos são capazes de montar RI adaptativas inadequadas para combater a infecção por *L. infantum*, e desenvolvem a doença, porém, após tratamento com antimoniais pentavalentes ou anfotericina B, conseguem reprogramar suas RI mantêm a replicação do parasito sob controle e não mostram recorrência da doença específicas (CARVALHO et al., 1994; BACELLAR et al., 1996).

(B) Infecção Canina por *Leishmania*

A LVC pode evoluir de uma infecção não aparente para uma doença grave e sistêmica, que geralmente culmina com a morte do animal. Cães podem estar co-infectados por *L. infantum* e *L. braziliensis*, assim como humanos (MADEIRA et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2010; QUARESMA et al., 2011; PIRES et al., 2014); e o fato que a maioria dos cães, que são positivos para PCR, são saudáveis e não apresentam sinais clínicos (BANETH et al. 2008; MIRÓ et al. 2008). Coura-Vital e colaboradores (2011b) mostraram que alta percentagem de cães que não apresentam sinais clínicos geralmente são resistentes à infecção por *L. infantum*, apresentam resultados de testes PCR positivo, mas são soronegativos. Nestes cães os diferentes tipos de RI determina a capacidade de fazer com que estes sejam resistentes, caracterizada pela RI eficiente (Th1), células B CD21⁺, alta produção de IFN- γ (COURA-VITAL et al., 2011; MENEZES-SOUZA et al., 2011; REIS et al., 2006), IL-2 e IL-12 (PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995; SANTOS-GOMES et al., 2002), com ativação de mecanismos leishmanicida em M ϕ infectados (ALVES et al., 2009; PANARO et al., 2001). Os componentes da RI inata e adaptativa apresentam interações que são diversas e complexas. A progressão da LVC está interconectada com a RI do cão, e a persistência e a proliferação dos parasitos através na pele e órgãos viscerais (REIS et al., 2009; 2010).

Já os cães que apresentam sinais clínicos são susceptíveis à infecção, desenvolvem a doença de forma severa apresentando supressão de tipos específicos de imunidade mediada por células, particularmente TCD8⁺ (PINELLI

et al., 1994), que pode ser acompanhada pelo aumento da produção de IL-10 (BOGGIATTO et al., 2010). A expressão aumentada da proteína de morte celular programada 1 (PD-1) e do ligante de morte programado 1 (PD-L1) podem suprimir a linfoproliferação e alterar a produção de citocinas Th1, contribuindo para o desenvolvimento da doença (OLIVEIRA SILVA et al., 2019). Manipulações de certas vias de sinalização de citocinas podem favorecer o controle sobre o parasito em indivíduos infectados (CARVALHO et al., 1994; PINELLI et al., 1994; PINELLI et al., 1995; BACELLAR et al., 1996; D'OLIVEIRA JUNIOR et al., 1997; STRAUSS-AYALI et al., 2005; BOGGIATTO et al., 2010). A resistência está associada com resposta do tipo Th1, com predominância de IL-12, IFN- γ , IL-2 e TNF- α , no qual aumenta a eficiência das células fagocíticas e dos linfócitos citotóxicos desencadeando a RI protetiva.

A susceptibilidade à infecção pode estar associada com resposta Th2, com predominância de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (PINELLI et al., 1995; 1999a; CORREA et al., 2007; LAGE et al., 2007; MENEZES-SOUZA et al., 2011). Estudos indicam que para resolução da infecção por *Leishmania* depende da habilidade do hospedeiro de montar a resposta T específica, com ativação de M ϕ mediados por citocinas derivadas de células T (CARRILLO; MORENO, 2009).

Modelos experimentais caninos são usados para investigar o mecanismo imune envolvido em doenças tais como Leishmaniose e Doenças de Chagas. Além disso, pela similaridade entre LVC e a LH, o modelo animal tem sido de grande valor para o teste clínico de novas drogas e vacinas (COBBOLD; METCALFE, 1994). No entanto, disponibilidade de ferramentas e reagentes para uso no estudo dos mecanismos imunopatológicos nestes modelos experimentais ainda é um tanto limitada.

(C) Infecção Murina

A infecção em modelos murinos tem sido caracterizada e varia de acordo com a espécie do parasito e a genética do hospedeiro (VON STEBUT et al., 2003; VON STEBUT; UDEY, 2004; ROSAS et al., 2005; ALEXANDER; BROMBACHER,

2012; VELASQUEZ et al., 2016; MUXEL et al., 2018). A progressividade da doença ocorre devido a imunidade celular prejudicada, com disfunção das células T, Mø ou ambos (KONG et al., 2017). A regulação da RI tem sido bem descrita em modelos de infecção por *L. major* com BALB/c, a qual é susceptível à infecção devido a explosão inicial de IL-4 que leva a progressão da doença. Já o C57BL/6 é resistente à infecção devido a resposta Th1 dominante, que leva ao controle da infecção (HIMMELRICH et al., 1998; VON STEBUT et al., 2003; VON STEBUT; UDEY, 2004; ALEXANDER; BROMBACHER, 2012; ROSSI; FASEL, 2018). Tais variações na infecção têm sido observadas como a diferença entre os tamanhos das lesões, as cargas parasitárias e as ativações celulares (SOONG, 1997; JI et al., 2002; VELASQUEZ et al., 2016).

Na infecção murina por *L. infantum/L. chagasi* e *L. donovani* ocorre o espalhamento sistêmico destas, com objetivo de se propagarem em Mø dos órgãos internos, como fígado, baço, medula óssea, linfonodos, diferentemente das espécies que causam a LC, que geralmente residem nos Mø da pele e de linfonodos drenantes da pele.

Após a infecção intravenosa ou intracardíaca (usando principalmente amastigotas), os parasitos multiplicam-se rapidamente no fígado nas primeiras semanas. A RI mediada por células controla o crescimento do parasito, como é observado na infecção em seres humanos, onde no baço murino é caracterizado por uma resposta mista (regulatória e inflamatória). É gerada uma produção elevada de IL-10 quanto de TNF- α no baço. TNF- α , responsável pelo desenvolvimento de imunidade protetora no fígado (SUNDAR et al., 2000), causa a destruição dos Møs da zona marginal e das células estromais GP38⁺, um subconjunto de células do estroma confinado à zona da célula T do baço de camundongos, e a IL-10 que prejudica a migração de CD para dentro das áreas de células T. O que leva o início de células T ineficientes e altera a função das células do baço, promovendo o desenvolvimento seletivo de CDs produtoras de IL-10 com propriedades imunomoduladoras (CARRIÓN, 2006; STANLEY; ENGWERDA, 2007).

L. amazonensis, que é agente etiológico de amplo espectro de leishmanioses nos países da América do Sul, pode causar a LCL, a LC e LV rara

(SILVEIRA et al., 2004). Para avaliar a relação do parasito-hospedeiro, como resistência e o controle genético de susceptibilidade, a resposta imune mediada por células e a interação parasito – Mø vem sendo realizado estudos experimentais com modelo murino (HANDMAN et al., 1979; SCOTT; FARRELL, 1998). Diversos estudos mostram que a polarização das respostas Th1/Th2, através da produção de IFN- γ pelas células Th1 em C57BL/6 (resistentes) e, da produção de IL-4 pelas células Th2 em BALB/c (suscetível), ajudaram a entender sobre os mecanismos de proteção e patogenicidade na infecção por *L. major* (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Camundongos das linhagens C57BL/6 e C57BL/10 desenvolvem lesões crônicas e metastáticas quando infectados com *L. amazonensis* (AFONSO; SCOTT, 1993; SOONG, 2012). Camundongos susceptíveis e resistentes à infecção por *L. amazonensis* não apresentam diferenciação polarizada Th1 e Th2 (AFONSO; SCOTT, 1993; SOONG et al., 1996). Outras espécies membros do complexo de *L. mexicana*, são capazes de formar enormes VP. Esses VP servem como "escudo", diluindo os efeitos leishmanicidas do NO e ROS em células infectadas (WILSON et al., 2008). Subtipos das populações de *Leishmania* podem apresentar assinaturas moleculares similares de células apoptóticas (apoptose-like), no qual expõe uma molécula que liga Anexina V em sua superfície, facilitando sua invasão e inibindo a produção de NO através da produção de TGF- β e IL-10 (De FREITAS BALANCO et al., 2001). As promastigotas de *L. amazonensis* são capazes de provocar ativação da CD, Mø, porém, o espectro de produção de citocinas são frequentemente muito mais baixos do que as desencadeadas por promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* (XIN et al., 2007; VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2008).

As linhagens puras de camundongos são geneticamente susceptíveis à *L. amazonensis*, no qual apresentam células que contêm VP, cargas parasitárias altas e, desenvolvem lesões que não cicatrizam progressivamente (SOONG et al., 1997), devido ao fato das células T CD4⁺ produzirem níveis baixos de IL-10, IL-17, IFN- γ , e outras citocinas (SOONG et al., 1997; XIN et al., 2007). As respostas mistas Th1/Th2, observadas nos camundongos infectados com *L. amazonensis*, são muito semelhantes às observadas em infecções humanas (SILVEIRA et al., 2009), confirmando a importância biológica do estudo de doenças humanas nesse

modelo murino. No modelo murinho, notou-se que as células Th1 que produzem IFN- γ podem ser fontes de IL-10, atuando como um mecanismo de auto regulação para minimizar a imunopatologia mediada pelas células T (ANDERSON et al., 2005).

Na infecção por *L. major* em BALB/c com CD8⁺ depletadas, durante a lesão curada, a frequência de IFN- γ produzido por TCD4⁺, e a quantidade de IFN- γ diminuídas resultou na maior carga do parasito (HERATH; KROPF; MULLER, 2003). E, em C57BL/6, a infecção com baixa dose de *L. major*, induziu uma resposta transitória do tipo Th2 pra Th1 associado à cura (ROSTAMI et al., 2010). A indução desse tipo de resposta Th1 depende, em partes, da ativação das células TCD8⁺ produtoras de IFN- γ e, na ausência de células TCD8⁺, a resposta Th2 é sustentada (UZONNA et al., 2004). Em ambos os modelos, TCD8⁺ tem sido mostrada como fonte de produção de IFN- γ , e contribui rapidamente para a cura da lesão secundária no qual é desenvolvida depois do desafio primário com *L. major* (MULLER et al., 1993) e no processo de cura de LC desenvolvida por *L. braziliensis* (COUTINHO et al., 1998; DA-CRUZ et al., 2002; 2005; BITTAR et al., 2007).

2.6 CONTROLE E PREVENÇÃO

Para controlar a dispersão da LV em países da América Latina (Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai) tem sido realizado medidas instituídas, como diagnóstico precoce e tratamento de casos humanos, controle do vetor utilizando sprays inseticidas, proteção individual e identificação e seleção de cães soropositivos (ECHENIQUE, 2010; BRASIL, 2006; PARAGUAY, 2011; URUGUAY, 2016). De acordo com o 3º encontro dos Programas Nacionais de Leishmaniose dos Países Prioritários da América, promovido pela Organização de Saúde Pan Americana (PAHO), foram recomendados controles e vigilâncias de *Leishmania* spp. mantidos em reservatórios, incluindo a eutanásia de cães (PAHO, 2015). A eutanásia é um método controverso e, experiências brasileiras têm mostrado que a seleção ampla (ex: a eliminação de 176.000 cães soropositivos durante 1990-1997) não foram associados com a redução dos

números de casos humanos e caninos da doença e infecção (DIETZE et al., 1997; COURTENAY et al., 2002; GRIMALDI et al., 2012; COURA-VITAL et al., 2014). Pelo contrário, o número total de casos em humanos nos países tem aumentado, e a doença se tornando um sério problema de saúde pública nos estados do Brasil (COSTA, 2011; BRASIL, 2017a). Porém, alguns autores ainda acreditam que a eutanásia de cães infectados diminuiria a incidência de casos de LV humana e canina (ASHFORD et al., 1998; COSTA et al., 2007; NUNES et al., 2010).

De acordo com Sundar e Olliaro (2007), outra dificuldade no controle é devido à grande diversidade biológica dos parasitos, à existência de muitas espécies de vetores e outros mamíferos que podem atuar como fontes de infecção, aos fatores socioeconômicos das populações afetadas, às diferentes formas clínicas da doença, incluindo aquelas formas graves e resistentes à quimioterapia, medicamentos de alto custo e com grande toxicidade para o hospedeiro e, ainda, à inexistência de uma vacina eficaz.

O uso de inseticidas, especialmente colares, pode reduzir o risco de infecção de cães por *L. infantum*. Essa medida pode ser integrada no programa de controle de LV (DANTAS-TORRES, 2009; DAVID et al., 2001; MIRÓ et al., 2008; OTRANTO; DANTAS-TORRES, 2013; REITHINGER et al., 2004). Um dos problemas do uso de colares é o alto preço destes e a situação socioeconômica do dono do animal, que geralmente vivem na zona rural ou suburbana (REITHINGER et al., 2004; DANTAS-TORRES, 2009).

Com isso, para que haja controle eficiente da doença, dos reservatórios e agentes etiológicos, é importante ter conhecimento da população afetada pelas leishmanioses. Deste modo, as ações são centradas no diagnóstico e tratamento precoce dos casos confirmados; redução da população de flebotomíneos; redução do contato homem–vetor; e atividades educativas em saúde (GONTIJO; CARVALHO, 2003; COSTA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

2.7 TRATAMENTO

Os fármacos utilizados até hoje como primeira linha de tratamento de LC e LV, em diversas partes do mundo, são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), que foram desenvolvidos em 1945. Eles existem sob duas formas: o antimoniato de N-metil-glucamina e o estibogluconato de sódio (este último não comercializado no Brasil). Porém, a LM exige maior cuidado, pois pode gerar respostas mais lentas e maior possibilidade de reincidência (GONTIJO; CARVALHO, 2003; TIUMAN et al., 2011). A OMS recomenda que a dose seja calculada em $mg/Sb^{+5}/Kg/dia$. No subcontinente indiano, eram aplicadas doses de 20 miligramas por kilo (mg/kg) de peso corporal de antimoniais, por 28 a 30 dias, como tratamento padrão de LV por muitas décadas. Porém, se tornou ineficaz, devido ao desenvolvimento de resistência (SUNDAR et al., 2000; RIJAL et al., 2003). Embora ele seja efetivo em alguns países, principalmente na África, ele é altamente tóxico, causando cardiotoxicidade na forma de arritmias cardíacas, batimentos ventriculares prematuros, taquicardia e fibrilação ventricular, dentre outros.

Os Sb^{+5} possuem ação leishmanicida, no qual são capazes de interferir na bioenergética das formas amastigotas *in vivo*, inibindo processos como glicólise e oxidação dos ácidos graxos. A inibição é acompanhada por redução de síntese de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP). Porém, estudos mostraram que essas drogas exercem pouco efeito sobre as formas promastigotas *in vitro* do parasito. Portanto, acredita-se que o antimonial pentavalente aja como um pró-fármaco, e que necessite da conversão *in vivo* de Sb^{+5} para Sb^{+3} , a sua forma ativa e mais tóxica, para que exerça ação leishmanicida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009).

Para tratamento de LC, são usados antimoniais por via intralesional (IL) (1-5 mL por sessão de 3-7 dias, de 1-5 infiltrações) e os sistêmicos (20 mg/kg for 20 dias para LC e 28-30 dias para LM); estes têm mostrado excelente taxa de cura na Arábia Saudita, Iraque, Turquia, SriLanka e Índia (SHARQUIE et al., 1988; TALLAB et al., 1996; UZUN et al., 2004; BUMB et al., 2010; RANAWAKA; WEERAKOON, 2010). A taxa de cura no Novo Mundo varia de 30-91%, dependendo da severidade da doença (FRANKE et al., 1990, 1994; LLANOS-CUENTAS et al., 1997; De OLIVEIRA-NETO et al., 2000), e foi observado que o

aumento da duração do tratamento, de 28 para 40 dias, não melhorou o resultado (FRANKE et al., 1994). Os antimoniais pentavalentes são usados na clínica há décadas, porém possuem inúmeras restrições, sendo contraindicados para gestantes, pacientes acima de 50 anos, pacientes co-infectados com o vírus HIV, e portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias ou doença de Chagas. Estes fármacos são extremamente tóxicos, pois são retidos nos tecidos, e os efeitos adversos incluem: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pancreatite, febre, entre outros. A cardio, nefro e hepatotoxicidade constituem uma importante limitação à sua segurança (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Se não houver resposta satisfatória ao tratamento ou não seja possível o uso, são adotadas drogas de segunda escolha, tais como, anfotericina B e as pentamidinas. Esses fármacos, apesar de serem eficazes, apresentam elevada toxicidade e são administrados pela via parenteral, o que limita seu uso clínico (LIMA et al., 2007)

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que possui ação leishmanicida, agindo sobre as formas amastigotas *in vivo* de *Leishmania*, por ter alta afinidade por esteróis da membrana plasmática do parasito (ergosterol ou seu precursor, episterol), causando alterações na permeabilidade da membrana através da formação de poros, e por fim, a sua morte (MISHRA, SAXENA; SINGH, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

É considerada eficaz na LM, e sua administração é feita por via intravenosa (IV), com dose de 1 mg/Kg/dia, em dias alternados, dado gota a gota, com 4 horas de infusão. Devido a esses processos, é necessário pessoas treinadas e ambiente hospitalar. Por serem altamente tóxicos, os efeitos colaterais mais comuns são: febre, náuseas, vômitos, anorexia, hipopotassemia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; GONTIJO; CARVALHO, 2003). Para minimizar esses efeitos adversos, formulações lipídicas de drogas foram introduzidas, no qual o desoxicolato é substituído por outros lipídeos. Essas novas formulações são rapidamente absorvidas pelos órgãos, tais como fígado, baço, e concentrado no tecido reticuloendotelial, no qual é o local da LV; e então essas drogas são capazes de distribuir largas doses em um período curto de tempo. Três

formulações têm sido testadas, anfotericina B lipossomal (comercializada sob o nome Ambisome[®], Gilead Sciences; L-AmB), complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet[®], Enzon pharmaceuticals) e dispersão coloidal de anfotericina B (Amphocil[®], InterMune Corp). Porém, esses fármacos são extremamente caros, o que torna seu uso inviável na maioria dos países (SUNDAR et al., 2010).

Uma segunda linha de tratamento contra a leishmaniose desde 1939 são os dois tipos de pentamidinas, o isotionato e o mesilato de pentamidina (este último não é comercializado no Brasil). David e Craft (2009) mostrou que um dos possíveis mecanismos de ação é a modificação morfológica do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial e a interferência na síntese de DNA. A administração é feita pelas vias IM ou IV, e a dose recomendada é de 4 mg/Kg/dia, em dias alternados, com duração de 3 – 4 semanas. Por exercerem ação no metabolismo da glicose, estes fármacos podem causar hipoglicemia seguida de hiperglicemia e indução de citólise das células β do pâncreas, levando ao aparecimento de diabetes insulino-dependente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; MISHRA, SAXENA; SINGH, 2007). Este tipo apresenta alta toxicidade e efeitos adversos, como anorexia, astenia, náuseas, vômitos, mialgia, cefaleia, hipotensão, taquicardia, insuficiência renal, hipoglicemia e hiperglicemia. É recomendando que pacientes tratados com pentamidinas tenham a dosagem da glicemia medida antes de cada administração da droga (BLUM et al., 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007, 2014).

Todos os medicamentos acima citados podem ser usados para o tratamento convencional para leishmaniose, porém, por serem injetáveis, eles possuem um alto custo de administração, pois além de pessoas qualificadas, necessitam de material adequado. Muitas pacientes abandonam o tratamento, devido ao longo período terapêutico, e a toxicidade que estes apresentam, o que favorece o surgimento de cepas resistentes. Por esse fato, cada vez mais vem se estudando novos tratamentos alternativos e novas formulações.

A miltefosina, que foi inicialmente desenvolvida como droga anticâncer e foi usada em tratamentos de LV na Índia, onde pacientes apresentaram taxa de curas de 94%. Entretanto, décadas depois, o uso no país, mostrou vários casos de recorrência e diminuição da eficácia do tratamento (SUNDAR et al., 2012). Tornou-se o primeiro fármaco por via oral usado no tratamento contra a

leishmaniose, com doses de 2.5 mg/kg/dia por 28 dias. Há diversos estudos da atividade terapêutica da Miltefosina (www.clinicaltrials.gov, consultado em 27/05/2020 às 16:28).

O uso deste em pacientes com LC no Brasil, onde apresentou uma taxa de cura inicial e final, e cicatrização completa da úlcera, 2 e 6 meses após o tratamento, que durou 20 dias (Fase III concluída em fevereiro de 2020) (MACHADO et al., 2020). No estudo em pacientes com LC no Novo Mundo, apresentou taxa de cura inicial, 90 dias após o início do tratamento, com 100% da re-epitelização da lesão, e cura final após 180 dias do tratamento, porém com alta frequência e severidade de estenose aórtica (AE), no dia 45 (VELEZ; LLANOS-CUENTAS, 2019). O uso em pacientes com LV no Brasil, no qual apresentou taxa de cura no 6º mês (Fase I e II concluída em outubro 2007) (DIETZE, 2007). O Uso em pacientes com LM (Fase II concluída em 2014), que mostrou cura, com re-epitelização de úlceras mucosas ou regressão dos sintomas, porém apresentou efeitos adversos no período de 6 meses (SILVA; SAMPAIO, 2015).

O mecanismo de ação da Miltefosina não é totalmente conhecido, mas acredita-se estar envolvido com danos à membrana flagelar, interferência no metabolismo de alquil-fosfolipídios, e indução à morte do parasito por apoptose (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007). Os efeitos colaterais geralmente são menos severos, reversíveis e associados ao trato gastrointestinal, como náuseas, vômitos e diarreia. A principal limitação é o uso por mulheres grávidas ou em idade fértil, devido ao seu potencial teratogênico (MONZOTE, 2009; WHO, 2010).

Outro medicamento em estudo é a paramomicina, que apresenta atividade leishmanicida para LC e LV, mas possui pobre absorção por via oral, então foi-se necessário o desenvolvimento de formulações tópica no tratamento da LC e por via parenteral no tratamento da LV (CROFT; YARDLEY; KENDRICK, 2002; TIUMAN et al., 2011). Este envolve inibição da síntese protéica e alterações na permeabilidade da membrana do parasito, como mecanismo de ação. Porém, para tratar a LC, a paramomicina deve ser associada a outros fármacos, pois sozinha não apresenta eficácia. Então, novos estudos vêm associando a paramomicina, como:

Uso da paramomicina com gentamicina em pacientes com LC no Peru, aplicada por 20 dias na lesão, que mostrou a cura da lesão clínica inicial e final, e 100% da re-epitelização no dia 63 do tratamento (Fase II concluída em 2011) (RAVIS et al., 2013). No Panamá, a fase II foi concluída em 2011, onde mais de 50% apresentaram cura e re-epitelização no dia 63, e 100% no dia 100 (RAVIS et al., 2013).

Em paciente com LV, a fase III concluída em 2007, com tratamento por 21 dias, via IM, mostrou cura final 6 meses após o final do tratamento, e a cura inicial no final do tratamento (SUNDAR et al., 2007). E fase IV, concluída em 2010, mostrou que esse fármaco apresenta resultados semelhantes à anfotericina B (SUNDAR et al., 2009).

O uso da miltefosina com a paramomicina em LV em pacientes no leste da África, apresentou uma cura definitiva após 6 meses de acompanhamento (Fase III concluída em 2019). A cura inicial se deu após 28 de tratamento, no qual o paciente não apresentou sintomas, sinais e ausência de parasitos na microscopia. Porém, apresentou efeitos adversos desde o início do tratamento até o dia 210, como frequência de encefalomielite autoimune experimental (EAE) e EA, que requerem a descontinuação do tratamento (MBUI et al., 2019).

Ainda que estas associações tenham mostrado resultados variáveis, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da situação epidemiológica, torna-se clara a necessidade de mais pesquisas na área (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; MONZOTE, 2009).

O sitamaquine é um antileishmanicida oral que está em fase III na Índia e Quênia, para LV. Com doses de 1.75 a 2 mg/kg/dia por 28 dias, apresentando de 89-100% de cura, respectivamente, ou 2 mg/kg/dia por 21 dias apresentou 85% de cura (PENICHE et al., 2015; PATTERSON et al., 2016).

Os derivados azólicos tem sido utilizado em LC. O uso oral de 200 mg/dia de fluconazol para *L. major* do Velho Mundo, por 6 semanas, apresentou taxa de cura de 44-59%, e efeitos adversos como sintomas gastrointestinais e hepatotoxicidade (MEISSNER et al., 2003; PINTO et al., 2014). No Novo mundo, para *L. braziliensis*, a dose foi de 5-8 mg/kg de 4-12 dias, mostrou de 75-100% de cura (KOUTINAS et al., 2001). Porém, estudos randômicos recentes controlou a infecção da *L. braziliensis* no Brazil, com uso de fluconazol de 6.5-8

mg/dia, por 28 dias, mostrou 22% de taxa de cura, comparada com antimonial que foi 53% (VELEZ et al., 1997). O itraconazol mostrou taxa de cura de 60% para *L. braziliensis* no Brasil, com doses de 4 mg/kg/dia por 5 semanas, enquanto no Equador foi de 23% depois de 12 semanas de tratamento (KROLEWIECKI et al., 2007). Cetoconazol mostrou eficácia no Kuwait e ineficiência na Turquia, mesmo com o uso de 600 mg/dia para adultos e 10 mg/dia/kg pra crianças, com duração de 4-6 meses. No novo mundo, apresentou eficácia de 76-89% na LC causada pela *L. panamensis* e *L. mexicana* na Guatemala e Panamá, mas não efetivo para *L. braziliensis* (SALMANPOUR et al., 2001; EL-SAYED; ANWAR, 2010).

Outros fármacos como nitroimidazoles, terapias locais, combinações de terapias com múltiplas drogas, tem sido realizada. Os resultados variaram dependendo da espécie do parasito envolvida, o que mostra a necessidade de mais estudos.

De acordo com a Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, o tratamento da LVC pode ser feito com uso do Milteforan, SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL. O licenciamento deste medicamento foi emitido respeitando-se as determinações da Portaria Interministerial n°1.426 de 11 de julho de 2008, que regulamenta o tratamento de cães, no qual proíbe o tratamento da LV com produtos de uso humano ou não registrados no MAPA. O Ministério da Saúde emitiu um Parecer Técnico, no qual explica que a Miltefosina, que o princípio ativo do Milteforan, não é uma droga utilizada para o tratamento da doença em humanos no Brasil e, de acordo com as evidências científicas geradas até a data da Nota Técnica, não apresenta eficácia para ser utilizada no protocolo terapêutico da LV. E, o tratamento de cães com LVC não é uma medida de saúde pública para controle da doença e, portanto, trata-se única e exclusivamente, de caráter individual, de uma escolha do proprietário do animal (MAPA, 2016).

2.6 TESTES DIAGNÓSTICOS

Em países desenvolvidos, cães infectados são sujeitos a diferentes protocolos de tratamento que melhora a condição clínica, mas não elimina o parasito. Nos países em desenvolvimento, a eutanásia de cães infectados é recomendada como medida de controle da doença, gerando conflitos éticos e sociais (NUNES et al., 2010; PASSANTINO et al., 2010; REGUERA et al., 2016). Algumas das técnicas de diagnósticos utilizadas em LVC, LVH e LCH são abordagens moleculares e sorológicas.

A sensibilidade analítica de testes moleculares sugere que eles podem detectar entre 0.001 e 0.1 parasitos/reações (FRANCINO et al., 2006; CARSON et al., 2010; CASTELLANOS-GONZALEZ et al., 2015; GAO et al., 2015). No entanto, a eficácia diagnóstica depende do estágio de infecção no hospedeiro vertebrado, que de acordo com as diretrizes da OMS, foram estabelecidas categorias, como oligossintomáticos ou polissintomáticos de acordo com o número de sinais de LVC, e sintomáticos pode variar entre os estudos, sendo difícil de comparar os resultados. Alguns testes moleculares podem ser utilizados no diagnóstico de leishmaniose, utilizando fontes de amostras, no qual as amostras biológicas a serem testadas têm uma influência significativa na capacidade de testes moleculares para identificar cães infectados. Amostras da medula óssea e de linfonodo produzem melhores resultados positivos comparado com outras amostras biológicas, independentemente do quadro clínico do animal (LOMBARDO et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013). Métodos de diagnóstico menos invasivos e sensíveis, como distender o “swab” na conjuntiva e mucosa oral ou focinho permitiu detectar maior carga parasitária que no sangue (STRAUSS-AYALI et al., 2004; LEITE et al., 2010; LOMBARDO et al., 2012; ASCHAR et al., 2016). Utilização de ITS-1 cPCR ou kDNA PCR híbrido mostrou que 91-92% de cães infectados naturalmente foram positivos em amostras de conjuntivas (STRAUSS-AYALI et al., 2004; FERREIRA et al., 2008). No entanto, os resultados dependem do estágio da infecção.

A detecção do parasito alvo utilizando mini-DNAs circulares contidos no kinetoplasta do DNA da *Leishmania* (kDNA) tem sido a base para a maioria dos testes moleculares, destinados a detectar espécies de *Leishmania*. Embora outros alvos têm sido utilizados, como o “espaçador transcrito interno-1” (ITS-1), o RNA ribossomal (rRNA) 18S e a glicoproteína-63 (gp-63) (RODGERS,

POPPER; WIRTH, 1990; GUERBOUJ et al., 2014; AKHOUNDI et al., 2017). A especificidade de testes moleculares varia de 95-100% (STRAUSS-AYALI et al., 2004; MOREIRA et al., 2007; CARSON et al., 2010; MOHAMMADIHA et al., 2013). Muitos estudos têm mostrado que o kDNA-baseado na reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional (cPCR) tem sensibilidade de 89-100% em amostras de sangue de cães polissintomáticos (CARSON et al., 2010; LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004). Porém, a sensibilidade diminui quando o método é aplicado em amostras de cães sem sinais clínicos (FRANCINO et al., 2006; GAO et al., 2015). A PCR quantitativa (qPCR) é considerado o método mais confiável devido à alta sensibilidade que apresenta. Alguns testes mostraram que o qPCR é mais sensível (91%) que o kDNA cPCR (72%), o ITS-1 PCR (54%), o teste-OligoC (70%), e o PCR híbrido (61%) (CARSON et al., 2010). E alguns estudos, quando material biológico usado é a medula óssea, o qPCR (TaqMan) foi capaz de detectar 0,2 parasito/mL (FRANCINO et al., 2006). Um teste rápido de qPCR de baixo custo foi otimizado pela redução dos volumes de reação e tempo de amplificação do DNA. O teste amplificou *L. infantum* ou *L. braziliensis* com boa sensibilidade (0.002 parasito/mL) (DANTAS-TORRES et al., 2017). Já os métodos para detecção usando PCR em tempo real (RT-PCR) são classificados em dois principais grupos, de acordo com o agente fluorescente usado na reação (NAVARRO et al., 2015), agentes intercalantes de DNA de fita dupla, como SYBR Green I, ou fluoróforos ligados a oligonucleotídeos (sondas) que detectam apenas produtos de amplificação de PCR específicos, como sondas TaqMan ou LightCycler (COPOLILLO et al., 2018). Weirather (2011) padronizou vários ensaios de RT-PCR para detectar, quantificar e genotipar todas as espécies de *Leishmania* de amostras clínicas e experimental de humanos e parasitas. No qual analisaram 41 primers específicos para *Leishmania*, e destes, pelo menos 3 ensaios seriados de RT-PCR para detectar/quantificar, e realizar a identificação do parasita em amostras de soro de pacientes com LV ou espécimes de biópsias de lesões de LC (COPOLILLO et al., 2018).

“New point-of-care” (**POC**): métodos POC utiliza polimerases capazes de amplificar DNA em temperaturas constantes, não requer equipamentos

sofisticados ou pessoas altamente qualificadas para realizar os testes. A amplificação mediada por loop (LAMP) (Eiken Chemical Company, Tokyo, Japan) usa a DNA polimerase com atividade de deslocamento de fita e quatro iniciadores que reconhecem seis regiões diferentes de DNA, tornando-a altamente específica (MORI; NOTOMI, 2009). Esse método é previsto pra ser avaliado com amostras de sangue de pacientes com LV (*L. donovani*) com sensibilidade de 90.7-96.4% e especificidade 98.5-100% (KHAN et al., 2012; VERMA et al., 2013). Na China, o LAMP em amostras conjuntivais, identificou 61% dos cães infectados, que foi similar ao cPCR (58,6%), e significativamente maior que microscopia (10,8%) e ELISA (40,5%) (GAO et al., 2015). Entretanto, esses iniciadores de kDNA projetados a partir de uma linhagem de *L. infantum* isolada na China não amplificaram linhagens de outros países. Ainda é necessária uma tipificação adicional dessas cepas usando métodos padrão (TRAVI et al., 2018).

A soroconversão para antígenos de parasitos geralmente ocorre um mês após a picada infectiva do flebotomíneo (MORENO; ALVAR, 2002). LVC ativa é usualmente significativamente associada com os títulos de anticorpos de todas as classes, e baixos níveis de anticorpos são característicos de infecções subclínicas ou cães expostos ao parasito, mas não infectados (SARIDOMICHELAKIS, 2009). Estudos mostraram que altos níveis de imunoglobulina G2 (IgG2) estava associado com resposta protetiva, enquanto baixa produção de IgG1 foi considerada como prognóstico ruim (INIESTA et al., 2005). As imunoglobulinas IgE e IgA têm sido detectadas em LVC ativa, mas com baixo valor preditivo em cães assintomáticos (INIESTA et al., 2005; REIS et al., 2006; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007). Os testes sorológicos envolvem o parasito bruto, extratos de parasitos solúveis, ou proteínas recombinantes derivados do gene de interesse, e esses tem mostrado a capacidade de detectar anticorpos específicos durante a doença ativa ou infecção assintomática (METTLER et al., 2005; PALTRINIERI et al., 2010).

Outros tipos de testes são utilizados, como testes sorológicos, que podem ser feitos por teste de aglutinação direta (DAT), no qual é baseado na aglutinação de promastigotas de *Leishmania* tripsinizadas, coradas com Coomassie. Esse foi o primeiro teste sorológico desenvolvido para tal uso. É

simples, barato, e realizável, com acurácia clínica comprovada (SOUSA et al., 2011; ADAMS et al., 2012). Além disso, pode ser usada em laboratórios, não requer equipamentos elétricos, e possui 2 anos de vida útil. Em contrapartida o DAT tem longos períodos de incubação e requer pessoas especializadas para realizar e ler o teste (ADAMS et al., 2012; GÓMEZ-OCHOA et al., 2003). Apresenta sensibilidade e especificidade de 91-100% e 72-100%, respectivamente. Contudo, a leitura subjetiva dos títulos de ponto final leva a discrepância entre os responsáveis pela leitura do exame (ADAMS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016). Apesar dessas desvantagens, o DAT é bem aceito como teste de rotina geralmente aplicado a um grande número de amostras (SCHALLIG et al., 2002)

O teste rápido de rastreio de aglutinação (FAST) é o DAT modificado, baseado em diluições simples do soro acima do “cut-off” do soro controle negativo. O teste requer menor tempo de incubação e tem sido otimizado para rastreio em populações de cães (SCHALLIG et al., 2002).

Já o teste de anticorpos para imunofluorescência (IFAT) é o teste de referência qualitativa contra promastigotas em diagnósticos de LVC (PALTRINIERI et al., 2016). Tem especificidade e sensibilidade próximo de 100% em animais sintomáticos, porém, apresenta reação cruzada com outros patógenos tripassomatídeos, como *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *R. conorii* and *T. gondii* (SOLANO-GALLEGO et al., 2014; PALTRINIERI et al., 2016), e tem menor sensibilidade para identificar cães assintomáticos comparado com o teste de ensaio de imunoabsorção (ELISA). É restrito em laboratórios pois precisa de equipamentos especializados e pessoas treinadas para a realização do exame (SOLANO-GALLEGO et al., 2014).

A Citometria de fluxo que é uma tecnologia (GOETZMAN, 1993) que quantifica anticorpos contra antígenos de *Leishmania* na superfície, evitando reatividade cruzada contra estruturas intracelulares mais conservadas. Usa pro ou amastigotas, apresenta alta sensibilidade e especificidade, e tem sido capaz de distinguir perfis sorológicos de cães infectados e saudáveis (SILVESTRE et al., 2008).

Com objetivo de melhorar a sensibilidade e especificidade dos testes para leishmaniose, principalmente para LV, cada vez mais vem se estudado e

utilizando métodos sorológicos para detectar anticorpos com vários antígenos, incluindo proteínas recombinantes, peptídeos sintéticos e proteínas com multiepítomos (COSTA et al., 2011; FARIA et al., 2011; FARIA et al., 2015; MENDES et al., 2017; RIBEIRO et al., 2018). O mais conhecido dos antígenos é a proteína recombinante K39 (rK39), no qual é constantemente utilizadas para sorodiagnóstico de LV e LVC em vários países, como o uso de métodos já citados anteriormente, de aglutinação látex (KAtex - Kalon Biological Limited, USA), o DAT ou teste rápido de imunocromatografia (rK39 - In Bios, USA) (SINGH et al., 2010). Esses métodos mostraram a sensibilidade de 87-98% e especificidade de 89-98%. No entanto, a validação para detecção de casos de infecção por *L. infantum* tem variado de acordo a proteína recombinante, e variabilidade clínica e sorológica dos pacientes, além da variabilidade genética observada entre diferentes cepas da mesma espécie, principalmente quando isoladas de locais distantes (ZIJLSTRA et al., 2001; SINGH et al., 2010). Isso mostra a necessidade urgente de melhora dos testes sorológicos atuais para o diagnóstico de LV e para LVC. Para isso, cada vez mais vem se estudando a bioinformática, pois essa tem sido usada para descoberta de novos antígenos, mais sensíveis e específicos (COSTA et al., 2011; MENDES et al., 2017). A estratégia é baseada em análise *in silico* de sequências de proteínas para prever epítomos de células B. Com isso, vários antígenos, peptídeos, proteínas recombinantes e proteína quimera foram obtidas para uso diagnóstico de LV e LVC (FARIA et al., 2011; RIBEIRO et al., 2018). Assim, usa-se o conhecimento em imunoinformática para descoberta de novos alvos para diagnósticos de doenças infecciosas (TOLEDO-MACHADO et al., 2015a; 2015a; COSTA DUARTE et al., 2016; LAGE et al., 2016).

Já o isolamento do parasito de *Leishmania* em cultura é feita a partir do cultivo *in vitro* de promastigostas de aspirados dos órgãos, raspado da lesão ou biópsia são importantes para a rotina diagnóstica. A recuperação do parasito em cultura raramente é mais que 70% de eficiência, e é um método demorado, caro, requer instalações sofisticadas de laboratório (BERMAN, 1997). A partir da cultura, é possível fazer a detecção de amastigotas por microscopia, que é o teste padrão ouro segundo o Ministério da Saúde. Porém, este não é prático para ser usado em larga escala. Esse método é utilizado para diagnóstico de lesões

de LC, e aspirados de fígado, medula óssea e linfonodos para LV (AKHOUNDI et al., 2017). É um método rápido e barato, porém invasivo, e não é possível diferenciar a espécie de *Leishmania* e quantificar esta. A sensibilidade é alta dependendo do número e dispersão dos parasitos na biópsia, bem como o processamento da amostra e dos profissionais que a executaram. A grande maioria desses testes não são efetivos em LV humana, devido a diferença na RI entre humanos (GOMES et al., 2008; ROMERO; BOELAERT, 2010; SRIVASTAVA et al., 2011; MAIA et al., 2008; SRIVIDYA et al., 2012).

São feitos também testes dérmicos, como o teste de Montenegro que mede a reação de hipersensibilidade tardia (DTH). No caso de positividade há a reação de endurecimento a uma injeção intradérmica no antebraço de uma suspensão de promastigotas mortas de *Leishmania*. A reação é comparada com a endurecimento no local de aplicação de um controle negativo, que é injeção de salina fenolada. É um teste importante devido a sua simplicidade, sensibilidade e especificidade mas não permite discriminar qual a espécie do parasito que causou a infecção (WEIGLE et al., 1991).

O teste rápido de duplo caminho (Tr-DPP) é um teste rápido para diagnóstico da LVC e usa uma plataforma de caminho duplo (DPP®) (Bio-Manguinhos / Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil), para detectar anticorpos contra a proteína de fusão rK26 / rK39. O dispositivo pronto para uso descartável tem potencial aplicabilidade em massa (GREENWALD et al., 2009). O teste foi avaliado usando um painel de soros cães considerado verdadeiramente positivo para o parasito, cães negativos e reativo cruzado. Os resultados indicam que o kit DPP® LVC é improvável que seja sensível o suficiente para detectar animais assintomáticos portadores de *L. infantum*, mas pode ser útil por confirmar casos clinicamente suspeitos devido à sua alta especificidade em cães com sinais clínicos (GRIMALDI et al., 2012).

Diversos antígenos vêm sendo estudados ao longo dos anos, um dos principais e mais estudados é o antígeno rK39, que é uma proteína recombinante derivada de *L. infantum* no qual contém 6.5 cópias do epítipo antigênico de célula B composto por 39 aminoácidos. Esse antígeno é uma proteína motora, a cinesina, bem conservada em *L. infantum* e *L. donovani*, e o gene correspondente revela uma única estrutura de leitura aberta que codifica um total

de 298 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 32,7 kDa (BURNS et al., 1993). A proteína motora de *Leishmania* está envolvida em vários processos intracelulares e nas amastigostas de muitas espécies.

A produção da proteína antigênica de *Leishmania*, por expressão heteróloga desses epítomos específicos no sistema procariótico, tais como *Escherichia coli* é uma técnica relativamente direta, barata e rápida para processar a proteína recombinante alvo. O protozoário *L. tarentolae*, a qual não é patogênico para humanos e outros vertebrados, tem sido explorado como hospedeiro eucariótico para desenvolver a plataforma que permite que o complexo de proteínas eucarióticas sejam altamente expressa, e tenham habilidade de produzir proteínas com processamento pós-traducional apropriado (BASILE; PETICCA, 2009). Utilizando esse processo, foi desenvolvida a proteína recombinante Lbk39, a qual foi utilizada no presente estudo.

A Lbk39 é um fragmento gênico do gene relacionado à cinesina de *L. braziliensis* (Burns et al., 1993), constituída por 843 pb, 6,5x repetições de 39 aminoácidos (aa), e codifica aa imunológicos repetitivos. Este fragmento foi inserido no vetor recombinante pLEXSY-sat2 (Bioscience Jena). Esse vetor foi transfectado dentro da *L.tarentolae* (de SOUZA et al., 2019). A Lbk39 utilizada como antígeno na detecção de leishmaniose humana no Brasil, apresentou 88% de sensibilidade e 98% de especificidade para LC, comparada com 98% de sensibilidade e 100% de especificidade para LV (de SOUZA et al., 2019).

Os antígenos também podem ser usados para sorodiagnósticos. Esses métodos que utilizam como antígeno o extrato bruto do parasito são altamente sensíveis para detectar infecções clínicas e subclínicas. Porém, têm menor especificidade que os outros métodos que utilizam antígenos purificados (GÓMEZ-OCHOA et al., 2003; RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2010). Proteínas recombinantes são boas candidatas para serem utilizadas como antígenos porque elas são facilmente absorvidas em várias superfícies (LAURICELLA et al., 2016; PATTABHI et al., 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2014; VENTURIN et al., 2015). A proteína rK39 tem sensibilidade de 90-100% em LVC na região Mediterrânea e África do Sul (BADARÓ et al., 1996; OZENSOY et al., 1998; RHALEM et al., 1999; SCALONE et al., 2002), mas é menos específico e

sensível em infecções assintomáticas e em leishmaniose humana (BADARÓ et al., 1996; RHALEM et al., 1999).

Além deste, também é utilizado o ensaio de imunoabsorção enzimática, conhecido como ELISA, que permite o *screening* de grandes números de amostras utilizando antígenos sensibilizados em microplacas, e espectrometria que determina títulos de anticorpos por densidade óptica. A sensibilidade e praticidade dos sistemas de ELISA são também evidentes nos testes de detecção de IgG, pois muitos soros podem ser testados em um único dia em pequenas quantidades e sem tratamento prévio das amostras. Duas variações do teste ELISA IgG têm sido descritas na espécie humana, Chungue et al. (1989) usaram um ensaio de captura para mensurar anticorpos IgG semelhante ao sistema utilizado para detecção de IgM; outro sistema mais sensível foi desenvolvido por Kuno et al. (1991) onde o antígeno é adsorvido diretamente na placa, sempre usando um anticorpo de captura. O potencial para quantificação absoluta de anticorpos torna o ELISA uma ferramenta poderosa e menos suscetível ao viés do operador. Um de seus pontos fortes é a possibilidade de usar combinações de vários antígenos, aumentando assim a sensibilidade e/ou especificidade do método (SOTO et al., 1998; SANTARÉM et al., 2010). No Brasil é utilizado o teste rápido rK39 que tem especificidade menor que 80% quando comparado com o teste ELISA convencional (MOHEBALI et al., 2004). A variância da eficácia de testes com rK39 é vista em regiões endêmicas e levou a busca de melhores alternativas para avaliar LVC ativa e em infecções assintomáticas. Exemplo disso são os rKLO8 e rK26, que foram propostos como antígenos capazes de aumentar a precisão diagnóstica da LVC (ABAD et al., 2017), que em conjunto, aumentou para 85% a sensibilidade e 93% a especificidade. Proteínas com multi-epítomos têm sido utilizadas para detecção de cães parasitados mas sem sinais clínicos. No ELISA, proteínas têm apresentado em torno de 100% de sensibilidade e especificidade em amostras de cães doentes e saudáveis infectados com *L. infantum*. Kits comerciais, usados em humanos e cães, empregam os antígenos recombinantes como rK39, rK26 e rKE16 (da COSTA et al., 2003; FARAHMAND et al., 2015), e podem ser avaliados os anticorpos em diferentes tipos de fluídos biológicos, como plasma, soro, sangue total. Estes testes apresentam alta especificidade (90%) e variada

sensibilidade (30 a 90%) (REITHINGER et al., 2002; METTLER et al., 2005; LAURENTI et al., 2014; FARAHMAND et al., 2015). Todavia, o diagnóstico em humanos é menos satisfatório que em cães (MAIA et al., 2012; QUINNELL et al., 2013).

2.9 TIPOS DE VACINAS

A maioria das vacinas que são utilizadas hoje em dia são ou inativadas ou viva atenuada, e tais tem obtido sucesso em diversas doenças humanas e veterinárias. Entretanto, ambas as tecnologias têm suas limitações e problemas associados. Existem diversos tipos de vacinas, como explicadas a seguir.

2.9.1 Vacinas inativadas

Esse tipo deve ser totalmente inócua e não infecciosas. Problemas com surtos de campo no passado foram ocasionalmente atribuídos à inativação incompleta. Tais problemas não deveriam e não existiriam se mais procedimento de inativação, de ativação e testes de inóculo fossem usados dentro do processo de fabricação da vacina. Além da produção envolver grandes quantidades de culturas do agente infeccioso, há risco potencial para o pessoal envolvido e o meio ambiente. As vacinas que são cultivadas em ovos, culturas de tecidos ou meio de cultura podem conter proteínas “estranhas” indesejáveis, que podem afetar a imunogenicidade ou ser potencialmente alergênicas/reatogênicas. Ou seja, este tipo de vacina tem certas limitações em seu modelo de apresentação, a resposta pode ser limitada ou de curta duração, e requer o uso de adjuvantes ou imunoestimulantes para aumentar sua eficácia/imunogenicidade (FRANCIS et al., 2020).

2.9.2 Vacinas atenuadas

Estas são precisamente controladas e caracterizadas a fim de promover o nível requerido de imunidade protetora sem causar sintomas significantes da doença no animal hospedeiro. Há baixo risco de antígeno atenuado se transformar em virulento, e reversão cuidadosa aos estudos de segurança de virulência devem ser realizadas. Além disso, no cultivo do antígeno vacinal, é possível que outros agentes infecciosos possam ser introduzidos, o que pode levar a efeitos colaterais indesejados, quando a vacina for usada em campo. Por esses e outros motivos, incluindo eficácia protetora, economia de manufatura, e se o agente infeccioso possa ser produzido *in vitro*, cada vez mais tem se dado atenção a novas tecnologias vacinais (FRANCIS et al., 2020). Essas podem se destacar em vacinas de subunidades e separação dos produtos naturais, vacinas de ácido nucléicos, vacinas de proteínas e subunidade recombinante

2.9.3 Vacinas de subunidades e separação dos produtos naturais

Ao identificar antígenos adequados de subunidades, proteínas ou peptídeos como candidatos a vacinas, devem ser entregues aos animais alvo a fim de obter resposta imune protetora desejada. A forma mais simples e básica da vacina de subunidade é a qual o agente infeccioso teve seus componentes divididos, tendo como exemplo a vacina de influenza. Esta consiste no vírus inativado com formalina que foi tratado para lisar o envelope viral e liberar as proteínas externas deste envelope e as proteínas nucleares e matriciais internas. Porém, essa vacina apresenta imunogenicidade reduzida comparada com produtos virais inteiros. Como alternativas para tentar uma melhoria, foi modificada a apresentação do antígeno, fornecendo glicoproteínas virais nas vesículas lipídicas, que podem ser compostas por lipídeos derivados de vírus (virossomas) ou não virais (lipossomas) (ALMEIDA et al., 1975). Assim, podem ser criados vírus vazios que podem exibir melhor imunogenicidade. Vem sendo feitas preparações poliméricas de proteínas isoladas na forma de micelas, que são mais imunogênicas do que monômeros de proteínas (MOREIN; SIMONS, 1985), estas são conhecidas como partículas semelhantes a vírus (VLPs) (CRISCI et al., 2013). O complexo imunoestimulador (ISCOM) tem sido

desenvolvido oferecendo polímeros para apresentação e atividade adjuvante incorporada (MOREIN et al., 1984), esse tipo teve sucesso na vacina contra influenza equina (MUMFORD et al., 1994), com administração em mucosa. Outro exemplo de vacinas divididas em produtos e subunidade de cultura é a utilizada contra o vírus da leucemia felina (FeLV) (OSTERHAUS et al., 1985).

2.9.4 Vacinas de ácido nucléicos

Estas utilizam técnicas baseadas em DNA clonado dentro de um plasmídeo ou a direta injeção de RNA mensageiro. Esse tipo de vacina é produzido de maneira econômica, e a síntese proteica endógena simula uma infecção natural. Assim, os antígenos são apresentados em sua forma nativa, desencadearão respostas de tipo MHC I e MHC II, bem como respostas de anticorpos, não há risco de infecção e podem ser usadas para contornar a imunidade (DONNELLY et al., 1997). A primeira vacina licenciada dessa tecnologia foi em 2005, para o controle da doença infecciosa do vírus da necrose hematopoiética no salmão do Atlântico canadense (TONHEIM et al., 2008), e para o vírus do Nilo Ocidental em cavalos (LEDGERWOOD et al., 2011).

2.9.5 Vacinas de proteínas e subunidade recombinante

São vacinas produzidas utilizando alta expressão de proteínas recuperadas de *E. coli* geneticamente modificadas, que fornecem uma ligação entre vacinas de subunidades naturais e aquelas derivadas usando a tecnologia do DNA recombinante. De fato, uma vez identificadas as proteínas imunogênicas, tornam-se objetivo de muitos pesquisadores, no qual desejam produzir grandes quantidades dessas proteínas em uma forma suficientemente pura para gerar vacinas seguras e eficazes. A técnica de DNA recombinante fornece uma fonte relativamente inesgotável e barata de proteínas do agente infeccioso, e podem ser expressas em bactérias (vacina contra FeLV), fungos (vacina contra hepatite B humana), célula de inseto (vacina contra circovírus suíno tipo 2 (MARTELLI et al., 2011) e peste suína clássica (ROMERO et al., 2001), células de mamíferos (contra diarreia viral bovina) (THOMAS et al., 2009) e CSF (HUA et al., 2014b;

2014b), VLPs para encefalite japonesa (HUA et al., 2014), célula de planta (contra a infecção pelo vírus de Newcastle em aves) (VERMIJ; WALTZ, 2006) e sendo investigada para aplicação em bronquite viral, doença infecciosa da bolsa (também conhecida como doença de Gumboro), vírus causador de herpes bovina, dentre outras (LIEW; HAIR-BEJO, 2015; TAKEYAMA et al., 2015).

A vacina de peptídeos utiliza regiões que identificam sequências imunogênicas dos agentes infectantes, que podem ser em muitos casos miméticos a cadeias curtas de aminoácidos (peptídeos). A primeira indicação que peptídeos tinham potencial vacinal foi demonstrada em 1963, usando um vírus de planta, o vírus do mosaico do tabaco, no qual isolou hexapeptídeos da proteína de revestimento do vírus acoplado à albumina sérica bovina, e usada para obter anticorpos de coelho que neutralizariam o vírus infeccioso (LANGBEHEIM et al., 1976). A técnica mais acessível foi o sequenciamento de proteínas em 1977, com a habilidade de sintetizar peptídeos desenvolvido por Merrifield em 1963 (MERRIFIELD, 1963), o que levou a um aumento na pesquisa experimental de vacinas peptídicas nos anos 80 (FRANCIS, 1990).

Depois que um peptídeo candidato é identificado ou predito, ele deve ser entregue ao sistema imunológico de maneira adequada, a fim de obter não apenas uma resposta antipeptídica, como anticorpos antipeptídicos que reconhecerão e neutralizarão o agente infeccioso. E devido ao tamanho molecular relativamente pequeno, os peptídeos são fracos imunógenos e, portanto, requerem acoplamento para aumentar sua imunogenicidade. Por esse motivo, existem muitos exemplos de peptídeos definidos que, ao serem acoplados de maneira descontrolada a grandes proteínas carreadores, produziram anticorpos antipeptídicos que falharam totalmente em reconhecer a proteína nativa.

Em 2003, o Ministério de Agricultura, Pecuária, e Abastecimento do Brasil garantiu a licença para a vacina Leishmune®, comercializado originalmente pra Fort Dodge Animal Health e posteriormente pela Zoetis. Foi a primeira vacina disponível contra a LVC, consistindo em uma fração purificada (ligante fuco-se-manose; FML) de promastigostas de *L. donovani* utilizando saponina como adjuvante. No entanto, em 2014 a vacina foi retirada do mercado por não atender aos requisitos da fase III em relação à avaliação da eficácia da

vacina (MAPA, 2014). Em 2006, outra vacina foi lançada no mercado brasileiro, a Leish-Tec® (Hertape Calier), que consiste na proteína recombinante A2, expressa em amastigotas de *Leishmania*, utilizando saponina como adjuvante, e atualmente é a única vacina contra a LVC comercializada no Brasil (CAMPOS et al., 2017). E esta apresentou redução na infecção em comparação com o placebo de 7,4% x 17,7%). A vacinação não tem sido adotada devido à falta de evidências científicas sobre a eficácia na redução da incidência da doença em cães e humanos (TRAVI, 2014). A Argentina e Paraguai utilizam a vacina para cães que consiste em sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. infantum* (LiESAp), composta de uma proteína com 54 Quilodalton (kDa), a qual é excretada por *L. infantum* com dipeptídeo muramil (MDP), a CaniLeish® (Virbac Animal Health), licenciada para uso na Europa desde 2011 (WYLIE et al., 2014). Estudos verificando a sorologia dos animais que fizeram uso das vacinas citadas mostraram que alguns animais, após o uso das vacinas, sofrem soroconversão, ou seja, se antes eram negativos, após um período se tornam positivos. Como no caso da Leish-Tec®, onde um dos cães que foram vacinados se tornou positivo, em teste ELISA e DPP® (TESTASICCA et al., 2014). Já em outro estudo, Testasicca (2014) mostrou que 30.9% dos cães vacinados, após 11 meses da primeira dose, sofreram soroconversão. Esses dados indicam a necessidade de mais estudos para avaliar se a vacinação de cães contra a leishmaniose visceral pode ser uma ferramenta útil no controle da doença (MARCONDES; DAY, 2019).

2.10 PEPTÍDEOS EM USO VACINAL

Por muitas décadas as medidas tradicionais profiláticas, como uso de inseticidas, controle de roedores, controle de reservatórios domésticos, dentre outros, têm sido usadas para o controle das leishmanioses (DESJEUX, 2004; MAIA-ELKHOURY et al., 2008). No entanto, nenhuma dessas estratégias são capazes de diminuir efetivamente o número de casos caninos e humanos (MAIA-ELKHOURY et al., 2008). Então, o desenvolvimento de vacinas profiláticas para leishmaniose se tornou uma ferramenta promissora em áreas endêmicas, com impacto potencial na epidemiologia da doença (MOHEBALI et al., 2004). A

resposta imune Th1 tem papel crucial não só na proteção contra a infecção primária, mas promovendo a imunidade contra a reinfeção por *Leishmania* (DIKHIT et al., 2017). Células TCD4⁺, são cruciais na proteção imune pela produção de várias citocinas associadas a resistência, como IFN- γ e TNF- α (KAYE; AEBISCHER, 2011). Assim, a vacina ideal é a que promova forte resposta Th1 (DIERING, 2018).

A prática de imunização é a leishmanização, no qual promastigotas vivas e virulentas são injetadas em indivíduos não infectados que moram em áreas endêmicas. Porém, o aparecimento de efeitos severos torna o protocolo de imunização em larga escala inadequado (MODABBER, 2000). As vacinas parasitárias, testadas em cães e humanos, utilizando parasitos mortos ou geneticamente atenuadas, oferecem um imenso repertório de antígenos e promove proteção significativa contra a infecção. Em contraste, essas vacinas apresentam baixa estabilidade e segurança em comparação com outros tipos (MOHEBALI et al., 2004; GIUNCHETTI et al., 2007; ROATT et al., 2012; FIUZA et al., 2013). Vacina baseadas em subunidades do parasito são mais populares atualmente devido a sua habilidade de estimular resposta imune específica. Porém, elas não são completamente seguras e podem apresentar efeitos adversos (FERNANDES et al., 2008; CARCELÉN et al., 2009; MARTIN et al., 2014; OLIVA et al., 2014). Não há vacinas licenciadas para uso contra a LVH (MOHEBALI et al., 2004), mas há diversos estudos com diferentes estratégias para identificação de novos antígenos (REZVAN; MOAFI, 2015), no qual são vacinas baseadas em peptídeos, que possuem epítomos antigênicos para desencadear a RI. Essa opção pode ser tornar uma estratégia promissora, promovendo não só a proteção contra leishmanioses, mas uma ferramenta terapêutica potencial para tratar a doença (MODABBER, 2000). Epítomos mínimos, como peptídeos, são capazes de induzir forte resposta específica de células T, que são fundamentais para eliminar o parasito intracelular (SKWARCZYNSKI; TOTH, 2016).

Um exemplo de candidato vacinal contra LV, com formulações de proteínas recombinantes associadas com adjuvantes, bem como o modelo animal utilizado no teste, é utilizando o antígeno específico de amastigotas, o A2, usado para indução de imunidade protetora contra LV. Foi codificada por

uma família multigênica que é abundantemente expressa nas formas amastigotas de algumas espécies de *Leishmania* capazes de causar LV (FERNANDES et al., 2008), e esta tem apresentado eficácia em modelos animais, sendo administrada com adjuvantes (ANTONIO et al., 2003; GHOSH et al., 2001), vacinas de DNA (ZANIN et al., 2007), vírus não replicativo atenuados (RESENDE et al., 2008), bactérias não patogênicas (YAM et al., 2011) e *L. tarentolae* não virulenta (MIZBANI et al., 2009). A imunidade protetora anti-A2 está associada com a geração de IgG2 específico para o parasito, altos níveis de IFN- γ e baixos de IL-10 por células T. Outro exemplo que vem sendo estudado são as cisteínas proteinases (CP), da superfamília da papaína, tendo 3 classes (CPA, CPB, CPC) e tem sido identificada em *Leishmania*. Tem se mostrado efetiva contra *L. major* em BALB/c, juntamente com adjuvantes ou vacinas de DNA, porém, ainda não foram testados contra LV (ZADEH-VAKILI et al., 2004). O uso de vacinas combinando diferentes proteínas pode promover o aumento de eficácia e diminuição de custos de produção, no qual seria capaz de produzir uma única vacina contra várias espécies de *Leishmania*, entretanto, poucos estudos têm avaliado vacinas quiméricas contra LV (DUARTE et al., 2016).

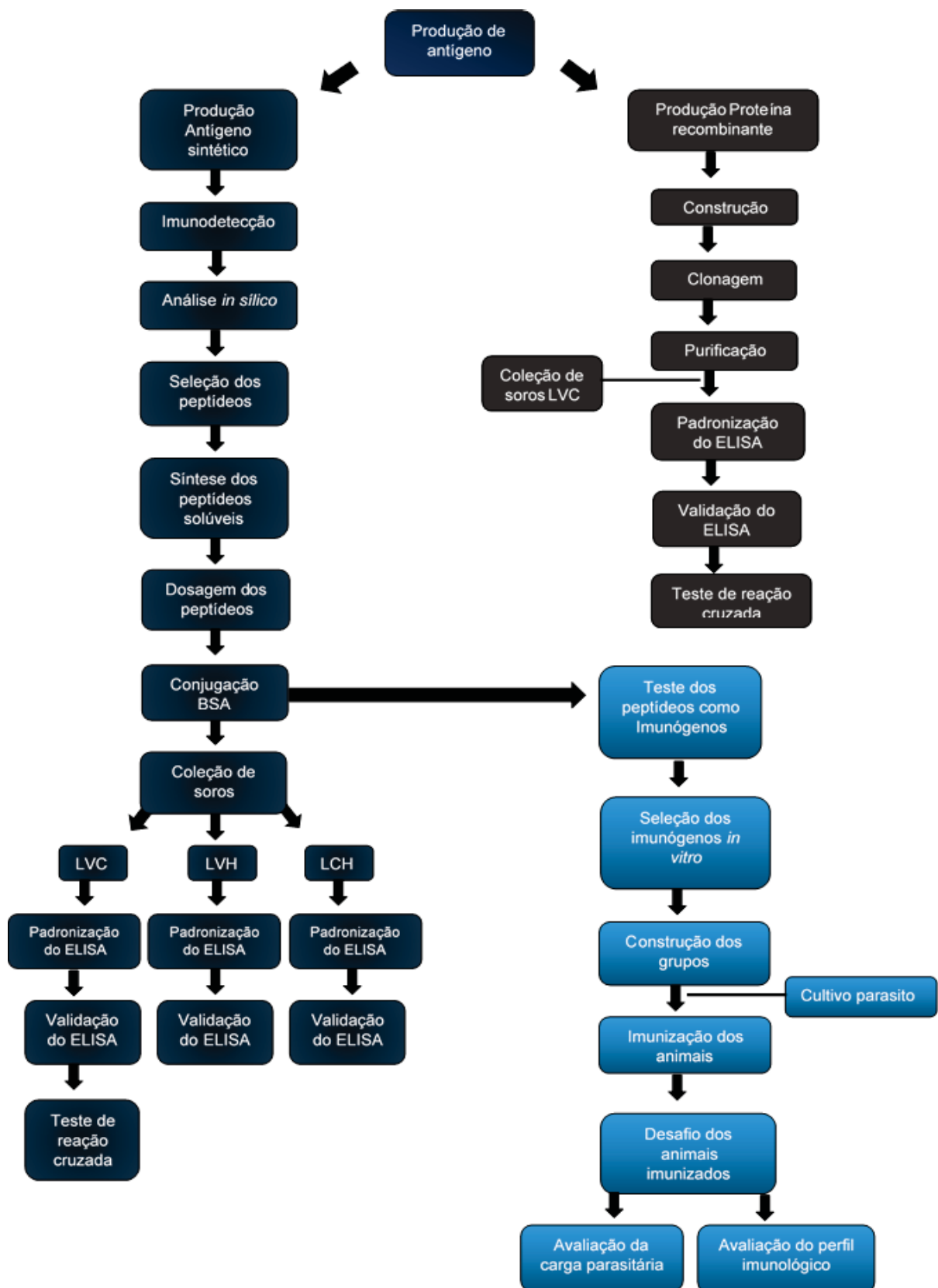
3. METODOLOGIA

Duas frentes de trabalho foram desenvolvidas para buscar melhores alternativas de diagnóstico para a LVC e LVH e LC humana. Na primeira fase os antígenos produzidos (proteína recombinante e peptídeos sintéticos) foram validados em testes sorológicos, e na segunda fase foram avaliados o potencial vacinal dos peptídeos sintéticos.

3.1 FLUXOGRAMA

Como o trabalho foi dividido em duas frentes, o fluxograma 01 a seguir ajuda no entendimento cronológico dos experimentos (FIGURA 4). A descrição da metodologia seguirá a ordem apresentada no fluxograma.

FIGURA 4 FLUXOGRAMA DOS EXPERIMENTOS



LEGENDA: Fluxograma resumido de todas as etapas apresentadas no presente trabalho.

i. Produção da proteína recombinante LBK39

Primeiramente, um litro (1L) do meio “Brain Heart Infusion” (BHI) foi suplementado com 2 mL de hemina porcina (Jena Bioscience), 5 mL de penicilina e estreptomicina, 1 mL de antibiótico Nourseithricin (NTC) (Jena Bioscience) (de SOUZA et al., 2019), e armazenado na geladeira, sobre o abrigo de luz. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL de Lbk39 transfectada de acordo com o manual *LEXSYcon2 Expression Kit* com glicerol foi descongelada, e colocada em frascos de cultura de tecidos com 10 mL de meio suplementado. Esses frascos foram mantidos na incubadora tipo BOD, à 24° C, por 7 dias, que é o tempo de repique inicial utilizado nessa cultura. Depois do repique inicial, os repiques posteriores foram feitos de 4 em 4 dias, para a obtenção de 1,5 L de cultura. As culturas foram então centrifugadas a 5000 x g por 10 min a 4°C, o pellet foi separado do sobrenadante e estocados no -20°C até seu uso.

ii. Purificação da proteína recombinante LBK39

Para cada etapa da purificação da proteína LBK39, foram usados 250 mL do sobrenadante da cultura de *L. trantolae* transfectada com o plasmídeo Lbk39 e cultivados em meio BHI (de SOUZA et al., 2019). A Lbk39 foi purificada a partir do meio sobrenadante utilizando cromatografia em coluna HisTrap HP (GE HealthCare), carregando o sobrenadante do meio de cultura na coluna, e eluindo a proteína purificada de acordo com as instruções do fabricante. Para remover os sais e o imidazol presentes foi realizada a diálise em tampão PBS 7.2 a 4 °C, uma vez durante a noite e duas vezes durante o dia, com intervalo de 2h entre cada troca. No dia seguinte, os 25 mL purificados foram distribuídos em frascos de 2,5 mL e liofilizados para concentrar a proteína recombinante Lbk39. Para determinar a concentração da proteína Lbk39 foi utilizado o kit de ensaio de proteína Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific), seguindo o manual do fabricante.

iii. SDS PAGE LBK39

A pureza da proteína recombinante após purificação foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil- sulfato de sódio (SDS) a 15%. O gel foi corado com nitrato de prata a 0,01% (SGARBIERI, 2005).

3.2.1.1 COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS CANINAS

Desde 2010, o laboratório de Biologia Molecular da UFPR recebe amostras de cães infectados naturalmente com LV de áreas endêmicas do Brasil. Para esse estudo foram utilizados soros de cães infectados com *L. infantum* (comprovado por isolamento do parasito) e não infectados. Para avaliação do potencial de reconhecimento antigênico da proteína Lbk39 foram utilizados 153 soros de cães classificados como positivos e negativos (TABELA 3). Todos os cães tiveram o diagnóstico clínico e laboratorial realizados. Os animais foram diagnosticados com base em exames parasitológicos (amastigotas na medula óssea ou gânglio poplíteo e coradas com Maygrunwald-Giemsa, e em cultura realizada em meio NNN (Novy, Neal e Nicolle). O teste sorológico (teste TrDPP) foi usado para confirmação do status da sorologia. As amostras de animais (usados como controles negativos) foram obtidas da Unidade de Controle de Zoonoses (UCZ) de Araucária, Paraná (PR). As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa da veia jugular, transferidas para tubos de polipropileno de 10 mL e processadas 3-4h após coleta. No laboratório, o sangue foi centrifugado a 1000 x g por 5 min, e os soros foram separados e armazenados a -20°C até serem analisados por métodos sorológicos, conforme recomendado pelo Ministério da Saúde do Brasil.

As amostras de células da camada leucocitárias ou punção de linfonodos foram inoculadas em meio NNN suplementado com 10% de sangue de coelho. As culturas foram incubadas a 24° na BOD para permitir o crescimento da *Leishmania* e as culturas foram inspecionadas se havia ou não presença de promastigotas por microscópio óptico (OLYMPUS BX41).

Para a coleta de amostras de cães, todos os procedimentos foram realizados orientando o cumprimento das normas definidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sobre o número de protocolo 044/2014. Os proprietários assinaram um termo de consentimento para o uso das amostras.

TABELA 3 - CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO CANINO

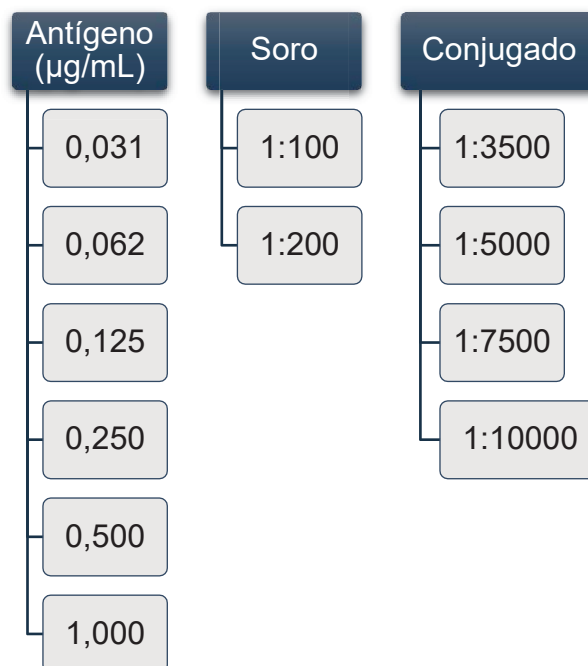
Características	Local	N	Teste diagnóstico
Avaliação do potencial antigênico da Lbk39			
Com sinais clínicos* de áreas endêmicas	Foz do Iguaçu - PR	52	Cultura, ELISA, Tr-DPP
Sem sinais clínicos de área endêmica	Foz do Iguaçu - PR	26	Cultura, ELISA, Tr-DPP
Negativos	UCZ - Curitiba – PR	75	Culture, ELISA, Tr-DPP

* Sinais clínicos: Os principais aspectos clínicos observados para esta classificação foram: alopecia, descamação da pele seca e quebradiça, nódulos na pele, úlceras, fraqueza, magreza e lesões oculares.

3.2.1 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ELISA DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Lbk39

O teste ELISA foi utilizado para determinar os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães, infectados ou não com *Leishmania*. Para utilização dos ensaios de ELISA primeiramente foram realizados testes de padronização de antígeno, soro e anticorpo secundário. As diluições dos antígenos avaliadas foram de (0,031, 0,062, 0,125, 0,250, 0,500 e 1,000 µg/poço), a diluição dos soros foram 1:100 e 1:200, e a diluição do conjugado foi 1:3500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000 representado no esquema abaixo (FIGURA 5).

FIGURA 5 – ESQUEMA DA PADRONIZAÇÃO DO ELISA LBK39



LEGENDA: Esquema com os valores da concentração de antígeno, diluição de soro e conjugado.

Como controle positivo foram testados soros de cães comprovadamente infectados com *L. infantum*. Os ensaios foram realizados em placas de poliestireno de alta afinidade (PVC) flexível de 96 poços (Stripwell Plate, Costar, US). Cada poço foi adsorvido com 100 µL/poço da concentração ideal diluída em *coating buffer* (Carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,16%, Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,29%, pH 9,6), e incubado *overnight* a 4°C. A solução inicial foi descartada e a placa lavada duas vezes com solução de lavagem (Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9%, Tween 20 a 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com tampão PBS 7,4 acrescidos de 2% de caseína durante 60 minutos, a 37 °C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100 µL dos soros diluídos conforme as diluições acima citadas em PBS 7,4 com caseína 0,2% foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 60 minutos. As placas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem (PBS 7,4, 0,05%, Tween20) e, em seguida, foi adicionado aos poços 100 µL do anticorpo anti-IgG (SIGMA) humano ou canino diluídos 1:200 em PBS 7,4-caseína 0,2%. Após incubação a 37°C por 60 minutos, as placas foram novamente lavadas por 4x com a solução de lavagem,

e 100 µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 molar (M), fosfato de sódio dibásico (Na₂PO₄) 0,2 M, OPD 2 mg e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,1 % foram adicionados. As placas foram incubadas a 25-37°C ao abrigo de luz por 10 a 30 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5M. A absorbância resultante foi lida em no leitor Powerwave HT (BioTek) de ELISA a 492 nanômetro (nm). As seguintes condições foram padronizadas para os futuros ensaios.

Para controle funcionalidade das reações, foram utilizados como antígeno o extrato bruto das culturas de *L.infantum*, cinco soros de controle positivo e cinco soros controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.1.3 TESTE DE REAÇÃO CRUZADA FRENTE A Lbk39

Para avaliar se havia reação cruzada da Lbk39, com outras doenças foram avaliados soros de cães portadores de títulos de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (N = 23).

3.2.2 PRODUÇÃO ANTÍGENOS SINTÉTICOS

3.2.2.1 ENSAIO DE IMUNODETECÇÃO

Peptídeos sobrepostos cobrindo toda a sequência da Lbk39 foram montados sobre uma membrana de celulose (Abimed-Langenfield, Alemanha). Na tentativa de mimetizar os possíveis epítomos, foram sintetizados peptídeos contínuos, compostos por uma sequência de quinze resíduos.

Após a síntese, a membrana foi congelada no freezer -20 °C até seu uso. Para realização do ensaio de imunodeteção para selecionar e avaliar os pontos reativos, foi necessário fazer o tratamento da membrana com metanol, por 2 min, seguidos por lavagem com TBS 1x e T-TBS 0,1%, ambos por 10 minutos. A

membrana de celulose foi primeiramente incubada com caseína para bloqueio de regiões não específicas por agitação durante a noite, com caseína 3% (p/v), 0,5% (p/v) de sacarose dissolvida em T-TBS 0,1% Tween 20 (v/v) a 4°C. Após isso, a membrana foi lavada novamente com T-TBS 0,1%, por 10 min sob agitação, e incubada, por 90 min a 37°C com o “pool” de cinco soros de pacientes humanos com anticorpos para *L. infantum* (realizado para soros positivos e negativos). Estes foram diluídos 1:100 em tampão de bloqueio caseína 3% (p/v), 0,5 % de sucrose (p/v) e T-TBS 0,1%. Após esse processo, a membrana foi novamente lavada com T-TBS 0,1%. Adicionou-se o conjugado marcado com biotina, diluído 1:30.000 em tampão de bloqueio por 60 min a 37°C, seguido por uma etapa de incubação com estreptavidina, na diluição de 1:10.000 diluído em tampão de bloqueio, por 60 min a 37°C. Após duas lavagens, os pontos positivos foram visualizados pelo sistema ECL TM.

3.2.2.2 ANÁLISE *IN SÍLICO* E SELEÇÃO DOS PEPTÍDEOS

Para complementar a seleção dos 15 peptídeos reativos, as sequências foram analisadas utilizando ferramentas do ABCPred (Saha and Raghava, 2006), com base em métodos de aprendizado de máquina que aplicam uma rede neural recorrente (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred>) e, o IEDB (Vita, 2015), que se baseia em recursos de acessibilidade de superfície, antigenicidade e hidrofobicidade (<https://www.iedb.org/>).

3.2.2.3 SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS SELECIONADOS

Dos 15 peptídeos selecionados pelo ensaio de imunodeteção e analisados por bioinformática, 3 foram sintetizados quimicamente pela estratégia 9-florenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc), utilizando-se, para tal, um protocolo de síntese de peptídeos em fase sólida (resina como suporte sólido insolúvel), que

usa aminoácidos especiais para a síntese *in vitro*. Esses aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc e são acoplados à resina. O protocolo foi realizado conforme descrito em MERRIFIELD, (1965) usando o sintetizador de peptídeos automático MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Nattermannallee, Alemanha). Esta técnica consiste em fixar o aminoácido C-terminal do peptídeo sobre um suporte sólido insolúvel e depois alongar a cadeia peptídica por adições sucessivas de resíduos da porção C-terminal para N-terminal.

Estes aminoácidos possuem o grupamento amina protegido pelo grupamento Fmoc, sua cadeia lateral está protegida por um grupo protetor para evitar reações indesejadas. Ciclos de acoplamento (de aminoácidos com seus ativadores) e desproteção (remoção do grupamento Fmoc pela presença de piperidina 20%) são realizados até que todos os aminoácidos do peptídeo estejam acoplados. Após o término do último ciclo, os peptídeos já sem o grupamento Fmoc do último aminoácido é removido da resina por uma etapa chamada de clivagem. Nesta etapa se elimina os grupamentos protetores da cadeia lateral. Em seguida esta solução foi filtrada e precipitada com éter etílico gelado obtendo-se assim os peptídeos. Após centrifugação o éter é eliminado por evaporação. Em seguida os peptídeos foram liofilizados, pesados, dissolvidos em água ultra-pura e armazenados a -20°C ou -80 °C em alíquotas na concentração de 1 mg/mL. Os peptídeos selecionados foram denominados de PepLi- 335, PepLi- 379 e PepLi- 409.

3.2.2.4 DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS

As concentrações dos peptídeos foram dosadas utilizando o kit Micro BCA™ (ThermoFischer), de acordo com as instruções do fabricante. Os peptídeos foram diluídos 100x para a dosagem.

3.2.2.5 CONJUGAÇÃO DOS PEPTÍDEOS COM BSA

Utilizou-se 10 mg de BSA dissolvidos em 10 mL de PBS (pH 7,2). A preparação da solução de trabalho, de cada peptídeo, foi feita separadamente. Para o peptídeo PepLi379, foi pesado 5 mg deste e dissolvida em 5 mL de PBS. Para o peptídeo PepLi409, foi realizada a conta a partir da concentração que se encontrava, pois não havia 5 mg, para poder ser utilizada na proporção recomendada. Para preparo da solução de BSA a 0,3 μmol e, peptídeo 0,6 μmol , foram adicionados 2 mL de solução BSA, à solução dos peptídeos. Adicionou-se, aos poucos, a solução 0,2% glutaraldeído na solução de proteína carreadora/peptídeo, agitando lentamente. Essa solução foi incubada sob agitação por 1 h em temperatura ambiente (TA). Após esse processo, foi adicionado 1,3 mL de glicina 1 M diluída em PBS 7,2 e, mantida sobre agitação por 1 h em TA. Após isso, os peptídeos conjugados foram quantificados utilizando Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fischer Scientific) seguindo a protocolo do fabricante, alíquotados e, estocados no -20°C .

3.2.3 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIGÊNICO DOS PEPTÍDEOS

3.2.3.1 COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS CANINAS

Para avaliação do potencial antigênico dos peptídeos selecionados na membrana, os soros utilizados nessa etapa foram os mesmos descritos no item 3.2.1.1. Porém, em número menor, e utilizados para cada peptídeo separadamente (TABELA 4). Para avaliar se havia reação cruzada de outras doenças contra à Lbk39, os peptídeos foram avaliados frente à soros de cães com *T. gondii* (N = 23). Em adição, a aprovação ética para realização dos experimentos, foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná sobre o número de protocolo 044/2014.

TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO CANINO

Características dos soros	Local	N	Testes diagnósticos usados para a confirmação
Positivos de áreas endêmicas	Foz do Iguaçu - PR	40	Cultura, ELISA, Tr-DPP
Negativos	UCZ - Curitiba – PR	40	Cultura, ELISA, Tr-DPP

3.2.3.2 COLEÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS HUMANAS

Para avaliação do potencial antigênico dos peptídeos, além dos soros caninos, foram avaliados para diagnóstico da LV e LTA em soros humanos. Os grupos foram divididos de acordo com a TABELA 5. Os pacientes saudáveis passaram por exames para detectar se havia a presença de *L.infantum* ou *L.braziliensis*. A partir dessas amostras foi calculado o *cut-off* para os testes ELISA, realizados nessa tese. Pacientes com *L. infantum* foram diagnosticados por PCR e sorologia, já os pacientes com *L. braziliensis* foram diagnosticados a partir do isolamento do parasito na lesão. Pacientes positivos para leishmaniose foram atendidos, de acordo com as diretrizes do Ministério da Saúde Brasileira, conforme descrito no Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Tegumentar Americana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Amostras de soros dos pacientes foram estocados a -20°C até o uso. Esse estudo foi conduzido de acordo com as Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisa Biomédica em Seres Humanos. Além disso, foi obtida aprovação ética do Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná sob o número 23075.067805/2018-01 e, de acordo com a lei do Tratado do Mercosul, Resolução nº 129/96.

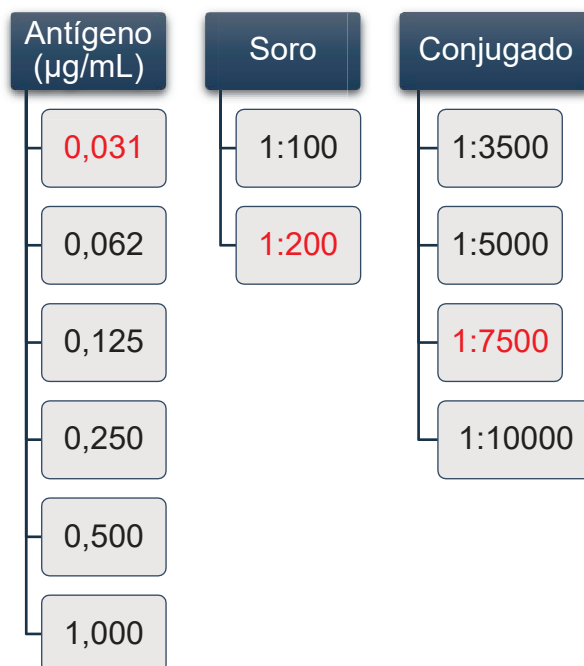
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS E LOCAIS DE COLETA DE SORO HUMANO

Características	Local	N	Teste diagnóstico
Indivíduos saudáveis de áreas não endêmica	Curitiba - PR	24	Cultura, PCR
Pacientes positivos para LV (PepLi379)	Foz do Iguaçu - PR	24	Cultura, PCR
Pacientes positivos para LV (PepLi409)	Foz do Iguaçu - PR	24	Cultura, PCR
Pacientes positivos para LC (PepLi379)	Curitiba - PR	7	Cultura
Pacientes positivos para LC (PepLi409)	Curitiba - PR	46	Cultura

3.2.3.3 PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ELISA PEPTÍDEOS

O teste ELISA foi utilizado para determinar os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* em soros de cães, e humanos, infectados ou não com *Leishmania*, e soro de *T. gondii*. Para utilização dos ensaios de ELISA usando a proteína recombinante, primeiramente foram realizados testes de padronização dos diferentes parâmetros (antígenos, diluição de soros, diluição de conjugado e, concentração da solução de bloqueios). As diluições dos antígenos foram de :0,031 µg/poço, 0,062 µg/poço, 0,125 µg/poço, 0,250 µg/poço, 0,500 µg/poço e 1,000 µg/poço). As diluições de soro (foram: 1:100, 1:200, 1:400 e 1:600) e, de conjugado 1:3500, 1:5000, 1:7500 e 1:10000 (esquema abaixo). Nesse experimento com os peptídeos foram testados tipos diferentes de soluções de bloqueios, como caseína 2% e BSA 4%. Foram testados soros de cães e de humanos infectados com *L. infantum* e *L. braziliensis*.

FIGURA 6 – ESQUEMA DA PADRONIZAÇÃO DO ELISA LBK39



LEGENDA: Esquema com os valores da concentração de antígeno, diluição de soro e conjugado.

Os ensaios foram realizados em placas de policloreto de vinila (PVC) flexível de 96 poços (Costar). Cada poço foi sensibilizado com 100 µL/poço da concentração ideal do antígeno diluída em “coating buffer” (Carbonato de sódio (Na₂CO₃) 0,16%, Bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 0,29%, pH 9,6), e deixadas overnight a 4°C. A solução inicial foi descartada e a placa lavada com solução de lavagem (Cloreto de Sódio (NaCl) 0,9%, Tween 20 a 0,05%) para remoção do antígeno não fixado. Após a sensibilização, a placa foi bloqueada com tampão PBS 7,4 acrescidos de 2% de caseína por 60 minutos, a 37 °C. Após o bloqueio, toda a solução dos poços foi removida por aspiração. A seguir, 100 µL dos soros diluídos na diluição ideal em PBS 7,4 com caseína 0,2% foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 60 minutos. As placas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem (PBS 7,4, 0,05%, Tween20) e, em seguida, foi adicionado aos poços 100 µL do anticorpo anti-IgG (SIGMA) humano ou canino diluído 1:200 em PBS 7,4-caseína 0,2%. Após incubação a 37°C por 60 minutos, as placas foram novamente lavadas por 4x com a solução de lavagem, e 100 µL da solução reveladora, contendo ácido cítrico 0,1 molar (M), fosfato de sódio dibásico (Na₂PO₄) 0,2 M, OPD 2mg e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,1 % foram

adicionados. As placas foram incubadas a 25-37°C ao abrigo de luz por 10 a 30 minutos com a solução reveladora, quando a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) M. A absorbância resultante foi lida em no leitor Powerwave HT (BioTek) de ELISA a 492 nanômetro (nm). Para controle funcionalidade das reações, foram utilizados como antígeno o extrato bruto das culturas de *L.infantum* e *L.braziliensis*, 5 soros de controle positivo e controle negativo. Ambos os experimentos foram mensurados em triplicata. Após os resultados da padronização, que serão apresentados nos resultados, foi optado por seguir com as concentrações mais baixas, concentração de 0,031 µg/poço para antígeno, diluição de peptídeo 1:200, e 1:7500 de conjugado, pois obtiveram melhores resultados.

3.2.3.3 AVALIAÇÃO DE REAÇÃO CRUZADA FRENTE AOS PEPTÍDEOS

Para avaliar se havia reação cruzada de outras doenças contra os peptídeos, foram avaliados soros de cães com *T. gondii* (N = 22) frente os mesmos.

3.2.4 TESTES DOS PEPTÍDEOS COMO IMUNÓGENOS

3.2.4.1 PARASITOS

Nessa etapa do trabalho foi utilizada apenas a espécie *L. infantum* (cepa MHOM/BR/84/LTB300). As promastigotas foram cultivadas a 24°C em meio completo M-199 (ThermoFischer 11150067) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) (ThermoFischer 1600044) e 0,05% de hemina e 1% de antibiótico Penicilina e Estreptomicina. Os parasitos foram relançados para cultivo a partir de cepas congeladas a -196° C. Nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, as culturas foram mantidas em meio M-199 (acima descrito) até a quinta passagem em cultura para realização dos experimentos de infecção. Infecções foram realizadas com cultura em fase estacionária.

3.2.4.2 ANÁLISE *IN VITRO*

Foram utilizados três camundongos BALB/C para obtenção de macrófagos peritoneais. Os camundongos receberam injeção por via intraperitoneal de 250 µg de concanavalina-A, que atua como ativador de Mø, diluídas em 1mL de PBS 7,2. A injeção foi dada no quadrante inferior direito, com ângulo de 45°, com intuito de aumentar a estimulação de macrófagos. Após três dias, os camundongos foram eutanaziados e receberam injeção de 5 mL de RPMI gelado, desenvolvido no **Roswell Park Memorial Institute**, na cavidade peritoneal. Foi feita a massagem abdominal e, os macrófagos foram removidos com o auxílio de uma seringa. Os macrófagos foram centrifugados a 400 x g por 10 min a 4°C. Estes foram ressuspensos em meio RPMI acrescido de 10% de SFB e 1% de antibiótico, corados com azul de tripan e, contados (1×10^5 macrófagos/poço) em câmara de Neubauer. 1×10^5 de macrófagos foram plaqueados, em uma placa de 12 poços e, incubados na estufa a 37°C com 5% CO₂ por 1h, para os macrófagos aderirem a superfície. Após incubação, as placas foram lavadas 3x com PBS 1x morno. Foram então adicionados 500 µL/poço de RPMI com 10% de SFB e 1% de antibiótico Penicilina e Estreptomicina e, incubadas por 1h. Após 1h, os peptídeos conjugados foram adicionados aos poços, com as concentrações variando de 0-15 µg/poço. Após 1h, as placas foram lavadas e infectadas com 5×10^5 *L.infantum*/poço e incubadas por 4 horas. Passadas as 4h, as placas foram lavadas 3x com PBS 1x morno e, adicionados 500 µL/poço de RPMI com 10% de SFB e, começou-se a contar o tempo 0 da infecção. As placas foram observadas por 48h e 72h. Esse experimento foi realizado em triplicata. Foi feito um “pool” com o sobrenadante das triplicatas e, separados em duas partes, uma parte foi adicionado a tubos com meio de cultura NNN com sangue de Coelho, para avaliação da carga parasitária e, a outra parte foi realizado a avaliação de citocinas foi determinada por teste ELISA utilizando kits comerciais (BD OptEIA), de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.4.3 ANIMAIS

Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c foram originalmente obtidos da Fiocruz Paraná, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério do CPPI com água e comida, maravalha esterilizada, e utilizados com idades de 6-8 semanas em todos os experimentos descritos neste trabalho foram aprovados pelo comitê de ética (23075.067805/2018-01). Para realização dos experimentos, os animais foram mantidos por 60 e 90 dias.

3.2.4.4 NOMENCLATURA DOS GRUPOS

Nesse experimento foram utilizados camundongos BALB/c (N = 60), divididos em **6 grupos** de 10 animais, porém, sendo separados em caixa com 5 animais cada, e divididos em 60 e 90 dias, ou seja, 5 animais/grupo por período de tempo:

Grupo 1: Sem infecção (N = 10).

Grupo 2: Com infecção por *Leishmania infantum* (N = 10).

Grupo 3: Imunizados com BSA + adjuvante (N = 10).

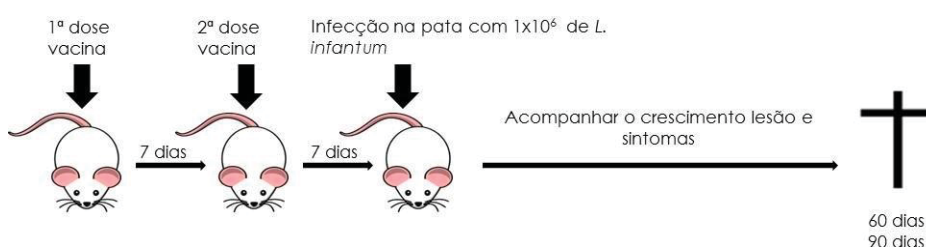
Grupo 4: Imunizados com **PepLi-379** + BSA + adjuvante (N = 10).

Grupo 5: Imunizados com **PepLi-409** + BSA + adjuvante (N = 10).

Grupo 6: Imunizados com Mix (**PepLi-379+ PepLi-409**) + BSA + adjuvante (N = 10).

3.2.4.5 IMUNIZAÇÃO

FIGURA 7 - MÉTODOS ESQUEMÁTICOS DAS IMUNIZAÇÕES DOS ANIMAIS E DESAFIOS COM *L. INFANTUM*



Uma semana após serem recebidos do biotério fornecedor (Fiocruz-PR), os animais foram vacinados duas vezes, com intervalo de 7 dias entre cada, com 20 µL de cada composição de acordo com seu grupo, por via intranasal.

Grupo 1: imunização: 20 µL PBS.

Grupo 2: imunização: 20 µL PBS.

Grupo 3: imunização: BSA (0,3 µmol/ml + 3,25 µL de adjuvante).

Grupo 4: imunização: 20 µL (15 µg do PepLi379 conjugado com BSA + 3,25 µL de adjuvante completo de Freud).

Grupo 5: imunização: 20 µL (15 µg do PepLi409 conjugado com BSA + 3,25 µL adjuvante completo de Freud).

Grupo 6: imunização: 20 µL (7 µg do PepLi379 + 7 µg do PepLi409 conjugados com BSA + 3,25 µL adjuvante completo de Freud).

3.2.4.6 DESAFIO COM *L. INFANTUM*

Sete dias após o término da vacinação, os animais foram infectados* pela via subcutânea:

Grupo 1: 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita.

Grupo 2: 1×10^6 *L.infantum* em 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita*.

Grupo 3: 1×10^6 *L.infantum* em 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita*.

Grupo 4: 1×10^6 *L.infantum* em 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita*.

Grupo 5: 1×10^6 *L.infantum* em 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita*.

Grupo 6: 1×10^6 *L.infantum* em 20 µL de PBS – coxim plantar da pata traseira direita*.

*Os animais foram sedados com Isoflurano, pela via inalatória.

3.2.4.7 ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS

Os animais foram acompanhados semanalmente, durante 90 dias. Para medição da espessura da pata infectada, com auxílio de um paquímetro (em mm), descontando a medida da pata não infectada. E, para observação das características físicas que estes apresentavam ao longo do experimento.

3.2.4.8 COLETA DE SANGUE E DOS ÓRGÃOS DOS ANIMAIS

Os animais foram anestesiados, por grupo, em dessecador com algodão embebido com isoflurano. Foram colocados no suporte de isopor, e tiveram as quatro patas fixadas no suporte. A coleta de sangue foi feita com seringa de insulina com 0,1 mL de Citrato dissolvido em soro fisiológico. Os sangues foram centrifugados a 28884 x g por 10 min e separados em duas partes, plasma e camada leucocitária. O fígado, baço e linfonodo poplíteo foram retirados, colocados em microtubo com M199 e, pesados para posterior maceração. Foram capturadas fotos do baço para verificar se havia diferença no tamanho dos mesmos.

3.2.4.9 CARGA PARASITÁRIA

No experimento com *L. infantum* após 60 e 90 dias, os camundongos foram eutanasiados e a pata infectada de cada animal foi retirada, colocada em banho no álcool 70% por um minuto e individualmente pesada. Os demais órgãos foram colocados em microtubo nomeados, pesados, e mantidos em gelo para serem homogeneizados.

O número de parasitos na pata infectada, no linfonodo poplíteo direito, no baço e no fígado dos animais foram determinados pela técnica de diluição limitante, que permite a contagem do número de microrganismos de amostras com concentrações muito elevadas.

Os homogenados destes órgãos foram obtidos por maceração manual das lesões com adição de 1 mL de meio M199, e após sedimentação das partículas mais pesadas. 10 µL foi recuperado do sobrenadante e resuspenso em 990 µL de meio, obtendo-se assim uma pré-diluição de 1:100. Os macerados

foram diluídos, em placas de cultura de 96 poços, e as mesmas foram incubadas a 26 °C durante 15 dias para seguir a multiplicação das promastigotas. As culturas foram observadas ao microscópio óptico, e registrado a última diluição onde havia promastigotas (Técnica de diluição limitante).

3.2.4.10 DETECÇÃO DE CITOCINAS PELO MÉTODO ELISA

As concentrações das citocinas presentes nos soros dos camundongos foram determinadas pelo método ELISA usando kits comerciais (BD OptEIA), de acordo com as instruções do fabricante. Foram avaliadas as citocinas IFN- γ , IL-10 e IL-4 de murinas. Os limites de detecção para esses testes são 31.3 pg/mL para IFN- γ , IL-10 e 15,72 pg/mL para IL-4.

3. 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados dos ELISAs, e reatividade cruzada, além das curvas ROC, as sensibilidades, as especificidades, e as comparações entre os testes foram analisadas pelo MedCalc, versão 18.9 (R Core Team, 2018) e GraphPad Prism versão 5.0 para Windows e a significância estatística das diferenças entre os grupos de camundongos foi determinada pelos t testes *student* com desvio padrão (DP), com nível de confiança $\alpha = 0,05\%$.

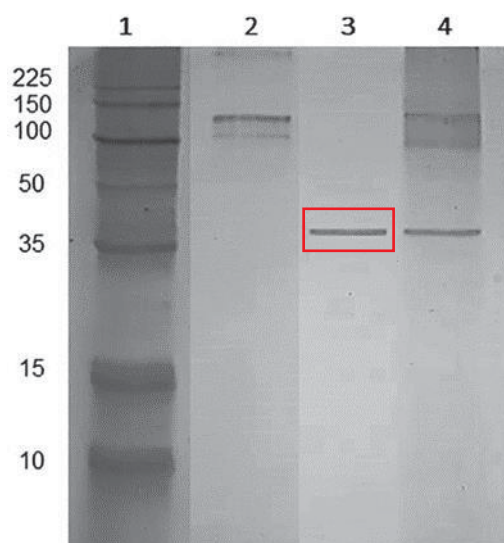
4 RESULTADOS

4.1 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE Lbk39

A Lbk39 foi separada em sobrenadante e pellet, onde o sobrenadante apresentava concentração de 8.286,52 µg/mL. Foram utilizados 250 mL da cultura gerada para purificação por coluna de cromatografia HisTrap HP de 1 mL (GE HealthCare), seguindo as instruções do fabricante. Após purificação e diálise o produto foi liofilizado, a proteína foi ressuspensa em 700 µg de água ultrapura, e sua concentração foi de 337,68 µg/mL, determinada pelo kit de Micro BCA™, e armazenadas em alíquotas no -20°C.

O procedimento de purificação e a expressão da proteína foi confirmada por SDS-PAGE, com a proteína recombinante apresentando massa molecular de aproximadamente 35 kDa (FIGURA 8). A proteína recombinante Lbk39 foi obtida na concentração final de 0,4 mg/mL.

FIGURA 8 - EXPRESSÃO DA Lbk39 PURIFICADA POR SDS-PAGE



LEGENDA: Coluna 1: marcador de peso molecular (10-225 kDa); Coluna 2: o extrato bruto de *L.tarentolae* não transfectada; Coluna 3: Lbk39 purificada; Coluna 4: extrato bruto de *L.tarentolae* transfectada.

4.2 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ELISA PARA A PROTEÍNA LBK39

Utilizando a padronização escolhida, 0,125 µg/mL de antígeno por poço, não foram observadas diferenças significativas entre as diluições testadas de soro. Porém, a diluição de 200x foi escolhida devido a menor utilização de soro, e com relação ao conjugado anti-cão IgG HRP diluído 1:7500. Esses resultados apresentaram aumento de 34x o valor da absorbância dos controles positivos em comparação com os controles negativos.

4.3 ELISA UTILIZANDO A PROTEÍNA Lbk39 COMO ANTÍGENO DEMONSTROU ALTA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE PARA O DIAGNÓSTICO DA LVC

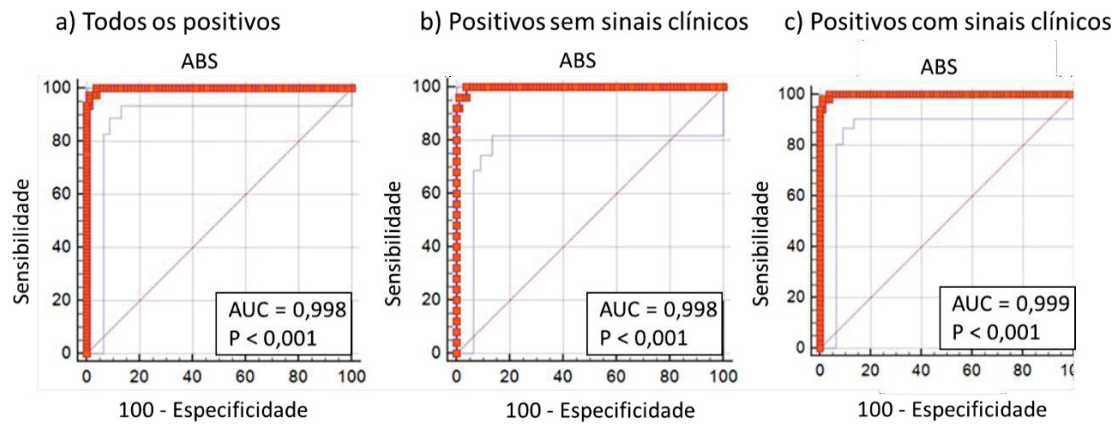
O teste ELISA foi avaliado quanto à sua capacidade de determinar o nível de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros de cães infectados e não infectados com *L. infantum*, utilizando como antígeno a proteína recombinante Lbk39. O valor de *cut-off* foi calculado utilizando a análise da curva ROC.

Foi utilizada a padronização descrita acima. Para determinar o *cut-off* da reação, foram utilizadas as amostras dos cães verdadeiramente negativos (73 amostras), no qual apresentaram um *cut-off* de absorbância de 0,156.

Após a padronização, foi utilizada a otimização do teste ELISA com Lbk39 para analisar os 153 soros de cães. Para essa análise, 78 soros de LVC eram de região endêmica, Foz do Iguaçu, onde 75 foram positivos, e 03 foram negativos para o ELISA. Desses 03 animais negativos, 2 eram do grupo dos animais sem sinais clínicos. O resultado negativo do cão com sinais clínicos foi positivo para o teste ELISA de extrato bruto de *Leishmania* e Tr-DPP. Todos os soros negativos, de cães provenientes do UCZ de Araucária, região não-endêmica, apresentaram resultados negativos para Lbk39.

A análise da curva ROC da distribuição de absorbância contra o antígeno Lbk39 foi dividida em diferentes grupos (todos positivos do ensaio, todavia, continham cães com sinais clínicos e cães sem sinais clínicos), como mostrado na FIGURA 9. A diferença de resultados nas amostras caninas foi significativa entre esses grupos ($P < 0,001$). O grupo positivo (78 amostras) (FIGURA 9A) apresentou alto valor de acurácia (AUC 0,998), similar aos animais sem sinais clínicos (0,998) (FIGURA 9B), enquanto os animais com sinais clínicos apresentaram maior acurácia (0,999) (FIGURA 9C).

FIGURA 9 - COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DO ELISA DE SORO CANINO CONTRA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39.



LEGENDA: A) Reatividade de todos os positivos. B) Reatividade dos positivos sem sinais clínicos. C) Reatividade dos positivos com sinais clínicos. AUC: acurácia

4.4 COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE E ACURÁCIA ENTRE OS GRUPOS

Foram avaliados um conjunto de 56 amostras de cães que apresentaram cultura positiva. A TABELA 6 mostra os resultados da sensibilidade e especificidade para Lbk39 dos soros de cães divididos em grupos de com e sem sinais clínicos. A proteína recombinante Lbk39 apresentou alta sensibilidade e especificidade para esses grupos.

Analisando a curva ROC para Lbk39 contra os animais de cultura positiva, foi confirmado que o teste apresenta diferença significativa ($P < 0,001$) (Figura 10A, B, C). O grupo que possui todos os animais positivos apresentam acurácia de 0,999, assim como os animais com sinais clínicos, enquanto o grupo sem sinais clínicos apresentou menor acurácia (0,997).

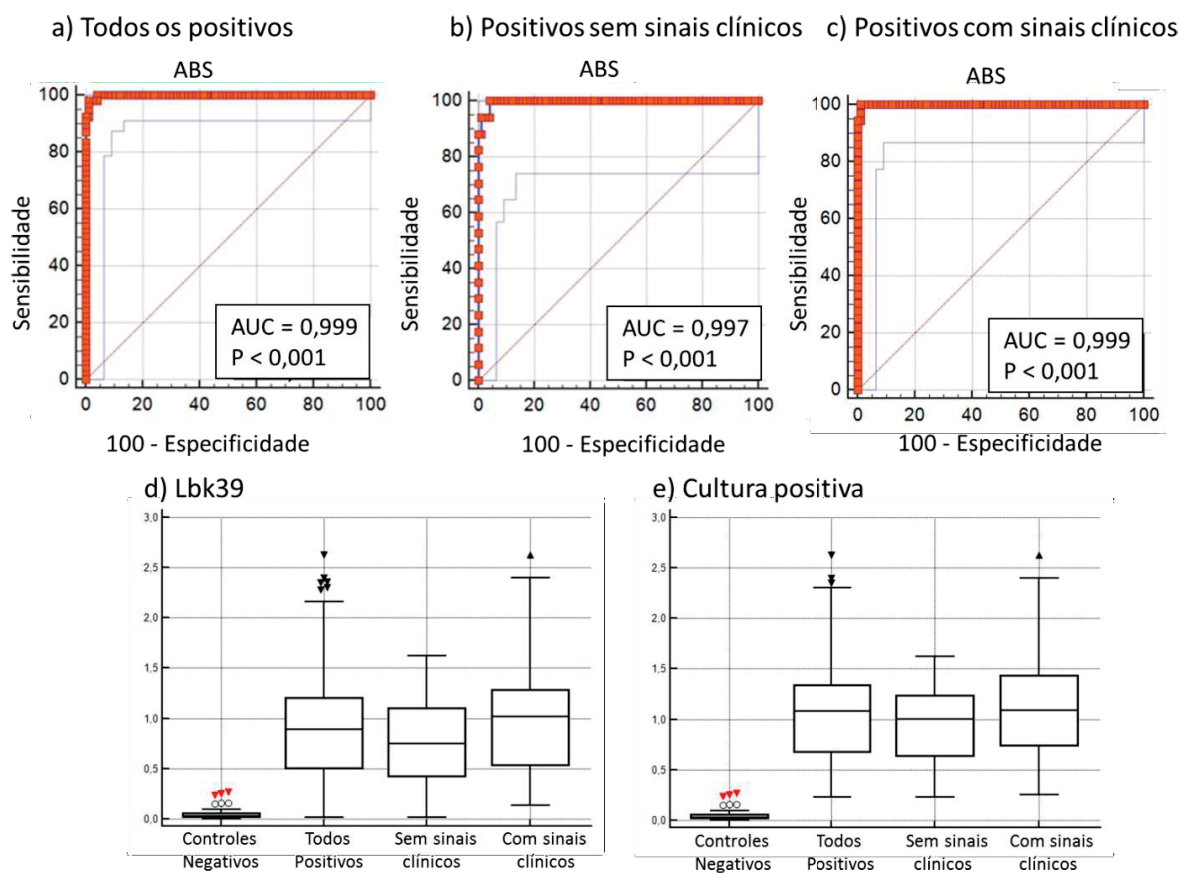
A comparação da distribuição de absorbância do teste ELISA para a proteína Lbk39 nos diferentes grupos (negativos, positivos com e sem sinais clínicos) foi mostrada na FIGURA 10D. A distribuição dos grupos com cultura positiva foram apresentados na FIGURA 8E. Todos os grupos e subgrupos de animais positivos apresentaram diferença significativa em comparação com o controle negativo. Quando a análise foi confinada apenas aos animais com cultura positiva, como esperado, tiveram maior distinção.

TABELA 6 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 56 AMOSTRAS DE CÃES COM CULTURA POSITIVA, DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA (COM OU SEM SINAIS CLÍNICOS)

Cultura Positiva	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)			
	Lbk39	Estimado	CI min	CI max	Estimado	CI min	CI max
Com sinais clínicos		100	90,3	100	98,7	92,8	100
Sem sinais clínicos		100	80,5	100	96	88,8	99,2

CI: intervalo de confiança

FIGURA 10 - COMPARAÇÃO DA REATIVIDADE DO ELISA DE SORO CANINO CONTRA A LBK39 EM SOROS COM CULTURA POSITIVA E, DA DISTRIBUIÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS NOS DIFERENTES GRUPOS



LEGENDA: A) Reatividade de todos os positivos. B) Reatividade dos positivos sem sinais clínicos. C) Reatividade dos positivos com sinais clínicos. D) Análise de todas as amostras. E) Análise de todos os conjuntos de ELISA positivos que apresentaram cultura positiva. Os símbolos representam os animais que apresentaram absorbância isolada dos demais, aonde cada um corresponde ao resultado obtido com soro individual. AUC: acurácia

4.5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DO TESTE SOROLÓGICO USANDO A PROTEÍNA Lbk39, TR-DPP, CULTURA E ELISA EXTRATO BRUTO

Para comparar o desempenho da Lbk39 com os outros testes parasitológicos e clínicos utilizados como diagnóstico de leishmaniose, o teste aqui padronizado foi comparado com o teste ELISA utilizando extrato bruto de *L.infantum*, o teste de fluxo lateral Tr-Dpp e cultura. Para essa comparação, utilizamos todos os soros positivos e negativos dos animais listados na TABELA 3. Essa avaliação mostrou que a proteína recombinante Lbk39 apresentou os melhores resultados quando comparada com todos os outros testes, para os parâmetros de sensibilidade (TABELA 7). Para o parâmetro especificidade a Lbk39 obteve 96,1% e o teste Tr-DPP apresentou 97,2%. A cultura apresentou alta especificidade, como já era esperado, porém, baixa sensibilidade (77%). Os cães com LVC são primeiro identificados por sinais clínicos e, em seguida, o teste Tr-DPP é aplicado, às vezes esse é o único teste realizado. Portanto, o grupo positivo foi dividido em cães com sinais clínicos e cães sem sinais clínicos, e foi avaliado a sensibilidade e especificidade de Lbk39 em comparação com o ensaio Tr-DPP (TABELA 8). Quando analisados os grupos individuais, o grupo de cães com sinais clínicos apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes e altas para ambos os testes, sendo o Tr-DPP um pouco mais específico. No entanto, em cães sem sinais clínicos, o teste ELISA com a proteína Lbk39 foi significativamente mais sensível.

TABELA 7 - COMPARAÇÃO ENTRE O ANTÍGENO Lbk39 E OUTROS MÉTODOS (TR-DPP, ELISA E CULTURA EM MEIO ARTIFICIAL), COM 78 AMOSTRAS DE CÃES POSITIVAS E 75 CONTROLES NEGATIVOS

Testes	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)		
	Estimado	CI min	CI max	Estimado	CI min	CI max
Antígeno Lbk39- ELISA	100	95,3	100	96,1	89	99,2
Tr-DPP	93,8	90	96,3	97,2	95,7	98,2
ELISA de extrato bruto	98,1	95,5	99,2	86,9	84,5	89
Cultura	77	69,8	82,9	100	-	-

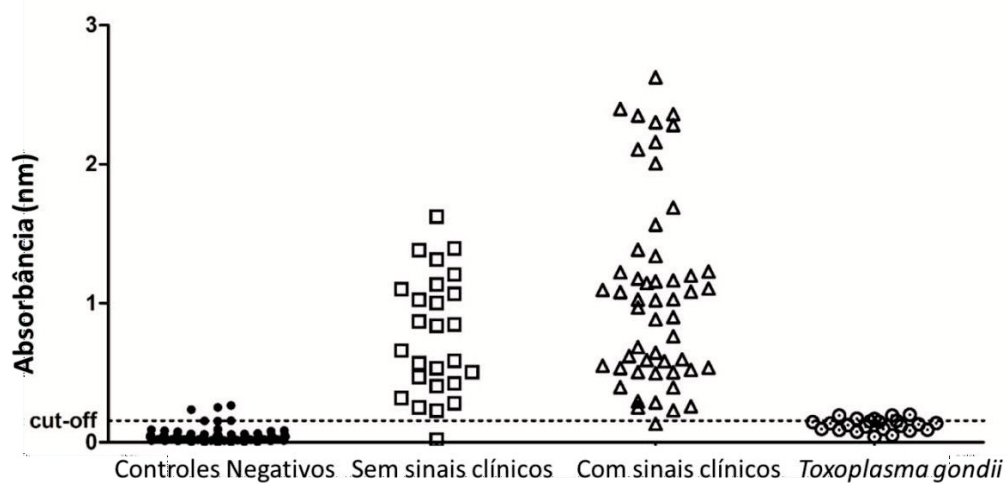
TABELA 8 - COMPARAÇÃO ENTRE O ANTÍGENO Lbk39 E O TR-DPP PARA AS 78 AMOSTRAS UTILIZADAS COMO CONTROLE POSITIVO, DE ACORDO COM A CLASSIFICAÇÃO (COM OU SEM SINAIS CLÍNICOS)

Teste	Sensibilidade (%)			Especificidade (%)		
	Estimado	CI min	CI max	Estimado	CI min	CI max
ELISA Lbk39						
Com sinais clínicos	98	89,6	100	98,7	92,9	100
Sem Sinais clínicos	100	86,3	100	96,1	88,9	99,2
Tr-DPP						
Com sinais clínicos	98	90	100	100	95	100
Sem Sinais clínicos	88	70	98	100	95	100

4.6 TESTE DE REAÇÃO CRUZADA PARA Lbk39

Para verificar o potencial de reação-cruzada com outro parasito intracelular, avaliamos o ELISA com Lbk39 contra amostras de soro de cães positivos para *T. gondii* (FIGURA 11). Observamos que a Lbk39 não apresenta reação-cruzada com *T. gondii*.

FIGURA 11 - ANÁLISE DE REAÇÃO-CRUZADA COM Lbk39 CONTRA *TOXOPLASMA GONDII*



4.7 PEPTÍDEOS: IMUNODETECÇÃO, IDENTIFICAÇÃO DE EPÍTOPO, ANÁLISE *IN SÍLICO* E SÍNTESE QUÍMICA

Os peptídeos gerados foram submetidos ao ensaio de imunodeteção com *pool* de amostras de soros humanos, obtidos de 5 humanos infectados com *L. infatum* e 5 humanos não infectados. Os soros de humanos não infectados não apresentaram reatividade comparados com os soros de humanos infectados. Igualmente foram testados os soros de cães com *T. gondii* para verificar reatividade cruzada.

Como resultado 15 peptídeos foram imunodetectados, e analisados *in silico* nos programas ABCpred e IEDB (dados não apresentados por apresentarem resultados individuais de cada aminoácido, foi optado por mostrar apenas o resultado do ABCpred). Na avaliação pelo *software* ABCpred obtivemos o score que variou de 0,89 a 0,91 ver TABELA 9, e foi optado por escolher o peptídeo que teve o maior *score*, sendo representado pelo peptídeo 409, e o segundo melhor, que apresentou uma maior parte da sequência que o programa apresenta como melhor antigenicidade, peptídeo 379. O peptídeo 335 não foi escolhido por apresentar baixa solubilidade em água. Com base nos valores de *score*, e das características apresentadas pelo *software* IEDB, os 2 peptídeos quimicamente solúveis foram sintetizados usando a química 9-florenil-metoxi-carbonil (Fmoc) no sintetizador automatizado. Após sintetizados, os peptídeos foram conjugados com BSA, para uso como antígenos em testes ELISA.

FIGURA 12 - SEQUÊNCIA PROTEÍNA RECOMBINANTE LBK39

```

MKPMAGNRQSPAGGESLANTKRQATYFQFDHVFWSV
ETPDACGARPATQADVFRITIGHPLVQHAFDGFNSCLFA
YGQTGSGKTYTMMGADVKTLLGGEGSGVTPRICLEIFE
RKASVEAEGHSRWSVELGYVEVYNERVSD LLGKRKKG
AKDGGEE VHVDVREHPNRGVFLEGQRVVEVGCLDDVV
RLIELGNGVRHTAATKMNER SSRSHAIIMLLREE RTM
TTTSGETIRTAGKNSRMNLVDLAGSERVAQSQVEGQQ
FKEATHINLSLTTLGASTCSRMAKKGARAQYTVAPFRD
SKLTFILRDSLGGNSKTFMIATVSPSALNYEETLSTLRY
ASRARDIVNVAQV NEDPRARRIRELEEQ MADMRKAMA
GGDPAYVSELKEKLTLLLESEAQKRAADLQALEREREHN
QVQERLLRATEAEKSELEARAAALQKEMTATTRQADE

```

MQTLNMRLKEEQESKERELLDEMAKKDAAFHAVQLRK
 DAEIARGRAKLQTTVAQLEREQHDREAALDALQTHQA
 KLQAALTSSAQTAERDKLQLQLAELLSEQERLVQALN
 DREQLSNDLQRIQVVCEETELGRKAALCALEEMEGRY
 HAAVFHLHTLMEIATEWEDELRRERALDELDAEAAEELD
 ELNAAAGKAENTASETISRITEQLRGAEERAAELAERD
 STTADLEERLRGAEERAAELASQLGATAAAKTLLERD
 DS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLGATAAAKTLLERD
 RDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLASTAAAKTLVEQ
 ERDSTTADLEERLRGAEERAAELASQLGATAAAKTLLER
QERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLASTAAAKTLL
 EQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLASTAAAKTL
 VEQERDSTTANLE **ERLQDAKKRA** **AELGRQLASTATAK**
KLLEQERDSTTADLEERLRGAEERAAELASQLASTAA
 KTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLASTAA
 AKTLLEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLASTA
 AAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLAST
 AAKTLVEQERDSTTADLEERLRGAEERAAELASQLGA
TAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQLA
 STAAAKTLLEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQL
 ASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELASQ
 LASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELAS
 QLASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AAELA
 SQLASTAAAKTLVEQERDSTTADLEERLRGAEERAAEL
 ASQLASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGAEER** AA
 LASQLASTAAAKTLLEQERDSTTADLEERLRGAEERAA
 ELASQLASTAAAKTLLEQERDS **TTANLEERLRGAEER** A
 AELASQLASTAAAKTLLEQERDS **TTANLEERLRGAEER**
RAAELASQLASTAAAKTLVEQERDSTTADLEERLRGAE
 ERAELASQLASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERLRGA**
EER AAELASQLASTAAAKTLVEQERDSTTADLEERLRG
 AEERAAELASQLASTAAAKTLVEQERDSTTADLEERLR
 GAEERAAELASQLASTAAAKTLVEQERDS **TTANLEERL**
RGAEER AAELASQLASTAAAKTLLEQERDSTTANLEER
MRDAKKRAAELARQLASTAAAKKQVEQERDSTTANLE
ERLRGAEER AAELASQLASTAAAKTLLEQERDSTTANL
ERLRDAKKRAAELASQLASTAAAKTLLEQELIMMKAN
 LEE **RLRDAKKRAAELASQ** LASTAAAKTLVEQERIMTRA
 DLEERLRDAKKRAAELASQ LASTAAAKKQVEQERDS **T**
TANLEERLRGAEER AAELASQLASTAAAKTLVEQERDS
TTANLEERLRDAKKRAAELASQ LASTAAAKKQ

LEGENDA: Em vermelho são as sequências ou parte das sequências que foram positivas na membrana por spot síntese (e repetições destas ao longo da sequência da proteína). Marcadas com quadrado azul, os peptídeos escolhidos para sintetizar e em negrito as repetições das regiões antigênicas dos peptídeos a serem sintetizados

TABELA 9 - PEPTÍDEOS REATIVOS NA IMUNODETECÇÃO E ANÁLISE *IN SÍLICO*

Linha	Coluna	Número	PM	Sequência/parte positiva no SPOT	Sequência da predição ABCpred	Score
8 (H11)	11	221	1586,2	LLGKR KKGAKDG GEE	KKGAKDG GEEVHVD	0,8
8 (H23)	23	233	1773,3	KMNERSSRSHAIIML	-	-
8 (H24)	24	234	1755,3	SSRSHAIIMLLREE	-	-
9 (I23)	23	263	1911,1	NEDP RARRIRE LEEQ	RARRIRE LEEQMAD	0,89
11 (K5)	5	305	1828	NDREQLSNDLQRIQV	-	-
12 (L5)	5	335	1501,9	SQL GATAAAK TLEEQ	LASQL GATAAAK TLEEQ	0,9
13 (M19)	19	379	1741,2	ERLQDAKKRAE LGR	EERLQDAKKRAE L*	0,89
13 (M20)	20	380	1600,1	AKKRAE LGRQLAST	EERLQDAKKRAE L	0,89
13 (M21)	21	381	1545	AELGR QLASTATAKK	EERLQDAKKRAE L	0,89
14 (N19)	19	409	1745	TTANLE ERLRGAEER	LLEQERD STTANLE **	0,91
19 (S11)	11	551	1757,3	MRDA KKRAE LARQL	EERLQDAKKRAE L	0,89
19 (S12)	12	552	1557	KRAE LARQLASTAA	EERLQDAKKRAE L	0,89
20 (T12)	12	582	1713,2	RLRDA KKRAE LASQ	EERLQDAKKRAE L	0,89
20 (T13)	13	583	1545	KKRAE LASQLASTA	EERLQDAKKRAE L	0,89

* Aparece 6x na sequência da proteína recombinante

** Aparece 23x na sequência da proteína recombinante

4.8 PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO ELISA USANDO OS PEPTÍDEOS COMO ANTÍGENOS

Os peptídeos sintetizados foram ressuspensos em água ultrapura, e avaliada sua concentração por kit de Micro BCAtm, no qual apresentaram concentração de 4.039,3 µg/mL para o peptídeo 379, e 4.783,3 µg/mL para o peptídeo 409. Os peptídeos foram nomeados como PepLi379 e PepLi409.

Após sintetizados, os peptídeos foram conjugados ao BSA. Para utilização dos peptídeos como antígenos no diagnóstico de Leishmaniose, foi necessário, primeiramente, realizar a padronização do método conforme descrito previamente. Para realização da padronização do ELISA de cães, foram utilizados *pools* de soros de cinco cães positivos e cinco cães negativos, já para a padronização do ELISA de humanos, utilizamos *pools* de soro de cinco pacientes infectados e não infectados. As padronizações escolhidas como padrão, tanto para humanos quanto para cães, foram determinadas a partir dos resultados que apresentaram maior diferença entre os controles positivos e negativos.

Foi escolhida como padrão tanto para humanos quanto para cães, a utilização de 0,031 µg de proteína por poço, soro diluído 1:200, conjugado diluído 1:7500, e bloqueio com caseína 2%, ao invés de BSA 4%, pois ao analisar os resultados, foi optado por seguir com o padrão utilizado no laboratório. Esses apresentaram o aumento de 10,6x para o peptídeo PepLi379, e 8,3x para o PepLi409. O valor da absorbância dos cães controles positivos em comparação com os controles negativos.

Em relação ao teste ELISA humanos, os peptídeos apresentaram aumento de 10,6x para o PepLi379, e 8,3x para o PepLi409 para humanos. Como controle da reação do teste ELISA, foi utilizado como antígeno a Lbk39, com concentração de antígeno de 0,125 µg de proteína por poço, com diluição de soro 1:200, e conjugado 1:7500, que são as concentrações e diluições padronizadas no presente estudo.

4.9 USO DO PEPLI379 PARA SORODIAGNÓSTICO POR ELISA DE LVC

O peptídeo PepLi379 foi testado como antígeno do teste ELISA para LVC, utilizando 40 amostras de soros de LVC, e controles negativos. A partir da padronização, foram utilizados como padrão, 0,031 de concentração de antígeno, 1:200 de diluição de soro e, 1:7500 de diluição de conjugado. O valor de *cut-off*, e a curva ROC foram obtidas pelo MedCalc 2.0 (FIGURA 13).

A Curva ROC foi aplicada utilizando os controles positivos e negativos das amostras, no qual, gerou o valor de sensibilidade, especificidade, AUC e índice de Youden J (TABELA 10). O índice foi sugerido por Youden (1950) como forma de resumir o desempenho de um teste diagnóstico. Seu valor varia de 0 a 1, onde valor zero é quando um teste diagnóstico dá a mesma proporção de resultados positivos para grupos com e sem a doença, ou seja, o teste não é útil. Já o valor de 1 indica que não há falsos positivos ou falsos negativos, ou seja, o teste é indicado para uso. O valor de index Youden J (0,950), e ACU (0,992) foram quase 1, o que indica que no utilizando o PepLi379 como antígeno, no ELISA, não apresentou falso positivo ou falso negativo.

FIGURA 13 - CURVA ROC PepLi379

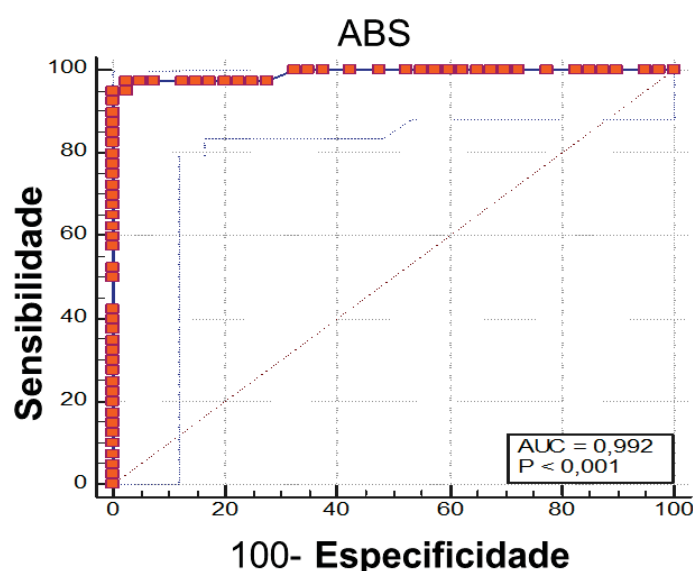


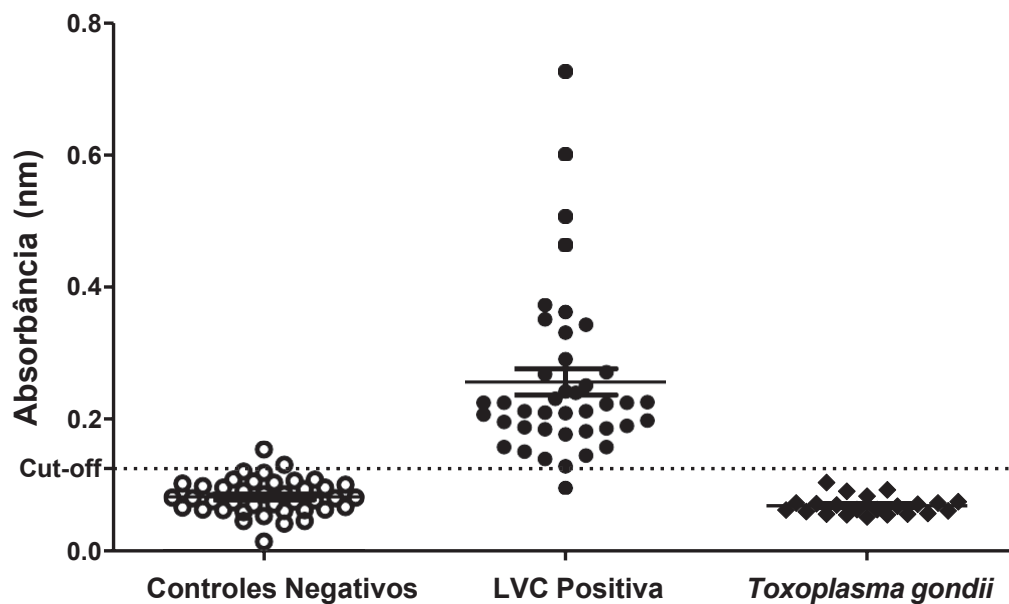
TABELA 10 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 40 AMOSTRAS, POSITIVAS E NEGATIVAS, DE CÃES

Sensibilidade	95% CI	Especificade	95% CI	AUC	Youden J
95,0%	86,8 - 99,9%	100,0%	91,2 -100,0%	0,992	0,950

4.10 TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA DO PepLi379 COM *T.GONDII*

Como o peptídeo PepLi379 foi testado como antígeno do teste ELISA para LVC, testamos se esse não apresentava reação cruzada com outro parasite intracelular. PepLi379 foi testado com 22 amostras de soros de *Toxoplasma gondii* e, comparados com os controles positivos e negativos de LVC. Podemos observar que PepLi379 não apresentou reação cruzada com *T. gondii* (FIGURA 14).

FIGURA 14 - ANÁLISE DA REATIVIDADE CRUZADA DO PepLi379



4.11 USO DO PEPLI379 PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVH E LCH

O PepLi379 foi testado como antígeno no teste ELISA para leishmaniose humana, tanto a visceral (LVH) quanto a cutânea (LCH). Para a LVH, foram utilizados 24 soros, positivos e 24 negativos. Já para a LCH foram utilizados 7 soros positivos, e 24 soros negativos. A FIGURA 15A, B apresenta a curva ROC para LCH e LVH, respectivamente. Estas foram obtidas pelo software MedCalc 2.0. O valor da sensibilidade, especificidade, AUC, e índice de Youden J estão apresentados na TABELA 11. A FIGURA 15C, D apresentam a distribuição da absorbância. Os dados mostram que o PepLi379 que apesar de ter alta especificidade, apresenta baixa sensibilidade e Youden J, no qual concluí-se que o PepLi379 não deva ser usado para diagnóstico de Leishmaniose humana.

FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DA ABSORBÂNCIA E CURVA ROC DO PEPLI379 PARA LEISHMANIOSE HUMANA

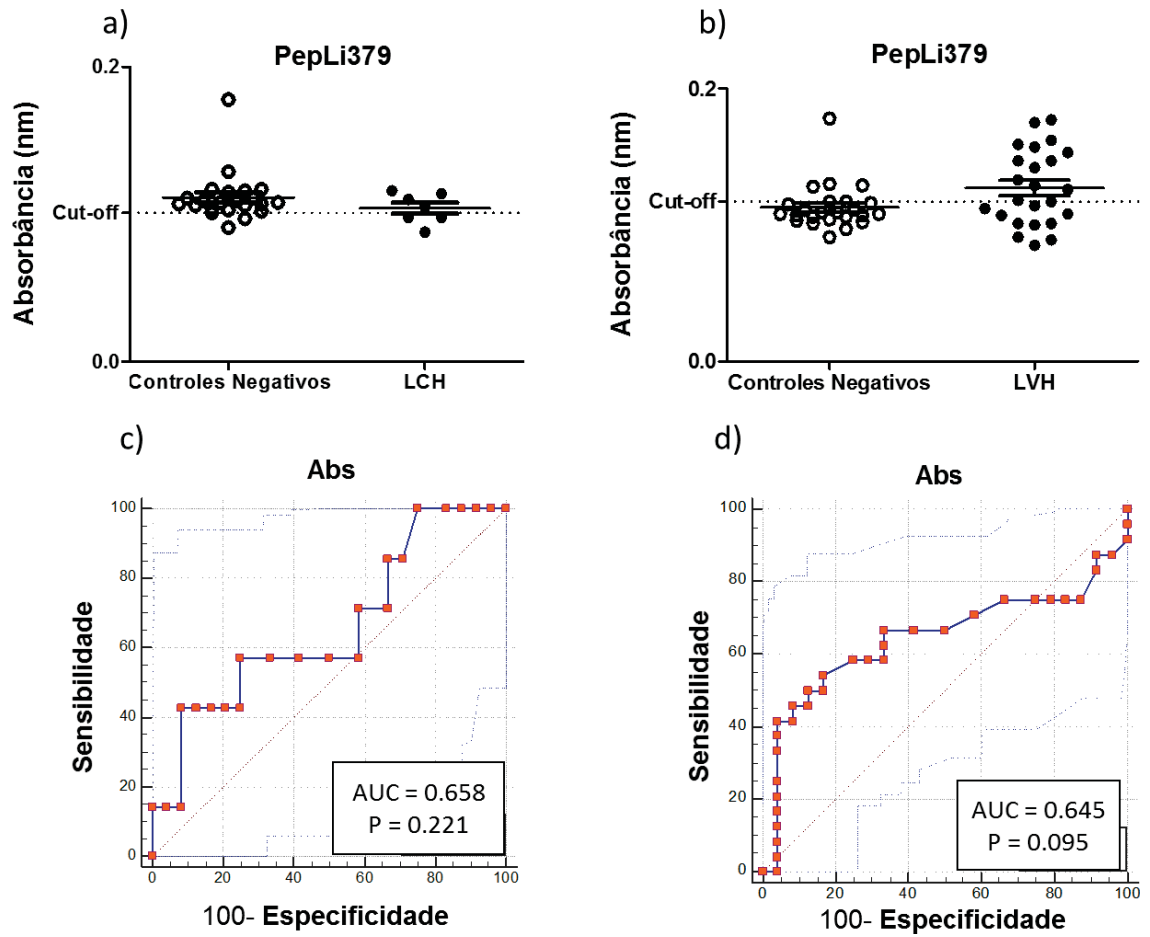


TABELA 11 - SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, AUC E YODEN J DO TESTE PARA LEISHMANIOSE HUMANA

	Sensibilidade	95% CI	Especificidade	95% CI	AUC	Youden J
PepLi379-LHC	42,9%	86,8-99,9%	91,67%	91,2 – 100,0%	0,658	0,345
PepLi379-LVH	41,7%	22,1- 63,4%	95,8%	78,9 - 99,9%	0,645	0,375

4.12 USO DO PEPLI409 COMO ANTÍGENO PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVC

O peptídeo PepLi409 foi testado como antígeno do teste ELISA para LVC, utilizando 40 amostras de soros de LVC, e controles negativos. A partir da padronização, foram utilizados como padrão, 0,031 de concentração de antígeno, 1:200 de diluição de soro e, 1:7500 de diluição de conjugado. O valor de cut-off, e a curva ROC foram obtidas pelo MedCalc 2.0 (FIGURA 16). A curva ROC foi aplicada utilizando os controles positivos e negativos das amostras, no qual, gerou o valor de sensibilidade, especificidade, AUC e index Youden J (TABELA 12). O valor de índice de Youden J (0,828), e ACU (0,968) foram quase 1, o que indica que no utilizando o PepLi409 como antígeno, no ELISA, não apresentou falso positivo ou falso negativo.

FIGURA 16 - CURVA ROC PEPLI409

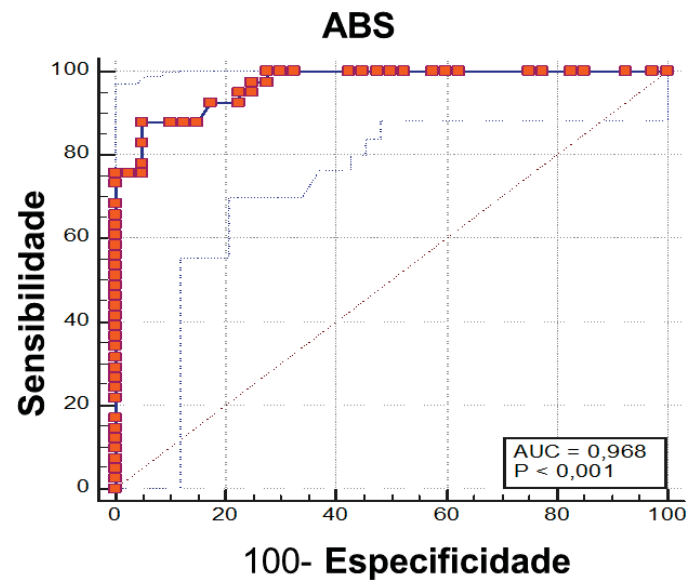


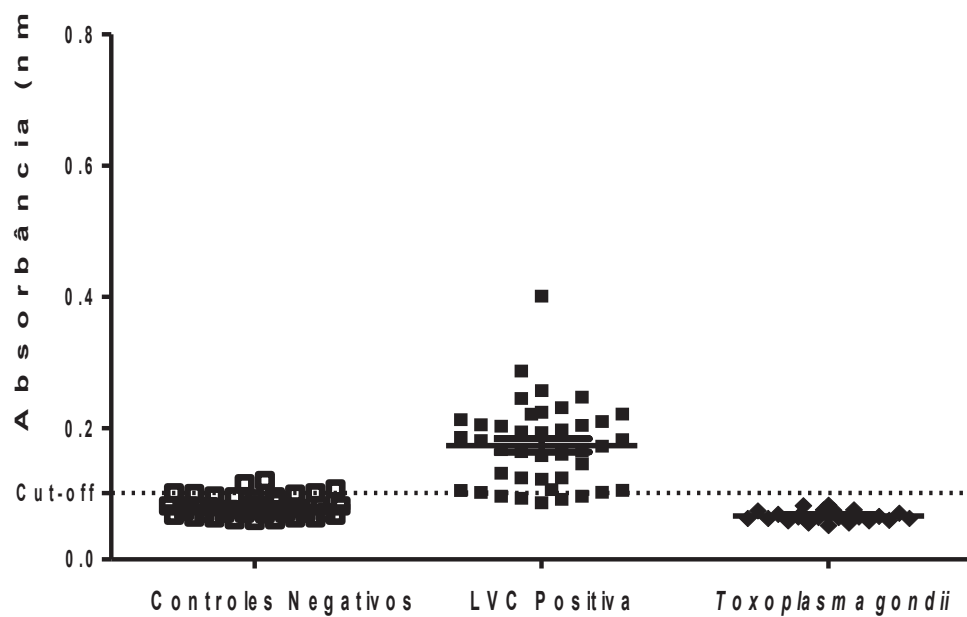
TABELA 12 - SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO TESTE PARA AS 40 AMOSTRAS, POSITIVAS E NEGATIVAS, DE CÃES

Sensibilidade	95% CI	Especificade	95% CI	AUC	Youden J
87,8%	83,1 – 99,4%	95,0%	76,3 - 97,2%	0,968	0,828

4.13 TESTE DE REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI409 COM *T. GONDII*

Como o peptídeo PepLi409 foi testado como antígeno do teste ELISA para LVC, foi testado se esse não apresentava reação cruzada *T. gondii*. PepLi409 foi testado com as 22 amostras de soros de *T. gondii* e, comparados com os controles positivos e negativos de LVC. Pode-se observar que PepLi409 não apresentou reação cruzada com *T.gondii* (FIGURA 17).

FIGURA 17 - ANÁLISE DA REATIVIDADE CRUZADA DO PEPLI409



4.14 USO DO PEPLI409 PARA SORODIAGNÓSTICO DE LVH E LCH

O PepLi409 foi testado como antígeno do ELISA para leishmaniose humana, tanto a visceral quanto a cutânea. Para a LVH, foram utilizados 24 soros, positivos e negativos. Já para a LCH foram utilizados 46 soros positivos, e 24 soros negativos. A FIGURA 18 A, B apresenta a curva ROC e, FIGURA 14C, D apresenta a distribuição da absorbância, para LVH e LCH, respectivamente. O valor da sensibilidade, especificidade, AUC, e índice de Youden J estão apresentados na TABELA 13. Os dados mostram que o PepLi409 apresentou alto valor de especificidade, sensibilidade, e Youden J, para ambas as leishmanioses, o que mostra que esse peptídeo praticamente não apresentou falso positivo ou falso negativo, concluindo ser um bom antígeno para uso em diagnóstico de Leishmanioses humana.

FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DA ABSORBÂNCIA E CURVA ROC DO PEPLI409 PARA LEISHMANIOSE HUMANA

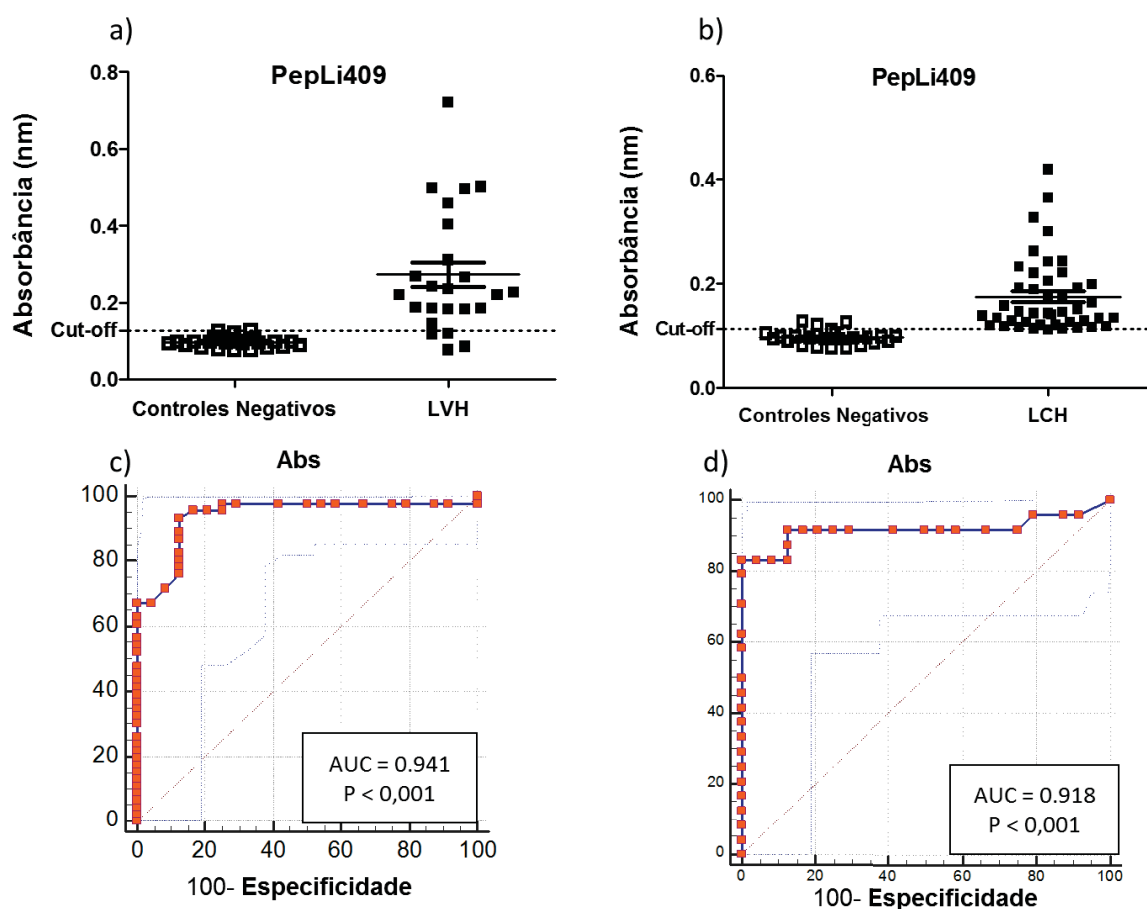


TABELA 13 - SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, AUC E YODEN J DO TESTE PARA LEISHMANIOSE HUMANA

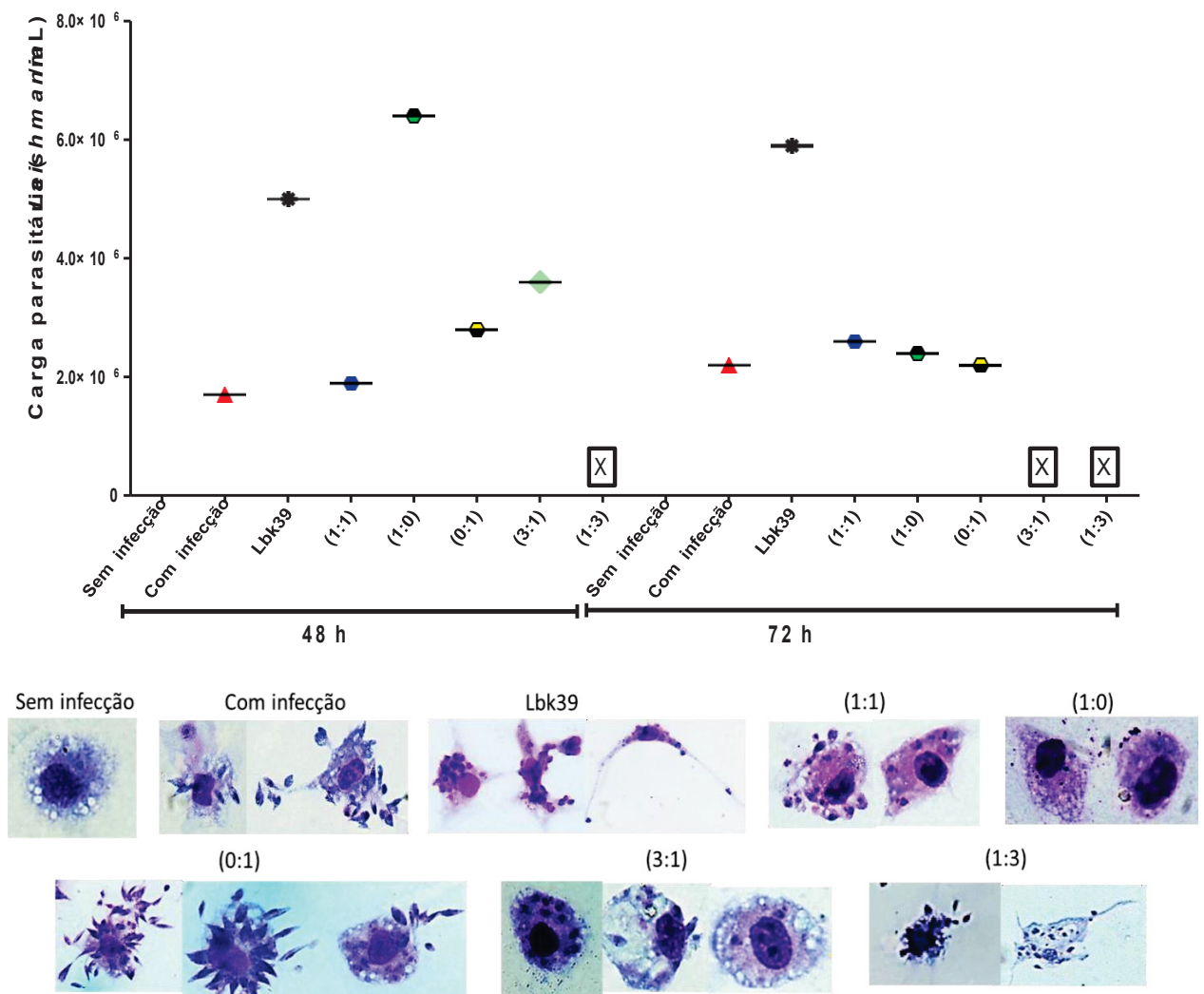
	Sensibilidade	95% CI	Especificidade	95% CI	AUC	Youden J
PepLi409-LCH	93,5%	82,1 - 98,6%	87,5%	67,6 - 97,3%	0,941	0,810
PepLi409-LVH	83,3%	62,6 - 95,3%	100,0%	85,8 - 100,0%	0,918	0,833


4.15 AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA IMUNIDADE *IN VITRO* DOS PEPTÍDEOS

Para avaliar se os peptídeos anteriormente estudados (PepLi409 e PSLi 379) geravam resposta imunológica, e sua capacidade para aplicação em protocolos vacinais contra leishmaniose, foi testado o uso destes *in vitro*. Os Mø peritoneais de camundongos foram plaqueados na concentração de 1×10^5 macrófagos/poço. Após 1 h, esses Mø receberam diferentes concentrações, que variavam de 0-15 µg/poço, como descrito na TABELA 14. Uma hora após os peptídeos serem plaqueado, os Mø foram infectados com 5×10^5 *L. infantum*/poço, e incubados por 4 horas, para começar a marcar o tempo zero. Como controle foi utilizado poço com a Lbk39, e poço com macrófago sem infecção. O *pool* dos sobrenadantes foram colocados em cultura e, as leituras foram feitas em 48 e 72 hrs (FIGURA 19). O número de *Leishmania* total foi contada em câmara de Neubauer.

TABELA 14 - COMBINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS PEPTÍDEOS

PepLi 379 µg/poço	PepLi 409 µg/poço	Nome
7,5	7,5	(1:1)
15	0	(1:0)
0	15	(0:1)
11,3	3,7	(3:1)
3,7	11,3	(1:3)

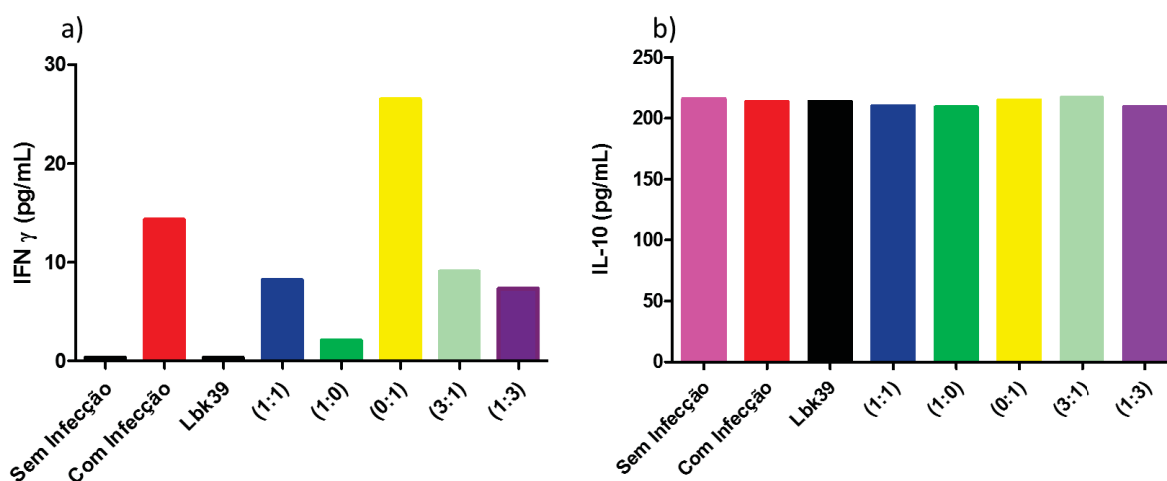
FIGURA 19 - CULTURA DE MØ, PEPTÍDEOS E *L. INFANTUM*

LEGENDA: O  apresenta as culturas que secaram e não foram possíveis de realizar contagem. Os Mø foram corados em 48 e 72 horas com May-Grunwald e Giemsa. O sobrenadante colocado em cultura foi contado no Microscópio óptico, OLYMPUS BX41, no aumento de 40x. As fotos foram retiradas no Microscópio óptico OLYMPUS BX51, no aumento de 100x. N=1, pool da triplicata de 1 experimento.

4.16 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR MØ ESTIMULADOS POR PEPTÍDEOS E INFECTADOS POR *L. INFANTUM*

O sobrenadante da cultura de MØ de 48 h foi utilizado para fazer dosagem de citocinas, IFN- γ e IL-10, de acordo com o descrito no item 3.2.4.10. Foi observado que todas as combinações das concentrações dos peptídeos, exceto a 0:1, houve uma tendência da diminuição na produção de IFN- γ , fato não observado com a produção de IL-10. O que mostra que os peptídeos apresentam uma resposta imunológica, e podem ser usados como antígenos vacinais.

FIGURA 20 - ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DAS CITOCINAS, IFN- γ E IL-10, PRESENTE NOS SOBRENADANTES DAS CULTURAS DE MØ

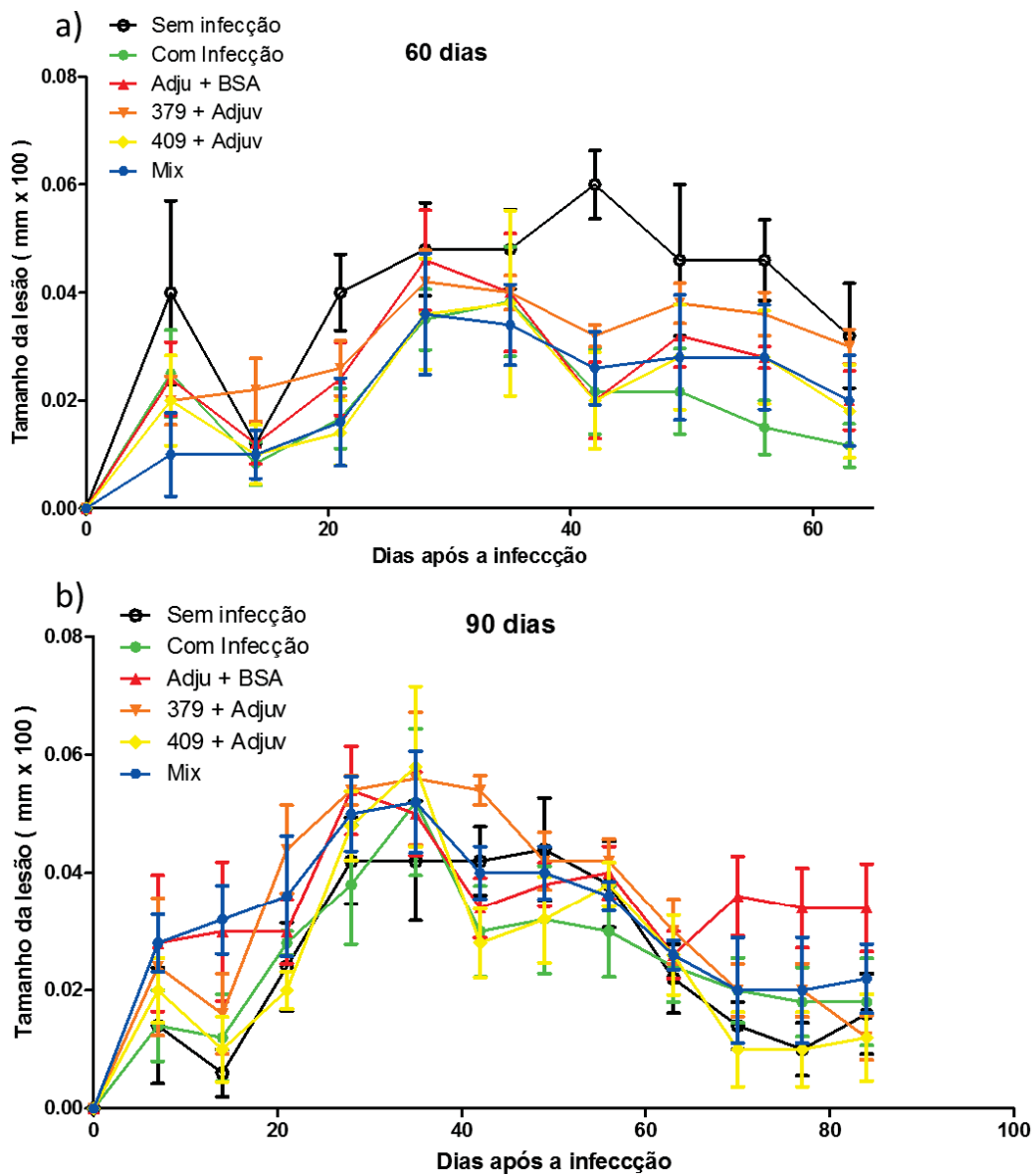


LEGENDA: As concentrações das citocinas IFN- γ (a), e IL-10 (b) foram determinados pelo método ELISA, usando kits comerciais BD, de acordo com as instruções do fabricante. Expresso em pg/mL. N=1, pool da triplicata de 1 experimento.

4.17 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS PEPTÍDEOS COMO ANTÍGENO PARA USO VACINAL

Os peptídeos conjugados com BSA foram usados como antígenos vacinais, acrescidos com adjuvante completo de Freud. Foram utilizados 60 camundongos BALB/c, divididos em 6 grupos, com 10 animais cada (Metodologia 3.2.4.4). Não houve diferença significativa no crescimento da lesão (FIGURA 21). Os animais do grupo controle sem infecção estavam brigando muito, e com isso, foram separados ao decorrer da experimentação, o que pode ter levado ao aumento da pata em comparação com os demais grupos.

FIGURA 21 - DESENVOLVIMENTO DA LESÃO NA PATA



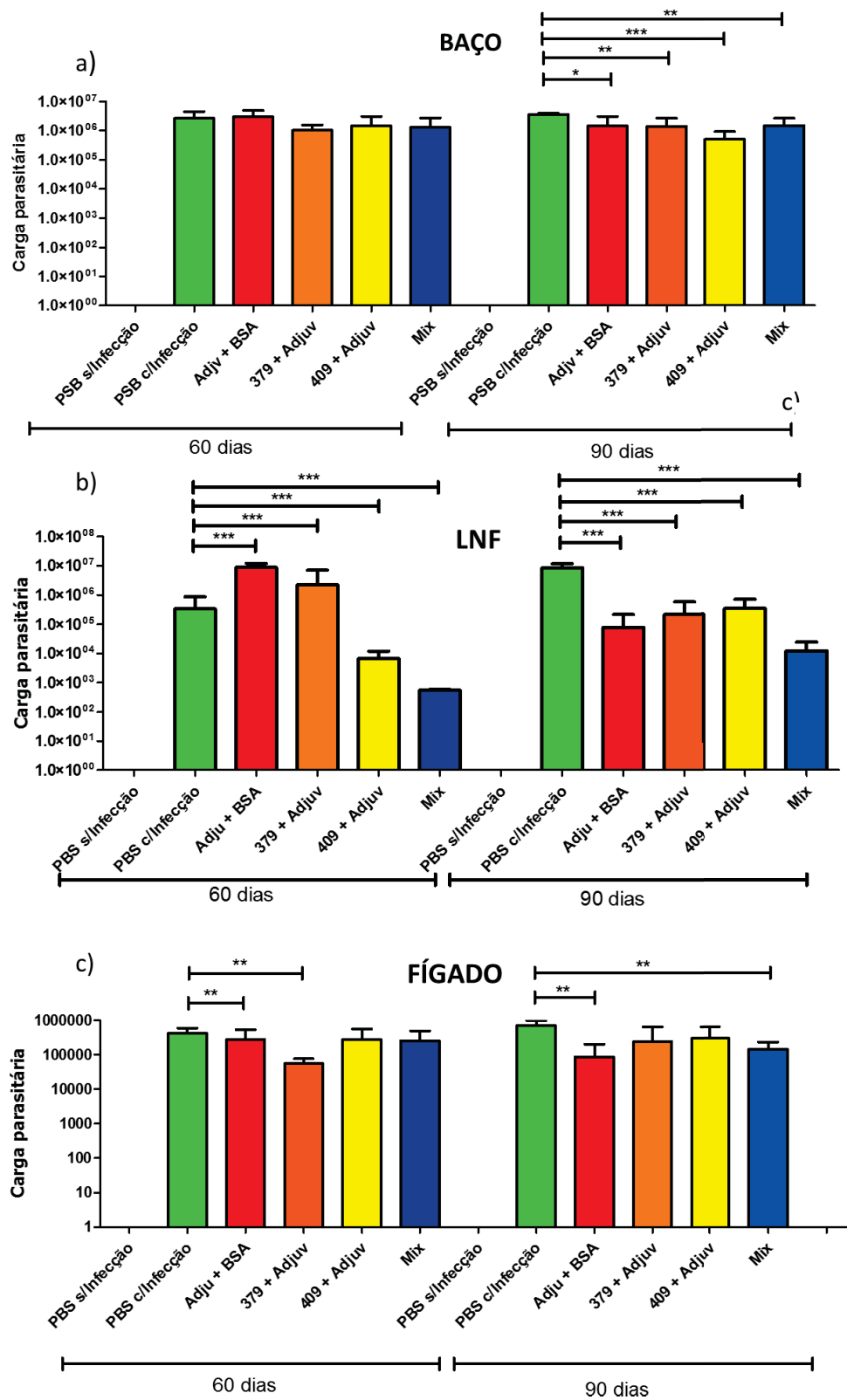
LEGENDA: Cada grupo é representado por N = 5; Resultados representativo de 1 experimento.

4.18 ANÁLISE DA CARGA PARASITÁRIA DOS GRUPOS VACINADOS

Para avaliar a eficácia da vacinação, os animais foram imunizados pela via intranasal com as composições já ditas, duas vezes, 14 dias antes do desafio. O desafiado foi feito com 1×10^6 de *L. infantum*, 60 e 90 dias pós desafio, 30 animais foram eutanasiados (a cada período), com baço, fígado, pata, linfonodo poplíteo, medula óssea, sangue e macrófagos retirados. Os números de parasitos por mg dos órgãos foram determinados pela técnica de diluição limitante e pesagem do baço, fígado e linfonodo. As combinações das vacinações apresentaram carga parasitária menor que o controle infectado após 90 dias, mostrando uma eficácia protetora em comparação com a vacinação em 60 dias (FIGURA 22A). No linfonodo poplíteo, a vacina composta por adjuvante e BSA e do peptídeo 379 apresentaram carga parasitária significativamente maior que o controle infectado, porém, quando observados pós 90 dias, houve redução significativa na carga parasitária dos animais vacinados em comparação com o controle, mostrando eficácia vacinal de todos os conjuntos de vacinas após 90 dias de infecção (FIGURA 22B).

Na FIGURA 22C, observa-se, através das análises estatísticas, que houve diferença significativa de ($P \leq 0,05$) da carga parasitária no fígado nos animais vacinados com o peptídeo 379 e adjuvante nos 60, e 90 dias após desafio, e redução na carga parasitária no fígado foi realizada com a vacinação do adjuvante com BSA e do composto MIX. Esses resultados mostram que a vacinação do composto MIX seria o ideal para composição da vacina, pois reduz a carga parasitária nos órgãos 90 dias após o desafio com *L. infantum*.

FIGURA 22 - AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA PÓS VACINAÇÃO NA INFECÇÃO POR *L. INFANTUM*



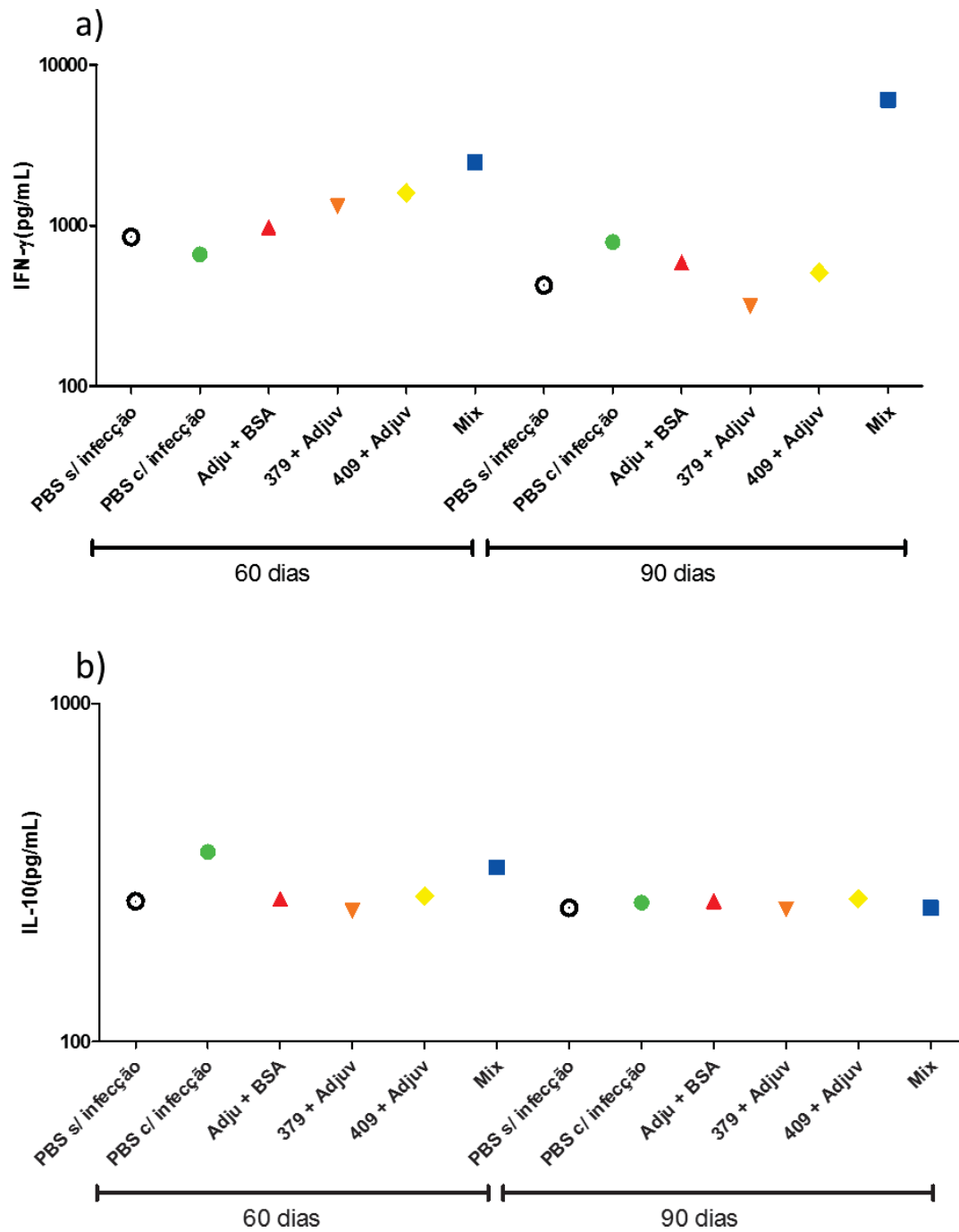
LEGENDA: O teste utilizado foi o t-test; (*) $P \leq 0.05$; (**) $P \leq 0.01$; (***) $P \leq 0.001$; $N = 5$;

Resultados representativo de 1 experimento.

4.19 ANÁLISE DO PERFIL DAS CITOCINAS DOS GRUPOS VACINADOS

Após avaliar o efeito da vacinação na carga parasitária, foi avaliado o perfil das citocinas encontradas no plasma sanguíneo dos camundongos. As concentrações das citocinas presentes no plasma foram determinadas pelo método ELISA. Pode-se observar que o grupo que recebeu a vacinação com o MIX dos peptídeos teve tendência de aumento da produção de IFN- γ em 60 e 90 dias. Os animais que receberam o peptídeo 379 com adjuvante, em 90 dias, houve diminuição da produção de IFN- γ . Os demais grupos apresentaram maior produção de citocina quando comparado com os animais do grupo controle, tanto infectados quanto sem infecção (FIGURA 23A). A produção de IL-10 se manteve semelhante em todos os grupos, tanto 60 quanto 90 dias após o desafio (FIGURA 23B). A TABELA 15 mostra o raio de produção de IFN- γ por IL-10 em pg/mL. O que pode estar relacionado com uma inflamação mediada por IFN- γ eficiente, já que a produção de IL-10 foi menor.

FIGURA 23 - ANÁLISE DA CONCENTRAÇÕES DE CITOCINAS IFN- γ E IL-10 PRESENTES NO PLASMA DOS ANIMAIS VACINADOS



LEGENDA: O teste foi realizado com o pool do plasma de 5 camundongos. Resultados representativo de 1 experimento.

TABELA 15 - RAZÃO DE PRODUÇÃO DE IFN- γ /IL-10

60 dias						
Grupos	PBS s/ infecção	PBS c/ infecção	Adju + BSA	379 + Adjuv	409 + Adjuv	Mix
[IFN- γ / IL-10]	3,27	1,82	3,69	5,39	5,95	7,57
90 dias						
Grupos	PBS s/ infecção	PBS c/ infecção	Adju + BSA	379 + Adjuv	409 + Adjuv	Mix
[IFN- γ / IL-10]	1,71	3,07	2,26	1,28	1,93	24,49

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos anos, estudos têm mostrado que os melhores antígenos para diagnóstico ou vacinas são compostos de regiões repetidas, no qual estão presentes em vários organismos e são caracterizados pela presença de dois ou mais cópias de sequências de aminoácidos. Isto ocorre pelo fato das sequências estimularem as células B, ligando-se a esses antígenos repetitivos, independentes de estimulação de linfócitos T (ROSATI et al., 2003; GOTO et al., 2008, 2010; VALIENTE-GABIOUD et al., 2011). Assim, proteínas que apresentam essas características são fortes candidatos para serem utilizados em teste diagnóstico e alvos vacinais.

Apesar dos diversos estudos para encontrar novos métodos diagnósticos, métodos com diagnóstico eficiente para LVC ainda não é acessível. É crucial métodos diagnósticos que sejam de fácil manipulação, baratos, e precisos, para o controle da doença. Com isso, as identificações de novos antígenos são necessárias. No presente trabalho, novos antígenos para diagnóstico/vacinação de leishmaniose foram feitos utilizando ferramentas de bioinformática, ABCpred e IEDB, e diversos testes utilizando imunoensaios. O ABCpred utiliza o método de *machine learning* para seleção. A sequência de Lbk39 é baseada em *L. braziliensis*, no qual exibe 59% de aminoácidos idênticos ao gene rK39 da *L. infantum*, o qual geralmente é utilizado em sorodiagnósticos de LV (de SOUZA et al., 2019). Com isso, utilizando a sequência da Lbk39 em spot síntese na membrana (FIGURA 12), 15 peptídeos foram reativos com múltiplos testes com amostras de soros. Após isso, estes foram avaliados *in silico*, e apenas dois foram sintetizados utilizando a técnica de Fmoc. Esses peptídeos mostraram boa reatividade como antígenos e foram capazes de reconhecer anticorpos específicos no ELISA. O PepLi379 e PepLi409 apresentaram score de 0,89 e 0,91, respectivamente (TABELA 8).

Dantas-Torres et al. (2006) mostraram que estudos conduzidos no nordeste do Brasil reportou que 85,3% de cães soropositivos são considerados infectados subclínicamente. Porém, essa prevalência pode ser menor, desde que os animais passem só por exames físicos, sem avaliação clinicopatológica, incluindo análises bioquímicas hematológicas e séricas, e exame de urina, e

cães que apresentam apenas um sinal clínico seja categorizado como infectados subclínicamente. Cães com infecção subclínica ou saudáveis são classificados como sem sinais clínicos em exame físico e não apresentam anormalidades clinicopatológicas nos testes, mas tem infecção por *L. infantum* confirmada (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; 2011). Estudos mostraram que há uma baixa percentagem de cães com infecção subclínicas, como no sudeste do Brasil, onde de 1,408 cães avaliados por IFAT e ELISA, a soroprevalência foi de 3,6% (51 cães), e 45% dos cães apresentam infecção subclínicas. Em Belo Horizonte, de 1,443 cães, 230 (15,9%) dos animais foram positivos para ELISA, enquanto 356 (24,7%) foram positivos para PCR, o que mostrou que a detecção foi melhor nos testes de PCR. Apenas 60 (16,8%) de cães positivos para PCR foram soropositivos (COURA-VITAL et al., 2011). Apesar da sensibilidade do PCR para identificação da infecção por *Leishmania*, essa técnica ainda apresenta alto custo, o que não faz ser viável o uso de tal (GOMES et al., 2007).

Diagnóstico preciso de LVC é importante por interromper o ciclo de vida do parasito e prevenir a dispersão da doença em áreas endêmicas (FRAGA et al., 2014; SINGH et al., 2015). A proteína recombinante tem sido validada aqui para uso em diagnóstico de LVC (PEREIRA et al., 2020). A produção do antígeno não foi realizada em *E. coli*, mas sim em *L. tarentolae*. Como o antígeno recombinante é derivado de espécies de *Leishmania*, o uso desse sistema maximiza a probabilidade de sucesso da expressão. A proteína antigênica produzida por expressão heteróloga de epítomos de *Leishmania* específicos em sistema procariótico, tais como *E. coli*, é barato para a cultura e permite rápido processamento da proteína recombinante alvo. Entretanto, esse sistema apresenta desvantagens, como atividade eucariótica pós-translacional, podendo aumentar os níveis de proteínas desdobradas, resultando na redução da eficácia. Além do fato que a temperatura ideal de cultivo para a *E.coli* pode reduzir a produção de proteínas recombinantes e aumentar a degradação da proteína (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). *L. tarentolae*, que é uma espécie não patogênica ao homem, tem sido explorada como hospedeiro eucariótico geral com o objetivo de desenvolver plataforma que permita altos níveis de expressão das proteínas do complexo eucariótico e tenha habilidade de produzir proteínas com processamento pós-translacional apropriado (BASILE; PETICCA,

2009). Esse tipo de hospedeiro é facilmente manipulado, e possui meios baratos de cultivo, com duplicação dentro de 6-8 horas. A Lbk39, em estudos recentes do nosso grupo, apresentou resultados excelentes para LC e LHV (de SOUZA et al., 2019).

No presente trabalho, utilizamos a proteína recombinante Lbk39 e seus peptídeos, PepLi379 e PepLi409, como antígenos no teste ELISA. O teste ELISA foi escolhido por ser usado para fazer o *screening* de doenças em laboratórios, sendo geralmente mais confiável e sensível que outros testes laboratoriais (SRIVIDYA et al., 2012; ABASS et al., 2015). A Lbk39 mostrou sensibilidade de 100% (TABELA 6, FIGURA 10) quando comparada com testes de TR-DPP (93,8%) (TABELA 7), ELISA utilizando o extrato bruto de *Leishmania* (98,1%) ou o cultivo (77%) (TABELA 7). Os peptídeos, PepLi379 e PepLi409, apresentaram 95% (FIGURA 13, TABELA 10) e 87,8% (FIGURA 16, TABELA 12) de sensibilidade, respectivamente. A especificidade da Lbk39 foi similar ao do TR-DPP (96,1% e 97,2%, respectivamente), e melhor que do extrato bruto, que foi de 86,9%. Já o peptídeo PepLi379 apresentou 100% (TABELA 10), e o PepLi409, 95% (TABELA 12) de especificidade. Esses resultados mostram que a Lbk39, têm alta probabilidade de resultados positivos na presença da doença, e possuem menor probabilidade de resultados falsos negativos na ausência da doença comparada com os outros testes. Já os seus peptídeos apresentaram menor sensibilidade quando comparados com a proteína recombinante e os demais testes, porém, o PepLi379 apresentou maior especificidade em comparação a Lbk39, TrR-DPP e extrato bruto, mostrando ter a menor probabilidade de falsos negativos na ausência da doença.

Para aumentar a especificidade e minimizar a probabilidade de falsos positivos, nos utilizamos o *cut-off* baseado no desvio padrão dos resultados negativos de cães saudáveis, e tanto a Lbk39 quanto seus peptídeos não produziram muitos resultados falsos negativos. Nossos resultados corroboram com dados publicados, que mostraram que proteínas repetitivas mostraram maior sensibilidade que quando comparada com proteínas que não apresentavam repetições, utilizando amostras biológicas de cães. E corroboram com estudos que mostram que peptídeos são bem utilizados como antígenos. Faria et al. (2011) mostraram que os 10 peptídeos que eles utilizaram como

teste, mostraram máxima de 84,1% de sensibilidade e 80% de especificidade, o que está compatível com resultados de vários outros peptídeos utilizados como antígenos para diagnóstico de LVC (SOTO et al., 1998; PORROZZI et al., 2007; MAIA; CAMPINO, 2008). Vos (2000) e Laurenti (2014) mostraram diferença na sensibilidade entre soros de cães e humanos. Isso pode estar relacionado com a interação parasito-hospedeiro em relação ao reconhecimento e apresentação dos antígenos estudados no SI ou aos diferentes mecanismos de sobrevivência que os parasitos apresentam em diferentes tipos de hospedeiros (LAURENTI et al., 2014). Os resultados podem depender do estágio que a doença está no momento no qual a amostra foi coletada (METTLER et al., 2005), e depende do status (QUINNELL et al., 2001; REITHINGER et al., 2002), e uma importante limitação no controle de LVC é a ineficiência que geralmente os testes apresentam em identificar cães assintomáticos, pois os testes possuem baixa sensibilidade (DYE; VIDOR; DEREURE, 1993). Assim, um antígeno sensível e específico para a detecção de cães assintomáticos seria altamente desejável porque permitiria uma intervenção efetiva de controle da doença. Fato que podemos observar no presente trabalho, no qual os antígenos utilizados são capazes de detectar a doença em animais sem sinais clínicos.

Ao avaliar apenas os animais que apresentaram cultura do parasito positiva, com ou sem sinais clínicos, nós observamos que nossa proteína apresentou 100% de sensibilidade em ambos os grupos, e pequena variação na especificidade entre os animais com sinais clínicos (98,7%) e sem sinais clínicos (96,0%). Quando comparada com o teste TR-DPP, podemos observar que o grupo com sinais clínicos mostrou maior sensibilidade (98,0%) que os animais sem (88%). Porém, quando avaliado a especificidade, que no TR-DPP era de 100% nos grupos sem e com sinais clínicos, a Lbk39 apresentou especificidade entre 96,1% e 98,7% (TABELA 8). Nossos dados corroboram com o estudo apresentado por Grimaldi e colaboradores (2012), que mostrou que o TR-DPP tem apresentado bons resultados na detecção de cães com sintomas (98%) quando feito em área endêmica, mas possui baixa detecção em cães que não possuem sintomas (47%). Laurenti et al. (2014) mostraram que o TR-DPP é melhor na detecção de animais sintomáticos (92,1%) que animais assintomáticos (89,4%). Em nosso estudo a Lbk39 apresentou acurácia de

0,998, o peptídeo PepLi379 de 0,992 e o PepLi409 de 0,968, mostrando o potencial destes antígenos para uso em teste diagnósticos. E a vantagem de produção mais barata e rápida.

Nos últimos 10 anos, diversos métodos diagnóstico têm sido utilizados com especificidade e sensibilidade variáveis. O cPCR apresentou sensibilidade de 89-100% em animais que apresentaram diversos sinais (LACHAUD et al., 2002; MANNA et al., 2004; CARSON et al., 2010), porém, em animais sem clínica, apresentou menor sensibilidade (FRANCINO et al., 2006; GAO et al., 2015). O teste por qPCR apresentou 91% de sensibilidade comparado com cPCR (72%), ITS-1 PCR (54%) e PCR híbrido (61%) (CARSON et al., 2010). O teste molecular LAMP, apresentou 90,7-96,4% e 98,5-100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente. Porém, na China, este foi capaz de identificar 61% dos cães infectados, porém, não amplificou DNA de cepas em outros países (GAO et al., 2015). Embora alguns testes sorológicos para leishmaniose canina tenham alta especificidade e sensibilidade, a presença de reação cruzada continua controverso. Testes que utilizam anticorpos imunoflorescentes, que é referência de diagnóstico de LVC em alguns países (PALTRINIERI et al., 2016), no qual apresenta sensibilidade e especificidade próximos de 100%, em animais com sinais clínicos, apresentam algumas limitações, como reatividade cruzada com patógenos tripanossomatídeos (SOLANO-GALLEGO et al., 2014; PALTRINIERI et al., 2016), e possuem baixa sensibilidade em identificar animais sem clínica quando comparados com ELISA (METTLER et al., 2005). Com isso, concluímos que, até o presente momento, a melhor técnica utilizada para diagnóstico de LVC seria a metodologia ELISA.

Para verificar a reatividade cruzada contra os antígenos de escolha, devem ser utilizados soros de cães infectados com outros organismos patogênicos como *T. cruzi*, *Babesia canis*, *Dirofilaria immitis* e *T. gondii*. Entretanto, no presente estudo foi realizado testes com os soros de cães infectados com *T. gondii*. Em estudos prévios, a reatividade cruzada entre espécies de *Leishmania* e de *T. gondii* foram testadas por ELISA e IFAT (BOELAERT et al., 2007; FERREIRA et al., 2007) e mostrou que não há reatividade cruzada. Entretanto, outros estudos mostraram que metade dos cães (5/10; 50%) com anticorpos anti-*T. gondii* foram erroneamente considerados

sorologicamente positivos para LV (TÁVORA et al., 2007). Para validar um método diagnóstico, tais problemas precisam ser levados em consideração, para obtenção de resultados confiáveis e precisos. O uso tanto da Lbk39, quanto de seus peptídeos PepLi379 e PepLi409, contra soro de cães infectados com *T. gondii* não mostraram reatividade cruzada, sendo essas amostras semelhante às amostras negativas de LVC, como apresentado nas FIGURAS 11, 14, 17 respectivamente.

Estudo do nosso grupo mostrou que a utilização da Lbk39 em sorodiagnóstico de LC causadas pela *L. braziliensis* apresentou 88% de sensibilidade e 98% de especificidade, comparado com 98% de sensibilidade e 100% especificidade em pacientes com LV. E apresentou diferença entre controle negativo e positivo de 30x e 28,4x para LV e LC respectivamente (de SOUZA et al., 2019). Ao avaliar os peptídeos derivados da Lbk39, podemos observar que o PepLi379 apresentou 41,7% de sensibilidade e 95,8% de especificidade para LV, e 42,9% de sensibilidade e 91,67% de especificidade para LC (TABELA 11, FIGURA 15). Já o peptídeo PepLi409 apresentou 83,3% e 100% de sensibilidade e especificidade para LHV e 93,5% e 87,5% de sensibilidade e especificidade para LHC (TABELA 13, FIGURA 18). A sensibilidade e especificidade de testes para leishmaniose são influenciados por diversos fatores, tais como propriedades que os antígenos apresentam, o tipo de infecção, a variação do parasito e a população que este atinge. Apesar de não haverem estudos que mostrem que os níveis de anticorpos contra proteínas relacionadas à *L. braziliensis* em pacientes com LCH e LV até o estudo do nosso grupo ser publicado (de SOUZA et al., 2019), poucos estudos têm sido feitos para tentar investigar a reação destes anticorpos em pacientes com LC. Em 2011 Oliveira et al. mostrou que antígenos recombinantes possuem habilidade de identificar pacientes infectados com *L. infantum*, e pacientes com LC tiveram menor sensibilidade. No presente estudo, utilizando proteínas recombinantes ou seus peptídeos verificou se sensibilidade e especificidade pois o peptídeo PepLi409 apresentou valores significantes, e semelhantes ao apresentado pela proteína Lbk39, e foi capaz de identificar pacientes com LC causada por *L. braziliensis*, além da capacidade de detectar pacientes com LV. Esses resultados mostram a importância do uso deste como antígeno para detecção

de LH. Porém, quando observamos os valores do peptídeo PepLi379, percebemos a não capacidade deste em detectar, tanto LC quanto LV, não sendo um bom candidato para uso em detecção de LH. Devido aos baixos títulos de anticorpos observados em pacientes com LC quando comparado com LV, estudos como de Menezes-Souza et al. (2015), optou por selecionar apenas proteínas presente no agente causador, a *L. braziliensis*, para garantir o maior espectro de diagnósticos (VEXENAT; SANTANA; TEIXEIRA, 1996; BRITO et al., 2000), porém eles observaram leve redução no desempenho da proteína, CatL, em fazer o diagnóstico nesses pacientes, quando comparado com peptídeos sintéticos. E levantaram a hipótese que poucas substituições de aminoácidos, podem interferir no epítopo e responder de maneira diferente nas espécies de *Leishmania*, podendo desencadear diferentes exposições do epítopo. As alterações poderiam ser na estrutura conformacional e essas características se associam a possibilidade de induzir a seleção de diferentes clones de células B produtoras de anticorpos específicos, podendo induzir pequenas variações no reconhecimento do mesmo epítopo por indivíduos afetados por diferentes formas clínicas.

Peptídeos sintéticos são altamente interessantes detectar anticorpos contra LV (de BRITO et al., 2018). Recentemente, vacinas peptídicas compostas por multi-epítopos, que é um subconjunto de vacinas peptídicas, no qual são compostas por segmentos antigênicos pequenos, tem chamado atenção. Esse tipo de vacina é mais seguro quando comparadas com as vacinas tradicionais (HOS et al. 2018; RUECKER; GUZMÁN, 2012), e pelo fato dessas responderem bem aos desafios com *L. infantum* (GOTO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2018). Entretanto, essas vacinas acabam sendo pobres imunógenos, o que faz necessidade do uso destes com adjuvantes (LI et al., 2014).

A resposta em cães infectados com *L. infantum* é altamente variável (SOLANO-GALLEGO et al., 2001). Sabe-se que a resistência canina é dada primeiramente pelo desenvolvimento de células Th, predominantemente Th-1, resposta imune mediada por células contra o parasito (SANTOS-GOMES et al. 2002; CARRILLO; MORENO, 2009). Portanto, ainda existe uma clara necessidade de se fortalecer a RI, específica de cada cão, com objetivo de manter sua imunidade e este permanecer saudável. Além disso, o controle

apropriado da RI controla a replicação do parasito, além reduzir o número de cães que servem como reservatório para mosquitos *naïve* (BONGIORNO et al., 2013). A partir disso, muitos autores defendem que a produção de uma vacina efetiva em cães seja eficaz para o controle do espalhamento da doença, tanto para cães como para os humanos (DYE, 1996). Existe consenso que programa de controle ideal para a LVC seja a partir da combinação de vacinas com produtos repelentes para maximizar a proteção dos cães (GRAMICCIA, 2011). A vacina LiESP/QA-21 (CaniLeish®, Virbac, França) que foi lançada na França em 2011, mostrou um rápido início de uma RI de tipo Th-1 depois do uso desta, com base na produção específica de IFN- γ em linfócitos após a estimulação *in vitro* e o aumento da atividade leishmanicida dos M ϕ de cães vacinados (MORENO et al., 2012), e se mostrou eficiente anos depois da vacinação (MORENO et al., 2014). Entretanto, como o parasito tem uma tendência em promover resposta do tipo Th-2 durante a infecção, é importante demonstrar que o desafio significativo com o parasito virulentos não reverta o perfil imunológico protetor induzido pela vacinação (MURRAY et al., 1997). No presente trabalho, ao testar as combinações dos peptídeos *in vitro*, podemos observar que em 48 h todos os grupos apresentaram uma carga parasitária maior em comparação ao controle positivo, porém, após 72h, os grupos, com exceção da proteína recombinante Lbk39, apresentou uma diminuição da carga parasitária, e ficou semelhante a carga do controle positivo (FIGURA 19).

A produção de citocinas, principalmente IL-10, IL-4, TGF-B e IFN- γ , na leishmaniose tem papel fundamental em manter a susceptibilidade ou resistência à doença. Estudos mostram que a IL-10 está associada com a infecção, tanto em experimentos murinho quanto humanos, e são observados que a produção de IL-10 *in vitro*, durante uma infecção por *Leishmania*, desempenha um papel que limita a produção de IFN- γ , pelas células NK e as TCD4⁺ (SCHARTON-KERSTEN et al. 1992; ROCHA et al. 1999). Na LC, a IL-10 influencia na ativação dos M ϕ , e promove a persistência do parasito (HAGENBAUGH et al., 1997; GROUX et al., 1999; KANE; MOSSER, 2001). No presente estudo, ao avaliarmos o perfil de citocinas dos sobrenadantes do cultivo *in vitro*, observamos uma alta produção de IL-10 *in vitro* (FIGURA 20B), e esta foi semelhante em

todos os grupos estudados, porém uma menor produção de IFN- γ (FIGURA 20A). A alta produção de IL-10 pode ter suprimido a produção de IFN- γ . Entretanto, avaliando apenas a geração de IFN- γ , o grupo que gerou melhor produção foi o tratado com o peptídeo PepLii409, então este é um forte candidato para uso vacinal. E esse resultado corrobora com candidatos prévios de vacinas peptídicas, que apresentam declínio significativo na carga parasitária depois da imunização profilática (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; BASU et al., 2005; DARABI et al., 2005; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006).

A partir desses resultados, optamos por seguir com o experimento vacinal em camundongos BALB/c, separados em 6 grupos, eutanasiados nos dias 60 e 90 pós desafio. A carga parasitária no baço dos animais não apresentou diferença nos 60 dias. Em 90 dias, o grupo vacinado com peptídeo PepLi409 apresentou redução significativa na carga em comparação com o grupo apenas infectado. No linfonodo poplíteo, em 60 dias, o grupo PepLi409 e o Mix dos peptídeos apresentaram redução significativa de carga parasitária, quando comparado com o controle. Porém os demais apresentam maior carga parasitária. Em 90 dias, todos os grupos controlaram bem a infecção pelo parasito, com diminuição significativa em todos os grupos, sendo a redução maior do grupo Mix. No fígado, o PepLi379 verificou redução significativa na carga parasitária, porém não se manteve em 90 dias. Em 90 dias o melhor resultado foi o grupo Mix e controle de Adjuvante com BSA (FIGURA 22).

Avaliando o perfil das citocinas pós vacinação, em 60 dias observamos que todos os grupos vacinados apresentaram semelhança na produção de IL-10, porém apresentaram tendência em diminuir a produção nos grupos vacinados (FIGURA 23B). A IL-10 nesse em modelo de BALB/c tem papel patogênico, como apresentado na literatura, mostrando que o aumento desta e a diminuição dos níveis de IFN- γ produzidos no baço (PEREIRA et al., 2017), pode ser o principal fator da falha de uma terapia/vacinação. A IL-10 possui efeitos variados nos modelos de animais com LC e LV, podendo suprimir a produção de NO e as atividades leishmanicida nos M ϕ , o que leva a supressão das respostas do tipo Th1, conseqüentemente levando à progressão contínua da infecção em camundongos susceptíveis e prevenindo a eliminação (cura estéril)

em camundongos resistentes (MCMAHON-PRATT; ALEXANDER, 2004). Estudos mostram que BALB/c deficientes de IL-10 são resistentes à infecção com *L. mexicana* e *L. amazonensis*, mas são incapazes de limitar o crescimento da lesão e o número de parasitos, ao contrário de animais infectados com *L. major* (PADIGEL; ALEXANDER; FARRELL, 2003). Embora a alta produção de IFN- γ e NO em camundongos IL-10 $-/-$ levem a resistência destes a infecção, isso não regula negativamente o desenvolvimento de uma resposta tipo Th2.

Alguns estudos prévios têm reportado que vacinas peptídicas profiláticas têm sido associadas com respostas do tipo Th1 em BALB/c (IBORRA et al., 2005; COLER et al., 2007; ALMEIDA et al., 2018). O IFN- γ é um dos principais marcadores de resposta do tipo Th-1 que induz resposta protetora ao hospedeiro contra LV (SOLANO-GALLEGO et al., 2016). Camundongos IFN- γ $-/-$ são incapazes de inibir o crescimento de *Leishmania* e induzem resposta do tipo Th-2, levando a infecção letal (WANG et al., 1994). O IFN- γ ativa os M ϕ que levam ao aumento da síntese de NO e mata os patógenos intracelulares (GANNAVARAM et al., 2016).

Avaliando o perfil da IFN- γ pós vacinação, em 60 dias observamos que todos os grupos vacinados apresentaram um aumento na produção sanguínea de IFN- γ em comparação com os controles, sendo o grupo que recebeu a composição Mix teve um aumento na tendência de produção de IFN- γ . Já em 90 dias, com exceção do grupo imunizado com o Mix de peptídeos que apresentou alta produção de IFN- γ , os demais grupos apresentaram produção menor em comparação com o controle (FIGURA 23A). Comparando com diminuição da carga parasitária nos órgãos (mostrados acima), mostra o potencial dessa composição, e que a produção de IFN- γ , tanto 60 quanto 90 dias, influenciou na redução da carga parasitária, dados que corroboram com a literatura.

Vakili et al. (2019) mostraram resultados semelhantes utilizando multi-epítomos (histona H1, esteroide 24-c-metiltransferase, proteína hipotética específica de *Leishmania* e proteína antigênica específica de *Leishmania*) com adjuvante de Freund, porém eles utilizam uma concentração de 30 μ g de peptídeo. A vacina obteve uma resposta predominantemente do tipo Th1, com

altos níveis de IgG2a. A maioria das vacinas peptídicas contendo proteínas antigênicas são capazes de induzirem anticorpos em soros de pacientes com LV (GHEDIN et al., 1997; BHATIA et al., 1999; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2010). Além de imunoglobulinas apresentaram aumento na produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α , gerando proteção contra a leishmaniose (KAIKO et al., 2008).

Com isso, todos os grupos utilizados apresentam potencial de serem utilizados como antígenos vacinais contra leishmaniose, sendo o mais promissor o grupo composto pelo peptídeo PLSi409, e o Mix (PepLi379 e PepLi409). Novos estudos complementares poderão corroborar para comprovação desta hipótese.

6 CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

O presente trabalho apresenta resultados promissores. E concluímos que tanto a proteína recombinante Lbk39, quanto seus peptídeos PepLi379 e PepLi409 são potenciais candidatos para serem usados como antígenos para LVC quer seja para uso no diagnóstico quanto para uso vacinal. E que o PepLi409 pode ser usado como antígeno para LC e LH. Os grupos vacinais, PepLi409 e Mix, também apresentaram potencial para serem utilizados para vacinação profilática.

REFERÊNCIAS

ABASS, E.; KANG, C.; MARTINKOVIC, F.; SEMIAO-SANTOS, S. J.; SUNDAR, S.; WALDEN, P.; PIARROUX, R.; HARITH, A.; LOHOFF, M.; ULRICH STEINHOFF, U. Heterogeneity of *Leishmania donovani* parasites complicates diagnosis of visceral leishmaniasis: comparison of different serological tests in three endemic regions. **PLoS One**, v. 10, p. e0116408. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116408>. Acesso em: 10 fev. 2020.

ADAMS, E. R.; JACQUET, D.; SCHOONE, G.; GIDWANI, K.; BOELAERT, M.; CUNNINGHAM, J. Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. 1–6. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001946>. 2012. Acesso em: 15 jan. 2020.

ADAUI, V.; LYE, L. F.; AKOPYANTS, N. S.; ZIMIC, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; GARCIA, L.; MAES, I.; DE DONCKER, S.; DOBSON, D. E.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C.; BEVERLEY, S. M. Association of the endobiont double-stranded RNA virus LRV1 with treatment failure for human leishmaniasis caused by *leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. **Journal of Infectious Diseases**, 213, n.1, 112–121. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv354>. Acesso em: 10 fev. 2020.

AFONSO, L. C. C., SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 7, p. 2952–2959. 1993.

AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHL, K.; LUKEŠ, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOUILLAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.11.012>. 2017. Acesso em: 15 mar. 2020.

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>.

AKILOV, O. E.; KHACHEMOUNE, A.; HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 2, 132–42. 2007.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–653. 2004. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.10.042>. 2004. Acesso em: 07 abr. 2020.

ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/T helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: Is this paradigm still relevant? **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 1–13. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00080>. Acesso em: 08 abr. 2020.

ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F.; GASPARETTO, N. D.; DA SILVA, G. F. R.; FIGUEIREDO, F. B.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; MADEIRA, M. F. Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 76, n. 3, p. 321–324. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.03.017>. Acesso em: 22 mai. 2020.

ALMEIDA, A. DO B. P. F.; DE SOUSA, V. R. F.; CRUZ, F. A. C. S. DA.; DAHROUG, M. A. A.; FIGUEIREDO, F. B.; MADEIRA, M. DE F. Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 359–365. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012005000005>. Acesso em: 10 abr. 2020.

ALMEIDA, J. D.; EDWARDS, D. C.; BRAND, C. M.; HEATH, T. D. Formation of virosomes from influenza subunits and liposomes. **Lancet , n.London, England)**, v. 2, n. 7941, p. 899–901.1975. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736,n.75\)92130-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736,n.75)92130-3). Acesso em: 01 abr. 2020.

ALMEIDA, A.; MACHADO, L. F. M.; DORO, D.; NASCIMENTO, F. C.; DAMASCENO, L.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P.; JUNQUEIRA, C. New vaccine formulations containing a modified version of the amastigote 2 antigen and the non-virulent *Trypanosoma cruzi* CL-14 strain are highly antigenic and protective against *Leishmania infantum* challenge. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 465. 2018 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00465>. Acesso em: 10 jun. 2020.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>. 2012. Acesso em: 18 jun. 2020.

ALVES, C. F.; DE AMORIM, I. F. G.; 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- γ , TNF- α , IL-10 and TGF- β in lymph nodes associates with parasite load and clinical form of disease in dogs naturally infected with *Leishmania* , *n.Leishmania) chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 4, p. 349–358. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.020>. Acesso em: 24 jul. 2020.

AMATO, V. S.; DE ANDRADE, H. F.; SEIXAS DUARTE, M. I. Mucosal leishmaniasis: In situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, v. 85, n. 1, p. 39–49. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0001-706X, n.02\)00260-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(n.02)00260-7). Acesso em: 31 jul. 2020.

ANDRADE-NARVAEZ, F. J.; MEDINA-PERALTA, S.; VARGAS-GONZALEZ, A.; CANTO-LARA, S. B.; ESTRADA-PARRA, S. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* , *n.Leishmania*) *mexicana* in the Yucatan Peninsula, Mexico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 47, n. 4, p. 191–194.2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652005000400003>. Acesso em: 05 mar. 2020.

ANDERSON, C. F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *L. major* in C567Bl/6 mouse. **Journal of Immunology**, v. 174, n. 5, p. 2934-41. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.5.2934>. Acesso em: 14 jun. 2020.

ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated Levels of Interferon-Gamma, interleukin-10, and interleukin-6 During Active Disease in Indian Kala Azar. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 339-45. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.01.017>. Acesso em: 22 ago. 2020.

ANTONIO, E.; COELHO, F.; ALBERTO, C.; TAVARES, P.; AE, F.; TEIXEIRA, K. N.; RODRIGUES, R. C.; CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. *Immune Responses Induced by the Leishmania* , *n.Leishmania*) *donovani* A2 antigen, but not by the LACK antigen, are protective against experimental *Leishmania* , *n.Leishmania*) *amazonensis* infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3988–3994. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.71.7.3988>. Acesso em: 18 ago. 2020.

ARENAS, R.; TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. Leishmaniasis: A review. **In F1000Research**, v .6, n; F1000 Faculty Rev, p.750. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>. Acesso em: 07 jun. 2020.

AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA- VERÁSTEGUI, C.; LAZO, M.; LOAYZA- MURO, R.; DONCKER, S. D.; MAURER, A.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.; LLANOS- CUENTAS.; A. Influence of *Leishmania* , *n.Viannia*) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis . **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846–1851. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/518041>. Acesso em: 06 jun. 2020.

ASCHAR, M.; DE OLIVEIRA, E. T. B.; LAURENTI, M. D.; MARCONDES, M.; TOLEZANO, J. E.; HIRAMOTO, R. M.; CORBETT, C. E. P.; DA MATTA, V. L. R. Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 225, p. 108–113. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.005>. Acesso em: 13 mar. 2020.

- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M.; DAVID, R.; SHERLOCK, I.; EULALIO, M. C.; SAMPAIO, D. P.; BADARO, R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 53–57 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.53>. Acesso em: 18 abr. 2020.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped Blast and Psi-Blast: a new generation of protein database search programs, **Nucleic Acids Research**, v. 25, n.17, p. 3389–3402. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>. Acesso em: 07 mai. 2020.
- BACELLAR, O.; BRODSKYN, C.; GUERREIRO, J.; BARRAL-NETTO, M.; COSTA, C. H.; COFFMAN, R. L.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 6, 1515–8. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/173.6.1515>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; RIBEIRO DE JESUS, A.; DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J; CARVALHO, E.M.. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n.12, p. 6734–40. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.6734-6740>. Acesso em: 12 mai. 2020.
- BADARÓ, R.; BENSON, D.; EULÁLIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADURCIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, n. 3, 758–761. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/173.3.758>. Acesso em: 10 set. 2020.
- BANETH, G.; KOUTINAS, A.; SOLANO-GALLEGO, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>. Acesso em: 05 ago. 2020.
- BARATA, R. A.; PEIXOTO, J. C.; TANURE, A.; GOMES, M. E.; APOLINÁRIO, E. C.; BODEVAN, E.; ARAÚJO, H. S.; DIAS, E. S.; PINHEIRO, A. C. Epidemiology of visceral in a reemerging focus of intense transmission in Minas Gerais State, Brazil. **BioMed Research International**, v. 405083, p. 1-6. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2013/405083>. Acesso em: 24 abr. 2020.
- BASILE, G.; PETICCA, M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 3, p. 273–278 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9213-5>. Acesso em: 24 abr. 2020.

BASU, R.; BHAUMIK, S.; BASU, J. M.; NASKAR, K.; DE T.; ROY, S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and-resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1-and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7160–7171. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7160>. Acesso em: 18 jun. 2020.

BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1566524043360285>. Acesso em: 20 mar. 2020.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: Clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 4, p. 684–703. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/clind/24.4.684>. Acesso em: 20 mar. 2020.

BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Involvement and interactions of different immune cells and their cytokines in human visceral leishmaniasis. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 128–134. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0022-2012>. Acesso em: 30 abr. 2020.

BHATIA, A.; DAIFALLA, N. S.; JEN, S.; BADARO, R.; REED, S. G.; SKEIKY, Y. A. Cloning, characterization and serological evaluation of K9 and K26: two related hydrophilic antigens of *Leishmania chagasi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 249–261. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)00098-5](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00098-5). Acesso em: 04 jun. 2020.

BITTAR, R. C.; NOGUEIRA, R. S.; VIEIRA-GONÇALVES, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G.; DA-CRUZ, A. M. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*n. Viannia*) *braziliensis*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 5, p. 625–630. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007005000069>. Acesso em: 05 jun. 2020.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 158–166. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh058>. Acesso em: 06 jul. 2020.

BOELAERT, M.; BHATTACHARYA, S.; CHAPPUIS, F.; EL SAFI, S. H.; HAILU, A.; MONDAI, D. Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S30–S39. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1766>. Acesso em: 08 set. 2020.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134. 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00169-0](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00169-0). Acesso em: 10 mar. 2020.

BOGDAN, C. Leishmaniasis in rheumatology, haematology and oncology: epidemiological, immunological and clinical aspects and caveats. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 71, n. Suppl 2, p. i60-6. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2011-200596>. Acesso em: 04 abr. 2020.

BOGGIATTO PM, RAMER-TAIT AE, METZ K, KRAMER EE, GIBSON-CORLEY K, MULLIN, K.; HOSTELLER, J. M.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E., PETERSEN, C. A. Immunologic indicators of clinical progression during *canine Leishmania infantum* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 267–273. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00456-09>. Acesso em: 04 abr. 2020.

BONGIORNO, G.; PAPARCONI, R.; FOGLIA MANZILLO, V.; OLIVA, G.; CUISINIER, A. M.; GRADONI, L. Vaccination with LiESP/QA-21 (n.CaniLeish®) reduces the intensity of infection in *Phlebotomus perniciosus* fed on *Leishmania infantum* infected dogs—a preliminary xenodiagnosis study. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3-4, p. 691–695. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.008>. Acesso em: 08 mai. 2020.

BOURREAU, E.; GINOUVES, M.; PRÉVOT, G.; HARTLEY, M. A.; GANGNEUX, J. P.; ROBERT-GANGNEUX, F.; DUFOUR, J.; SAINTE-MARIE, D.; BERTOLOTTI, A.; PRATLONG, F.; MARTIN, R.; SCHÜTZ, F.; COUPPIÉ, P.; FASEL, N.; RNET, C. Presence of *leishmania* RNA virus 1 in *leishmania guyanensis* increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 105–111. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv355>. Acesso em: 09 jul. 2020.

BOURREAU, E.; RNET, C.; DARCISSAC, E.; LISE, M. C.; SAINTE MARIE, D.; CLITY, E.; TACCHINI-COTTIER, F.; COUPPIE, P.; LAUNOIS, P. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due *Leishmania guyanensis*. **Infection Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1465-74. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01398-08>. Acesso em: 10 jul. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Brasília, pp. 120. 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta nº 1/2011 CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Brasília: Ministério da Saúde do Brasil, 2011

BRASIL. Ministério da Saúde. **Leishmaniose Visceral**. 2017a. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>, Acesso em: 25 mai. 2020 às 14:48.

BRASILEIRA, S.; TROPICAL, D. M.; FARAHMAND, M.; KHALAJ, V.; MOHEBALI, M.; KHALILI, G. Major Article Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 188–193. 2015 Acesso em: 20 ago. 2020.

BREITLING, R.; KLINGNER, S.; CALLEWAERT, N.; PIETRUCHA, R.; GEYER, A.; EHRLICH, G.; HARTUNG, R.; MULLER, A.; CONTRERAS, R.; BEVERLEY, S. M.; ALEXANDROV, K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 209–218. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1046-5928,n.02\)00001-3](https://doi.org/10.1016/s1046-5928,n.02)00001-3). Acesso em: 17 jul. 2020.

BRITO, M.E.; MENDONCA, M. G.; GOMES, Y. M.; JARDIM, M. L.; ABATH, F. G. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 2, p. 318–321. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cdli.7.2.318-321.2000>. Acesso em: 11 abr. 2020.

BUMB, R. A.; MEHTA, R. D.; GHIYA, B. C.; JAKHAR, R.; PRASAD, N.; SONI, P.; LEZAMA-DAVILA, C.; SATOSKAR, A. R. Efficacy of short-duration , n.twice weekly) intralesional sodium stibogluconate in treatment of cutaneous Leishmaniasis in India. **The British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 4, p. 854–858. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.09865.x>. Acesso em: 08 jul. 2020.

BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 2, p. 775–779. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.775>. Acesso em: 09 jun. 2020.

CAMPOS, M. P.; DE LUCA, P. M.; DE, RENZETTI, A. R.; DOS SOUZA, S. M. M.; DE, MENDES JÚNIOR, A. A. V.; BARROS, R. S.; FIGUEIREDO, F. B. Can vaccines against canine visceral leishmaniasis interfere with the serological diagnostics recommended by the Brazilian Ministry of Health? **Ciência Rural**, v. 47, n. 4, p. 1–6. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160846>. Acesso em: 11 abr. 2020.

CARCELÉN, J.; INIESTA, V.; FERNÁNDEZ-COTRINA, J.; SERRANO, F.; PAREJO, J. C.; CORRALIZA, I.; GALLARDO-SOLER, A.; MARAÑÓN, F.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GÓMEZ-NIETO, C. The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. **Vaccine**, v. 27, n. 43, p. 5964–5973. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.069>. Acesso em: 12 mai. 2020.

CARDIM, M. F. M.; RODAS, L. A. C.; DIBO, M. R.; GUIRADO, M. M.;

- OLIVEIRA, A. M.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Introduction and expansion of human American visceral leishmaniasis in the state of Sao Paulo, Brazil, 1999±2011. **Revista de Saude Publica.**, v. 47, n. 4, p. 691-700. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0034-8910.2013047004454>. Acesso em: 13 jul. 2020.
- CARNEIRO, M. B. H.; ROMA, E. H.; RANSON, A. J.; DORIA, N. A.; DEBRABANT, A.; SACKS, D. L.; VIEIRA, L. Q.; PETERS, N. C. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during Leishmania amazonensis Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 1, p. 196–208. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700899>. Acesso em: 08 jul. 2020.
- CARRILLO, E.; MORENO, J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1-3, p. 67–70. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.310>. Acesso em: 09 jul. 2020.
- CARRIÓN, J.; NIETO, A.; IBORRA, S.; INIESTA, V.; SOTO, M.; FOLGUEIRA, C.; ABANADES, D. R.; REQUENA, J. M.; ALONSO, C. Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 5, p. 173–183. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2006.00817.x>. Acesso em: 08 jun. 2020.
- CARSON, C.; QUINNELL, R. J.; HOLDEN, J.; GARCEZ, L. M.; DEBORGGRAEVE, S.; COURTENAY, O. Comparison of Leishmania OligoC-Test PCR with conventional and real-time PCR for diagnosis of canine Leishmania infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 3325–3330. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02331-09>. Acesso em: 11 abr. 2020.
- CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O.; BROWNELL, C.; REGIS, T.; COFFMAN, R. L.; REED, S. G. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 12, p. 5949–56. 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8207220>. Acesso em: 13 abr. 2020.
- CASTELLANOS-GONZALEZ, A.; SALDARRIAGA, O. A.; TARTAGLINO, L.; GACEK, R.; TEMPLE, E.; SPARKS, H.; MELBY, P. C.; TRAVI, B. L. A novel molecular test to diagnose canine visceral leishmaniasis at the point of care. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 970–975. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0145>. Acesso em: 15 set. 2020.
- CASTELLUCCI, L.; MENEZES, E.; OLIVEIRA, J.; MAGALHAES, A.; GUIMARAES, L. H.; LESSA, M. et al. IL6-174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 519–27. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/505504>. Acesso em: 10 set. 2020.

CHAGAS, A. C.; OLIVEIRA, F.; DEBRABANT, A.; VALENZUELA, J. G.; RIBEIRO, J. M. C.; CALVO, E. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases Leishmania Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits Xlla Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003923>. Acesso em: 12 abr. 2020.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; COSTA, M. A.; OLIVEIRA, D. M.; RAMÍREZ, L.; COSTA, L. E.; DUARTE, M. C. Vaccination with the Leishmania infantum ribosomal proteins induces protection in BALB/c mice against Leishmania chagasi and Leishmania amazonensis challenge. **Microbes and Infection**, 12, n.12–13), 967–977. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.06.008>. Acesso em: 13 abr. 2020.

CHUNGUE, E., MARCHÉ, G., PLICHAT, R., BOUTING, J.P., ROUX, J. Comparison of immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay (IgG-ELISA) and haemagglutination inhibition (HI) test for the detection of dengue antibodies. Prevalence of dengue IgG-ELISA antibodies in Tahiti. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, p. 708-11, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.4.622-630.2003>. Acesso em: 10 jan. 2021.

CLABORN, D.M. The biology and control of leishmaniasis vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 127–134. 2010. Disponível em: <http://www.jgid.org/text.asp?2010/2/2/127/62866>. Acesso em: 09 jul. 2020.

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the 1st International Canine Leukocyte Antigen Workshop , n.CLAW). **Tissue Antigens**, v. 43, n. 3, p. 137–154. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1994.tb02315.x>. Acesso em: 14 mai. 2020.

COLER, R. N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S.G. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4 + T cells. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–4654. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00394-07>. Acesso em: 18 jun. 2020.

CORREA, A. P.; DOSSI, A. C.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, R.; MUNARI, D. P.; DE LIMA, V. M. Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by *Leishmania*, n.*Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 3-4, p. 267–274. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.023>. Acesso em: 19 jun. 2020.

COSTA, C. H. N. Quanto é efetivo o abate de cães para o controle do calazar zoonótico? Uma avaliação crítica da ciência, política e ética por trás desta política de saúde pública. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 232–242. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011005000014>. Acesso em: 20 jul. 2020.

COSTA, C. H. N.; TAPETY, C. M. M.; WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: Estudo de intervenção randomizado fatorial. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 415–419. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0037-86822007000400009>. Acesso em: 01 ago. 2020.

COSTA DUARTE, M.; DOS REIS LAGE, L. M.; LAGE, D. P.; MESQUITA, J. T.; SALLES, B. C. S.; LAVORATO, S. N.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; ALVES, R. J.; TAVARES, C. A. P.; TEMPONE, A. G.; COELHO, E. A. F. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 81–88. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.01.002>. Acesso em: 04 abr. 2020.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil / Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica Da Bahia**, v. 1, n. 1c, p. 3–17. 2005.

COSTA, M. M.; ANDRADE, H. M.; BARTHOLOMEU, D. C.; FREITAS, L. M.; PIRES, S. F.; CHAPEAUROUGE, A. D.; PERALES, J.; FERREIRA, A. T.; GIUSTA, M. S.; MELO, M. N.; GAZZINELLI, R. T. Analysis of *Leishmania* chagasi by 2-D difference gel electrophoresis (2-D DIGE) and immunoproteomic: identification of novel candidate antigens for diagnostic tests and vaccine. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 5, p. 2172–2184. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/pr101286y>. Acesso em: 14 jun. 2020.

COURA-VITAL, W.; KER, H. G.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; LEAL, G. G. D. A.; MOREIRA, N. D. D.; OLIVEIRA, L. A. M.; MACHADO, E. M. D. M.; MORAIS, M. H. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B. Evaluation of change in canine diagnosis protocol adopted by the visceral leishmaniasis control program in Brazil and a new proposal for diagnosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–6. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091009>. Acesso em: 14 mai. 2020.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M. J.; VELOSO, V. M.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; REIS, L. E. S.; BRAGA, S. L.; MORAIS, M. H. F.; REIS, A. B.; CARNEIRO, M. Prevalence and factors associated with *Leishmania infantum* infection of dogs from an urban area of Brazil as identified by molecular methods. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001291>. Acesso em: 08 ago. 2020.

COURTENAY, O.; QUINNELL, R. J.; GARCEZ, L. M.; SHAW, J. J.; DYE, C. Infectiousness in a Cohort of Brazilian Dogs: Why Culling Fails to Control Visceral Leishmaniasis in Areas of High Transmission. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 9, p. 1314–1320. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/344312>. Acesso em: 09 jul. 2020.

COUTINHO, S. G.; DA-CRUZ, A. M.; BERTHO, A. L.; SANTIAGO, M. A.; DE-LUCA, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 139–142. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X1998000100019>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CRISCI, E.; BÁRCENA, J.; MONTOYA, M. Virus-Like particle-Based vaccines for animal viral infections. **Inmunologia**, v. 32, n. 3, p. 102–116. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.08.002>. Acesso em: 11 ago. 2020.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V.; KENDRICK, H. Drug sensitivity of Leishmania species: some unresolved problems. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 96, p. 127–9. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.02\)90063-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.02)90063-5). Acesso em: 12 ago. 2020.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–141. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/exmp.2002.2418>. Acesso em: 10 jun. 2020.

D'OLIVEIRA JÚNIOR, A.; COSTA, S. R. M.; BISPO BARBOSA, A.; ORGE ORGE, DE L. G.; CARVALHO, E. M. Asymptomatic Leishmania chagasi infection in relatives and neighbors of patients with visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 15–20. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000100003>. Acesso em: 13 jul. 2020.

DA-CRUZ, A. M.; BITTAR, R.; MATTOS, M.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; NOGUEIRA, R.; PINHO-RIBEIRO, V.; AZEREDO-COUTINHO, R. B.; COUTINHO, S. G. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: Long-term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 2, p. 251–256. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.2.251-256>. Acesso em: 15 jul. 2020.

DA-CRUZ, A. M.; BERTHO, A. L.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G. Flowcytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **British Journal of Dermatology**, v. 153, n. 3, p. 537–543. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06647.x>. Acesso em: 05 jul. 2020.

DA COSTA, R. T.; FRANÇA, J. C.; MAYRINK, W.; NASCIMENTO, E.; GENARO, O.; CAMPOS-NETO, A. Standardization of a rapid immunochromatographic test with the recombinant antigens K39 and K26 for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 6, p. 678–682. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.03\)80102-5](https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.03)80102-5). Acesso em: 16 jul. 2020.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Infectious Diseases**, v. 165, n. 2, p. 1-6. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00165>. Acesso em: 10 ago. 2020.

DANTAS-TORRES, F. Canine leishmaniasis in South America. **Parasites and Vectors**, v. 2, n. SUPPL.1, p. 1–8. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S1-S1>. Acesso em: 01 ago. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; DE PAIVA-CAVALCANTI, M.; FIGUEREDO, L. A.; MELO, M. F.; DA SILVA, F. J.; DA SILVA, A. L.; ALMEIDA, E. L.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3-4, p. 313–317. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.019>. Acesso em: 12 abr. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 3, p. 151–156. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000300007>. Acesso em: 13 abr. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M. E. F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 1-2, p. 54–60. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.008>. Acesso em: 14 abr. 2020.

DANTAS-TORRES, F.; DA SILVA SALES, K. G.; GOMES DA SILVA, L.; OTRANTO, D.; FIGUEREDO, L. A. *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. **Molecular and Cellular Probes**, v. 31, p. 65–69. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>. Acesso em: 10 mai. 2020.

DARABI, H.; ERAVANI, D.; SANOS, S.; KAYE, P.; TAGHIKHAN, M.; JAMSHIDI, S. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine**, v. 23, n. 28, p. 3716–3725. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.02.009>. Acesso em: 06 ago. 2020.

DAVID, J. R.; STAMM, L. M.; BEZERRA, H. S.; SOUZA, R. N.; KILLICK-KENDRICK, R.; LIMA, J. W. O. Deltamethrin-impregnated Dog Collars Have a Potent Anti-feeding and Insecticidal Effect on *Lutzomyia longipalpis* and *Lutzomyia migonei*. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 839–847. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000600018>. Acesso em: 26 abr. 2020.

- DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- DE ALMEIDA, A. D. B. P. F.; FARIA, R. P.; PIMENTEL, M. F. A.; DAHROUG, M. A. A.; TURBINO, N. C. M. R.; SOUSA, V. R. F. Inquérito soropidemiológico de leishmaniose canina em áreas endêmicas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 156–159. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000200012>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- DE BRITO, R. C. F.; CARDOSO, J. M. D. O.; REIS, L. E. S.; VIEIRA, J. F.; MATHIAS, F. A. S.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. D. O.; RUIZ, J. C.; RESENDE, D. D. M.; REIS, A. B. Peptide vaccines for Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1043, p. 1–11. 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01043>. Acesso em: 19 jul. 2020.
- DE FREITAS BALANCO, J. M.; MOREIRA, M. E. C.; BONOMO, A; BOZZA, P. T.; AMARANTE-MENDES, G.; PIRMEZ, C.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. **Current Biology**, v. 11, n. 23, p. 1870–3. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(n.01\)00563-2](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(n.01)00563-2). Acesso em: 22 mai. 2020.
- DE FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; DE ABREU, C. R. A. Geographical variation in clinical signs and prevalence of *Leishmania sp.* infection among dogs in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 3, p. 293–297. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.17067>. Acesso em: 21 mai. 2020.
- DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1540-3>. Acesso em: 10 mai. 2020.
- DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; MATTOS, M.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; GONÇALVES-COSTA, S. C.; DE SOUZA, C. D. F. S.; GRIMALDI G. J. Mucosal leishmaniasis , n.“espundia”) responsive to low dose of N-methyl glucamine , n.Glucantime®) in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 6, p. 321–325. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46652000000600004>. Acesso em: 14 mai. 2020.
- DE SOUZA, L. M. B.; CARVALHO, J.; BATES, M. D.; PETTERLE, R. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; BATES, P. A. Production of a kinesin-related recombinant protein , n.Lbk39) from *Leishmania braziliensis* by *Leishmania tarentolae* promastigotes and its application in the serodiagnosis of leishmaniasis. **One Health**, v. 8, n. June, p. 100111. 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100111>. Acesso em: 17 mai. 2020.

DENG, G.; SONG, X.; FUJIMOTO, S.; PICCIRILLO, C. A.; NAGAI, Y.; GREENE, M.I. Foxp3 post- translational modifications and treg suppressive activity, *Frontiers in Immunology*, v. 10, p. 1. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02486>. Acesso em: 11 jan. 2021.).

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.01\)90223-8](https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.01)90223-8). Acesso em: 18 mai. 2020.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>. Acesso em: 12 abr. 2020.

DIERING. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. **Physiology & Behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>. Acesso em: 18 jun. 2020.

DIETZE, R.; BARROS, G. B.; TEIXEIRA, L.; HARRIS, J.; MICHELSON, K.; FALQUETO, A.; COREY, R. Effect of Eliminating Seropositive Canines on the Transmission of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 1240–1242. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/516096>. Acesso em: 20 mai. 2020.

DIKHIT, M. R.; KUMAR, A.; DAS, S.; DEHURY, B.; ROUT, A. K.; JAMAL, F.; SAHOO, G. C.; TOPNO, R. K.; PANDEY, K.; DAS, V. N. R.; BIMAL, S.; DAS, P. Identification of potential MHC Class-II-restricted epitopes derived from *Leishmania donovani* antigens by reverse vaccinology and evaluation of their CD4+ T-cell responsiveness against visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. DEC, p. 1–17. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01763>. Acesso em: 18 jun. 2020.

DO PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; DE SOUSA, J. F.; CALDEIRA, D. I.; PAZ, G. F.; DIAS, E. S. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral humana e canina em montes claros, Estado de Minas Gerais, Brasil, entre 2007 e 2009. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 561–566. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822011000500006>. Acesso em: 22 jun. 2020.

DONNELLY, J. J.; ULMER, J. B.; SHIVER, J. W.; LIU, M. A. DNA vaccines. **Annual Review of Immunology**, n. 15, p. 617–648. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.617>. Acesso em: 24 mai. 2020.

DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DECUYPERE, S.; CLARK, T. G.; COOMBS, G. H.; COTTON, J. A.; HILLEY, J. D.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; MOTTRAM, J. C.; QUAIL, M. A.; RIJAL, S.; SANDERS, M.; SCHÖNIAN, G.; STARK, O.;

SUNDAR, S.; VANAERSCHOT, M.; HERTZ-FOWLER, C.; DUJARDIN, J. C.; BERRIMAN, M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.123430.111>. Acesso em: 31 jul. 2020.

DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; ROATT, B. M.; MENEZES-SOUZA, D.; GOULART, L. R.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 4, p. 398–407. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0120-2016>. Acesso em: 12 mai. 2020.

DUFFOUR, C.; ZAKARI, S.; IMOROU, I. T.; THOMAS, O. A. B.; DJAOUGA, M.; AROUNA, O.; SYLLA, D.; NEWTON, A. C.; HILL, R. A.; ECHEVERRÍA, C.; GOLICHER, D.; BENAYAS, J. M.; CAYUELA, L.; HINSLEY, S. A.; TAPIA J.; BOUAZZA, S.; LEBAUT, S.; KHALKI, Y. EL.; GILLE, E.; MACHINES, S. V. No 主観的健康感を中心とした在宅高齢者における健康関連指標に関する共分散構造分析Title. **Progress in Physical Geography**, v. 14, n. 7, p. 450. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0309133309346882>. Acesso em: 10 abr. 2020.

DUTRA, W. O.; DE FARIA, D. R.; LIMA MACHADO, P. R.; GUIMARAES, L. H.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory and Effector Activities in Human Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis: Understanding Mechanisms of Pathology. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p.430–6. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ddr.20449>. Acesso em: 12 abr. 2020.

Dye, C. The logic of visceral leishmaniasis control. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 2, p. 125–130. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1996.55.125>. Acesso em: 01 jun. 2020.

DYE, C.; VIDOR, E.; DEREURE, J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 3, p. 647–656. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0950268800051074>. Acesso em: 02 jun. 2020.

ECHENIQUE, H. **Enfermedades Infecciosas. Leishmaniasis Visceral**. Guia para el Equipo de Salud. Ministerio de Salud de la República Argentina. pp. 41. 2010.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 24, n. 3, p. 335–340. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03417.x>. Acesso em: 10 abr. 2020.

FALEIRO, J.; KUMAR, R.; HAFNER, L. M.; ENGWERDA, C. R. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis, *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 7, p. e2914. 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002914>. Acesso em: 11 jan. 2021

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. *Nature Reviews Microbiology*, v. 2, n. 10, p. 820–832. 2004.

Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1004>. Acesso em: 12 mai. 2020.

FARAHMAND, M.; KHALAJ, V.; MOHEBALI, M.; KHALILI, G.; NADERI, S.; GHAFFARINEJAD, P.; NAHREVANIAN, H. Comparison of recombinant A2-ELISA with rKE16 dipstick and direct agglutination tests for diagnosis of visceral leishmaniasis in dogs in Northwestern Iran. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 48, n. 2, p. 188–193. 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0285-2014>. Acesso em: 13 jun. 2020.

FARIA, A. R.; COSTA, M. M.; GIUSTA, M. S.; GRIMALDI, G.; PENIDO, M. L. O.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. High-throughput analysis of synthetic peptides for the immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 9. 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001310>. Acesso em: 18 jul. 2020.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001310>. Acesso em: 18 jul. 2020.

FARIA, A. R.; DE CASTRO VELOSO, L.; COURA-VITAL, W.; REIS, A. B.; DAMASCENO, L. M.; GAZZINELLI, R. T.; ANDRADE, H. M. Novel Recombinant Multiepitope Proteins for the Diagnosis of Asymptomatic *Leishmania infantum*-Infected Dogs. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 1, p. 13–16. 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003429>. Acesso em: 19 ago. 2020.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V.

Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba - São Paulo. *Clínica Veterinária*, v. 28, p. 36-44. 2000. Acesso em: 24 jul. 2020.

FELIPE, I. M.; AQUINO, D. M.; KUPPINGER, O.; SANTOS, M. D.; RANGEL, M. E.; BARBOSA D.; BARRAL, A.; WERNECK, G. L.; CALDAS ADE, J.

Leishmania infection in humans, dogs and sandflies in a visceral endemic area in Maranhão, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 2, p. 207-11. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762011000200015>.

Acesso em: 19 ago. 2020.

FERNANDES, A. P.; COSTA, M. M. S.; COELHO, E. A. F.; MICHALICK, M. S. M.; DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; LUIZ TAFURI, W.; RESENDE, D. DE M.; HERMONT, V.; ABRANTES, C. DE F.; GAZZINELLI, R. T. Protective immunity against challenge with *Leishmania* (Leishmania) chagasi in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine*, v. 26, n. 46, p. 5888–5895. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.095>. Acesso em:

18 jun. 2020.

FERREIRA, E. C.; DE LANA, M.; CARNEIRO, M.; REIS, A. B.; PAES, D. V.; DA SILVA, E. S.; SCHALLIG, H.; GONTIJO, C. M. Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. **Veterinary Parasitology**, v. 146, n. 3-4, p. 235–241. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.015>. Acesso em: 19 jul. 2020.

FERREIRA, S. DE A.; ITUASSU, L. T.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. R. Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3–4, p. 257–263. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.022>. Acesso em: 20 jun. 2020.

FIUZA, J. A.; SANTIAGO, H. DA C.; SELVAPANDIYAN, A.; GANNAVARAM, S.; RICCI, N. D.; BUENO, L. L.; BARTHOLOMEU, D. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; NAKHASI, H. L.; FUJIWARA, R. T. Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. **Vaccine**, v. 31, n. 14, p. 1785–1792. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.048>. Acesso em: 22 jul. 2020.

FRAGA, D.B.; DA SILVA, E. D.; PACHECO, L. V.; BORJA, L. S.; COURAVITAL, W.; MONTEIRO, G. R.; OLIVEIRA, G. G.; JERÔNIMO, S. M.; REIS, A. B.; VERAS, P. S. A multicentric evaluation of the recombinant *Leishmania infantum* antigen-based immunochromatographic assay for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, n. 7, p. 136. 2014. doi: 10.1186/1756-3305-7-136. Acesso em: 11 abr. 2020.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.011>. Acesso em: 12 mai. 2020.

FRANÇA-COSTA, J.; WANDERLEY, J. L. M.; DEOLINDO, P.; ZARATTINI, J. B.; COSTA, J.; Soong, L.; Barcinski, M. A.; Barral, A.; Borges, V. M. Exposure of Phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* Isolates Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis and Parasite Infectivity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36595. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036595>. Acesso em: 15 jun. 2020.

FRANCIS, M. J. Peptide vaccines for viral diseases. **Science Progress**, v. 74, n. 293 Pt, p. 115–30. 1990. PMID: 2267573. Acesso em: 15 jun. 2020.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by *Leishmania lipophosphoglycan*. **Journal of Parasitology Research**, p. 165126. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/165126>. Acesso em: 12 ago. 2020.

FRANKE, E. D.; LLANOS-CUENTAS, A.; ECHEVARRIA, J.; CRUZ, M. E.; CAMPOS, P.; TOVAR, A. A.; LUCAS, C. M.; BERMAN, J. D. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (n.Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 1, p. 77–82. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.77>. Acesso em: 19 jul. 2020.

FRANKE, E. D.; WIGNALL, F. S.; CRUZ, M. E.; ROSALES, E.; TOVAR, A. A.; LUCAS, C. M.; LLANOS-CUENTAS, A.; BERMAN, J. D. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. **Annals of Internal Medicine**, v. 113, n. 12, p. 934–940. 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-113-12-934>. Acesso em: 16 jun. 2020.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317–2336. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules14072317>. Acesso em: 12 jul. 2020.

GABRIEL, C.; MCMASTER, W. R.; GIRARD, D.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* Promastigotes Evade the Antimicrobial Activity of Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 7, p. 4319–4327. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000893>. Acesso em: 13 ago. 2020.

GÁLVEZ, R.; MIRÓ, G.; DESCALZO, M. A.; OLINA, R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (n.central Spain). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 102, n. 1, p. 59–65. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.07.002>. Acesso em: 14 set. 2020.

GANNAVARAM, S.; BHATTACHARYA, P.; ISMAIL, N.; KAUL, A.; SINGH, R.; NAKHASI, H. L. Modulation of innate immune mechanisms to enhance *Leishmania* vaccine-induced immunity: role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 13, n. 7, p. 187. 2016. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00187>. Acesso em: 01 set. 2020.

GAO, C. H.; DING, D.; WANG, J. Y.; STEVERDING, D.; WANG, X.; YANG, Y. T.; SHI, F. Development of a LAMP assay for detection of *Leishmania infantum* infection in dogs using conjunctival swab samples. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–8. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0991-2>. Acesso em: 02 set. 2020.

GHEDIN, E.; ZHANG, W. W.; CHAREST, H.; SUNDAR, S.; KENNEY, R. T.; MATLASHEWSKI, G. Antibody response against a *Leishmania donovani* amastigote-stage-specific protein in patients with visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, p. 530–535. 1997. PMID: PMC170587. Acesso em: 02 set. 2020.

GHOSH, A.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response which protects

mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine**, v. 20, n. 1–2, p. 59–66. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00322-x](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00322-x). Acesso em: 02 set. 2020.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; DE SOUZA, J. V.; DAS DORES MOREIRA, N.; MALAQUIAS, L. C. C.; MOTA E CASTRO, L. L.; DE LANA, M.; REIS, A. B. Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. **Vaccine**, v. 25, n. 44, p. 7674–7686. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.009>. Acesso em: 01 set. 2020.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.07.009>. Acesso em: 01 set. 2020.

GOETZMAN, E. A. Flow cytometry: basic concepts and clinical applications in immunodiagnosics. **Clinical Laboratory Science : Journal of the American Society for Medical Technology**, v. 6, n. 3, p. 177–182. 1993.

GÓMEZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J. A.; LUCIENTES, J.; GASCÓN, M.; ZARATE, J. J.; ARBEA, J. I.; LARRAGA, V.; RODRIGUEZ, C. Modified direct agglutination test for simplified serologic diagnosis of leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 5, p. 967–968. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.967-968.2003>. Acesso em: 18 jun. 2020.

GOMES, Y. M.; PAIVA, C. M.; LIRA, R. A.; ABATH, F. G.; ALVES, L. C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. **The Veterinary Journal**, v. 175, n. 1, p. 45–52. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.10.019>. Acesso em: 19 mai. 2020.

GOMES, A. H.; FERREIRA, I. M.; LIMA, M. L.; CUNHA, E. A.; GARCIA, A. S.; ARAÚJO, M. F.; PEREIRA- CHIOCCOLA, V. L. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 144, n. 3-4, p. 234–241. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.10.008>. Acesso em: 21 set. 2020.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>. Acesso em: 22 abr. 2020.

GOTO, Y.; BOGATZKI, L. Y.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N.; REED, S. G. Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. **Vaccine**, v. 25, n. 42, p. 7450–

7458. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.001>. Acesso em: 23 abr. 2020.

GOTO, Y.; CARTER, D.; GUDERIAN, J.; INOUE, N.; KAWAZU, S.; REED, S. G. Upregulated expression of B-cell antigen family tandem repeat proteins by *Leishmania amastigotes*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 138–2145. 2010. doi: 10.1128/IAI.01102-09. Acesso em: 20 abr. 2020.

GOTO, Y.; CARTER, D.; REED, S. G. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 9, p. 3967–3974. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00604-08>. Acesso em: 21 abr. 2020.

GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23–30. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>. Acesso em: 04 jun. 2020.

GREENWALD, R.; LYASHCHENKO, O.; ESFANDIARI, J.; MILLER, M.; MIKOTA, S.; OLSEN, J. H.; BALL, R.; DUMONCEAUX, G.; SCHMITT, D.; MOLLER, T.; PAYEUR, J. B.; HARRIS, B.; SOFRANKO, D.; WATERS, W. R.; LYASHCHENKO, K. P. Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 5, p. 605–12. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CVI.00038-09>. Acesso em: 07 abr. 2020.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130, n. SUPPL 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182005008139>. Acesso em: 06 ago. 2020.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; TESH, JR. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 3, p. 230–250. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cmr.6.3.230>. Acesso em: 09 abr. 2020.

GRIMALDI, G.; TEVA, A.; FERREIRA, A. L.; DOS SANTOS, C. B.; PINTO, I. DE S.; DE-AZEVEDO, C. T.; FALQUETO, A. Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology, n.DPP ® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 1, p. 54–59. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.10.001>. Acesso em: 09 abr. 2020.

GUERBOUJ, S.; DJILANI, F.; BETTAIEB, J.; LAMBSON, B.; DIOUANI, M. F.; BEN SALAH, A.; BEN ISMAIL, R.; GUIZANI, I. Evaluation of a gp63-PCR based assay as a molecular diagnosis tool in canine Leishmaniasis in Tunisia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105419>. Acesso em: 10 mai. 2020.

GUIMARAES-COSTA, A. B.; NASCIMENTO, T.; FROMENT, G. S.; SOARES, P.; MORGADO, F. N.; CONCEICAO-SILVA, F.; SARAIVA, E. M. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 106, n. 16, p. 6748-53. 2009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900226106>. Acesso em: 02 dez. 2020

HANDMAN, E.; CEREDIG, R.; MITCHELL, G. F. Murine cutaneous leishmaniasis: disease patterns in intact and nude mice of various genotypes and examination of some differences between normal and infected macrophages. **Australian Journal of Experimental Biology and Medicine Science**, v. 75, p. 9-29. 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/icb.1979.2>. Acesso em: 11 jul. 2020.

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**. v. 27, n. 9, p. 403–409. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>. Acesso em: 15 abr. 2020.

HERATH, S.; KROPF, P.; MULLER, I. Cross-talk between CD8, n.+) and CD4, n.+)Tcells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8, n.+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4, n.+) T cells. **Parasite Immunol**, v. 25, n. 11-12, p. 559–567. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00668.x>. Acesso em: 27 mai. 2020.

HIMMELRICH, H.; PARRA-LOPEZ, C.; TACCHINI-COTTIER, F.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The IL-4 rapidly produced in BALB/c mice after infection with Leishmania major down-regulates IL-12 receptor beta 2-chain expression on CD4+ T cells resulting in a state of unresponsiveness to IL-12. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 11, p. 6156–6163. 1998. PMID: 9834101. Acesso em: 15 jul. 2020.

HOS, B. J.; TONDINI, E.; VAN KASTEREN, S. I.; OSSENDORP, F. , n.2018) Approaches to improve chemically defined synthetic peptide vaccines. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 884–884. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00884>. Acesso em: 15 abr. 2020.

HUA, R.; HUO, H.; LI, Y.; XUE, Y.; WANG, X.; GUO, L.; ZHOU, B. Generation and Efficacy Evaluation of Recombinant Classical Swine Fever Virus E2 Glycoprotein Expressed in Stable Transgenic Mammalian Cell Line. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–9. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106891>. Acesso em: 04 jun. 2020.

HUA, R.; LI, Y.; CHEN, Z.; LIU, L.; HUO, H.; WANG, X.; GUO, L.; SHEN, N.; WANG, J.; BU, Z. Generation and characterization of a new mammalian cell line continuously expressing virus-like particles of Japanese encephalitis virus for a subunit vaccine candidate. **BMC Biotechnol**, v. 14, n. 1, p. 1–9. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-62>. Acesso em: 05 jul.

2020.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.003>. Acesso em: 06 jul. 2020.

HURRELL, B. P.; SCHUSTER, S.; GRÜN, E.; COUTAZ, M.; WILLIAMS, R. A.; HELD, W.; MALISSEN, B.; MALISSEN, M.; YOUSEFI, S.; SIMON, H. U.; MÜLLER, A. J.; TACCHINI-COTTIER, F. Rapid Sequestration of Leishmania mexicana by Neutrophils Contributes to the Development of Chronic Lesion. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. 1–23. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004929>. Acesso em: 08 set. 2020.

IBORRA, S.; CARRIÓN, J.; ANDERSON, C.; ALONSO, C.; SACKS, D.; SOTO, M. Vaccination with the Leishmania infantum acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5842–5852. 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.9.5842-5852.2005>. Acesso em: 09 jul. 2020.

ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunologic Research**, v. 26, n. 1–3, p. 95–105. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/ir:26:1-3:095>. Acesso em: 07 jun. 2020.

INIESTA, L.; GÁLLEGO, M.; PORTÚS, M. Immunoglobulin G and E responses in various stages of canine leishmaniosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 77–81. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.08.011>. Acesso em: 05 abr. 2020

IIZUKA-KOGA, M.; NAKATSUKASA, H.; ITO, M.; AKANUMA, T.; LU, Q.; YOSHIMURA, A. Induction and maintenance of regulatory T cells by transcription factors and epigenetic modifications, **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 113–121. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.07.002>. Acesso em: 11 jan. 2021.

JL, J.; SUN, J.; QI, H.; SOONG, L. Analysis of T helper cell responses during infection with Leishmania amazonensis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 4, p. 338–345. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.338>. Acesso em: 26 mai. 2020.

JIRMANUS, L.; GLESBY, M. J.; GUIMARÃES, L. H.; LAGO, E.; ROSA, M. E.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E. M. Epidemiological and clinical changes in American tegumentar leishmaniasis in na área of *Leishmania*, *n.Vianna*) *braziliensis* transmission over a 20-year period. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 3, p. 426-33. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0378>. Acesso em: 08 jul. 2020.

KAIKO, G. E.; HORVAT, J. C.; BEAGLEY, K.W.; HANSBRO, P. M. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 326–338. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02719.x>. Acesso em: 09 abr. 2020.

KANE, M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1141–1147. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.1141>. Acesso em: 10 mar. 2020.

KARP, C. L.; EL-SAFI, S. H.; WYNN, T. A.; SATTI, M. M. H.; KORDOFANI, A. M.; HASHIM, F. A.; HAG-ALI, M.; NEVA, F. A.; NUTMAN, T. B.; SACKS, D. L. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1644–1648. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI116372>. Acesso em: 01 jul. 2020.

KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: immunology and prospects for a vaccine. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 17, n. 10, p. 1462–1470. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03610.x>. Acesso em: 02 jul. 2020.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>. Acesso em: 01 ago. 2020.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.018>. Acesso em: 05 jul. 2020.

KHAN, M. G. M.; BHASKAR, K. R. H.; SALAM, M. A.; AKTHER, T.; PLUSCHKE, G.; MONDAL, D. Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients. **Parasites and Vectors**, v. 5, n. 1, p. 1. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-280>. Acesso em: 08 jun. 2020.

KHOSHDEL, A.; ALBORZI, A.; ROSOULI, M.; TAHERI, E.; KIANY, S.; JAVADIAN, M. H. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 44–46. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-86702009000100010>. Acesso em: 01 ago. 2020.

KHOURI, R.; BAFICA, A.; SILVA, M. DA P. P.; NORONHA, A.; KOLB, J.-P.; WIETZERBIN, J.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; VAN WEYENBERGH, J. IFN- β Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The**

Journal of Immunology, v. 182, n. 4, p. 2525–2531. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0802860>. Acesso em: 11 ago. 2020.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159–162. 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S2221-1691, n.11\)60213-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691, n.11)60213-X). Acesso em: 11 jul. 2020.

KONG, F.; SALDARRIAGA, O. A.; SPRATT, H.; OSORIO, E. Y.; TRAVI, B. L.; LUXON, B. A.; MELBY, P. C. Transcriptional Profiling in Experimental Visceral Leishmaniasis Reveals a Broad Splenic Inflammatory Environment that Conditions Macrophages toward a Disease-Promoting Phenotype. **In PLoS Pathogens**, v. 13, Issue 1. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006165>. Acesso em: 10 set. 2020.

KONDĚLKOVÁ, K.; VOKURKOVÁ, D.; KREJSEK, J.; BORSKÁ, L.; FIALA, Z.; CTIRAD, A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders, **Acta Medica (Hradec Kralove)**, v. 53, n. 2, p. 73-77. 2010. <https://doi.org/10.14712/18059694.2016.63>. Acesso em: 11 jan. 2021.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHRO, V. Th17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485-517. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710>. Acesso em: 21 mai. 2020.

KOUTINAS, A. F.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; MYLONAKIS, M. E.; LEONTIDES, L.; POLIZOPOULOU, Z.; BILLINIS, C.; ARGYRIADIS, D.; DIAKOU, N.; PAPADOPOULOS, O. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 98, n. 4, p. 247–261. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017, n.01\)00399-5](https://doi.org/10.1016/s0304-4017, n.01)00399-5). Acesso em: 24 mai. 2020.

KROLEWIECKI, A. J.; ROMERO, H. D.; CAJAL, S. P.; ABRAHAM, D.; MIMORI, T.; MATSUMOTO, T.; JUAREZ, M.; TARANTO, N. J. A randomized clinical trial comparing oral azithromycin and meglumine antimoniate for the treatment of American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania*, *n. Viannia braziliensis*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 4, p. 640–646. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.640>. Acesso em: 27 mar. 2020.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. AUG, p. 1–10. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00251>. Acesso em: 28 mai. 2020.

LACHAUD, L.; CHABBERT, E.; DUBESSAY, P.; DEREURE, J.; LAMOTHE, J.; DEDET, J. P.; BASTIEN, P. Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. **Parasitology**, v. 125, n. Pt 3, p. 197–207. 2002. Disponível em:

<https://doi.org/10.1017/s0031182002002081>. Acesso em: 04 mai. 2020.

LAGE, D. P.; MARTINS, V. T.; DUARTE, M. C.; COSTA, L. E.; GARDE, E.; DIMER, L. M.; KURSANCEW, A. C. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; DE MAGALHÃES-SOARES, D. F.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; SOTO, M.; TAVARES, C. A. P.; COELHO, E. A. F. A new Leishmania-specific hypothetical protein and its non-described specific B cell conformational epitope applied in the serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p. 1649–1658. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-016-4904-x>. Acesso em: 01 ago. 2020.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U.; GUERRA, L. L.; GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; REIS, A. B. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1–2, p. 135–145. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.10.001>. Acesso em: 04 mai. 2020.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; Evolution, classification and geographical distribution. In Peters W & Killick-Kendrick R, n.eds): *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. **Academic Press**, v. 1, p. 1–120. 1987.

LANGBEHEIM, H.; ARNON, R.; SELA, M. Antiviral effect on MS-2 coliphage obtained with a synthetic antigen. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, v. 73, n. 12, p. 4636–4640. 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.73.12.4636>. Acesso em: 14 jul. 2020.

LARA-SILVA, F. O.; MICHALSKY, E. M.; FORTES-DIAS, C. L.; FIUZA, V. O. P.; PESSANHA, J. E. M.; REGINA-SILVA, S.; AVELAR, D. M.; SILVA, M. A.; VIANNA, A. C.; LIMA, M. R.; COSTA, A. J. A.; MACHADO-COELHO, L. L.; DIAS, E.S. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, n. 2015, p. 128–136. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.002>. Acesso em: 01 ago. 2020.

LAURENTI, M. D.; DE SANTANA LEANDRO, M. V. J.; TOMOKANE, T. Y.; DE LUCCA, H. R. L.; ASCHAR, M.; SOUZA, C. S. F.; SILVA, R. M.; MARCONDES, M.; DA MATTA, V. L. R. Comparative evaluation of the DPP, n.®) CVL rapid test for canine serodiagnosis in area of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 3–4, p. 444–450. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.09.002>. Acesso em: 11 set. 2020.

LAURICELLA, M. A.; MAIDANA, C. G.; FRIAS, V. F.; ROMAGOSA, C. M.; NEGRI, V.; BENEDETTI, R.; SINAGRA, A. J.; LUNA, C.; TARTAGLINO, L.; LAUCELLA, S.; REED, S. G.; RIARTE, A. R. An rK28-based immunoenzymatic assay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in Latin America. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 1, p. 92–98. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0768>. Acesso em: 10

ago. 2020.

LEDGERWOOD, J. E.; PIERSON, T. C.; HUBKA, S. A.; DESAI, N.; RUCKER, S.; GORDON, I. J.; ENAMA, E.; NELSON, S.; NASON, M.; GU, W.; BUNDRANT, N.; KOUP, R. A.; BAILER, R. T.; MASCOLA, J. R.; NABEL, G. J.; GRAHAM, B. S.; TEAM, S. *MAJOR ARTICLE* A West Nile Virus DNA Vaccine Utilizing a Modified Promoter Induces Neutralizing Antibody in Younger and Older Healthy Adults in a Phase I Clinical Trial. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n.10, p. 1396-1404. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir054>. Acesso em: 12 ago. 2020.

LEITE, R. S.; FERREIRA, S. DE A.; ITUASSU, L. T.; DE MELO, M. N.; DE ANDRADE, A. S. R. PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 3–4, p. 201–206. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.02.020>. Acesso em: 14 jul. 2020.

LI, W.; JOSHI, M. D.; SINGHANIA, S.; RAMSEY, K. H.; MURTHY, A. K. Peptide vaccine: progress and challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515–536. 2014. <https://doi.org/10.3390/vaccines2030515>. Acesso em: 18 jun. 2020.

LIEW, P. S.; HAIR-BEJO, M. Farming of Plant-Based Veterinary Vaccines and Their. **Advances in Virology**, n. 2015, p. 936940. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/936940>. Acesso em: 10 abr. 2020.

LIMA, W. G.; MICHALICK, M. S. M.; MELO, M. N. DE.; TAFURI, W. L.; TAFURI, W. L. Canine visceral leishmaniasis: A histopathological study of lymph nodes. **Acta Tropica**, v. 92, n. 1, p. 43–53. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2004.04.007>. Acesso em: 15 jun. 2020.

LLANOS-CUENTAS, A.; ECHEVARRÍA, J.; CRUZ, M.; LA ROSA, A.; CAMPOS, P.; CAMPOS, M.; FRANKE, E.; BERMAN, J.; MODABBER, F.; MARR, J. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 25, n. 3, p. 677–684. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/513776>. Acesso em: 19 jul. 2020.

LOMBARDO, G., PENNISI, M. G., LUPO, T., MIGLIAZZO, A., CAPRÌ, A., & SOLANO-GALLEGO, L. Detection of *Leishmania infantum* DNA by real-time PCR in canine oral and conjunctival swabs and comparison with other diagnostic techniques. **Veterinary Parasitology**, v. 184, n. 1, p. 10–17. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.08.010>. Acesso em: 14 ago. 2020.

LUPI, O.; BARTLETT, B. L.; HAUGEN, R. N.; DY, L. C.; SETHI, A.; KLAUS, S. N.; MACHADO PINTO, J.; BRAVO, F.; TYRING, S. K. Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 60, n. 6, p. 897–925; quiz 926–928. 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.03.004>. Acesso em: 04 ago. 2020.

MACHADO-PINTO, J.; AZULAY, R.D.; TYRING, S.K.; LUPI, O.; HENGGE, U.R. Leishmaniasis. **Tropical dermatology. Elsevier Inc**; 2006. pp. 41-8.

MADEIRA, M. F.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T. M.; PACHECO, R. S.; OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, S. A.; FIGUEIREDO, F. B.; BAPTISTA, C.; MARZOCHI, M. C. Mixed infection with *Leishmania*, *n.Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania*, *n.Leishmania*) *chagasi* in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442–445. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.07.011>. Acesso em: 05 set. 2020.

MAGALHÃES, L. F.; WILSON, T. M.; MEDEIROS, A. A. Quadro clínico de cães com Leishmaniose visceral e sua correlação com a sensibilidade do teste parasitológico. **Revista Veterinária**, v. 18, n. 2, p. 67-72. 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vetinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 274–287. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.07.028>. Acesso em: 01 ago. 2020.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; DE SOUSA-GOMES, M. L.; DE SENA, J. M.; LUNA, E. A. Visceral leishmaniasis in Brazil: Trends and challenges. **Cadernos de Saude Publica**, v. 24, n. 12, p. 2941–2947. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>. Acesso em: 10 set. 2020.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: Systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1484. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001484>. Acesso em: 11 set. 2020.

MANNA, L.; VITALE, F.; REALE, S.; CARACAPPA, S.; PAVONE, L. M.; MORTE, R.; DELLA CRINGOLI, G.; STAIANO, N.; GRAVINO, A. E. Comparison of different tissue sampling for PCR-based diagnosis and follow-up of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3–4, p. 251–262. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.019>. Acesso em: 12 set. 2020.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Nota técnica nº038/ 2014/DFIP/DAS. Suspensão da licença de fabricação e comercialização do produto Leishmune vacina contra leishmanioses visceral canina**. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/arquivos/nota-tecnica-dfip-38-14-leishmune.pdf/view>>, Acesso em: 26 mai. 2020 às 13:29.

MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; GOMES, A. A. D.; SILVA, A. R. S.; VIEIRA, R. F. C.; CAMACHO, A. A.; QUINN, JOHN, CHANDRASHEKAR, R. Validation of a *Leishmania infantum* ELISA rapid test for serological diagnosis of *Leishmania chagasi* in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 175, n. 1-2, p. 15–19. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.09.036>. Acesso em: 31 ago. 2020.

MARCONDES, M.; DAY, M. J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, v. 123, p. 261–272. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.022>. Acesso em: 24 jul. 2020.

MARTELLI, P.; FERRARI, L.; MORGANTI, M.; DE ANGELIS, E.; BONILAURI, P.; GUAZZETTI, S.; CALEFFI, A.; BORGHETTI, P. One dose of a porcine circovirus 2 subunit vaccine induces humoral and cell-mediated immunity and protects against porcine circovirus-associated disease under field conditions. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3–4, p. 339–351. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.008>. Acesso em: 22 mar. 2020.

MARTIN, V.; VOULDOUKIS, I.; MORENO, J.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CUISINIER, A. M. The protective immune response produced in dogs after primary vaccination with the LIESP/QA-21 vaccine (n.CaniLeish®) remains effective against an experimental challenge one year later. **Veterinary Research**, v. 45, n. 1, p. 1–15. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-45-69>. Acesso em: 24 jul. 2020.

MARTÍNEZ ABAD, L. P.; ALMEIDA, C. S.; MATTOS, A. M. M.; MENDONÇA, A. C. P.; ALVES, M. J. M.; PINHEIRO, A. C.; PORROZZI, R.; ABASS, E.; STEINHOFF, U.; TEIXEIRA, H. C. Diagnostic accuracy of rKLO8 versus rK26 ELISAs for screening of canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 166, p.133–138. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.021>. Acesso em: 03 ago. 2020.

MEISSNER, U.; JÜTTNER, S.; RÖLLINGHOFF, M.; GESSNER, A. Cyclosporin A-mediated killing of *Leishmania major* by macrophages is independent of reactive nitrogen and endogenous TNF-alpha and is not inhibited by IL-10 and 13. **Parasitology Research**, v. 89, n. 3, p. 221–227. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0743-z>. Acesso em: 01 ago. 2020.

MENDES, T. M.; ROMA, E. H.; COSTAL-OLIVEIRA, F.; DHOM-LEMOS, L. DE C.; TOLEDO-MACHADO, C. M.; BRUNA-ROMERO, O.; BARTHOLOMEU, D. C.; FUJIWARA, R. T.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C. Epitope mapping of recombinant *Leishmania donovani* virulence factor A2 (n.recLdVFA2) and canine leishmaniasis diagnosis using a derived synthetic bi-epitope. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–14. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005562>. Acesso em: 21 mai. 2020.

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* (n. *Leishmania*) *chagasi* presenting distinct cutaneous parasite density and clinical status. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1–2, p. 39–49. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.025>. Acesso em: 14 mai. 2020.

MERRIFIELD, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. the synthesis of a tetrapeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 14, p. 2149–54. 1963. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ja00897a025>. Acesso em: 11 abr. 2020.

METTLER, M.; GRIMM, F.; CAPELLI, G.; CAMP, H.; DEPLAZES, P. Evaluation of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, an Immunofluorescent-Antibody Test, and Two Rapid Tests (n. Immunochromatographic-Dipstick and Gel Tests) for Serological Diagnosis of Symptomatic and Asymptomatic *Leishmania* Infections in Dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5515–5519. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5515>. Acesso em: 13 jun. 2020.

MCMAHON-PRATT, D.; ALEXANDER, J. Does the *Leishmania major* paradigm of pathogenesis and protection hold for New World cutaneous leishmaniasis or the visceral disease? **Immunological Reviews**, v. 201, p. 206–224. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00190.x>. Acesso em: 06 abr. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília. 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília. 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Reunião de validação dos kits de diagnóstico da leishmaniose visceral**. Technical report. Ministério da Saúde do Brasil, Brasília, Distrito Federal, Brasil. 2011b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília. 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Brasília. 2017.

MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; OLIVA, G.; BANETH, G. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 371–377. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.003>. Acesso em: 11 abr. 2020.

MISHRA, J., SAXENA, A., & SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153–1169.

2007. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/092986707780362862>. Acesso em: 29 jul. 2020.

MIZBANI, A.; TAHERI, T.; ZAHEDIFARD, F.; TASLIMI, Y.; AZIZI, H.; AZADMANESH, K.; PAPADOPOULOU, B.; RAFATI, S. Recombinant *Leishmania tarentolae* expressing the A2 virulence gene as a novel candidate vaccine against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 53–62. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.09.114>. Acesso em: 22 abr. 2020.

MODABBER, F. First generation leishmaniasis vaccines in clinical development: moving, but what next. **Current Opinion in Anti-Infective Investigational Drugs**, v. 2, p. 35–9. 2000.

MOHAMMADIHA, A.; MOHEBALI, M.; HAGHIGHI, A.; MAHDIAN, R.; ABADI, A. R.; ZAREI, Z.; YEGANEH, F.; KAZEMI, B.; TAGHIPOUR, N.; AKHOUNDI, B. Comparison of real-time PCR and conventional PCR with two DNA targets for detection of *Leishmania* , *n.Leishmania*) *infantum* infection in human and dog blood samples. **Experimental Parasitology**, v. 133, n. 1, p. 89–94. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.017>. Acesso em: 17 jul. 2020.

MOHEBALI, M.; TARAN, M.; ZAREI, Z. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: Comparative study using an immunochromatographic dipstick rk39 test and direct agglutination. **Veterinary Parasitology**, v. 121, n. 3–4, p. 239–245. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.02.014>. Acesso em: 15 mar. 2020.

MOHEBALI, M.; KHAMESIPOUR, A.; MOBEDI, I.; ZAREI, Z.; HASHEMI-FESHARKI, R. Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania major* vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. **Vaccine**, v. 22, n. 29–30, p. 4097–4100. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.03.058>. Acesso em: 18 abr. 2020.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; RAHAMAN, M.; ALI, N.; GOSWAMI, R. P. A curative immune profile one week after treatment of Indian Kala-azar patients predicts success with a Short-course liposomal amphotericin B therapy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 7. 2010.. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000764>. Acesso em: 11 abr. 2020.

MONTALVO, A. M.; FRAGA, J.; TIRADO, D.; BLANDÓN, G.; ALBA, A.; VAN DER AUWERA, G.; VÉLEZ, I. D.; MUSKUS, C. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1843–1848. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5454-6>. Acesso em: 15 abr. 2020.

MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis : A Review. **The Open**

- Antimicrobial Agents Journal**, v. 1, p. 9–19. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1876518100901010009>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- MOREIN, B.; SIMONS, K. Subunit vaccines against enveloped viruses: virosomes, micelles and other protein complexes. **Vaccine**, v. 3, n. 2, p. 83–93. 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(85\)90055-6](https://doi.org/10.1016/0264-410x(85)90055-6). Acesso em: 22 abr. 2020.
- MOREIN, B.; SUNDQUIST, B.; HÖGLUND, S.; DALSGAARD, K.; OSTERHAUS, A. Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. **Nature**, v. 308, n. 5958, p. 457–460. 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/308457a0>. Acesso em: 22 jun. 2020.
- MOREIRA, M. A. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; GARCIA, J. F.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D. Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 3–4, p. 245–252. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.12.012>. Acesso em: 18 set. 2020.
- MORENO, G.; RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; PRATLONG, F.; SERRES, E. Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In : COLLOQUE INTERNATIONAL CNRS/INSERM, 1984. *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*, p. 105-117. 1986.
- MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 9, p. 399–405. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(n.02\)02347-4](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(n.02)02347-4). Acesso em: 11 jul. 2020.
- MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; CUISINIER, A. M.; GUEGUEN, S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (n.CaniLeish) stimulates an appropriate Th1- dominated cell-mediated immune response in dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1683. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001683>. Acesso em: 14 jul. 2020.
- MORENO, J.; VOULDOUKIS, I.; SCHREIBER, P.; MARTIN, V.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CUISINIER, A. M. Primary vaccination with the LiESP/QA-21 vaccine (n.CaniLeish®) produces a cell-mediated immune response which is still present 1 year later. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 3-4, p. 199-207. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.01.011>. Acesso em: 18 jun. 2020.
- MORI, Y.; NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (n.LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases.

Journal of Infection and Chemotherapy, v. 15, n. 2, p. 62–69. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>. Acesso em: 25 mai. 2020.

MORIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: From a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells, **Immunological Reviews**, v. 259, n. 1, p. 192–205. 2014. <https://doi.org/10.1111/imr.12174>. Acesso em: 11 jan. 2021.

MOUTTAKI, T.; MORALES-YUSTE, M.; MERINO-ESPINOSA, G.; CHIHEB, S.; FELLAH, H.; MARTIN-SANCHEZ, J.; RIYAD, M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–9. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-420>. Acesso em: 17 jul. 2020.

MULLER, I.; KROPF, P.; ETGES, R. J.; LOUIS, J. A. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: Role of CD8+ T cells. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 9, p. 3730–3738. 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3730-3738.1993>. Acesso em: 21 mai. 2020.

MUKBEL, R. M.; PATTEN, C. JR.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D. E. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, n. 4, p. 669–675. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.669>. Acesso em: 19 jul. 2020.

MUMFORD, J. A.; JESSETT, D. M.; ROLLINSON, E. A.; HANNANT, D.; DRAPER, M. E. Duration of protective efficacy of equine influenza immunostimulating complex/tetanus vaccines. **The Veterinary Record**, v. 134, n. 7, p. 158–162. 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/vr.134.7.158>. Acesso em: 19 ago. 2020.

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J.; COFFMAN, R. L. Behavior of visceral *Leishmania donovani* in an experimentally induced T helper cell 2 (n.Th2)-associated response model. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 3, p. 867–874. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.185.5.867>. Acesso em: 19 jul. 2020.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N..G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577. 2005. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(n.05\)67629-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(n.05)67629-5). Acesso em: 23 abr. 2020.

MUXEL, S. M.; AOKI, J. I.; FERNANDES, J. C. R.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A.; ACUÑA, S. M.; MÜLLER, K. E.; VANDERLINDE, R. H.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginine and polyamines fate in leishmania infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2682, p. 1–15. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02682>. Acesso em: 24 abr. 2020.

NASCIMENTO, M. S. L.; CARREGARO, V.; LIMA- JÚNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; RYFFEL, B.; DUTHIE, M.; DE JESUS, A.; DE ALMEIDA, R. P.; DA SILVA, J. S. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015-26. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu531>. Acesso em: 25 mai. 2020.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841–8848. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8841>. Acesso em: 26 jul. 2020.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 21, p. 970–974. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.098>. Acesso em: 18 ago. 2020.

NUNES, C. M.; PIRES, M. M.; DA SILVA, K. M.; ASSIS, F. D.; FILHO, J. G.; PERRI, S. H. V. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Veterinary Parasitology**, v. 170, n. 1–2, p. 131–133. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.01.044>. Acesso em: 19 jul. 2020.

NYLEN, S.; GAUTAM, S. Immunological perspectives of leishmaniasis, **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 135–146. 2010. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62876>. Acesso em: 11 jan. 2021

NYLÉN, S.; MAURYA, R.; EIDSMO, L.; DAS MANANDHAR, K.; SUNDAR, S.; SACKS, D. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–817. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20061141>. Acesso em: 21 jun. 2020.

OLIVA, G.; NIETO, J.; FOGLIA MANZILLO, V.; CAPPIELLO, S.; FIORENTINO, E.; DI MUCCIO, T.; SCALONE, A.; MORENO, J.; CHICHARRO, C.; CARRILLO, E.; BUTAUD, T.; GUEGAND, L.; MARTIN, V.; CUISINIER, A. M.; MCGAHIE, D.; GUEGUEN, S.; CAÑAVATE, C.; GRADONI, L. A Randomised, Double-Blind, Controlled Efficacy Trial of the LiESP/QA-21 Vaccine in Naïve Dogs Exposed to Two *Leishmania infantum* Transmission Seasons. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003213>. Acesso em: 31 jul. 2020.

OLIVEIRA, F.; BAFICA, A.; ROSATO, A. B.; FAVALI, C. B.; COSTA, J. M.; CAFÉ, V.; BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 70–

3. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0680>. Acesso em: 01 set. 2020.

OLIVEIRA, G.G.S.; MAGALHÃES, F.B.; TEIXEIRA, M.A.; PEREIRA, A.M.; PINHEIRO, C.M.; SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, M.B.; BEDOR, C.N.G.; ALBUQUERQUE, A.L.; DOS-SANTOS, W.L.C.; GOMES, Y.M.; MOREIRA-JR, E.D.; BRITO, M.E.F.; CARVALHO, L.C.P.; MELO-NETO, O.P. Characterization of novel *Leishmania infantum* recombinant proteins encoded by genes from five families with distinct capacities for serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 6, p. 1025–1034. 2011. Acesso em: 02 jul. 2020.

OLIVEIRA, E.; SALIBA, J. W.; OLIVEIRA, D.; DIAS, E. S.; PAZ, G. F. A prototype of the direct agglutination test kit (n.DAT-Canis) for the serological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 9–13. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.02.006>. Acesso em: 04 jun. 2020.

OLIVEIRA, A. M.; VIEIRA, C. P.; DIBO, M. R.; GUIRADO, M. M.; RODAS, L. A. C.; CHIARAVALLI-NETO, F. Dispersal of *Lutzomyia longipalpis* and expansion of canine and human visceral leishmaniasis in São Paulo State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 164, p. 233–242. 2016 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.014>. Acesso em: 11 jul. 2020.

OLIVEIRA SILVA, K. L.; MARIN CHIKU, V.; LUVIZOTTO VENTURIN, G.; CORREA LEAL, A. A.; DE ALMEIDA, B. F.; DE REZENDE EUGENIO, F.; DOS SANTOS, P. S. P.; FABRINO MACHADO, G.; DE LIMA, V. M. F. PD-1 and PD-L1 regulate cellular immunity in canine visceral leishmaniasis. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 62, p. 76–87. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.12.002>. Acesso em: 12 ago. 2020.

OSTERHAUS, A.; WEIJER, K.; UYTDEHAAG, F.; JARRETT, O.; SUNDQUIST, B.; MOREIN, B. Induction of protective immune response in cats by vaccination with feline leukemia virus iscom. **Journal of Immunology**, n.Baltimore, Md. : **1950**), v. 135, n. 1, p. 591–596. 1985. Acesso em: 19 jul. 2020.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 7, p. 339–345. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>. Acesso em: 21 jul. 2020.

OZENSOY, S.; OZBEL, Y.; TURGAY, N.; ALKAN, M. Z.; GUL, K.; GILMAN-SACHS, A.; CHANG, K. P.; REED, S. G.; OZCEL, M. A. Serodiagnosis and epidemiology of visceral leishmaniasis in Turkey. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 363–369. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.363>. Acesso em: 23 abr. 2020.

PAHO. **3a. Reunión de los Programas Nacionales de Leishmaniasis de los Países Prioritarios de las Américas**. Resumen Ejecutivo. pp. 22. 2015.

PAIVA, B. R.; OLIVEIRA, A. G.; DORVAL, M. E. M. C.; GALATI, E. A. B.; MALAFRONTI, R. S. Species-specific identification of *Leishmania* in naturally infected sand flies captured in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 126–130. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.02.013>. Acesso em: 17 jul. 2020.

PALTRINIERI, S., GRADONI, L., ROURA, X., ZATELLI, A., & ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 552–578. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vcp.12413>. Acesso em: 18 jun. 2020.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.2460/javma.236.11.1184>. Acesso em: 19 mai. 2020.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; MITOLO, V.; SISTO, M.; FASANELLA, A.; TROTTA, T.; BERTANI, F.; CONSENTI, B.; BRANDONISIO, O. Nitric oxide production by macrophages of dogs vaccinated with killed *Leishmania infantum* promastigotes. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 187–195. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(00\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(00)00026-6). Acesso em: 22 abr. 2020.

PANDAY, A.; SAHOO, M. K.; OSORIO, D.; BATRA, S. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.89>. Acesso em: 21 mai. 2020.

PARAGUAY. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. **Programa Nacional de Control de Leishmaniosis**. Manual de Diagnóstico de Tratamiento de las Leishmaniosis. Asunción: OPS. p. 76. 2011.

PASSANTINO, A.; RUSSO, M.; COLUCCIO, P. Canine leishmaniosis and euthanasia in Italy: A critical legal-ethical analysis. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v. 29, n. 3, p. 537–548. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.20506/rst.29.3.1993>. Acesso em: 23 ago. 2020.

PATTABHI, S.; WHITTLE, J.; MOHAMATH, R.; EL-SAFI, S.; MOULTON, G. G.; GUDERIAN, J. A.; COLOMBARA, D.; ABDOON, A. O.; MUKHTAR, M. M.; MONDAL, D.; ESFANDIARI, J.; KUMAR, S.; CHUN, P.; REED, S. G.; BHATIA, A. Design, development and evaluation of rK28-based point-of-care tests for improving rapid diagnosis of visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical**

Diseases, v. 4, n. 9. 2010. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000822>. Acesso em: 05 ago. 2020.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S.; NORVAL, S.; STOJANOVSKI, L.; SIMEONS, F. R. C.; AUER, J. L.; OSUNA-CABELLO, M.; READ, K. D.; FAIRLAMB, A. H. The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. **ELife**, v. 5, p. 1–21. 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.7554/eLife.09744>. Acesso em: 18 jun. 2020.

PEIXOTO, H. M.; OLIVEIRA, M. R. F.; ROMERO, G. A. S. Serological diagnosis of canine visceral in Brazil: systematic review and meta-analysis.

Trop Med Internat Health, v. 20, n. 3, p. 334±352. 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/tmi.12429>. Acesso em: 19 jun. 2020.

PENICHE, A. G.; RENSLO, A. R.; MELBY, P. C.; TRAVI, B. L. Antileishmanial Activity of Disulfiram and Thiuram Disulfide Analogs in an Ex Vivo Model System Is Selectively Enhanced by the Addition of Divalent Metal Ions.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, n. 10, p. 6463–6470. 2015.

Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.05131-14>. Acesso em: 21 ago. 2020.

PEREZ-AYALA, A; NORMAN, F; PÉREZ-MOLINA, J.A; *et al.* Imported leishmaniasis: a heterogeneous group of diseases. **Journal of Travel**

Medicine, v. 16, n. 6, p. 395-401. 2009. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2009.00341.x>. Acesso em: 19 ago. 2020.

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. Disponível em:

<https://doi.org/10.1128/iai.62.1.229-235.1994>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P.; RUTTEN, V. P. M. G.; 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.

Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.1830250619>. Acesso em: 14 abr. 2020.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; BROEREN, C. P.; RUITENBERG, E. J.;

RUTTEN, V. P. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. **Immunogenetics**, v. 49, n. 7-8, p. 696–699. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s002510050667>.

Acesso em: 15 mai. 2020.

PINTO, E. G.; DA COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G. Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania infantum*: an in vitro and in vivo evaluation using phosphatidylserine-liposomes. **Acta Tropica**, v. 137, p. 206–

210 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.05.017>. Acesso em: 21 mar. 2020.

PIRES, M. Q.; MADEIRA, M. F.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PACHECO, R. S. Cutaneous and visceral leishmaniasis co-infection in dogs from Rio de Janeiro, Brazil: evaluation by specific PCR and RFLP-PCR assays. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 243–246. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0007-2013>. Acesso em: 14 abr. 2020.

PISCOPO, T. V & AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis , n.Reprinted from vol 82, pg 649-657, 2006). **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/pgmj.2006.047340corr1>. Acesso em: 18 jun. 2020.

PORROZZI, R.; COSTA, M. V.; TEVA, A.; FALQUETO, A.; FERREIRA, A. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 5, p. 544–548. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/cvi.00420-06>. Acesso em: 31 jul. 2020.

QUARESMA, P. F.; RÊGO, F. D.; BOTELHO, H. A.; SILVA, S. R.; MOURA JÚNIOR, A. J.; TEIXEIRA NETO, R. G.; MADEIRA, F. M. C.; PAGLIA, A. P.; MELO, M. N.; GONTIJO, C. M. F. Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 10, p. 579–585. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.005>. Acesso em: 04 mai. 2020.

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O.; DAVIDSON, S.; GARCEZ, L.; LAMBSON, B.; RAMOS, P.; SHAW, J. J.; SHAW, M. A.; DYE, C. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and immune response in a cohort study of Brazilian dogs. **Parasitology**, v. 122, p. 253–261. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182001007363>. Acesso em: 08 set. 2020.

QUINNELL, R. J.; CARSON, C.; REITHINGER, R.; GARCEZ, L. M.; COURTENAY, O. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001992>. Acesso em: 17 jul. 2020.

RAFATI, S.; ZAHEDIFARD, F.; NAZGOUEE, F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 24, n. 12, p. 2169–2175. 2006.

RAI, A. K.; THAKUR, C. P.; SINGH, A.; SETH, T.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, P.; MITRA, D. K. Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic

site of human visceral leishmaniasis, *PLoS One*, v. 7, n. 2, p. e31551. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031551>. Acesso em: 11 jan. 2021

RAMÍREZ, J. D.; HERNÁNDEZ, C.; LEÓN, C. M.; AYALA, M. S.; FLÓREZ, C.; GONZÁLEZ, C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep28266>. Acesso em: 19 jul. 2020.

RANAWAKA, R. R.; WEERAKOON, H. S. Randomized, double-blind, comparative clinical trial on the efficacy and safety of intralesional sodium stibogluconate and intralesional 7% hypertonic sodium chloride against cutaneous leishmaniasis caused by *L. donovani*. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 21, n. 5, p. 286–293. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09546630903287445>. Acesso em: 24 jul. 2020.

RAVIS, W. R.; LLANOS-CUENTAS, A.; SOSA, N.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; KOPYDLOWSKI, K. M.; NIELSEN, C.; SMITH, K. S.; SMITH, P. L.; RANSOM, J. H.; LIN, Y. J.; GROGL, M. Pharmacokinetics and absorption of paromomycin and gentamicin from topical creams used to treat cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4809–4815. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.00628-13>. Acesso em: 14 ago. 2020.

READY, P. D. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, v. 6, n. 1, p. 147–154. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>. Acesso em: 11 jul. 2020.

REGUERA, R. M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; GARCÍA-ESTRADA, C.; BALAÑA-FOUCE, R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 227, p. 98–114. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>. Acesso em: 16 jul. 2020.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; GUERRA, L. L.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Phenotypic features of circulating leucocytes as immunological markers for clinical status and bone marrow parasite density in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 2, p. 303–311. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03206.x>. Acesso em: 02 abr. 2020.

REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; CARRILLO, E.; MARTINS-FILHO, O. A.; MORENO, J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 7, p. 341–349. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.005>. Acesso em: 04 abr. 2020.

REIS, A. B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A. M.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; 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* (*n.Leishmania*) *chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 112, n. 3–4, p. 102–116. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.02.001>. Acesso em: 15 mai. 2020.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; CARNEIRO, C. M.; MAYRINK, W.; TAFURI, W. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.10.307>. Acesso em: 16 mai. 2020.

REISEN, W. K. Landscape Epidemiology of Vector-Borne Diseases. **Annual Review of Entomology**, v. 55, n. 1, p. 461–483. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085419>. Acesso em: 17 ago. 2020.

REITHINGER, R.; QUINNELL, R. J.; ALEXANDER, B.; DAVIES, C. R. Rapid detection of *Leishmania infantum* infection in dogs: comparative study using an immunochromatographic dipstick test, enzyme-linked immunosorbent assay, and PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2352–2356. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2352-2356.2002>. Acesso em: 04 mai. 2020.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G.; ALEXANDER, B.; VIEIRA, E. P.; ASSIS, G.; DAVIES, C. R. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 1, p. 55–62. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.09.006>. Acesso em: 24 mai. 2020.

RESENDE, D. M.; CAETANO, B. C.; DUTRA, M. S.; PENIDO, M. L. O.; ABRANTES, C. F.; VERLY, R. M.; RESENDE, J. M.; PILÓ-VELOSO, D.; REZENDE, S. A.; BRUNA-ROMERO, O.; FERNANDES, A. P.; GAZZINELLI, R. T. Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the *Leishmania* amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. **Vaccine**, v. 26, n. 35, p. 4585–4593. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.091>. Acesso em: 26 ago. 2020.

REY, L. Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África. **Edição Guanabara-Koogan**, Rio de Janeiro, 3 edição, 856 p., 2001.

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–7. 2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4405679>. Acesso em: 31 jul. 2020.

RHALEM, A.; SAHIBI, H.; GUESSOUS-IDRISSI, N.; LASRI, S.; NATAMI, A.; RIYAD, M.; BERRAG, B. Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 173–184. 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017, n.98\)00240-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017,n.98)00240-4). Acesso em: 17 ago. 2020.

RIBEIRO, P. A. F.; DIAS, D. S.; LAGE, D. P.; COSTA, L. E.; SALLES, B. C. S.; STEINER, B. T.; RAMOS, F. F.; LIMA, M. P.; SANTOS, T. T. O.; CHAVES, A. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L.; CALIGIORNE, R. B., DE MAGALHÃES-SOARES, D. F., SILVEIRA, J. A. G., MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; GONÇALVES, D. U.; COELHO, E. A. F. A conserved *Leishmania* hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 92, n. 3, p. 196–203. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.026>. Acesso em: 19 mai. 2020.

RIJAL, S.; CHAPPUIS, F.; SINGH, R.; BOVIER, P. A.; ACHARYA, P.; KARKI, B. M. S.; DAS, M. L.; DESJEUX, P.; LOUTAN, L.; KOIRALA, S. Treatment of visceral leishmaniasis in south-eastern Nepal: decreasing efficacy of sodium stibogluconate and need for a policy to limit further decline. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 350–354. 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0035-9203, n.03\)90167-2](https://doi.org/10.1016/s0035-9203,n.03)90167-2). Acesso em: 17 abr. 2020.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. DE O.; VITORIANO-SOUZA, J.; COURA-VITAL, W.; BRAGA, S. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DE LANA, M.; GONTIJO, N. F.; MARQUES, M. J.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. Performance of LBSap Vaccine after Intradermal Challenge with *L. infantum* and Saliva of *Lu. longipalpis*: Immunogenicity and Parasitological Evaluation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049780>. Acesso em: 16 jul. 2020.

RODGERS, M.R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol**, v. 71, n. 3, p. 267–275. 1990. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4894, n.90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894,n.90)90031-7). Acesso em: 16 abr. 2020.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; FRANCINO, O.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALBEROLA, J. *Leishmania* infection: Laboratory diagnosing in the absence of a “gold standard.” **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 2, p. 251–256. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0366>. Acesso em: 16 abr. 2020.

RODRÍGUEZ-CORTÉS, A.; OJEDA, A.; LÓPEZ-FUERTES, L.; TIMÓN, M.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; SÁNCHEZ-ROBERT, E.; FRANCINO, O.; ALBEROLA, J. A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 6, p. 683–693. 2007.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.11.007>. Acesso em: 12 mai. 2020.

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, p. e584. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>. Acesso em: 13 abr. 2020.

ROMERO, L.; MIA, G. M. DE & FLOEGEL-NIESMANN, G. Classical swine fever , n. CSF) marker vaccine Trial I . Challenge studies in weaner pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 83, n. 2, p. 85–106. 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135,n.01\)00409-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1135,n.01)00409-6). Acesso em: 16 abr. 2020.

ROSATI, S.; ORTOFFI, M.; PROFITI, M.; MANNELLI, A.; MIGNONE, W.; BOLLO, E.; GRADONI, L. Prokaryotic expression and antigenic characterization of three recombinant Leishmania antigens for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 6, p. 1153–1156. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CDLI.10.6.1153-1156.2003>. Acesso em: 19 ago. 2020.

ROSAS, L. E.; KEISER, T.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. A.; SEPTER, A.; KACZMAREK, J.; LEZAMA-DAVILA, C. M.; SATOSKAR, A. R. Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. **International Immunology**, v. 17, n. 10, p. 1347–1357. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh313>. Acesso em: 11 abr. 2020.

ROSSI, M.; & FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions!. **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx075>. Acesso em: 13 mai. 2020.

ROSTAMI, M. N.; KESHAVARZ, H.; EDALAT, R.; SARRAFNEJAD, A.; SHAHRESTANI, T.; MAHBOUDI, F.; KHAMESIPOUR, A. CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000845>. Acesso em: 21 mai. 2020.

RUECKERT, C.; GUZMÁN, C.A. Vaccines: from empirical development to rational design. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 11, p. e1003001. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003001>. Acesso em: 22 jun. 2020.

SAHA, S.; MONDAL, S.; RAVINDRAN, R.; BHOWMICK, S.; MODAK, D.; MALLICK, S.; RAHMAN, M.; KAR, S.; GOSWAMI, R.; GUHA, S. K.; PRAMANIK, N.; SAHA, B.; ALI, N. IL-10- and TGF- β -Mediated Susceptibility in

- Kala-azar and Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis: The Significance of Amphotericin B in the Control of *Leishmania donovani* Infection in India . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 8, p. 5592–5603. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5592>. Acesso em: 23 abr. 2020.
- SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T.; ONO, M. Regulatory T cells and immune tolerance, *Cell*, v. 133, n. 5, p. 775–787. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>. Acesso em: 11 jan. 2021
- SALMANPOUR, R.; HANDJANI, F.; & NOUHPISHEH, M. K. Comparative study of the efficacy of oral ketoconazole with intra-lesional meglumine antimoniate , n.Glucantime) for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **The Journal of Dermatological Treatment**, v. 12, n. 3, p. 159–162. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09546630152607899>. Acesso em: 26 ago. 2020.
- SANTARÉM, N.; SILVESTRE, R.; CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.; REED, S. G.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Application of an improved enzyme-linked immunosorbent assay method for serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1866–1874. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.02402-09>. Acesso em: 29 abr. 2020.
- SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 1–2, p. 21–30. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427,n.02\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2427,n.02)00134-4). Acesso em: 19 mai. 2020.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 471–489. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00823.x>. Acesso em: 09 jun. 2020.
- SCALONE, A.; DE LUNA, R.; OLIVA, G.; BALDI, L.; SATTA, G.; VESCO, G.; MIGNONE, W.; TURILLI, C.; MONDESIRE, R. R.; SIMPSON, D.; DONOGHUE, A. R.; FRANK, G. R.; GRADONI, L. Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. **Veterinary Parasitology**, v. 104, n. 4, p. 275–285. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017,n.01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017,n.01)00643-4). Acesso em: 14 mai. 2020.
- SCHALLIG, H. D. F. H.; SCHOONE, G. J.; BEIJER, E. G. M.; KROON, C. C. M.; HOMMERS, M.; OZBEL, Y.; OZENSOY, S.; DA SILVA, E. S.; CARDOSO, L. M.; DA SILVA, E. D. Development of a fast agglutination screening test , n.FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 109, n. 1–2, p. 1–8. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017,n.02\)00268-6](https://doi.org/10.1016/s0304-4017,n.02)00268-6). Acesso em: 14 mai. 2020.

SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 158-66. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jac/dkh058>. Acesso em: 04 jun. 2020.

SCOTT, P.; FARREL, J.P. Experimental Cutaneous Leishmaniasis: Induction and Regulation of T Cells following Infection of Mice with *Leishmania major*. **Chemical Immunology**, v. 70, p. 60-80. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000058698>. Acesso em: 07 ago. 2020.

SCOTT, P.; & NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>. Acesso em: 01 ago. 2020.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHARQUIE, K. E.; AL-TALIB, K. K.; & CHU, A. C. Intralesional therapy of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. **The British Journal of Dermatology**, v. 119, n. 1, p. 53–57. 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1988.tb07100.x>. Acesso em: 02 jul. 2020.

SILVA, D. A.; MADEIRA, M. F.; FIGUEIREDO, F. B. Geographical expansion of canine visceral in Rio de Janeiro State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 57, n. 5, p. 435-38. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500012>. Acesso em: 06 abr. 2020.

SILVESTRE, R.; SANTARÉM, N.; CUNHA, J.; CARDOSO, L.; NIETO, J.; CARRILLO, E.; MORENO, J.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Serological evaluation of experimentally infected dogs by LicTXNPx-ELISA and amastigote-flow cytometry. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 1–2, p. 23–30. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.09.001>. Acesso em: 04 jul. 2020.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Developments in diagnosis of visceral leishmaniasis in the elimination era. **Journal of Parasitology Research**, v. 239469, p. 1-10. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/239469>. Acesso em: 01 jul. 2020.

SINGH, D. P.; GOYAL, R. K.; SINGH, R. K.; SUNDAR, S.; MOHAPATRA, T. M. In search of an ideal test for diagnosis and prognosis of Kala-azar. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 281–285. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.3329/jhpn.v28i3.5557>. Acesso em: 30 abr. 2020.

SKWARCZYNSKI, M.; & TOTH, I. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical Science**, v. 7, n. 2, p. 842–854. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5sc03892h>. Acesso em: 22 abr. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; MORELL, P.; ARBOIX, M.; ALBEROLA, J.; FERRER, L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. **J Clin Microbiol**, v. 39, n. 2, p. 560–563. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.39.2.560-563>. Acesso em: 21 jul. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRO, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165, n. 1-2, p. 1–18. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>. Acesso em: 23 ago. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v. 4, p. 86. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>. Acesso em: 24 set. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; VILLANUEVA-SAZ, S.; CARBONELL, M.; TROTTA, M.; FURLANELLO, T.; NATALE, A. Serological diagnosis of canine leishmaniosis: Comparison of three commercial ELISA tests , n.Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test , n.Speed Leish K®) and an in-house IFAT. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–10. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-111>. Acesso em: 21 mar. 2020.

SOLANO-GALLEGO, L.; MONTSERRAT-SANGRÀ, S.; ORDEIX, L.; MARTÍNEZ- ORELLANA, P. Leishmania infantum-specific production of IFN- γ and IL-10 in stimulated blood from dogs with clinical leishmaniosis. **Parasite Vector**, v. 9, n. 1, p. 317. 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1598-y>. Acesso em: 15 jul. 2020.

SOONG, L. Subversion and utilization of host innate defense by *Leishmania amazonensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 58, n. 3. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00058>. Acesso em: 04 jun. 2020.

SOONG, L.; CHANG, C. H.; SUN, J.; LONGLEY, B. J.; JR, RUDDLE, N. H.; FLAVELL, R. A.; MCMAHON-PRATT, D. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **The Journal of Immunology**, v. 158, n. 11, p.5374–5383. 1997. PMID: 9164958. Acesso em: 05 jun. 2020.

SOTO, M.; REQUENA, J. M.; QUIJADA, L.; ALONSO, C. Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 58–63. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.36.1.58-63.1998>. Acesso em: 01 jul. 2020.

SOUSA, S.; LOPES, A. P.; CARDOSO, L.; SILVESTRE, R.; SCHALLIG, H.; REED, S. G.; CORDEIRO DA SILVA, A. Seroepidemiological survey of *Leishmania infantum* infection in dogs from northeastern Portugal. **Acta**

- Tropica**, v. 120, n. 1–2, p. 82–87. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.06.003>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- SRIVASTAVA, P.; DAYAMA, A.; MEHROTRA, S.; SUNDAR, S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1-6. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.09.006>. Acesso em: 04 jul. 2020.
- SRIVIDYA, G.; KULSHRESTHA, A.; SINGH, R.; SALOTRA, P. Diagnosis of visceral leishmaniasis: Developments over the last decade. **Parasitology Research**, v. 110, n. 3, p. 1065–1078. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2680-1>. Acesso em: 03 abr. 2020.
- STANLEY, A. C.; ENGWERDA, C. R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunol. Nature Cell Biology**, v. 85, p. 138–147. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.icb7100011>. Acesso em: 03 abr. 2020.
- STEVENSON, A. F. Brazil, Market Development Reports. **Pet Food Report**, GAIN Report-BR4602, p. 1–11. 2004.
- 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 of Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 63–73. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.015>. Acesso em: 01 abr. 2020.
- STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C. L.; BURSHTAIN, O.; GONEN, L.; BANETH, G. Polymerase Chain Reaction Using Noninvasively Obtained Samples, for the Detection of *Leishmania infantum* DNA in Dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 9, p. 1729–1733. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/383281>. Acesso em: 02 abr. 2020.
- SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C. K.; MURRAY, H. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the Center of the Indian Epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/318121>. Acesso em: 04 mai. 2020.
- SUNDAR, S.; AGRAWAL, N.; ARORA, R.; AGARWAL, D.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J. Short-Course Paromomycin Treatment of Visceral Leishmaniasis in India: 14-Day vs 21-Day Treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p. 914–918. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/605438>. Acesso em: 05 jun. 2020.
- SUNDAR, S.; JHA, T. K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S. K. Injectable paramomycin for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v. 356, n. 25, p. 2571-2581. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066536>. Acesso em: 04 set. 2020

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 4, p. 543–550. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/cis474>. Acesso em: 30 ago. 2020.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J.; AGARWAL, D.; DIPTI AGARWAL, M.D.; MADHUKAR RAI, M.D.; HENRY, W.; MURRAY, M.D. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. v. 362, n. 6, p. 504–512. 2010.

TAKEYAMA, N.; KIYONO, H.; & YUKI, Y. Plant-based vaccines for animals and humans : recent advances in technology and clinical trials. **Therapeutic Advances in Vaccines**, v. 3, n. 5-6, p. 139–154. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2051013615613272>. Acesso em: 04 ago. 2020.

TALLAB, T. M.; BAHAMDAM, K. A.; MIRDAD, S.; JOHARGI, H.; MOURAD, M. M.; IBRAHIM, K.; EL SHERBINI, A. H.; KARKASHAN, E.; KHARE, A. K.; JAMAL, A. Cutaneous leishmaniasis: schedules for intralesional treatment with sodium stibogluconate. **International Journal of Dermatology**, v. 35, n. 8, p. 594–597. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-4362.1996.tb03669.x>. Acesso em: 14 mai. 2020.

TÁVORA, M. P. F.; PEREIRA, M. A. V. C.; SILVA, V. L.; VITA, G. F. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania* sp. em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 482-483. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000400023>. Acesso em: 04 set. 2020.

TEIXEIRA, M. C.; FREITAS, T. D.; BISOL, J.; ROCHA, A. C.; TARTAROTTI, A. L. Occurrence of seropositivity for *Leishmania infantum* chagasi in dogs from built-up areas of the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul±Brazil. Fifth World Congress on Leishmaniosis, 2013; Porto de Galinhas. Brazil. Porto Galinhas: **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2013. p.854.

TERRAZAS, C.; VARIKUTI, S.; KIMBLE, J.; MORETTI, E.; BOYAKA, P. N.; SATOSKAR, A. R. IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by *Leishmania donovani*. **FASEB Journal**, v. 30, n. 3, p. 1135–1143. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1096/fj.15-277202>. Acesso em: 14 jul. 2020.

TESTASICCA, M. C. DE S.; DOS SANTOS, M. S.; MACHADO, L. M.; SERUFO, A. V.; DORO, D.; AVELAR, D.; TIBÚRCIO, A. M. L.; ABRANTES, C. DE F.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; GRIMALDI, G. J.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Veterinary Parasitology**, v. 204, n. 3–4, p. 169–176. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.04.025>. Acesso em: 17 set. 2020.

THAKUR, C. P. Socio-economics of visceral leishmaniasis in Bihar , n.India). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 2, p. 156–157. 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0035-9203, n.00\)90255-4](https://doi.org/10.1016/S0035-9203, n.00)90255-4). Acesso em: 08 jun. 2020.

THOMAS, C.; YOUNG, N. J.; HEANEY, J.; COLLINS, M. E.; BROWNLIE, J. Evaluation of efficacy of mammalian and baculovirus expressed E2 subunit vaccine candidates to bovine viral diarrhoea virus. **Vaccine**, v. 27, n. 17, p. 2387–2393. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.010>. Acesso em: 09 jul. 2020.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LANOTTE, G; RIOUX, R.; PRATLONG, F.; MARTINI-DUMAS, A.; SERRES, E. Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 68, n. 1, p. 104-106. 1993. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/15505968>. Acesso em: 09 ago. 2020.

THOMAZ-SOCCOL, V.; LUZ, E.; BISETO-JUNIOR, A.; CASTRO, E.; FERREIRA-COSTA, E. Visceral and cutaneous leishmaniasis in the Parana State, Southern of Brazil border with Argentina and Paraguay. **Fifth World Congress on Leishmaniasis**; 13 to 17 May Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil p. 76±77. 2013.

THOMAZ-SOCCOL, V.; PASQUALI, A. K. S.; POZZOLO, E. M.; LEANDRO, A. S.; CHIYO, L.; BAGGIO, R. A.; Michalyszyn, M. S.; SILVA, C.; CUBAS, P. H.; PETERLLE, R.; PAZ, O. L. S.; BELMONTE, I. L.; BISETTO-JUNIOR, A. More than the eyes can see: the worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian side of the triple border. **PLoS ONE.**, v. 12, n. 12, p. e0189182. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189182>. Acesso em: 04 jul. 2020.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525-32. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>. Acesso em: 04 jul. 2020.

TOLEDO-MACHADO, C. M.; BUENO, L. L.; MENEZES-SOUZA, D.; MACHADO-DE-AVILA, R. A.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; BARTHOLOMEU, D. C.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FUJIWARA, R. T. Use of Phage Display technology in development of canine visceral leishmaniasis vaccine using synthetic peptide trapped in sphingomyelin/cholesterol liposomes. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–8. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0747-z>. Acesso em: 03 set. 2020.

TOLEDO-MACHADO, C. M.; DE AVILA, R. A. M.; NGUYEN, C.; GRANIER, C.; BUENO, L. L.; CARNEIRO, C. M.; MENEZES-SOUZA, D.; CARNEIRO, R. A.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FUJIWARA, R. T. Immunodiagnosis of canine

visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries. **BioMed Research International**, v. 2015, n. 401509, p. 1-10. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/401509>. Acesso em: 04 jul. 2020.

TOLEZANO, J. E.; ULIANA, S. R.; TANIGUCHI, H. H.; ARAÚJO, M. F.; BARBOSA, J. A.; BARBOSA, J. E.; FLOETER-WINTER, L. M.; SHAW, J. J.; The first records of *Leishmania* , n.*Leishmania*) *amazonensis* in dogs , n.*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Araçatuba County, São Paulo state, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 149, n. 3-4, p. 280–284. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.07.008>. Acesso em: 11 set. 2020.

TONHEIM, T. C.; BØGWALD, J.; & DALMO, R. A. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n. 1–2, p. 1–18. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.007>. Acesso em: 12 abr. 2020.

TRAVI, B. L. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomedica : Revista Del Instituto Nacional de Salud**, v. 34, n. 1, p. 7–12. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0120-41572014000100002>. Acesso em: 13 mai. 2020.

TRAVI, B. L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; DANTAS-TORRES, F.; MIRÓ, G. Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. 1–13. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006082>. Acesso em: 14 jun. 2020.

TRONCARELLI, M. Z.; CAMARGO, J. B.; MACHADO, J. G.; LUCHEIS, S. B.; LANGONI, H. *Leishmania spp.* and/or *Trypanosoma cruzi* diagnosis in dogs from endemic and nonendemic areas for canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 164, n. 2-4, p. 118–123. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.06.027>. Acesso em: 18 mai. 2020.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8, n.+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 11-12, p. 569–579. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0141-9838.2004.00672.x>. Acesso em: 10 jul. 2020.

UMEZAWA, E. S.; SOUZA, A. I.; PINEDO-CANCINO, V.; MARCONDES, M.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; CAMACHO, A. A.; STOLF, A. M. S.; TEIXEIRA, M. M. G. TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. **Acta tropica**, v. 111, n. 1, p. 15–20. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.006>. Acesso em: 04 mar. 2020.

URUGUAY. **Guía de diagnóstico, tratamiento y control de la leishmaniasis**

visceral em Uruguay. Universidad de la República, Ministerio de Salud, 2016. p. 53.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon γ -producing CD8+ T cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 11, p. 1559–1566. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20040172>. Acesso em: 07 mai. 2020.

UZUN, S.; DURDU, M.; CULHA, G.; ALLAHVERDIYEV, A. M.; MEMISOGLU, H. R. Clinical features, epidemiology, and efficacy and safety of intralesional antimony treatment of cutaneous leishmaniasis: recent experience in Turkey. **The Journal of Parasitology**, v. 90, n. 4, p. 853–859. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1645/GE-185R>. Acesso em: 06 ago. 2020.

VALIENTE-GABIOUD, A. A.; VEAUTE, C.; PERRIG, M.; GALAN-ROMANO, F. S.; SFERCO, S. J.; MARCIPAR, I. S. Effect of repetitiveness on the immunogenicity and antigenicity of *Trypanosoma cruzi* FRA protein. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 672–679. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2010.11.011>. Acesso em: 07 ago. 2020.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7537>. Acesso em: 06 ago. 2020.

VELASQUEZ, L. G.; GALUPPO, M. K.; DE REZENDE, E.; BRANDÃO, W. N.; PERON, J. P.; ULIANA, S. R. B.; DUARTE, M. I.; STOLF, B. S. Distinct courses of infection with *Leishmania* (n.L.) amazonensis are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. **Parasitology**, v. 143, n. 6, p. 692–703. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S003118201600024X>. Acesso em: 06 set. 2020.

VELEZ, I.; AGUDELO, S.; HENDRICKX, E.; PUERTA, J.; GROGL, M.; MODABBER, F.; BERMAN, J. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 126, n. 3, p. 232–236. 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/0003-4819-126-3-199702010-00010>. Acesso em: 01 ago. 2020.

VENTURIN, G. L.; BRAGATO, J. P.; SILVA, K. L. O.; DE LIMA, V. M. F. Recombinant K28 antigen in ELISA in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 12, p. 670–673. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12281>. Acesso em: 31 jul. 2020.

VERA-IZAGUIRRE, D. S.; VEGA-MEMIJE, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; ARENAS, R. Leishmaniasis. Revisión. **Dermatologia Cosmetica, Medica y Quirurgica**, v. 4, n. 4, p. 252–260. 2006.

VERMA, S.; AVISHEK, K.; SHARMA, V.; NEGI, N. S.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Application of loop-mediated isothermal amplification assay for the sensitive and rapid diagnosis of visceral leishmaniasis and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 4, p. 390–395. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.011>. Acesso em: 01 ago. 2020.

VERMIJ, P. USDA approves the first plant-based vaccine. **Nature Biotechnology**, p. 24, n. 3, p. 233–4. 2006

VEXENAT, A. D. E. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. , n.1996) Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and *Leishmania* , n.viannia) *braziliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 38, n. 3, p. 177–185. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651996000300003>. Acesso em: 05 abr. 2020.

VINET, A. F.; FUKUDA, M.; TURCO, S. J.; Descoteaux, A. The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000628>. Acesso em: 06 jul. 2020.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ddg.12595>. Acesso em: 09 abr. 2020.

VON STEBUT, E.; EHRCHEN, J. M.; BELKAID, Y.; KOSTKA, S. L.; MÖLLE, K.; KNOP, J.; SUNDERKÖTTER, C.; UDEY, M. C. Interleukin 1 α promotes TH1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 2, p. 191–199. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20030159>. Acesso em: 06 mar. 2020.

VON STEBUT, E.; & UDEY, M. C. Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 12, p. 1102–1109. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.05.024>. Acesso em: 30 mar. 2020.

VOS, Q.; LEES, A.; WU, Z. Q.; SNAPPER, C. M.; MOND, J. J. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. **Immunology Review**, v. 176, p. 154–170. 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2000.00607.x>. Acesso em: 16 ago. 2020.

WANG, Z-E.; REINER, S. L.; ZHENG, S.; DALTON, D. K.; LOCKSLEY, R. M. CD4⁺ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 4, p. 1367–1371. 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1084/jem.179.4.1367>. 1994. Acesso em: 06 out. 2020.

WANG, Y.; CHEN, Y.; XIN, L.; BEVERLEY, S. M.; CARLSEN, E. D.; POPOV, V.; CHANG, K. P.; WANG, M.; SOONG, L. Differential microbicidal effects of human histone proteins H2A and H2B on *Leishmania* promastigotes and amastigotes. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1124–1133. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.00658-10>. Acesso em: 17 mar. 2020.

WEIGLE, K. A.; VALDERRAMA, L.; ARIAS, A. L.; SANTRICH, C.; SARAVIA, N. G. *Leishmanin* skin test standardization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of reaction and sensitization. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 3, p. 260-71. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1991.44.260>. Acesso em: 25 jul. 2020.

WEINA, P.J; NEAFIE, R.C; WORTMANN, G; POLHEMUS, M; ARONSON, N.E. Old world leishmaniasis: an emerging infection among deployed US military and civilian workers. **Clinical Infectious Disease**, v. 39, n. 11, p. 1674–1680. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/425747>. Acesso em: 10 jan. 2020.

WHO. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series**, 949, xii–xiii, 1–186, n. 2010.

WHO. Leishmaniasis fact sheet N375 , n.2015). www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/index.html <acesso em 10 mai. 2020>

WHO, 2017. World Health Organization. Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en> <acesso em 25 ago. 2020>

WILSON, J.; HUYNH, C.; KENNEDY, K. A.; WARD, D. M.; KAPLAN, J.; ADEREM, A.; ANDREWS, N. W. Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 10, p. e1000179. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000179>. Acesso em: 12 fev. 2020.

WYLIE, C. E.; CARBONELL-ANTOÑANZAS, M.; AIASSA, E.; DHOLLANDER, S.; AGMUTT, F. J.; BRODBELT, D. C.; SOLANO-GALLEGO, L. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: vaccinations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, p. 7–18. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.06.015>. Acesso em: 15 mai. 2020.

XIN, L; LI, Y; SOONG, L. Role of interleukin -1 β in activating the CD11chigh CD45RB - dendritic cell subset and priming *Leishmania amazonensis*- specific CD4+ T cells in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 10, p. 5018–5026. 2007. Acesso em: 27 jun. 2020.

YAM, K. K.; HUGENTOBLER, F.; POULIOT, P.; STERN, A. M.; LALANDE, J.

D.; MATLASHEWSKI, G.; OLIVIER, M.; COUSINEAU, B. Generation and evaluation of A2-expressing *Lactococcus lactis* live vaccines against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 9, p. 1248–1260. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.029959-0>. Acesso em: 27 jun. 2020.

YOU DEN, W.J. Index for rating diagnostic tests. **Cancer**, v. 3, p. 32–35. 1950. <https://doi.org/10.1002/1097-0142>. PMID 15405679 Acesso em: 30 nov. 2020.

YU, N.; LI, X.; SONG, W.; LI, D.; YU, D.; ZENG, X.; LI, M.; LENG, X.; LI, X. CD4⁺CD25⁺CD127^{low}/- T cells: A more specific treg population in human peripheral blood, **Inflammation**, v. 35, p. 1773–1780. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10753-012-9496-8>. Acesso em: 11 jan. 2021).

ZADEH-VAKILI, A.; TAHERI, T.; TASLIMI, Y.; DOUSTDARI, F.; SALMANIAN, A.H.; RAFATI, S. Immunization with the hybrid protein vaccine, consisting of *Leishmania major* cysteine proteinases Type I , n.CPB) and Type II , n.CPA), partially protects against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 22, n. 15–16, p. 1930–1940. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.014>. Acesso em: 13 jun. 2020.

ZANIN, F. H. C.; COELHO, E. A. F.; TAVARES, C. A. P.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; SILVA COSTA, M. M.; REZENDE, S. A.; GAZZINELLI, R. T.; FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase , n.NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 9, p. 1070–1077. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.012>. Acesso em: 18 jun. 2020.

ZERPA, O.; CONVIT, J. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Venezuela. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. 3, p. 30–34. 2009.

ZIJLSTRA, E. E.; NUR, Y.; DESJEUX, P.; KHALIL, E. A. G.; GROEN, J. Diagnosing visceral leishmaniasis with the recombinant K39 strip test : experience from the Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 2, p. 108-113. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00680.x>. Acesso em: 22 fev. 2020.

ZOFOU, D.; NYASA, R. B.; NSAGHA, D. S.; NTIE-KANG, F.; MERIKI, H. D.; ASSOBI, J. C. N.; KUETE, V. Control of malaria and other vector-borne protozoan diseases in the tropics: enduring challenges despite considerable progress and achievements. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 3, n. 1, p. 1. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2049-9957-3-1>. Acesso em: 06 mar. 2020.

APÊNDICE 1 – PATENTE**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT****Número do Processo:** BR 10 2020 007615 9**Dados do Depositante (71)**

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 75095679000149**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Rua João Negrão, 280 2o andar**Cidade:** Curitiba**Estado:** PR**CEP:** 80010-200**País:** Brasil**Telefone:** (41) 3360 7441**Fax:** (41) 3360 7416**Email:** coord.pi@ufpr.br**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/04/2020 às 16:07, Petição 870200048057

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI379 E KIT PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Resumo: A presente invenção descreve a produção de um kit ELISA utilizando um novo antígeno, o peptídeo (SEQ no. 1) PSLi379, para imunodiagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC), doença causada pelo protozoário *Leishmania infantum*. Os métodos de diagnóstico são baseados na interação de tal peptídeo com componentes de amostras biológicas e posterior detecção da resultante interação. O kit de diagnóstico ELISA compreende o uso do peptídeo e reagentes de detecção da reação entre peptídeos e componentes das amostras biológicas. A invenção também se refere a composições imunológicas que contenham peptídeos como princípio ativo. O peptídeo sintético descrito na presente invenção apresenta utilidade em quaisquer métodos, kit de diagnóstico e biosensores, usados para detectar a infecção e/ou a doença, em cães, com maior sensibilidade e especificidade para LVC, reduzindo resultados falsos positivos e falsos negativos. O produto reivindicado na presente invenção não apresenta toxicidade. Foram testados com soros caninos. A aplicação está relacionada com a saúde humana e veterinária.

Figura a publicar: 3

APÊNDICE 2 – PATENTE

12/05/2020 870200058624
13:44

29409161917386310

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 009366 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 75095679000149

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua João Negrão, 280 2o andar

Cidade: Curitiba

Estado: PR

CEP: 80010-200

País: Brasil

Telefone: (41) 3360 7441

Fax: (41) 3360 7416

Email: coord.pi@ufpr.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 12/05/2020 às 13:44, Petição 870200058624

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): KIT E MÉTODO ELISA PARA IMUNODIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL E CUTÂNEA HUMANA E LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA UTILIZANDO NOVO ANTÍGENO PEPTÍDEO SINTÉTICO PSLI409

Resumo: Esta invenção reivindica um kit ELISA de diagnóstico para leishmanioses utilizando um novo antígeno, o peptídeo sintético PSLi409, produzido por síntese química, e seu método de utilização. O kit e o método têm aplicação na detecção de diferentes formas clínicas de leishmanioses, sendo estas: leishmaniose visceral e cutânea humana e leishmaniose visceral canina, tanto em portadores sintomáticos quanto assintomáticos, apresentando alta sensibilidade e especificidade. Os componentes do kit reivindicado na presente invenção não apresentam toxicidade. Foram realizados testes com soros de pacientes humanos e caninos. A aplicação desta invenção está relacionada com a saúde humana e veterinária.

Figura a publicar: 4

ANEXO 1 – ARTIGO 1

The efficacy of recombinant protein Ibk39 for the diagnosis of leishmaniosis in dogs

Joyce Carvalho Pereira^{1*}, Pedro Dos Santos Sousa^{1*}, Ligia Moraes Barizon De Souza¹,
Aline Kuhn Sbruzzi Pasquali¹, Michelle Bates², Paul Bates², Vanete Thomaz Soccol¹

¹Federal University of Paraná, Post-graduate Course in Bioprocess Engineering and Biotechnology, Polytechnic Centre, Jardim das Américas, CEP 81530-980, Curitiba, Paraná, Brazil;

²Division of Biomedical and Life Sciences, Faculty of Health and Medicine, Lancaster University, Lancaster, LA1 4YQ, UK.

* These authors contributed equally to this work

Corresponding Author: Professor Dr Vanete Thomaz Soccol, Departamento de Engenharia de Bioprocessos and Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná. Centro Politécnico, Curitiba, Paraná, Brasil. Email: vanetesoccol@gmail.com

This is an Accepted Manuscript for Parasitology. This version may be subject to change during the production process. DOI: 10.1017/S0031182020001997

Downloaded from <https://www.cambridge.org/core>. University of New England, on 27 Oct 2020 at 07:35:14, subject to the Cambridge Core terms of use, available at <https://www.cambridge.org/core/terms>. <https://doi.org/10.1017/S0031182020001997>