

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

RENATA ROCHA DA SILVA

**CONCENTRAÇÃO SOROLÓGICA DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ 2 EM
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* sp.**

ARACAJU

2023

RENATA ROCHA DA SILVA

**CONCENTRAÇÃO SOROLÓGICA DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ 2 EM
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Lima dos Santos
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Nunes de Santana Campos

ARACAJU

2023

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S586c Silva, Renata Rocha da
Concentração sorológica da metaloproteinase da matriz 2 em
cães naturalmente infectados por *Leishmania sp.* / Renata Rocha
da Silva ; orientadora Priscila Lima dos Santos; coorientadora
Roseane Nunes de Santana Campos. – Aracaju, 2023.
80 f. : il.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, 2023.

1. Ciências da Saúde. 2. Leishmaniose visceral. 3.
Metaloproteinase da matriz. 4. Inflamação. 5. ELISA. I. Santos,
Priscila Lima dos, orient. II. Campos, Roseane Nunes de Santana.
III. Título.

CDU 616.993.161

RENATA ROCHA DA SILVA

**CONCENTRAÇÃO SOROLÓGICA DA METALOPROTEINASE DA MATRIZ 2 EM
CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania* sp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Roseane Nunes de Santana Campos

1º Examinador: Prof^a. Dr^a. Roberta Fernandes Miranda
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof. Dr. Lucas Magalhães
Universidade Federal de Alagoas

Dedico este trabalho aos meus pais, Estelysses e
Carlos Alberto

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar a enfrentar todos os obstáculos que aparecem na minha vida, para que eu alcance meus sonhos;

Agradeço mais uma vez aos meus pais, Estelys e Carlos Alberto, por todo apoio, dedicação e compreensão durante toda essa jornada, amo vocês;

A toda minha família pelo apoio durante a minha vida; principalmente minhas avós Estelys Maria e Mara, aos meus tios e primos e as queridas Maria Auxiliadora, Gleyde e Sandra;

A Arthur pelo carinho, amor, força, respeito e suporte emocional durante todos esses anos;

A minha orientadora Priscila pela confiança depositada em mim. Obrigado por todo conhecimento que me concedeu e pela oportunidade;

A minha querida amiga e coorientadora, Roseane Nunes, pelas longas conversas, conselhos e ensinamento e principalmente por novamente me incentivar e me apoiar durante toda essa jornada, obrigada por tudo;

A todos os professores que tive durante o mestrado e a minha família Realeza: Anita, Carol, Fran, Iure, Júlio, Keise e Thailson, vocês foram importantes para o meu desenvolvimento profissional;

A todos os integrantes do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em especial para Fabrícia por toda contribuição e apoio;

Aos meus amigos e companheiros de caminhada, tão imprescindíveis na construção do que hoje eu sou. Contudo, preciso me dirigir particularmente ao meu sexteto: Amanda, Brenda, Gabi, Joyce e Natália, a amizade de vocês é muito especial;

Aos meus cães: Hulk e Glória Maria e meus gatos: Joaquim e Sarah Gabriela, por serem fontes inesgotáveis de inspiração e amor.

A todos que indiretamente ou diretamente participaram da minha qualificação profissional e crescimento pessoal.

Muito obrigada!

A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.

Albert Einstein

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania*; possui caráter zoonótico onde o cão doméstico é considerado o principal reservatório urbano no ciclo de transmissão da doença. Nestes animais, a LV é caracterizada como uma doença sistêmica crônica, podendo classificá-los em animais sintomáticos (quando apresenta sinal clínico) ou animais assintomáticos (com ausência de sinais clínicos). A infecção por *Leishmania* ativa macrófagos resultando na liberação de diversos agentes leishmanicidas. As metaloproteinases da matriz (MMP) são enzimas secretadas por processos inflamatórios e estromais das células em resposta a insultos exógenos e modulam os gradientes de quimiocinas e citocinas que degradam a matriz extracelular os qual, em excesso, pode causar severos danos aos tecidos. Em animais, estudos têm evidenciado elevação dessas enzimas em condições como neoplasias cerebrais, enteropatias crônicas e LV em cães. Uma vez que a MMP-2 é considerada como sinalizador da inflamação, o objetivo deste estudo é avaliar a concentração sérica da MMP-2 em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp. Foram utilizadas neste estudo amostras de soro (n=166) previamente coletadas de cães de diferentes raças sexo, idade superior a 6 meses dos municípios de Aracaju e Nossa Senhora da Glória, Sergipe. As amostras de soro foram divididas em três grupos experimentais com base no diagnóstico a partir do teste de triagem Imunocromatográfico DPP® e o teste sorológico confirmatório da leishmaniose por ensaio imunoenzimático (ELISA) e na presença de sinais clínicos de leishmaniose visceral: grupo sintomático, grupo assintomático e grupo controle composto por cães saudáveis não infectados. A concentração de MMP-2 total foi determinada utilizando o ELISA a partir de 80 amostras subdivididas em grupo caso n = 55 e grupo controle n = 25. Foi realizado análise descritiva e estatística dos dados, aplicado o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, os quais foram expressos com mediana e intervalo interquartil. Utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis, teste não-paramétrico para a comparação entre grupos: sororeagentes e não reagentes e assintomático, sintomático e controle. Teste exato de Fisher foi empregado para averiguar a correlação entre os sinais clínicos e características dos cães sororeagentes e concentrações séricas da MMP-2. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 9.0. Todos os cães expressaram níveis séricos de MMP-2, no entanto os cães sororeagentes sintomáticos e assintomáticos expressaram aumento significativo dos níveis séricos quando comparado ao grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa com relação as concentrações de MMP-2 entre os grupos sintomáticos e assintomáticos sororeagentes e em animais com diferentes manifestações clínicas. Alguns estudos sugerem que a MMP-2 seja liberada na primeira fase da infecção com uma produção equilibrada de citocinas Th1 e Th2. Com isso, estudos envolvendo MMPs na leishmaniose visceral canina podem servir de base para o melhor entendimento dos mecanismos de persistência e disseminação da *Leishmania* e servir como um possível biomarcador de diagnóstico além do estadiamento e acompanhamento da evolução no tratamento da doença.

Descritores: ELISA, Inflamação. *Leishmania*. Metaloproteinase da matriz.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease caused by the protozoan *Leishmania*; it has a zoonotic character where the domestic dog is considered the main urban reservoir in the disease transmission cycle. In these animals, VL is characterized as a chronic systemic disease, and can classify them as symptomatic animals (when presenting clinical signs) or asymptomatic animals (with no clinical signs). *Leishmania* infection activates macrophages resulting in the release of several leishmanicide agents. Matrix metalloproteinases (MMP) are enzymes secreted by inflammatory and stromal processes of cells in response to exogenous insults and modulate the gradients of chemokines and cytokines that degrade the extracellular matrix which, in excess, can cause severe tissue damage. In animals, studies have shown an increase in these enzymes in conditions such as brain neoplasms, chronic enteropathies and VL in dogs. Since MMP-2 is considered as a flag of inflammation, the aim of this study is to evaluate the serum concentration of MMP-2 in dogs naturally infected with *Leishmania* sp. We used serum samples (n=166) previously collected from dogs of different sex breeds, aged over 6 months from the municipalities of Aracaju and Nossa Senhora da Glória, Sergipe. Serum samples were divided into three experimental groups based on diagnosis based on the Immunochromatographic DPP screening test® and the confirmatory serological test of leishmaniasis by immunoenzymatic assay (ELISA) and in the presence of clinical signs of visceral leishmaniasis: symptomatic group, asymptomatic group and control group composed of healthy uninfected dogs. The total MMP-2 concentration was determined using ELISA from 80 samples subdivided into case group n = 55 and control group n = 25. Descriptive and statistical analysis of the data was performed, the Kolmogorov-Smirnov normality test was applied, which were expressed with median and interquartile interval. The Kruskal-Wallis Test was used, a non-parametric test for the comparison between groups: seroreagent and non reagent and asymptomatic, symptomatic and control. Fisher's exact test was used to verify the correlation between clinical signs and characteristics of seroreagent dogs and serum concentrations of MMP-2. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were performed in the GraphPad Prism 9.0 software. All dogs expressed serum levels of MMP-2, however the seroreagent dogs expressed a significant increase in serum levels when compared to the control group. There was no statistically significant difference in relation to MMP-2 concentrations between symptomatic and asymptomatic seroreagent groups and in animals with different clinical manifestations. Several studies suggest that MMP-2 is released in the first phase of infection with a balanced production of Th1 and Th2 cytokines. Therefore, studies involving MMPs in canine visceral leishmaniasis can serve as a basis for a better understanding of the mechanisms of persistence and dissemination of *Leishmania* and serve as a possible diagnostic biomarker beyond staging and follow-up of the evolution in the treatment of the disease.

Descriptores: ELISA. Inflammation. *Leishmania infantum*. Matrix metalloproteinase.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Frequência relativa das características dos animais avaliados	39
Tabela 2 Frequência relativa dos sinais clínicos apresentados pelos animais sintomáticos para LCan	39
Tabela 3 Análise descritiva relacionada aos sinais clínicos de cães com sororeagentes para LCan com concentrações séricas de MMP-2 acima de 3,61 ng/mL.....	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Países endêmicos para a leishmaniose visceral em 2020.....	17
Figura 2 Manifestações clínicas comumente encontradas na leishmaniose visceral canina ...	20
Figura 3 Classificação da leishmaniose visceral nas Américas, segundo o cenário epidemiológico e os países correspondentes a cada cenário	21
Figura 4 Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina	24
Figura 5 Resposta imune na LCan.....	26
Figura 6 Desenho experimental	35
Figura 7 Concentrações da MMP-2 no soro de cães não reagentes e sororeagentes através do ELISA	40
Figura 8 Concentrações da MMP-2 em relação aos grupos sintomático e assintomático no soro de cães com Lcan através do ELISA	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC – Células apresentadoras de antígeno

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IIQ – Intervalo interquantil

LC – Leishmaniose cutânea

LCan – Leishmaniose visceral canina

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LMC – Leishmaniose mucocutânea

LPS – Lipopolissacarídeos

LT – Leishmaniose tegumentar

LV – Leishmaniose visceral

MEC – Matriz extracelular

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MMP – Metaloproteinase da matriz

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON – Óxido nítrico

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões

PVCLV – Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

TH – T-helper

TIMP – Inibidor tecidual de metaloproteinase

TNF – Fator de necrose tumoral

TLRs – Receptores Toll-like

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Leishmania e leishmanioses	17
2.2 Medidas de vigilância e controle	20
2.3 Imunopatogênese da LVC	22
2.4 Metaloproteinases de matriz	26
2.5 Relação entre MMPs e doenças infecciosas	28
3 OBJETIVO	32
3.1 Objetivo Geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Delineamento experimental	34
4.2 Aspectos éticos	35
4.3 Análise das concentrações de MMP-2	35
4.4 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
APÊNDICE	62

INTRODUÇÃO



1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma das principais doenças tropicais negligenciadas do mundo (HOTEZ et al., 2008). As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por um protozoário com mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, que mantêm seu ciclo de vida através da transmissão entre um inseto vetor, especialmente o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, e um hospedeiro mamífero (DANTAS-TORRES et al., 2012; KAYE; SCOTT, 2011; REIS et al., 2017). A *Leishmania* tem um ciclo de vida dimórfico: promastigotas de estágio extracelular se multiplicam e se desenvolvem dentro do trato digestivo do vetor, e amastigotas intracelulares residem e se multiplicam dentro dos vacúolos fagolisossomais de fagócitos dos mamíferos (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). A doença é caracterizada por sua grande diversidade e complexidade (CALDERON-ANYOSA et al., 2018), como uma infecção multissistêmica que apresenta manifestações clínicas divergentes que dependem não apenas da resposta imunológica do hospedeiro, mas também, em grande parte, da espécie do parasita (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

As leishmanias são inoculadas na sua forma infectante (promastigota metacíclicas), durante o repasto sanguíneo na pele do hospedeiro pelo flebotomíneo. Uma vez ultrapassada a barreira cutânea, as leishmanias são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocítico, principalmente os macrófagos, transformando-se em formas amastigotas, as quais multiplicam-se até a lise celular para infectar novas células (ALEXANDER; BRYSON, 2005; ALEXANDER; RUSSELL, 1992; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; MURASE et al., 2018).

Vários fatores de risco associados à leishmaniose visceral (LV) já foram descritos. Isso inclui a vulnerabilidade social e a expansão desordenada das cidades, principalmente em áreas periurbanas, o que influencia diretamente na adaptação e migração do vetor (ABRANTES et al., 2018; CAMPOS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013). Fatores climáticos como temperatura, umidade relativa do ar e a precipitação também acabam influenciando na variação da população dos flebotomínios em cada região (ABRANTES et al., 2018; CAMPOS et al., 2017; COSTA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2020; SILVA et al., 2019).

A leishmaniose visceral canina (Lcan) manifesta-se como um amplo espectro clínico que varia de infecção assintomática a doença grave, que culmina principalmente em óbito. O cão doméstico (*Canis familiaris*) é apontado como o principal reservatório de LV, sendo responsável pela manutenção da *Leishmania* em áreas urbanas. Esses animais, quando

infectados, são considerados fonte de infecção para o vetor (CAMPOS et al., 2017; COSTA et al., 2018; NUNES et al., 2008). Os cães sororeagentes se dividem em dois grupos: cães assintomáticos e cães sintomáticos. Dependendo da imunocompetência do hospedeiro, os sinais clínicos tornam-se evidentes dentro de um período que varia de um mês a vários anos e a sua evolução pode evoluir para o óbito (BRASIL, 2014; JACINTHO, 2012).

A apresentação clínica e evolução da leishmaniose estão associadas ao desenvolvimento da imunidade celular (Th1) e da imunidade humoral (Th2) do hospedeiro (BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002; SCOTT et al., 1989). A resistência da doença está associada com a ativação de citocinas Th1 e com a produção de $\text{INF-}\gamma$, IL-2 e $\text{TNF-}\alpha$. O principal mecanismo efetor é a ativação de macrófagos por $\text{INF-}\gamma$ e $\text{TNF-}\alpha$, para destruir amastigotas intracelulares, por meio da síntese de óxido nítrico (BARBIÉRI, 2006; JACINTHO et al., 2018). Em contrapartida, os animais sintomáticos expressam maior células Th2, as quais mediam a suscetibilidade à doença liberando citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e $\text{TGF-}\beta$, que inibe a atividade microbicida de macrófagos infectados e são mais propensos à apoptose por possuírem um fraco processo oxidativo, favorecendo o crescimento do parasita intracelular e progressão da doença (ALMEIDA et al., 2013; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; DUARTE et al., 2016; SILVA, 2017a).

As metaloproteinasas de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas zinco dependentes, as quais desempenham um papel importante nos processos fisiológicos do organismo como o remodelamento da matriz extracelular (MEC) até a imunomodulação (CAWSTON; WILSON, 2006; JACINTHO et al., 2018; SANTOS, 2020; STERNLICHT; WERB, 2001). Elas se originam de principalmente de monócitos, macrófagos, neutrófilos, queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais e são secretadas na forma de zimogênios latentes que precisam sofrer ativação proteolítica para se tornarem enzimas ativas (WOESSNER, 1991).

Estas enzimas, em particular a MMP-2 e a MMP-9 estão envolvidas em diversas infecções parasitárias (AOKI, 2014; BRUSCHI; PINTO, 2013; OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS, 2020). Os estudos existentes que relacionam as MMPs à LCan enfatizam o papel da gelatinase 2 e a sua importância na migração celular e possível relação com a reação inflamatória, pelo fato de degradarem colágeno do tipo IV e recrutarem mais células inflamatórias para o local (JACINTHO et al., 2018; MELO et al., 2011; SANTOS, 2020).

Na LCan, Santos (2020) demonstrou que os cães com a doença apresentaram aumento na expressão das MMPs em tecido hepático, com maior expressão de MMP-2 em animais

sintomáticos. Tendo em vista a relevância da situação apresentada, além de poucos estudos conclusivos a respeito da expressão das MMPs na leishmaniose canina, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as concentrações séricas da MMP-2 na LCan, e associá-las com os sinais clínicos dos animais.

REVISÃO DE LITERATURA

maiores níveis de incidência são o Norte e Nordeste do país, especialmente a região Nordeste, onde se concentram mais de 47,6% dos casos humanos da doença (ANDRADE et al., 2007; CEARÁ, 2019).

A presença de cães infectados mantém a transmissão da *Leishmania* entre as espécies. A busca ativa de cães infectados está diretamente relacionada a áreas com alta incidência de casos humanos. No Nordeste, a cidade de São Luís - MA apresentou uma soroprevalência de 45.8% para LCan entre 2007 e 2016, Já Muritiba, interior da Bahia, apresentou uma soroprevalência de 15.7% em 2019. Um estudo com 6 municípios de Pernambuco apresentou uma prevalência de 42.8% em 2017 e 29.3% em oito municípios da Paraíba, e 12,6% de incidência em Aracaju – SE em 2014 (BERNARDINO et al., 2020; CAMPOS et al., 2017; EVARISTO et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2021; VARJÃO et al., 2021).

A LV é transmitida por vetores através do repasto sanguíneo, especialmente o flebotomíneo *Lutzomyia* (COSTA, 2011; HANDMAN; ELISO; FOOTE, 2005; PEREIRA et al., 2017; SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012). Estes insetos estão adaptados a diversos ambientes na fase adulta, mas na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética, no entanto somente as fêmeas alimentam-se de sangue do hospedeiro vertebrado para o desenvolvimento dos ovos (ABRANTES et al., 2018; BRASIL, 2014; OLIVEIRA et al., 2013).

A enfermidade inicialmente tinha um caráter eminentemente rural, considerada endêmica principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (DANTAS-TORRES et al., 2012). Entretanto, nas últimas décadas, a doença vem se urbanizando à medida que o vetor tem se adaptado melhor a esses ambientes devido ao desequilíbrio ecológico, refletindo assim em um aumento da incidência de casos (BARBIÉRI, 2006; FARIA; ANDRADE, 2012; RIBEIRO et al., 2019). O flebotomíneo adaptou-se ao peridomicílio, principalmente na presença de animais domésticos, como os cães, o qual tem assumido um importante papel no ciclo de transmissão da doença como reservatório (ASHFORD et al., 1998; CAMPOS et al., 2017; COSTA, 2011; DANTAS-TORRES et al., 2012). Estudos apontam que as infecções em humanos e cães são interdependentes. Os cães são altamente susceptíveis à infecção, além de possuir uma estreita relação com o homem, tanto em áreas rurais como urbanas (CAMPOS et al., 2017; FELIPE et al., 2014; NUNES et al., 2008). Entretanto, têm sido identificados como outros reservatórios, os animais silvestres como a raposa do mato e os gambás, equídeos, roedores e os gatos (BARBIÉRI, 2006; SCHIMMING; PINTO E SILVA, 2012; SILVA et al., 2010).

O histórico genético do hospedeiro na LCan influencia profundamente a resistência ou

suscetibilidade da enfermidade; estudos demonstram que a suscetibilidade à doença está associada a polimorfismos do gene NRAMP1 (resistência natural associada à proteína macrofágica) canino e alelos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II (ALTET et al., 2002; BARBIÉRI, 2006; QUINNELL; DYE, 1994), e, apesar da prevalência da infecção não diferir entre cães de diversas raças com estilo de vida semelhante, existem raças (Boxer, Pastor Alemão, Rottweiler) mostrando uma clara predisposição para o desenvolvimento da doença (LEONTIDES et al., 2002; MIRANDA et al., 2008; SARIDOMICHELAKIS, 2009) e outras como o Ibizian hound, que mesmo inseridos em um foco endêmico de LCan, raramente desenvolve a forma clínica da doença (BANETH et al., 2008; SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

Alguns cães que vivem em áreas endêmicas podem ter contato com o parasita e não desenvolver sinais clínicos da doença ou podem permanecer assintomáticos por longos períodos, já outros cães podem apresentar múltiplas manifestações clínicas (BRASIL, 2014; CONTRERAS et al., 2019; REIS et al., 2009; SARIDOMICHELAKIS, 2009). Estes sinais clínicos ocorrem por causa dos mecanismos patogênicos relacionados ao parasita e a resposta imunológica particular produzida pelo hospedeiro (OLIVA et al., 2010; PALTRINIERI et al., 2010; SANTOS, 2020).

Os cães infectados eram classificados em três grupos diferentes pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2014): assintomático, oligossintomático ou sintomático. No entanto, essa classificação foi alterada pois a manifestação clínica é variável; atualmente os animais são classificados em assintomáticos e sintomáticos (ALEXANDRE-PIRES et al., 2010). Cães sintomáticos podem apresentar um ou mais sinais clínicos típicos da Lcan, como apatia, anorexia, lesões oftálmicas como cegueira e ceratoconjuntivite, lesões dermatológicas como úlceras, dermatite furfurácea, alopecia geral, onicogribose, progredindo para morbidade geral e morte (REIS et al., 2009) (Figura 2). O achado histopatológico mais comum é uma reação inflamatória granulomatosa associada à presença de amastigotas nos tecidos (BANETH et al., 2008). Como as manifestações clínicas são semelhantes às de outras doenças infectocontagiosas, o diagnóstico deve ser realizado através da associação de dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (DE FREITAS et al., 2006; SILVA; WINCK, 2018).



Figura 2. Manifestações clínicas comumente encontradas na leishmaniose visceral canina. (A) Perda de peso e massa muscular. (B) Onicogribose. (C) Dermatite esfoliativa não purigrinosa. (D) Necrose em borda de pavilhão auricular. Fonte: Arquivo pessoal.

2.2 Medidas de vigilância e controle

O aumento da mobilidade populacional expandiu áreas de transmissão de algumas doenças endêmicas e fez com que doenças anteriormente rurais aparecessem em áreas urbanas, a exemplo da leishmaniose visceral (ABRANTES et al., 2018; STODDARD et al., 2009; WERNECK, 2008). O processo de tomada de decisão de vigilância permite a identificação de estratos de risco, monitoramento de tendências temporais e dispersão da transmissão da *Leishmania*. A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) classificou em 2019, os países da América do Sul em quatro cenários epidemiológicos diferentes; países com transmissão esporádica, países com transmissão controlada, países com transmissão em expansão e países com transmissão de LCan sem casos de LV em humanos (Figura 3). Essa classificação foi desenvolvida a fim de compreender a magnitude e o risco de ocorrência da doença, além de priorizar e orientar a vigilância, prevenção e ações de controle em países com maior risco (OPAS, 2020).

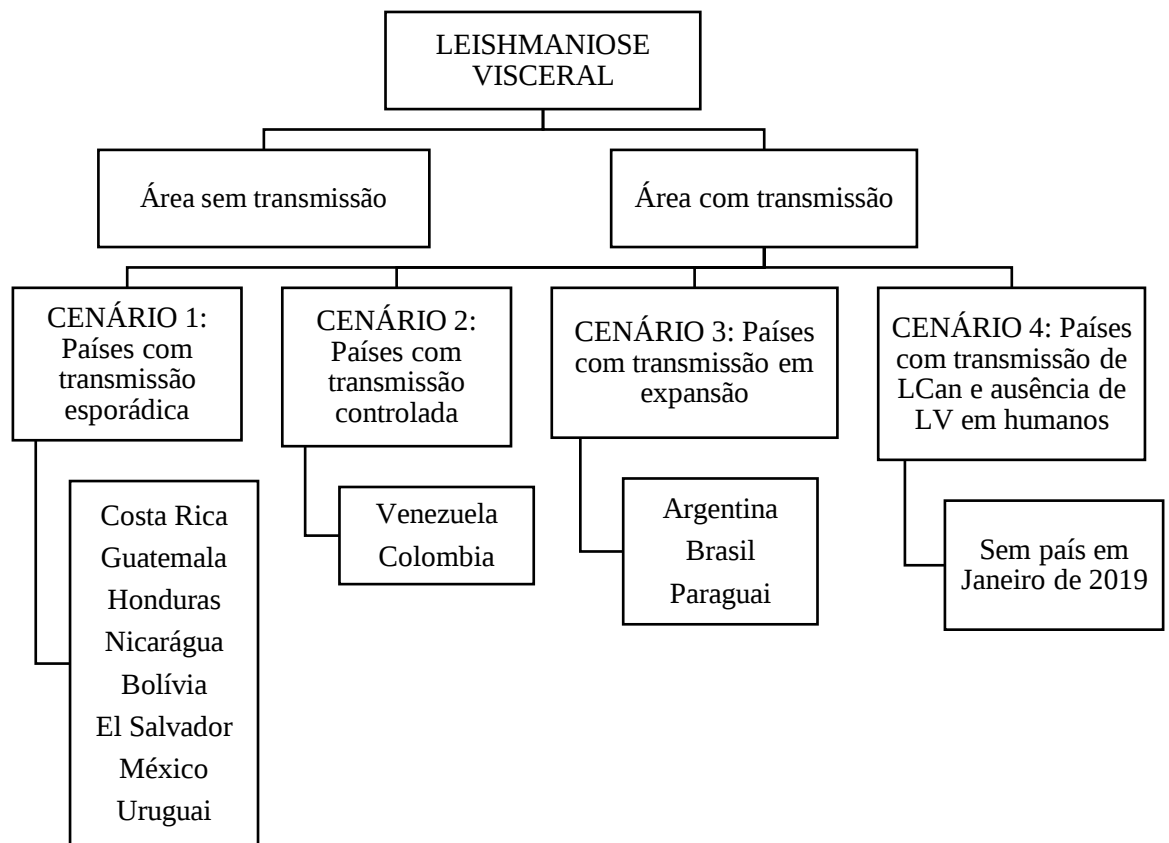


Figura 3. Classificação da leishmaniose visceral nas Américas, segundo o cenário epidemiológico e os países correspondentes a cada cenário. Fonte: OPAS/OMS, 2020.

No Brasil, o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PVCLV) do Ministério da Saúde, tem como objetivos reduzir as taxas de letalidade e grau de morbidade e reduzir os riscos de transmissão mediante controle da população de reservatórios e do agente transmissor (BRASIL, 2014). Para reduzir a força de transmissão recomenda-se o controle vetorial e inquéritos soropidemiológicos caninos (amostrais ou censitários) com posterior eutanásia dos cães sororeagentes (BRASIL, 2014; WERNECK, 2014). A realização de inquéritos soropidemiológicos caninos, tem papel fundamental na detecção de focos silenciosos da LV e na delimitação de regiões ou setores de maior prevalência, onde a execução das medidas de controle se faz necessária (BEVILACQUA; ALVES, 2004; CARNEIRO, 2014).

Contudo, Werneck (2016) aponta necessidade de mudanças no PVCLV e levanta algumas condições como: primazia da pesquisa científica de qualidade para prover evidências sólidas que guiem a incorporação de novas ferramentas de controle; fortalecimento de abordagens educativas que fomentem a participação ativa da população nas ações de controle

e investimento em saneamento ambiental.

Diversas estratégias têm sido propostas para prevenir e controlar a LCan, tanto em nível individual quanto populacional. A nível individual, tem sido aplicada algumas medidas preventivas em cães como a aplicação de coleiras impregnadas com inseticida ou produtos spot-on a base de deltametrina, permetrina, flumetrina ou fipronil, além da vacinação ou imunomodulação (LUZ, 2016; SILVA, 2017b; WERNECK, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010), enfatiza a importância dos cães domésticos como reservatórios do parasita nas Américas e a complexidade do controle deste reservatório como parte do controle da LV. Apesar da complexidade, eles enfatizam que por estar relacionado à saúde humana, a eutanásia canina é aceita como método de controle, eliminando todos os sintomáticos ou cães sororeagentes em cenários epidemiológicos onde estes são importantes para o ciclo de transmissão. Evidências sugerem que as infecções em humanos e cães são interdependentes; onde há a transmissão de LV em humanos, também ocorre entre cães (CAMPOS et al., 2017; COSTA, 2011; COSTA et al., 2018; GUAN, 1991; MARGONARI et al., 2006), no entanto nem o seu papel no ciclo de transmissão ao homem, nem os benefícios da eutanásia foram consensuais na literatura (COSTA, 2011; COSTA; VIEIRA, 2001; MARQUES et al., 2020).

A eutanásia em massa de cães sororeagentes no Brasil não demonstrou eficácia nos programas de controle devido a problemas operacionais, sensibilidade diagnóstica, rejeição pela população, substituição de cães em cenários que mantenham o nível de exposição e a necessidade de manutenção da área sob vigilância contínua e com controle sistemático (COSTA, 2011; MARQUES et al., 2020; NUNES et al., 2008). No estudo desenvolvido por Abrantes et al. (2018) foi demonstrado a associação entre a ocorrência da infecção por *L. infantum* em humanos e o histórico de LCan no domicílio, sugerindo a eutanásia de cães infectados como uma estratégia ineficaz, em razão da alta taxa de substituição de cães eliminados por outros cães suscetíveis (ROMERO; BOELAERT, 2010).

2.3 Imunopatogênese da LCan

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear (KAYE; SCOTT, 2011; SANTOS, 2020), especialmente os macrófagos que são consideradas as principais células hospedeiras do parasita

(DE VASCONCELOS et al., 2019; JACINTHO et al., 2018; MELO et al., 2013; RESENDE et al., 2020; RODRÍGUEZ et al., 1996; SARIDOMICHELAKIS, 2009; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007). As formas flageladas são chamadas de promastigotas e estão presentes no tubo digestivo do inseto vetor, já as amastigotas não apresentam um flagelo exteriorizado e vivem como parasitas intracelulares e, embora o parasitismo seja verificado em todos os fagócitos, eles sobrevivem apenas em macrófagos e monócitos imaturos de mamíferos (BARBIÉRI, 2006; KAYE; SCOTT, 2011; ROSS, 1903; SANTOS, 2020; STUART et al., 2008).

No trato digestivo anterior do flebotomíneo ocorre o rompimento dos macrófagos liberando as amastigotas, estas se reproduzem por divisão binária e diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; PIRES et al., 2012). Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectada inocula na pele do hospedeiro as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* juntamente com a saliva a qual inibe seletivamente a morte de parasitas por macrófagos e produção de óxido nítrico (ALEXANDER; BRYSON, 2005; ALEXANDER; RUSSELL, 1992; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; PINELLI et al., 1995; STUART et al., 2008). Estas promastigotas metacíclicas, ou forma infectivas de *Leishmania* ligam-se a algumas das moléculas de superfície como os receptores de complemento 1 e 3 do macrófago antes de serem internalizados. Após se ligarem, invadem macrófagos por endocitose mediada por receptor, onde se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária, eventualmente levando à lise dos macrófagos (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). As amastigotas liberadas são absorvidas por macrófagos adicionais e assim o ciclo continua. No final, todos os órgãos que contêm macrófagos e fagócitos são infectados, principalmente o baço, fígado e medula óssea. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, o flebótomo ingere células infectadas com amastigotas do animal infectado (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; STUART et al., 2008) (Figura 4).

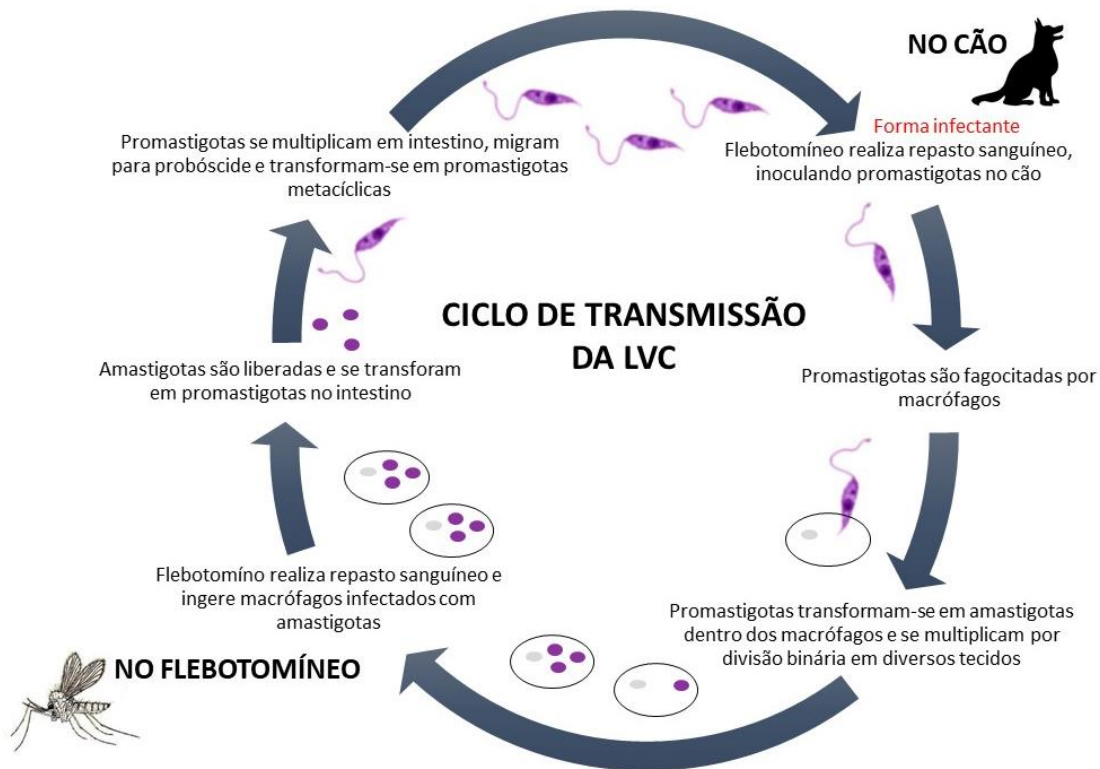


Figura 4. Ciclo de transmissão da leishmaniose visceral canina. Fonte: Arquivo pessoal.

Em cães suscetíveis ou sintomáticos, os parasitas podem se disseminar em horas, enquanto em animais resistentes ou assintomáticos eles podem permanecer localizados na pele e nos linfonodos regionais (DE QUEIROZ et al., 2011; LAURENTI et al., 2013; SANTOS-GOMES et al., 2002; SARIDOMICHELAKIS, 2009).

A transmissão vetorial pode ocorrer independentemente do parasitismo cutâneo e sanguíneo dos cães e tanto os animais sintomáticos como os assintomáticos são considerados infectantes para flebotomíneos (BATISTA et al., 2016; GUARGA et al., 2000; LAURENTI et al., 2013). Um estudo de Batista et al. (2016), demonstrou que os cães assintomáticos foram preferencialmente picados pelo *L. longipalpis*, sugerindo que cães assintomáticos desempenham um papel fundamental na manutenção do ciclo da *Leishmania* e na disseminação do parasita em áreas endêmicas de LV.

O estabelecimento de uma infecção em um hospedeiro envolve diversos mecanismos, sendo um dos mais relevantes o modo de interação do microrganismo com o sistema imune e a sua resposta contra o agente invasor (CAMPOS, 2016). A apresentação clínica e evolução da leishmaniose é consequência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro, sendo sua resistência ou suscetibilidade associadas ao desenvolvimento de respostas T helper 1 (imunidade celular) e T helper 2 (imunidade humoral) do hospedeiro, respectivamente (BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; PINELLI et al., 1994; SANTOS-

GOMES et al., 2002; SCOTT et al., 1989).

A picada do flebótomo resulta no ferimento da microvasculatura que cria uma lesão hemorrágica. Após a entrada da *Leishmania*, o sistema imune inato exerce duas respostas para combater o patógeno (BANETH et al., 2008; ZACHARY; MCGAVIN, 2013). A primeira defesa do organismo do hospedeiro é o confinamento do parasita com o recrutamento das células inflamatórias no microambiente. As principais células são os neutrófilos, mastócitos, Natural Killer (NK) e monócitos. E, também, as células apresentadoras de antígeno (APCs) como células dendríticas e macrófagos (OLIVEIRA et al., 2014; POLARI; MACEDO; MACHADO; et al., 2019).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o local de infecção e quando fagocitam as promastigotas da *Leishmania*, secretam quimiocinas como IL-8 e MIP-1 β , moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção. Estes neutrófilos são levados a apoptose e os macrófagos recrutados fagocitam os corpos apoptóticos desencadeando a sinalização de vias anti-inflamatórias (BACELLAR; CARVALHO, 2005; DE MORAIS et al., 2015). Ao morrer, os neutrófilos podem liberar armadilhas neutrofílicas extracelulares (NET), compostas por um arcabouço de DNA embebido por peptídeos e proteínas antimicrobianas e outras moléculas, como histonas, conteúdo dos grânulos primários, lactoferrina, gelatinase, catelicidinas e α -defensinas. As NET prendem o parasita e podem ser microbicida ((ZACHARY; MCGAVIN, 2013).

A *Leishmania* é um parasita intracelular em hospedeiros vertebrados e dessa forma, a imunidade mediada por células T efectoras é reconhecida como um dos principais mecanismos de defesa contra o protozoário. Os linfócitos T desempenham papel importante na geração de respostas específicas e de memória. Estas células apresentam duas subpopulações com funções distintas e com produção de citocinas a depender da resposta imune (ALEXANDER; BRYSON, 2005; CAMPOS, 2016; KUMAR; NYLÉN, 2012; MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011). A produção de IL-12 por APCs, macrófagos e células dendríticas, ativa as células natural killer (NK), CD8⁺ e impulsiona a diferenciação e proliferação das células T CD4⁺ em células do tipo Th1, e estimulam o aumento de secreção de IFN- γ por estas células (ALEXANDER; BRYSON, 2005; DUARTE et al., 2016; SILVA, 2017b). Já os linfócitos T regulatórios (Tregs) atuam na produção de citocinas como IL-10 e TGF- β , destacando o seu papel durante o perfil de susceptibilidade a infecção (Th2) (KHADEM; UZONNA, 2014; SILVA, 2017b) (Figura 5).

Estudos demonstram que animais assintomáticos expressam uma maior atividade da resposta imune celular com células Th1, e estão associadas à resistência do hospedeiro contra

a *Leishmania* através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, IFN- γ , TNF- α e IL-2. Estas citocinas atuam na ativação de macrófagos por meio da expressão da enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida (iNOS); mecanismo para eliminar o parasita *Leishmania* mediado pela produção de óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (ALMEIDA et al., 2013; BACELLAR; CARVALHO, 2005; MIRZAEI et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2021; SILVA, 2017a; WOODMAN et al., 1998) (Figura 5).

Em contrapartida, os animais sintomáticos apresentam uma resposta predominantemente humoral e expressam maior células Th2, as quais mediam a suscetibilidade à doença liberando citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e TGF- β , que inibe a atividade microbicida de macrófagos infectados e são mais propensos à apoptose por possuírem um fraco processo oxidativo, favorecendo o crescimento do parasita intracelular e progressão da doença (ALMEIDA et al., 2013; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; DUARTE et al., 2016; SILVA, 2017b) (Figura 5). Para sobreviver, a *Leishmania* precisa alterar o sistema do hospedeiro para suprimir o sistema imunológico ou promover reações pró-parasitárias do hospedeiro (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; DE VASCONCELOS et al., 2019; MIRZAEI et al., 2021; PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002; TURCHETTI et al., 2015).

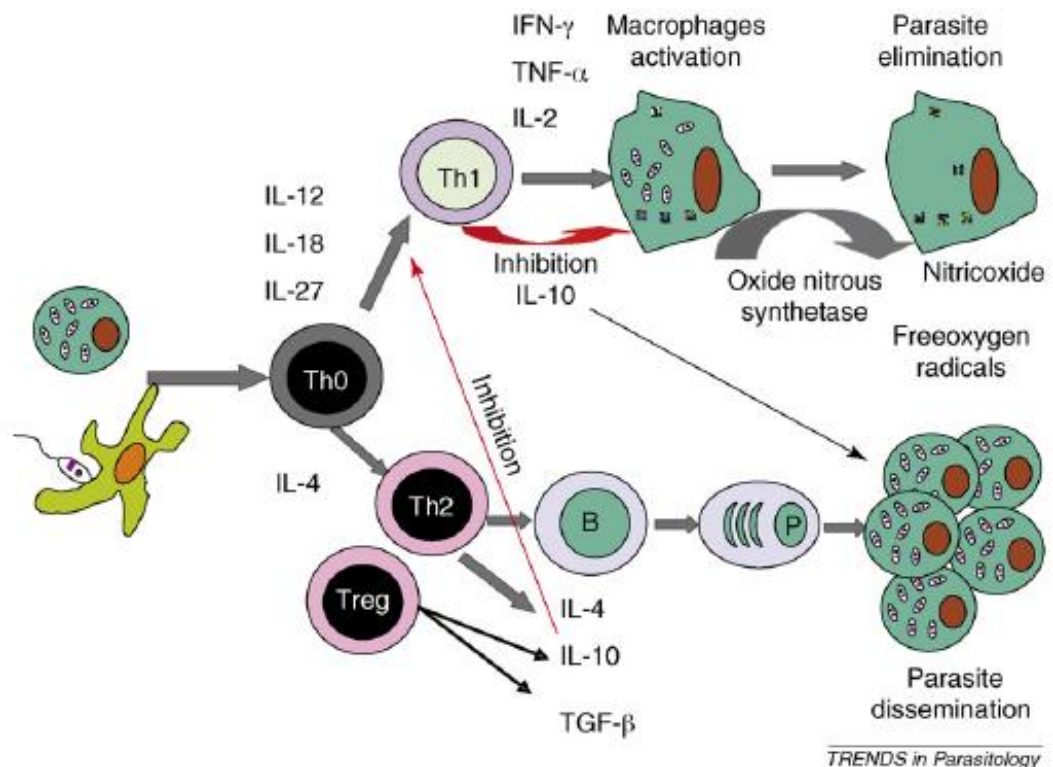


Figura 5. Resposta imune na LCan. Fonte: Baneth et al., 2008.

2.4 Metaloproteínases de matriz

A matriz extracelular (MEC) é um complexo estrutural que cerca as células encontradas nos tecidos, composta principalmente por proteínas estruturais, proteínas especializadas, proteínas da matriz e moléculas de superfícies de células (CAWSTON; WILSON, 2006; JACINTHO, 2012). A sua quebra é essencial para o desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelamento dos tecidos (NAGASE, 1996; NAGASE; WOESSNER, 1999).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de enzimas proteolíticas zinco dependentes, constituídas de mais de 23 tipos diferentes de endopeptidases (CAWSTON; WILSON, 2006; JACINTHO et al., 2018; SANTOS, 2020; STERNLICHT; WERB, 2001). Estas enzimas desempenham um papel importante nos processos fisiológicos; inicialmente eram consideradas enzimas puramente degradantes da MEC, no entanto, suas funções têm expandido além remodelamento da MEC para vários mecanismos de imunomodulação; por exemplo, as MMPs podem clivar citocinas para aumentar ou inibir sua atividade funcional (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005).

As MMPs são enzimas zimogênicas, ou seja, são sintetizadas em uma forma inativa, conhecidas como pró-enzimas e que sofrem clivagem proteolítica para ativação, liberando um resíduo de cisteína no domínio pró-peptídeo do zinco catalítico, conhecido como switch de cisteína (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990). Após síntese, essas enzimas podem ser ativadas no meio intracelular ou extracelular em pH neutro (CAWSTON; WILSON, 2006; SANTOS, 2020; VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990).

Elas são caracterizadas tendo como base a sua estrutura primária e sua especificidade ao seu substrato, como estromelisinases, collagenases, gelatinases, matrilisinas, MMPs de membrana entre outras (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; JACINTHO, 2012). São produzidas por diferentes tipos de células, incluindo os macrófagos, linfócitos e as células endoteliais (NAGASE; WOESSNER, 1999; OLIVEIRA et al., 2013) e secretadas por processos inflamatórios e estromais das células em resposta a insultos exógenos e citocinas inflamatórias, como o TNF- α (BRENNER et al., 1989; ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005).

A maioria das MMPs, também são induzidas em vários estados de doença (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; VAN DEN STEEN et al., 2006). São rigidamente reguladas na transcrição e níveis pós-transcricionais por hormônios, fatores de crescimento, citocinas incluindo IFN-, IL-4 e IL-10 (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; MERTZ et al., 1994; RIVERA-MARRERO et al., 2000), interações célula-célula e célula-

matriz e são controlados no nível da proteína por meio de seus ativadores, seus inibidores e sua localização na superfície celular (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

A atividade da enzima é regulada principalmente pela secreção de inibidores específicos, os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), que se ligam de forma não covalente ao domínio catalítico das formas latente e ativa das MMPs e cuja expressão também é regulada por uma rede de moléculas de sinalização (CAWSTON; WILSON, 2006; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012). Este equilíbrio entre ativação e inibição é essencial para evitar atividades descontroladas que podem causar uma série de condições patológicas (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

Geralmente todos os TIMPs são capazes de inibir todos as MMPs; no entanto, a eficácia da inibição da MMP varia com cada TIMP. Por exemplo, TIMP1 é um forte inibidor de muitas MMPs, exceto algumas do tipo de membrana (MT)-MMPs, incluindo MMP14, -15, -16, -19 e -24. Assim como os TIMP1 e -3, os quais estão associados a inibição da forma latente da MMP-9, enquanto a TIMP2 -3 e -4 são capazes de interação com a forma latente da MMP-2 (ARPINO; BROCK; GILL, 2015).

2.5 Relação entre MMPs e doenças infecciosas

As metaloproteinases desempenham um papel importante nas doenças infecciosas. Quando o sistema imunológico do hospedeiro é desafiado por um patógeno, o sistema imune inato é imediatamente ativado e desencadeado por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), sendo reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores Toll-like (TLRs). A resposta imune do hospedeiro de primeira linha à infecção é a inflamação local, recruta leucócitos para o local da infecção para erradicar o patógeno e então diminuir a resposta para permitir a resolução da inflamação juntamente com a libertação de uma grande quantidade de moléculas de defesa a exemplo as defensinas, citocinas e MMPs (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012).

As MMPs são peças-chave nesses processos, atuando tanto por degradação dos componentes da MEC quanto por modulação dos gradientes de quimiocinas e citocinas que conduzem o recrutamento de células inflamatórias e, reciprocamente, fornecendo ciclos de feedback negativo que amortecem a inflamação. Finalmente, quando a infecção é eliminada, as

MMPs iniciam os processos de reparo do tecido (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; KORPOS; WU; SOROKIN, 2009; PARKS; WILSON; LÓPEZ-BOADO, 2004).

No entanto, a atividade aumentada e desregulada dessas enzimas contribui para a inflamação crônica e aumento da destruição do tecido e pode, assim, ajudar os patógenos a se disseminarem por todo o corpo e invadirem diversos tecidos. O excesso de atividade da MMP resulta tanto do aumento da sua secreção quanto da diminuição da secreção de TIMP, levando a dano tecidual grave, disseminação microbiana e imunopatologia no hospedeiro que pode causar danos ao tecido e levar à morte (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; HU et al., 2007). Os próprios patógenos também podem produzir metaloproteases que são necessárias para a virulência, a exemplo da gp63 pela *Leishmania*, a qual apresenta semelhanças estruturais e bioquímicas das MMPs (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; MCGWIRE; CHANG; ENGMAN, 2003)

Os níveis de MMP-9 no líquido cefalorraquidiano (LCR) estão relacionados a doenças neurológicas associadas ao vírus da imunodeficiência humana e demência em humanos (CONANT et al., 1999; ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; SPORER et al., 1998). Na infecção aguda por hepatite B, o recrutamento de linfócitos também está associado à expressão de MMP-8 e -9 (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005). Além de outras doenças envolvendo a quebra da MEC e consequente aumento da permeabilidade vascular, como infecção pela *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis*, até a sepse, podendo ser utilizados como preditores de gravidade, uma vez que estão associados a mortalidade (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; RIVERA-MARRERO et al., 2000; WROBLEWSKI et al., 2003). Além disso, Campos et al. (2014) observaram que pacientes humanos com leishmaniose cutânea apresentavam maior expressão de MMP-9 por macrófagos e que havia uma relação positiva entre a expressão dessa MMP e a expressão da citocina TNF- α .

Em animais, estudos têm evidenciado elevação dessas enzimas no sistema nervoso central em condições como neoplasias cerebrais (TURBA et al., 2006), enteropatias crônicas (LJUNGVALL et al., 2011), cinomose (AOKI, 2014) e leishmaniose visceral canina, os quais demonstram que as lesões inflamatórias multissistêmicas apresentadas podem ser resultado do aumento da expressão de MMPs (JACINTHO et al., 2018; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011; SANTOS, 2020). Em cães naturalmente infectados por *L. infantum* Santos(2020) demonstrou que os cães apresentaram aumento na expressão das MMPs em tecido hepático, e ainda, animais sintomáticos apresentaram maior expressão de MMP-2 e IL-10, quando

comparado ao grupo de cães assintomáticos. No entanto, no estudo de Oliveira et al. (2013), a MMP-9 demonstrou ter um efeito protetor na leishmaniose visceral humana, os quais os níveis da enzima aumentaram progressivamente após o início do tratamento. Em um estudo desenvolvido por Leib et al. (2001), a inibição da atividade da enzima conversora de MMP e TNF- α reduziu a mortalidade de camundongos com meningite pneumocócica, enquanto a inibição da atividade de MMP por uma tetraciclina quimicamente modificada reduziu a mortalidade da sepse também em camundongos (ELKINGTON; O’KANE; FRIEDLAND, 2005; MAITRA et al., 2003).

Portanto, regular a atividade das MMPs em doenças infecciosas através de inibidores diretos ou por direcionamento às vias de sinalização pode não apenas influenciar as vias do hospedeiro, mas também afetar o metabolismo dos parasitas (ELKINGTON; O’KANE; FRIEDLAND, 2005). Dessa forma, percebe-se que há importância na função das MMPs durante o desenvolvimento da leishmaniose visceral devido a sua contribuição na migração celular (OLIVEIRA et al., 2013; SANTOS, 2020), entretanto, em virtude da escassez de estudos sobre a relação das MMPs no controle ou progressão da doença e seus sinais clínicos, destaca-se a importância de investigar a relação dessas metaloproteinases com a imunopatogênese da LCan, afim de detectar biomarcadores da doença bem como contribuir para o surgimento de novos alvos no tratamento.

OBJETIVOS



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as concentrações séricas da metaloproteinase da matriz 2 em cães naturalmente infectados por *Leishmania* sp.

3.2 Objetivos específicos

- a. Quantificar as concentrações de MMP-2 no soro de cães naturalmente infectados por *Leishmania*;
- b. Verificar a relação entre as concentrações séricas de MMP-2 e sinais clínicos da leishmaniose visceral em cães.

MATERIAL E MÉTODOS



4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

Estudo analítico observacional do tipo caso-controle que buscou verificar a associação da metaloproteinase da matriz 2 em 80 cães domiciliados naturalmente infectados por *Leishmania* e com diferentes manifestações clínicas. As amostras de soro utilizadas nesse estudo foram oriundas de cães domésticos com idade ≥ 6 meses dos municípios de Aracaju e Nossa Senhora da Glória, Sergipe, sem predileção por raça ou sexo.

Os tutores dos cães assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, permitindo voluntariamente a realização do exame físico e coleta de sangue de seu animal. Uma média de 3 mL de sangue foi coletada por punção venosa externa ou punção venosa cefálica e acondicionada em tubos de ensaio anticoagulantes previamente rotulados. As amostras foram centrifugadas a 2000 xg por 5 min para obtenção do soro, que foi aliquoteado em microtubos e armazenado a -20 °C até a realização da sorologia. Os soros dos cães foram submetidos ao teste de triagem preconizado pelo Ministério da Saúde de acordo com as recomendações do fabricante para detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, o Teste Imunocromatográfico DPP® (Dual Path Platform, Biomanguinhos - Fiocruz, Brasil) baseado em dois antígenos recombinantes (rK39 e rK26). Os soros reagentes foram encaminhados à Fiocruz Bahia e submetidos ao teste confirmatório através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) específico para anticorpos anti- *Leishmania*.

Todas as amostras de soros reagentes nos testes TR-DPP® e ELISA para LCan compuseram o grupo caso e foram subdivididos de acordo com as manifestações clínicas apresentadas em: (i) assintomáticos, animais infectados que não apresentam sinais clínicos sugestivos de LCan e (ii) sintomáticos, quando os cães infectados possuem sinais clínicos sugestivos da doença. Os sinais clínicos observados utilizados para a classificação clínica foram: caquexia, lesões oftálmicas, lesões dermatológicas, linfadenopatia, epistaxe, claudicação e onicogribose. O grupo controle foi composto dos soros de animais não reagentes para *Leishmania* no TR-DPP® e ELISA (Figura 6).

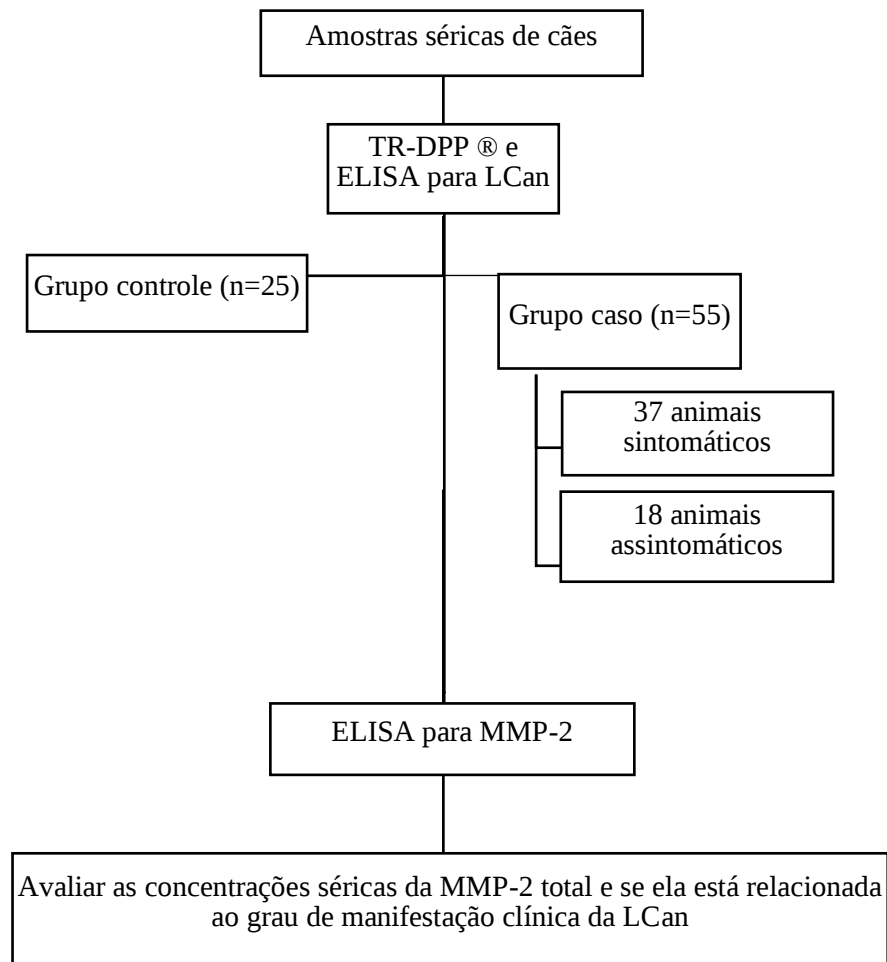


Figura 6. Desenho experimental.

4.2 Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal de Sergipe (96/2011 e 44/2017) e os preceitos éticos aludidos na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) foram respeitados.

4.3 Análise das concentrações de MMP-2

As concentrações de MMP-2 ativa foram determinadas pelo ELISA Quantikine, realizado de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems - Bio-Techne Brand, Houston, Texas, EUA).

Todos os reagentes e amostras foram preparadas conforme indicado pelo fabricante. Foi adicionado 50µL do diluente de ensaio e 50µL de amostra a cada poço da microplaca e incubado por 2 horas em temperatura ambiente em um agitador de microplacas ajustado em 500 ± 50 rpm. Após 2 horas, cada poço foi aspirado e lavado com tampão de lavagem (400µL) por um total de quatro lavagens. Foi acrescentado 200µL de conjugado de MMP-2 total a cada poço e incubado por mais 2 horas em temperatura ambiente no agitador.

Após a incubação, o processo de aspiração e lavagem por repetido e 200µL da solução de substrato foi adicionada a cada poço. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente na bancada protegendo da luz, foi adicionado 50µL de solução de parada a cada poço e a densidade óptica foi determinada em 30 minutos utilizando o espectrofotômetro.

4.4 Análise estatística

Os dados foram tabulados utilizando o Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, Estados Unidos) para análise descritiva. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi empregado para avaliação da normalidade dos dados, as quais foram expressas com mediana e intervalo interquartil (IIQ). Utilizou-se o Teste de Kruskal-Wallis, teste não-paramétrico para a comparação entre grupos: soropositivo e soronegativo e assintomático, sintomático e controle. Teste exato de Fisher foi empregado para averiguar a correlação entre os sinais clínicos, o sexo e a raça dos cães sororeagentes e concentrações séricas da MMP-2 acima da mediana.

As análises foram processadas utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, California, Estados Unidos). Em todos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $P > 0,05$. Todos os testes foram realizados com nível de 95% de confiança.

RESULTADOS



5. RESULTADOS

Foram analisadas amostras de soro sanguíneo de 166 cães dos municípios de Nossa Senhora da Glória e Aracaju, onde 57,8% (96/166) das amostras foram sororeagentes no teste imunocromatográfico DPP[®]. Estes soros reagentes foram submetidos ao teste ELISA sendo 33,1% (55/166) das amostras reagentes para anticorpos anti-*Leishmania*. As características dos animais avaliados e seu manejo estão descritos na Tabela 1.

Em relação aos cães sororeagentes, 65,5% eram machos, sendo a maioria deles (76,3%) de raça não definida e sem idade específica. Quanto a alimentação, 57,1% dos cães alimentavam-se de comida caseira, 9,6% de ração comercial e 33,3% de ambos. 52,5% dos cães eram domiciliados, ou seja, criados na residência, 28,5% eram não domiciliados e 19,0%, dos animais eram semi-domiciliados (animal com acesso a rua quando o tutor autorizava). Esses animais sororeagentes foram alocados em dois grupos: sintomáticos (37/55) e assintomáticos (18/55). A tabela 2 apresenta a frequência relativas dos sinais clínicos apresentados entre o grupo sintomático.

Tabela 1. Frequência relativa das características dos animais avaliados.

Variáveis	Controle (n = 25)	Caso	
		Assintomático (n = 18)	Sintomático (n = 37)
Idade			
6 meses – 1 ano	12,0	12,5	5,4
1 – 2 anos	32,0	12,5	24,3
2 – 3 anos	12,0	12,5	18,9
4 – 8 anos	36,0	37,5	27,0
Maior que 8 anos	8,0	25,0	18,9
Sexo			
Macho	60,0	88,8	59,5
Fêmea	40,0	11,1	40,5
Raça			
Sem raça definida	72,0	88,8	70,2
Labrador	8,0	-	-
Pastor Alemão	-	5,5	5,4
Perdigueiro	4,0	-	-
Pinscher	-	5,5	2,7
Pitbull	-	-	2,7
Poodle	12,0	-	16,2
Rottweiler	-	-	2,7
Shih Tzu	4,0	-	-
Criação			
Domiciliar	68,0	55,5	-
Semi-domiciliar	24,0	16,7	33,3*
Solto	8,0	27,8	66,6*
Alimentação			
Ração	24,0	11,2	-
Alimento preparado em casa	32,0	55,5	66,6*
Ambos	44,0	33,3	33,3*

*Alguns animais sintomáticos não tiveram as variáveis criação e alimentação coletadas, portando a frequência relativa foi obtida a partir de 3 amostras.

Tabela 2. Frequência relativa dos sinais clínicos apresentados pelos animais sintomáticos para LCan.

Sinais clínicos	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
Alterações oftálmicas	6	16,2
Alterações dermatológicas	31	83,7
Caquexia	14	37,8
Claudicação	1	2,7
Epistaxe	4	10,8
Linfadenomegalia	14	37,8
Onicogribose	4	8,1

Em relação a concentração sérica da MMP-2 total através da análise quantitativa, todas as amostras de soro de cães infectados e cães controle saudável apresentaram níveis séricos da enzima. A concentração mediana da MMP-2 total foi de 3,61 ng/mL (IIQ: 1,00-8,80) em animais sororeagentes ($P = 0,0697$) e 2,16 ng/mL (IIQ: 0,25-7,74) em animais não reagentes ($P = 0,0586$) (Figura 7). Quando a concentração da MMP-2 foi comparada entre os grupos (assintomático, sintomático e grupo controle), observou-se uma diferença significativa na

expressão de MMP-2 no grupo sintomático quando comparado ao grupo controle ($P = 0,0059$) e no grupo assintomático quando comparado ao grupo controle ($P = 0,0480$). Não foi observado diferença estatística entre os grupos sororeagentes sintomáticos e assintomáticos. Estes resultados estão demonstrados nas Figura 8.

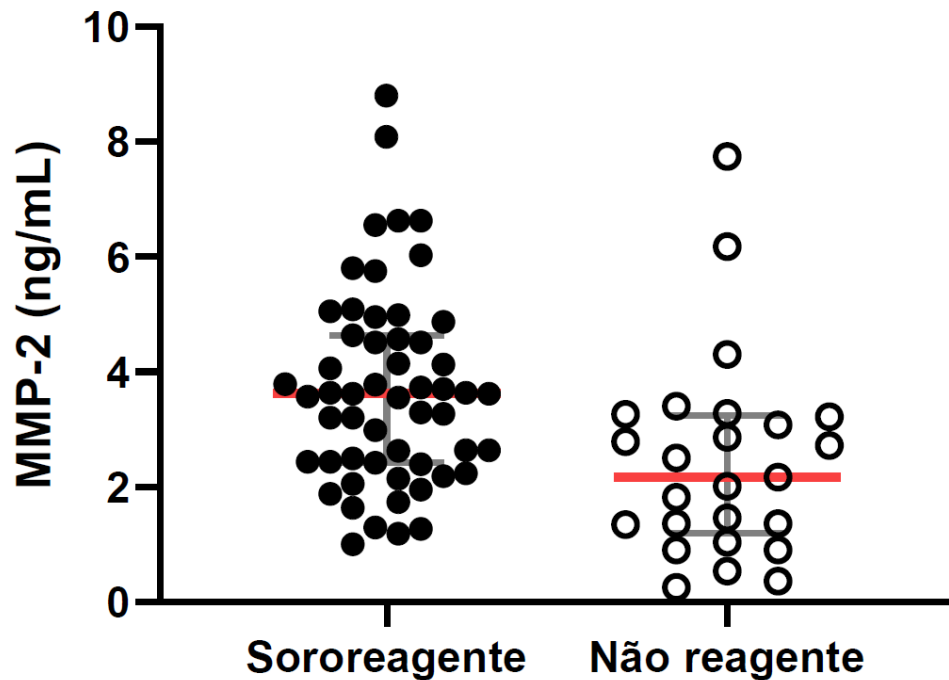


Figura 7. Concentrações da MMP-2 no soro de cães não reagentes e sororeagentes para Leishmaniose Visceral através do ELISA. Teste de Kolmogorov-Smirnov.

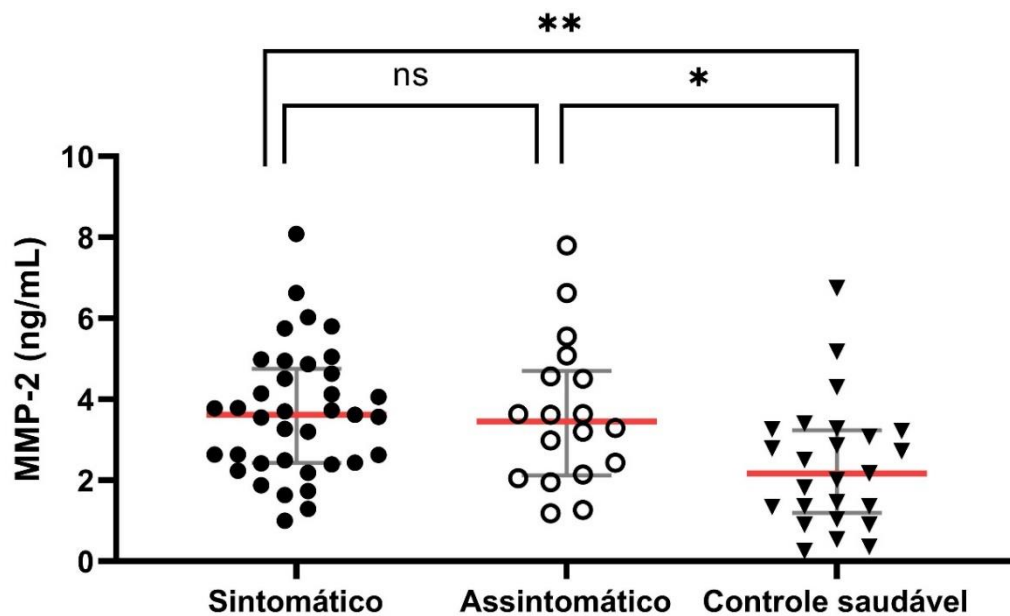


Figura 8. Concentrações da MMP-2 em relação aos grupos sintomático e assintomático no soro de cães com Lcan através do ELISA. Teste de Kruskal-Wallis.

Para averiguar a correlação entre os sinais clínicos, o sexo e a raça dos cães sororeagentes com concentrações séricas da MMP-2, foi utilizado amostras de cães com concentrações de MMP-2 acima da mediana (3,61 ng/mL). Ao analisar a relação entre o sexo e a raça do animal e concentrações da MMP-2 total, não foi possível observar diferença significativa ($P = 0,4533$ e $P = 0,7819$, respectivamente).

Na análise dos sinais clínicos em relação a concentração da MMP-2 total em animais sintomáticos, não houve diferença significativa entre os animais com lesões dermatológicas ($P = 0,1797$), lesões oftálmicas ($P > 0,9999$), presença de caquexia ($P = 0,3133$), claudicação ($P > 0,9999$), epistaxe ($P > 0,9999$), linfadenomegalia ($P = 0,5077$) e onicogribose ($P = 0,6039$) (Tabela 3). Em relação aos animais que apresentavam dois ou mais sinais clínicos concomitantes, também não houve diferença significativa ($P > 0,7281$).

Tabela 3. Análise descritiva relacionada aos sinais clínicos de cães com sororeagentes para LCan com concentrações séricas de MMP-2 acima de 3,61 ng/mL.

Sinais clínicos	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)	P-valor
Caquexia	8	44,4	0,3133
Claudicação	0	0,00	>0,9999
Epistaxe	2	11,1	>0,9999
Lesões dermatológicas	17	94,4	0,1797
Lesões oftálmicas	3	16,6	>0,9999
Linfadenomegalia	8	44,4	0,5077
Onicogribose	1	5,55	0,6039

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A suscetibilidade genética imunológica do cão à *Leishmania*, fatores ambientais e condição socioeconômica da população humana são os principais fatores de risco associados a uma maior prevalência de Lcan (BELO et al., 2013; CAMPOS et al., 2017; VARJÃO et al., 2021). A população estudada apresenta mais cães sem raça definida do que cães de raça, no entanto, mais da metade deles não tinham livre acesso às ruas. Além do cão ser considerado o reservatório mais importante da infecção em ambientes urbanos, sua presença no domicílio está associada com a abundância do vetor (BELO et al., 2013; BRAGA et al., 1986; LAINSON; SHAW, 1998; QUINNELL; DYE, 1994) e de fato, os cães estritamente domiciliados não estão mais protegidos do que os cães que tem livre acesso a rua, o que é esperado para uma doença transmitida por vetores biológicos voadores (COSTA et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2020; VARJÃO et al., 2021).

Embora a importância da resposta imunológica na infecção por *Leishmania* ter sido bem estabelecida, há poucos relatos sobre os mecanismos das MMPs nas diferentes manifestações clínicas (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011; SANTOS-GOMES et al., 2002). Em virtude da importância no desempenho das MMPs nos processos fisiológicos e patogênicos em diversos processos infecciosos, esse estudo realizou a dosagem quantitativa da MMP-2, em grupos de cães sororeagentes para Lcan sintomáticos e assintomáticos e controles não reagentes. A concentração da MMP-2 total foi determinada pelo ELISA. O ELISA é útil para avaliação da MMP-2, pois as amostras podem ser analisadas em 4 a 5 horas, enquanto a Zimografia requer de 2 a 3 dias, no entanto uma desvantagem potencial do ELISA é o volume de amostra necessária para cada poço (BERGMAN; INZANA; INZANA, 2002). Além disso, as MMPs parecem ser relativamente estáveis e as amostras podem ser armazenadas a -70°C por longos períodos sem perda de atividade. Muitas das amostras usadas neste estudo foram armazenadas por mais de 1 ano.

A MMP-2, é expressa em níveis relativamente baixos em tecidos normais em repouso, implicando papéis funcionais na homeostase do tecido por meio do remodelamento de matriz desempenhando sua atividade pró-fibrogênica (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; NAGASE, 1996; SANTOS, 2020). Esta gelatinase é expressa em baixas concentrações e carece de uma sequência promotora, que é ligada à sua expressão constitutiva e sua resposta menos proeminente à maioria dos estímulos, quando comparada a MMP-9 que é induzível (JACINTHO, 2012; MANICONE; JOHN K, 2008; MELO et al., 2011;

OPDENAKKER et al., 2001). A atividade da forma latente e ativa da enzima é regulada pelos inibidores específicos, os TIMPs (ARPINO; BROCK; GILL, 2015; WOESSNER, 1991). Nosso estudo analisou a forma total da MMP-2 a qual engloba suas formas ativa, latente e complexada com o TIMP.

A atividade das MMPs é essencial em processos biológicos celulares e muitos eventos fisiológicos fundamentais envolvendo a remodelação tecidual, como angiogênese, desenvolvimento ósseo e cicatrização (CHANG; WERB, 2001; KORPOS; WU; SOROKIN, 2009; LÖFFEK; SCHILLING; FRANZKE, 2011; PAGE-MCCAW; EWALD; WERB, 2007). O crescente interesse na função das MMPs decorre principalmente de seu papel também em várias condições patológicas, como câncer ou doenças inflamatórias crônicas (AOKI, 2014; GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; TURBA et al., 2006).

Bergman et al. (2002) desenvolveram um estudo a fim de avaliar a presença da gelatinase tanto na sua forma latente quanto na sua forma ativa em cães clinicamente saudáveis. A MMP-2 latente foi expressa no líquido cefalorraquidiano (LCR) e no cérebro de todos os animais, já a forma ativa também foi detectada em algumas amostras, mas em níveis extremamente baixos. Estudos que avaliaram a expressão da MMP-2 em cães incluem fragmentos do miocárdio e plasma de cães com cardiomiopatia, LCR em cães com tumor intracraniano, fragmentos de intestino de cães com enteropatias e fragmentos de osteossarcomas e mastocitomas (AUPPERLE et al., 2009; HANIFEH et al., 2018; LJUNGVALL et al., 2011; MÄÄTTÄ et al., 2021; MARIANI et al., 2013). No estudo de Mariani et al. (2013) foi possível observar a presença da forma latente da MMP-2 no LCR de todos os cães (com tumor intracraniano e controle) e ausência da forma ativa da enzima em todos os grupos. No estudo desenvolvido por Ljungvall et al. (2011) também foi detectado a presença da forma latente da enzima no plasma de ambos os grupos, mas sem expressão da forma ativa.

O presente estudo demonstrou presença da MMP-2 total em todas as amostras de soro, tanto nos cães infectados quanto no grupo controle saudável. Outros estudos também demonstraram a presença da forma latente de MMP-2 em ambos os grupos por ela ser expressa em concentrações baixas em tecidos normais em repouso, responsável pela homeostase do tecido (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011; MELO; MARCONDES; MACHADO, 2012; NAGASE, 1996; SANTOS, 2020). No entanto, foi possível observar concentrações mais elevadas nos cães infectados, implicando papéis funcionais na inflamação por meio da degradação da MEC, regulação dos gradientes de citocinas e reparo tecidual.

Alguns estudos em cães com LCan demonstraram atividades aumentadas das MMPs em amostras de soro, líquido cefalorraquidiano e tecido nervoso (AOKI, 2014; JACINTHO et al., 2018; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011; MELO; MARCONDES; MACHADO, 2012). Jacintho et al. (2018) obtiveram uma proporção da forma latente da MMP-2 maior nos grupos infectados.

No estudo desenvolvido por Melo et al. (2011), cães com LCan apresentaram quantidades aumentadas da forma latente da MMP-2 no soro em relação a um grupo controle saudável, no entanto não foi detectado a presença da forma ativa da enzima, indicando que a infecção natural pela *L. infantum* não superou os mecanismos regulatórios que mantêm a MMP-2 como um zimogênio, uma vez que a conversão da forma latente MMP-2 à enzima ativa madura evidentemente não ocorreu nos cães infectados no estudo. Na análise da expressão da MMP-2 e de TIMPs (1 e 4) no tecido hepático por Santos (2020), foi possível observar que há aumento em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, entretanto, cães oligossintomáticos e sintomáticos apresentaram maior expressão de MMP-2, quando comparados aos cães assintomáticos. Já no estudo desenvolvido por Marangoni et al. (2011), não houve diferença entre animais sintomáticos e assintomáticos em relação a concentração da MMP-2, corroborando assim com os resultados encontrado no nosso estudo, o qual não apresentou diferença significativa entre os grupos sintomático e assintomático.

A manifestação clínica e evolução da Lcan é consequência de interações complexas entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro, associadas ao desenvolvimento de respostas Th1 e Th2 (BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; PINELLI et al., 1994; SANTOS-GOMES et al., 2002; SCOTT et al., 1989). Animais assintomáticos expressam uma maior atividade da resposta imune celular com células Th1, as quais produzem IFN- γ , TNF- α e IL-2 e ativam os macrófagos, enquanto que animais sintomáticos expressam maior resposta Th2, a qual está associada ao aumento da produção de citocinas como a IL-10, que inibe a atividade microbicida de macrófagos infectados (BANETH et al., 2008; BARBIÉRI, 2006; DE VASCONCELOS et al., 2019; PINELLI et al., 1999; SANTOS-GOMES et al., 2002; TURCHETTI et al., 2015).

No entanto, estudos referentes à avaliação do perfil de citocinas em células do baço de cães naturalmente e experimentalmente infectados por LCan não detectaram diferenças nos níveis de TNF- α , IL-12, IL-4, IFN-g e IL-10 quando os cães foram classificados em sintomáticos e assintomáticos (LAGE et al., 2007; STRAUSS-AYALI; BANETH; JAFFE, 2007). Esses dados sugerem que a LCan é marcada por uma produção equilibrada de citocinas Th1/Th2, com acúmulo predominante de IL-10, como consequência do aumento da carga parasitária e progressão da doença (REIS et al., 2009). Santos (2020) concluiu que há correlação

positiva entre o aumento da expressão de RNAm de TNF- α e IL-10 e o aumento da expressão de RNAm da MMP-2 e os inibidores teciduais TIMP-1 e TIMP-4. No presente estudo foi observado aumento da MMP-2 em ambos os grupos infectados (sintomáticos e assintomáticos) em comparação ao grupo controle no entanto não houve diferença significativa entre os grupos sintomático e assintomático, sugerindo a partir dos estudos citados, que tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2 influencia na liberação da MMP-2.

Um fator que pode ter influenciado a detecção da MMP-2 foram os diferentes estados imunológicos dos cães, devido às diferentes fases da infecção. Alguns estudos sugerem possíveis diferenças na fase de expressão da MMP-2, a qual seja liberada na primeira fase da infecção (fase aguda) (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005; MARANGONI et al., 2011). Contudo, essa hipótese não pode ser confirmada nas condições do presente estudo, pois se utilizou cães com doença espontânea, sem condições de determinação da fase de evolução da infecção. Em uma tentativa de evitar essa interferência, foi analisado a relação entre a concentração sorológica da gelatinase com os diferentes sinais clínicos, no entanto observamos que a concentração sorológica da MMP-2 não estava relacionada com os sinais clínicos dos animais sintomáticos. Isso nos mostra que a detecção da MMP-2 está presente em animais infectados, porém parece não ser influenciada ou influenciar a sintomatologia clínica.

A formação e a degeneração da MEC são processos equilibrados dependentes dos mesmos tipos de células, dentre elas as MMPs. O excesso da MEC, conhecida como fibrose, se acumula quando a formação excede a degradação. A inflamação crônica, uma consequência comum das infecções parasitárias, é um potente promotor da formação de MEC (ANDRADE, 1991; TAFURI et al., 2009). Os fibroblastos produzem proteínas da MEC, a exemplo do colágeno I e III, citocinas, MMPs, quimiocinas, que regulam a composição do microambiente extracelular em condições fisiológicas e patológicas (SILVA et al., 2013; ZACHARY; MCGAVIN, 2013).

A LCan é uma doença crônica definida como uma resposta imune que persiste por vários meses, em quais processos de inflamação, remodelação e reparação tecidual ocorrem simultaneamente; o qual impossibilita a diferenciação estatisticamente significativa entre os grupos sintomático e assintomático do nosso estudo. O estímulo persistente da inflamação crônica ativa macrófagos e linfócitos, levando à produção de fatores de crescimento e citocinas que aumentam a síntese de colágeno e consequente fibrose (TAFURI et al., 2009). Silva et al. (2013) descreveu uma significativa deposição de colágeno em órgãos como: fígado, baço, linfonodos, pulmões e rins de cães naturalmente infectados por *L. chagasi*. Tafuri et al. (2009)

observaram deposição de colágeno em fígado e encontraram uma correlação positiva altamente significativa entre deposição de colágeno e carga parasitária.

Jacinto et al. (2012) observou a presença da *Leishmania* em fibroblastos na pele e maior degradação do colágeno, mais evidente nos grupos infectados. Melo (2005) sugere que as alterações da matriz extracelular seriam decorrentes da ação da *Leishmania*, que utiliza o processo de degradação do colágeno do tipo I como um mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro e consequente a migração de macrófagos parasitados para o leito vascular, visando disseminação sistêmica.

Embora as MMPs sejam cruciais para uma resposta inflamatória normal, a atividade descontrolada dessas proteases após a infecção resulta em dano tecidual grave, disseminação microbiana e imunopatologia no hospedeiro que pode levar à morte (GEURTS; OPDENAKKER; VAN DEN STEEN, 2012). Dessa forma, a partir desses resultados, sugere que a MMP-2 aumentada, pode compor fator importante na migração de macrófagos parasitados para o leito vascular e a disseminação sistêmica da *Leishmania* além de contribuir para a remodelação da MEC.

Com isso, estudos envolvendo metaloproteinases de matriz na LCan podem servir de base para o melhor entendimento dos mecanismos de persistência e disseminação da *Leishmania*, sobretudo, determinar se a ação das enzimas é benéfica ou prejudicial para a progressão da doença.

7. CONCLUSÃO

Nossos resultados apresentaram alterações marcantes ao medir os níveis séricos de MMP-2 total em cães com leishmaniose visceral canina. Houve aumento significativo nos níveis séricos de MMP-2 em cães infectados, independente da sintomatologia clínica em relação aos cães saudáveis. No entanto, as concentrações de MMP-2 não demonstraram resultados estatisticamente significativo entre os grupos sintomáticos e assintomáticos sororeagentes e em animais com diferentes manifestações clínicas.

Alguns estudos sugerem que a MMP-2 seja liberada na primeira fase da infecção com uma produção equilibrada de citocinas Th1 e Th2. Contudo, essa hipótese não pode ser confirmada nas condições do presente estudo, pois se utilizou cães com doença espontânea, sem condições de determinação da fase de evolução da infecção.

Com isso, estudos envolvendo metaloproteinases de matriz na LCan podem servir de base para o melhor entendimento dos mecanismos de persistência e disseminação da *Leishmania*, além de ser um possível biomarcador de diagnóstico e para o estadiamento e acompanhamento da evolução no tratamento da doença.

8. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T. R.; WERNECK, G. L.; ALMEIDA, A. S. et al. Fatores ambientais associados à ocorrência de leishmaniose visceral canina em uma área de recente introdução da doença no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1–12, 2018.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: Paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ALEXANDER, J.; RUSSELL, D. G. The Interaction of Leishmania Species with Macrophages. **Advances in Parasitology**, [s. l.], v. 31, n. C, p. 175–254, 1992.
- ALEXANDRE-PIRES, G.; DE BRITO, M. T. V.; ALGUERÓ, C. et al. Canine leishmaniosis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 137, n. 3–4, p. 275–283, 2010.
- ALMEIDA, B. F. M.; NARCISO, L. G.; BOSCO, A. M. et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 196, n. 1–2, p. 6–12, 2013.
- ALTET, L.; FRANCINO, O.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Mapping and Sequencing of the Canine NRAM1 Gene and Identification of Mutations in Leishmaniasis-Susceptible Dogs. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.
- ANDRADE, A. M.; QUEIROZ, L. H.; NUNES, G. R. et al. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 594–595, 2007.
- ANDRADE, Z. A. Contribution to the study of septal fibrosis of the liver. **Internation Journal of Experimental Pathology**, [s. l.], v. 99, p. 553–562, 1991.
- AOKI, C. G. **Metaloproteinasas de matriz 2 e 9 no líquido cefalorraquidiano e soro de cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose**. 2014. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, [s. l.], 2014.
- ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. **Matrix Biology**, v. 44-46, p. 247-245, 2015.
- ASHFORD, D. A.; DAVID, J. R.; FREIRE, M. et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 53–57, 1998.
- AUPPERLE, H.; THIELEBEIN, J.; KIEFER, B. et al. An immunohistochemical study of the role of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in chronic mitral valvular disease (valvular endocardiosis) in dogs. **The Veterinary Journal**, [s. l.], v. 180, n. 1, p. 88–94, 2009.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian Journal of Medical Research**, [s. l.], v. 119, n. 6, p. 238–258, 2004.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. **Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral**. Gazeta Médica da Bahia, [s. l.], 75, n.1, p. 24-34, 2005.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGO, L. et al. Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 329–337, 2006.

BATISTA, L. F. da S.; DA MATTA, V. L. R.; TOMOKANE, T. Y. et al. Canine antibody response to *Lutzomyia longipalpis* saliva in endemic area of visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 361–364, 2016.

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S. et al. Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 4, 2013.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; INZANA, T. J. Characterization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in cerebrospinal fluid of clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 63, n. 10, p. 1359–1362, 2002.

BERNARDINO, M. das G. da S.; ANGELO, D. F. D. S.; SILVA, R. B. S. et al. High seroprevalence and associated factors for visceral leishmaniasis in dogs in a transmission area of Paraíba state, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 1–9, 2020.

BEVILACQUA, P. D.; ALVES, W. A. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 259–265, 2004.

BRAGA, R. R.; LAINSON, R.; SHAW, J. J. et al. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva 1912) isolated during an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 80, n. 1, p. 143–145, 1986.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRENNER, D. A.; O'HARA, M.; ANGEL, P. et al. Prolonged activation of jun and collagenase genes by tumour necrosis factor- α . **Nature**, [s. l.], v. 337, n. 6208, p. 661–663, 1989.

BRUSCHI, F.; PINTO, B. The significance of matrix metalloproteinases in parasitic infections involving the central nervous system. **Pathogens**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 105–129, 2013.

CALDERON-ANYOSA, R.; GALVEZ-PETZOLDT, C.; GARCIA, P. J. et al. Housing characteristics and leishmaniasis: A systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 99, n. 6, p. 1547–1554, 2018.

CAMPOS, R. N. de S. **Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em Sergipe e liberação de redes extracelulares de neutrófilos em humanos e cães na infecção por Leishmania infantum**. 2016. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2016.

CAMPOS, R.; SANTOS, M.; TUNON, G. et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, [s. l.], v. 12, n. 503, p. 67–73, 2017.

CAMPOS, T. M.; PASSOS, S. T.; NOVAIS, F. O.; et al. Matrix Metalloproteinase 9 Production by Monocytes is Enhanced by TNF and Participates in the Pathology of Human Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 8, n. 11, p. e3282, 2014.

CARNEIRO, D. Identificação de áreas de risco para a leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de. **Revista Baiana de Saúde Pública**, [s. l.], 2014.

CAWSTON, T. E.; WILSON, A. J. Understanding the role of tissue degrading enzymes and their inhibitors in development and disease. **Best Practice and Research: Clinical Rheumatology**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 983–1002, 2006.

CEARÁ, S. da S. do E. Do. **Boletim Epidemiológico: Leishmaniose Visceral**. Fortaleza.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 11, n. 11, 2001.

CONANT, K.; MCARTHUR, J. C.; GRIFFIN, D. E. et al. Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 391–398, 1999.

CONTRERAS, I. K.; MACHADO, M. A.; ROCHA, R. C. O. J. M. et al. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para Leishmaniose Visceral no município de Vassouras, Rio de Janeiro. **Pubvet**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 1–6, 2019.

COSTA, A. T.; DIAS, E. S.; SOUZA, A. G. M.; et al. Ecology of phlebotomine sand flies in an area of leishmaniasis occurrence in the Xakriabá Indigenous Reserve, Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 52, p. e20180474, 2019.

COSTA, C. H. N. How effective is dog culling in controlling zoonotic visceral leishmaniasis ? A critical evaluation of the science , politics and ethics behind this public health policy.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 232–242, 2011.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 223–228, 2001.

COSTA, D. N. C. C.; BERMUDI, P. M. M.; RODAS, L. A. C. et al. Human visceral leishmaniasis and relationship with vector and canine control measures. **Revista de Saude Publica**, [s. l.], v. 52, p. 1–11, 2018.

DANTAS-TORRES, F.; SOLANO-GALLEGU, L.; BANETH, G.; et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 28, n. 12, p. 531–538, 2012.

DE FREITAS, E.; MELO, M. N.; DA COSTA-VAL, A. P. et al. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 137, n. 1–2, p. 159–167, 2006.

DE MORAIS, C. G. V.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R. et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2015, p. 1–19, 2015.

DE QUEIROZ, N. M. G. P.; DA SILVEIRA, R. C. V.; DE NORONHA, A. C. F. et al. Detection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in canine skin. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 178, n. 1–2, p. 1–8, 2011.

DE VASCONCELOS, T. C. B.; FURTADO, M. C.; BELO, V. S. et al. Canine susceptibility to visceral leishmaniasis: A systematic review upon genetic aspects, considering breed factors and immunological concepts. **Infection, Genetics and Evolution**, [s. l.], v. 74, 2019.

DUARTE, M. C.; LAGE, D. P.; MARTINS, V. T. et al. Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, n. 4, p. 398–407, 2016.

ELKINGTON, P. T. G.; O’KANE, C. M.; FRIEDLAND, J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. **Clinical and Experimental Immunology**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 12–20, 2005.

EVARISTO, A. M. da C. F.; SEVÁ, A. da P.; DE OLIVEIRA, G. M. B. et al. Canine leishmaniasis in the semi-arid region of pernambuco, northeastern Brazil: Epidemiology, factors associated with seropositivity and spatial analysis. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 1–13, 2020.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. De. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 47–57, 2012.

FELIPE, K.; COSTA, D. L.; SANTOS, S. et al. De. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 47, n. October, p. 607–612, 2014.

GEURTS, N.; OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. **Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 133, n. 3, p. 257–279, 2012.

GUAN, L. Current status of kala-azar and vector control in China. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 69, n. 5, p. 595–601, 1991.

GUARGA, J. L.; MORENO, J.; LUCIENTES, J. et al. Canine leishmaniasis transmission: Higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 249–253, 2000.

HANDMAN, E.; ELSO, C.; FOOTE, S. Genes and Susceptibility to Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 1–75, 2005.

HANIFEH, M.; RAJAMÄKI, M. M.; SYRJÄ, P. et al. Identification of matrix metalloproteinase-2 and -9 activities within the intestinal mucosa of dogs with chronic enteropathies. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 1–10, 2018.

HOTEZ, P. J.; BOTTAZZI, M. E.; FRANCO-PAREDES, C. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 2, n. 9, 2008.

HU, J.; VAN DEN STEEN, P. E.; SANG, Q. X. A. et al. Matrix metalloproteinase inhibitors as therapy for inflammatory and vascular diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 6, p. 480–498, 2007.

JACINTHO, A. P. P. **Análise da expressão de MMP-2 e MMP-9 na pele de cães com leishmaniose visceral**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

JACINTHO, A. P. P.; MELO, G. D.; MACHADO, G. F. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 1819–1827, 2018.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 901–915, 2014.

KORPOS, E.; WU, C.; SOROKIN, L. Multiple Roles of the Extracellular Matrix in Inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 1349–1357, 2009.

KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. 3, p. 1-10, 2012.

LAGE, R. S.; OLIVEIRA, G. C.; BUSEK, S. U. et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 115, n. 1-2, p. 135-145, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World leishmaniasis: the neotropical *Leishmania* species. Em: COLLIER, L.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. (Eds.). **Microbiology and microbial infections**. 9. ed. Londres: Topley & Wilson's, 1998. p. 241-307.

LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; MATTA, V. L. R. Da et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 196, n. 3-4, p. 296-300, 2013.

LEIB, S. L. Inhibition of matrix metalloproteinases and tumour necrosis factor alpha converting enzyme as adjuvant therapy in pneumococcal meningitis. **Brain**, [s. l.], v. 124, n. 9, p. 1734-1742, 2001.

LEONTIDES, L. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; BILLINIS, C. et al. A cross-sectional study of *Leishmania* spp. infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 109, n. 1-2, p. 19-27, 2002.

LJUNGVALL, I.; RAJAMÄKI, M. M.; CROSARA, S. et al. Evaluation of plasma activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in dogs with myxomatous mitral valve disease. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 72, n. 8, p. 1022-1028, 2011.

LÖFFEK, S.; SCHILLING, O.; FRANZKE, C. W. Biological role of matrix metalloproteinases: A critical balance. **European Respiratory Journal**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 191-208, 2011.

LUZ, Z. M. P. Participação da população na prevenção da leishmaniose visceral: Como superar as lacunas? **Cadernos de Saude Publica**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1-2, 2016.

MÄÄTTÄ, M.; LAURILA, H. P.; HOLOPAINEN, S. et al. Matrix metalloproteinase-2, -7, and -9 activities in dogs with idiopathic pulmonary fibrosis compared to healthy dogs and dogs with other respiratory diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 462-471, 2021.

MAITRA, S. R.; BHADURI, S.; VALANE, P. D. et al. Inhibition of Matrix Metalloproteinases by Chemically Modified Tetracyclines in Sepsis. **Shock**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 280-285, 2003.

MANICONE, A. M.; JOHN K, M. Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 34-41, 2008.

MARANGONI, N. R.; MELO, G. D.; MORAES, O. C. et al. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 6, p. 330-334, 2011.

- MARGONARI, C.; FREITAS, C. R.; RIBEIRO, R. C.; et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 31–38, 2006.
- MARIANI, C. L.; BOOZER, L. B.; BRAXTON, A. M.; et al. Evaluation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the cerebrospinal fluid of dogs with intracranial tumors. **American Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 122–129, 2013.
- MARQUES, P.; BERMUDI, M.; NUNES, D. et al. Canine serological survey and dog culling and its relationship with human visceral leishmaniasis in an endemic urban area. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 20, p. 401, 2020.
- MCGWIRE, B. S.; CHANG, K.; ENGMAN, D. M. Migration through the Extracellular Matrix by the Parasitic Protozoan. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 1008–1010, 2003.
- MELO, F. A. **Alterações da matriz extracelular na pele de cães com leishmaniose visceral naturalmente infectados**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- MELO, G. D.; MARANGONI, N. R.; MARCONDES, M. et al. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: A preliminary report. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 188, n. 2, p. 243–245, 2011.
- MELO, G. D.; MARCONDES, M.; MACHADO, G. F. Canine cerebral leishmaniasis: Potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 148, n. 3–4, p. 260–266, 2012.
- MELO, G. D.; SERAGUCI, T. F.; SCHWEIGERT, A. et al. Pro-inflammatory cytokines predominate in the brains of dogs with visceral leishmaniasis: A natural model of neuroinflammation during systemic parasitic infection. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 192, n. 1, p. 57–66, 2013.
- MERTZ, P. M.; DEWITT, D. L.; STETLER-STEVENSON, W. G. et al. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 269, n. 33, p. 21322–21329, 1994.
- MIRANDA, S.; ROURA, X.; PICADO, A.; et al. Characterization of sex, age, and breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 85, n. 1, p. 35–38, 2008.
- MIRZAEI, A.; MALEKI, M.; MASOUMI, E. et al. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. **Cytokine**, [s. l.], v. 145, n. May, p. 155297, 2021.
- MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological Reviews**, v. 240, n.1, p. 286-96, 2011.

MURASE, L. S.; DE SOUZA, J. V. P.; DE LIMA NETO, Q. A. et al. The role of metalloproteases in Leishmania species infection in the New World: A systematic review. **Parasitology**, [s. l.], v. 145, n. 12, p. 1499–1509, 2018.

NAGASE, H. **Zinc Metalloproteases In Health And Disease**. 1. ed. Londres: Taylor & Francis, 1996.

NAGASE, H.; WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 274, p. 21491–21494, 1999.

NOGUEIRA, R. A.; LIRA, M. G. S.; SANTOS, S. I. P.; et al. Intense transmission of visceral leishmaniasis in a region of northeastern Brazil: A situation analysis after the discontinuance of a zoonosis control program. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 1–9, 2021.

NUNES, C. M.; LIMA, V. M.; PAULA, H. B. et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 153, n. 1–2, p. 19–23, 2008.

OLIVA, G.; ROURA, X.; CROTTI, A. et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 236, n. 11, p. 1192–1198, 2010.

OLIVEIRA, D. K. F. De; SOARES, M. E. H. da S.; BRITO, K. M. L. De. et al. Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 1–14, 2021.

OLIVEIRA, F. A. De; SILVA, V. O. C.; DAMASCENA, N. P. et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 331, 2013.

OLIVEIRA, W. N.; RIBEIRO, L. E.; SCHRIEFFER, A. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

OPAS. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. **PAHO/WHO Institutional Repository**, [s. l.], n. 9, p. 1–7, 2020.

OPDENAKKER, G.; VAN DEN STEEN, P. E.; DUBOIS, B.; et al. Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. **Journal of leukocyte biology**, [s. l.], v. 69, n. 6, p. 851–9, 2001.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 221–233, 2007.

PALTRINIERI, S.; SOLANO-GALLEGO, L.; FONDATI, A. et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [s. l.], v. 236, n. 11, p. 1184–1191, 2010.

PARKS, W. C.; WILSON, C. L.; LÓPEZ-BOADO, Y. S. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 4, n. 8, p. 617–629, 2004.

PEREIRA, L. de O. R.; MOREIRA, R. B.; DE OLIVEIRA, M. P. et al. Is Leishmania (Viannia) braziliensis parasite load associated with disease pathogenesis? **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 57, p. 132–137, 2017.

PEREIRA, N. C. L.; MICHALSKY, É. M.; LARA-SILVA, F. O.; et al. Ecology of phlebotomine sand flies in a Brazilian area with recent leishmaniasis transmission (Itaúna, in Minas Gerais state). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 53, n. November 2019, p. 1–7, 2020.

PINELLI, E.; GONZALO, R. M.; BOOG, C. J. P.; et al. 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**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1594–1600, 1995.

PINELLI, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J. et al. Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with Leishmania infantum. **Infection and Immunity**, [s. l.], v. 62, n. 1, p. 229–235, 1994.

PINELLI, E.; VAN DER KAAIJ, S. Y.; SLAPPENDEL, R. et al. Detection of canine cytokine gene expression by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 69, n. 2, p. 121–126, 1999.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G. R.; et al. Aspectos Imunológicos e Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. **Revista Ciência da Saúde**, [s. l.], v. 14, p. 30–39, 2012.

POLARI L.P.; MACEDO M.; MACHADO P.R.L. et al. Leishmania braziliensis infection enhances toll-like receptors 2 and 4 expression and triggers TNF- α and IL-10 production in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 9, 2019.

QUINNELL, R. J.; DYE, C. Correlates of the peridomestic abundance of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae) in Amazonian Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 219–224, 1994.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.

REIS, L. L. Dos; BALIEIRO, A. A. da S.; FONSECA, F. R. et al. Changes in the epidemiology of visceral leishmaniasis in Brazil from 2001 to 2014. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 638–645, 2017.

- RESENDE, L. A.; AGUIAR-SOARES, R. D. de O.; MOREIRA, N. das D. et al. In vitro Infectivity of Strains Isolated From Dogs Naturally Infected With *Leishmania infantum* Present a Distinct Pathogenic Profile in Hamsters. **Frontiers in Medicine**, [s. l.], v. 7, p. 1-11, 2020.
- RIBEIRO, C. R.; GONÇALVES, C. A.; CRUZ, L. M. et al. Prevalence of visceral canine leishmaniosis and co-infections in periurban region in the Federal district - Brazil. **Ciencia Animal Brasileira**, [s. l.], v. 20, p. 1–8, 2019.
- RIVERA-MARRERO, C. A.; SCHUYLER, W.; ROSER, S. et al. Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of *M. tuberculosis*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 231–244, 2000.
- RODRÍGUEZ, J. H.; MOZOS, E.; MÉNDEZ, A. et al. Leishmania Infection of Canine Skin Fibroblasts In Vivo. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 469–473, 1996.
- ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. e584, 2010.
- ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.
- SANTOS, W. V. Dos. **Avaliação de metaloproteínas de matriz em fígado de cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum***. 2020. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, [s. l.], 2020.
- SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C. et al. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 21–30, 2002.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. **Veterinary Dermatology**, [s. l.], v. 20, n. 5–6, p. 471–489, 2009.
- SCHIMMING, B. C.; PINTO E SILVA, J. R. C. Leishmaniose Visceral Canina - Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, [s. l.], v. 10, n. 19, p. 1–17, 2012.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A. W. et al. Role of Cytokines and CD4+ T-Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. **Immunological Reviews**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 161–182, 1989.
- SILVA, C. M. H. de S.; WINCK, C. A. Leishmaniose visceral canina: revisão de literatura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, [s. l.], v. 16, n. 1, 2018.
- SILVA, S. M. Da; RABELO, P. F. B.; GONTIJO, N. de F. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 174, n. 1–2, p. 150–154, 2010.

SILVA, J. A. O.; DA SILVA, F. J.; DE MACEDO, L. O.; et al. Sandflies in an endemic area for visceral Leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 569–573, 2019.

SILVA, L. A. M. T. **Caracterização da resposta imune celular em cães frente a novos antígenos de *Leishmania infantum***. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

SILVA, L. C.; CASTRO, R. S.; FIGUEIREDO, M. M. et al. Canine visceral leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. **International Journal of Experimental Pathology**, [s. l.], v. 94, n. 2, p. 133–143, 2013.

SOLANO-GALLEGO, L.; LLULL, J.; RAMOS, G. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 90, n. 1–2, p. 37–45, 2000.

SONG, W.; JACKSON, K.; MCGUIRE, P. G. Degradation of type IV collagen by matrix metalloproteinases is an important step in the epithelial-mesenchymal transformation of the endocardial cushions. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 227, n. 2, p. 606–617, 2000.

SPORER, B.; PAUL, R.; KOEDEL, U. et al. Presence of Matrix Metalloproteinase-9 Activity in the Cerebrospinal Fluid of Human Immunodeficiency Virus—Infected Patients. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 178, n. 3, p. 854–857, 1998.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How Matrix Metalloproteinases Regulate Cell Behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 463–516, 2001.

STODDARD, S. T.; MORRISON, A. C.; VAZQUEZ-PROKOPEC, G. M. et al. The Role of Human Movement in the Transmission of Vector-Borne Pathogens. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. e481, 2009.

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

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S. et al. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

TAFURI, W. L.; MELO, F. A.; MOURA, E. P. et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 538–548, 2009.

TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TURBA, M. E.; FORNI, M.; GANDINI, G. et al. Recruited leukocytes and local synthesis account for increased matrix metalloproteinase-9 activity in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system neoplasm. **Journal of Neuro-Oncology**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 123–129, 2006.

TURCHETTI, A. P.; DA COSTA, L. F.; ROMÃO, E. de L. et al. Transcription of innate immunity genes and cytokine secretion by canine macrophages resistant or susceptible to intracellular survival of *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 163, n. 1–2, p. 67–76, 2015.

VAN DEN STEEN, P. E.; VAN AELST, I.; STARCKX, S. e tal. Matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of MMPs and TACE in experimental cerebral malaria. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 86, n. 9, p. 873–888, 2006.

VAN WART, H. E.; BIRKEDAL-HANSEN, H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 14, p. 5578–5582, 1990.

VARJÃO, B. M.; PINHO, F. A. De; SOLCÀ, M. da S.; et al. Spatial distribution of canine *Leishmania infantum* infection in a municipality with endemic human leishmaniasis in Eastern Bahia, Brazil. **Journal of Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. e022620, 2021.

WERNECK, G. L. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 2937–2940, 2008.

WERNECK, G. L. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Revista de Saúde Pública**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 851–856, 2014.

WERNECK, G. L. Controle da leishmaniose visceral no Brasil: o fim de um ciclo? **Caderno De Saúde Pública**, [s. l.], v. 32, n. 6, p. 1–2, 2016.

WHO. **Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010**. World Health Organization technical report series. Geneva, 2010.

WHO. **Leishmaniasis**. 2021a.

WHO. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis**. 2021b. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/status-of-endemicity-of-visceral-leishmaniasis>>. Acesso em: 27 out. 2021.

WOESSNER, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. **The FASEB Journal**, v. 5, n. 8, p. 2145–2154, 1991.

WOODMAN, R. C.; JOHNSTON, B.; HICKEY, M. J. et al. The Functional Paradox of CD43 in Leukocyte Recruitment: A Study Using CD43-deficient Mice. **Journal of Experimental Medicine**, [s. l.], v. 188, n. 11, p. 2181–2186, 1998.

WROBLEWSKI, L. E.; NOBLE, P.-J. M.; PAGLIOCCA, A. et al. Stimulation of MMP-7 (matrilysin) by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells: role in epithelial cell migration. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 116, n. 14, p. 3017–3026, 2003.

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da Patologia em Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013.

APÊNDICE

A) ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO

Matrix Metalloproteinases -2 and -9 expression in dogs with visceral leishmaniasis: a systematic review

Renata Rocha Da Silva^a, Fernanda de Santana Fontes Vasconcelos^b, Roseane Nunes de Santana Campos^{b, c}, Débora dos Santos Tavare^d, Priscila Lima dos Santos^{a, b, d*}

a. Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, Aracaju, Sergipe, Brasil.

b. Universidade Federal de Sergipe, Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Saúde, Lagarto, Sergipe, Brasil.

c. Universidade Federal de Sergipe, Núcleo de Medicina Veterinária, Nossa Senhora da Glória, Sergipe, Brasil.

d. Universidade Federal de Sergipe Departamento de Educação em Saúde, Lagarto, Sergipe, Brasil

Corresponding author: Dr^a. Priscila Lima dos Santos

Address: Av. Governador Marcelo Déda, Universidade Federal de Sergipe, Campus Lagarto - São José, Lagarto - SE, 49400-000

E-mail: plimabio@gmail.com

ORCID: 0000-0002-8863-5718

*Artigo submetido para Cytokine, conforme documento abaixo.

De: **Cytokine** <em@editorialmanager.com>

Date: ter., 20 de dez. de 2022 12:35 PM

Subject: Cytokine Submission Confirmation

To: Priscila Santos <plimabio@gmail.com>

Title: Matrix Metalloproteinases -2 and -9 expression in dogs with visceral leishmaniasis: a systematic review

Corresponding Author: Priscila Santos

Authors: Renata Silva; Fernanda Vasconcelos; Roseane Campos; Debora Tavares

Review

Dear Santos,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Cytokine.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Editorial Manager for Cytokine as an author:

<https://www.editorialmanager.com/ycyto/>



CYTOKINE

An Official journal of the [International Cytokine & Interferon Society \(ICIS\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.1
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.5



ISSN: 1043-4666

DESCRIPTION

The journal *Cytokine* has an open access companion journal [Cytokine: X](#) which has the same aims and scope and peer-review process. To submit to *Cytokine: X* visit <https://www.editorialmanager.com/CYTOX/default.aspx>.

Cytokine will publish studies that report on the molecular biology, signal transduction, genetics, biochemistry, immunology, genome-wide association, pathobiology, diagnostic, clinical, and therapeutic applications of all known and emerging cytokines, cytotoxins, interferons, chemokines, adipokines, matrikines, hematopoietic factors, and growth factors. Studies reporting all signaling molecules from the pathogens and host-endogenous sources, metabolic products/adducts that mediate inflammation and immunity, either influence and/or operate under this broad class of "biological response modifiers" as they relate to host defenses and immune responses will be considered for publication.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

IMPACT FACTOR

2021: 3.926 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

Scopus
PubMed/Medline
Current Contents
BIOSIS Citation Index
Chemical Abstracts
Embase
Science Citation Index

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Cytokine has an open access companion journal, Cytokine: X. An official journal of the *International Cytokine and Interferon Society (ICIS)*

Cytokine is devoted exclusively to the study of the molecular biology, biochemistry, immunology, diagnostic and clinical applications of all known interleukins, hematopoietic factors, growth factors, cytotoxins, interferons, and new cytokines, *Cytokine* provides comprehensive coverage of cytokines and their receptors, 12 times a year, by publishing original high quality refereed scientific papers from prominent investigators in both the academic and industrial sectors.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

New requirements: Authors must provide the name, position, institution, and e-mail contacts of at least 5 potential reviewers, who are not the collaborators, friends and relatives, and are working at the authors' organization/institution.

Authors cannot use broad terminologies, such as Cytokines, Chicken, Human, etc., at the time of submission of their manuscripts. Such terms are not useful for identifying potential reviewers. They should provide at least 6 keywords based on the content of the study. For example, if an author is submitting a paper, "Interleukin-6 effects on arthritis and the study describes therapy with a new drug and the discovery of biomarkers for the action of the said drug" they must provide some keywords like the following: IL-6, arthritis, transcriptome, signal transduction, inhibition, B-cells, macrophage, therapeutics.

Revisions: To accelerate the speed of review and publication of data, we limit the reviews to a maximum of 3 rounds per manuscript (original submission+ 2 rounds of revision). The first revision must address all major concerns (e.g., new data and experiments are needed). After that we will allow only one more revision, that addresses any minor concerns (e.g., display of graphs, tables, missing statements and grammatical mistakes). Please revise thoroughly and check the manuscript for any mistakes before submitting the revised version.

Author response(rebuttal) to review comments must be complete. Responses such as, "Done", "Completed", "Changed", "Modified as suggested" are no longer acceptable. The rebuttal must indicate the details of all modifications made in response to each question/concern raised in the review. Such details must include the exact page numbers, paragraphs, figure or table numbers, subsection of a manuscript. They also must detail all data changes (deleted or added) to the revised manuscript and references (added or deleted), the subpanels of a figure, or the columns and rows of the revised manuscript where the new data are presented. Manuscripts not adhering to these instructions will not be considered.

Redundant publication policy: We will not consider papers if the data in your paper are already published online websites before peer-review. Papers submitted under this category, violate the norms of publication ethics, as noted in our instructions to the authors. "Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information). Since all of the data and text can be publicly viewed and directly accessible to the public at large, we will consider the data as "published." Re-submission of such data for publication in another journal is regarded as a "redundant publication."

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Author Instructions on data quality checks(December 2020)

To ensure the authenticity and reproducibility of the data, we require the authors to include the following in their papers as applicable.

Inferences drawn basing on results from a single-cell line can be misleading. Authors must ensure to reproduce their fundamental observations in 2-3 cell lines of a similar cell and tissue type. It does not mean that every experiment in the study must be repeated in all cell lines, authors are also encouraged to provide in vivo evidence for better reality check of an appropriate disease or physiology insight model.

Mycoplasma contamination of cell lines produces spurious data. Authors should certify in the Material and Methods section in written statement that cell lines in their study have been tested and found free of Mycoplasma.

A significant concern worldwide is the contamination of cell lines with other cell types or cancer types. Authors should certify that the cell lines' authenticity was verified using STTR markers, whole-genome sequencing, or an equivalent method. Disclose details of analysis in the Material and Methods section.

Several antibodies for the same protein for different applications are commercially available, e.g., Western blot, Immunoprecipitation, Immunohistochemistry, ELISA, and Chromatin Immunoprecipitation analyses. Many are not suitable for all/some of the applications. In light of these, authors should mention the Source of the antibody, Catalog number, the intent (e.g. Western) and dilutions used in their study.

All primers, their sequence and the expected PCR product sizes must be presented in a tabular format. The application for which a primer set was used (for example RT-PCR, or ChIP assay, mutational analyses) should be indicated in the table legend.

Unless there are large data sets that cannot fit into a standard figure or table, all relevant supplementary data should be part of the main paper for an easier understanding.

The importance of a protein involved in a given biological process must be validated using RNAi technology. shRNA expression vectors for many genes are commercially available. A control shRNA and a gene-specific shRNA must be included when validating the data. Exogenous add-back of knocked-down gene product could be used for better validation controls of phenotypes as well. Authors must evaluate quantitatively the efficiency of knockdown in their experimental system.

Studies using animal models should include both equal/comparable numbers of females and males to establish a global relevance to both genders. Some exceptions to this requirement are: 1) the disease is gender-specific (e.g., breast cancer in females and prostate cancer in males); and 2) the genetic model produces the disease only in a gender-specific manner. The authors should make explicit statements in case only one gender was mainly used for experimental read out. Power calculations for choosing the numbers of animals per each experimental group, Statistical methods used, the exact significance of the differences must be indicated for each experiment.

Types of paper

Review Articles are comprehensive appraisals of research and clinical outcomes in a field of current interest related to cytokine biology. All reviews are subject to the normal peer review process. Reviews are mostly invited by the *Editor-in-Chief*. Interested authors may contact our [Support Center](#) to present an outline.

Research Articles are full-length descriptions of original research. The scope may include basic science, clinical results, or applications. These manuscripts will undergo standard review.

Short Communications. These submissions will also undergo standard review. Manuscripts should not exceed 2000 words plus no more than 15 references. Your cover letter must include your word count. Results and Discussion sections may be combined. No more than 2 Figures and/or Tables should be included.

Cytokine Stimulus Cytokine stimulus articles describe significance and how it explains or contradicts the reported literature. Manuscripts should not exceed 1500 words plus one figure and a maximum of 10 references.

CYTOKINE policy on papers using cell lines In light of increasing evidence that many cell lines grown in some labs previously (Bian et al, A Combination of Species Identification and STR Profiling Identifies Cross-contaminated Cells from 482 Human Tumor Cell Lines. Sci Rep. 2017 Aug 29;7(1):9774; Ye et al, Genetic profiling reveals an alarming rate of cross-contamination among human cell lines used in China. FASEB J. 2015 Oct;29(10):4268-72) may have been cross-contaminated (<https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>), Cytokine? is concerned about the validity of the data obtained using such cell lines. Therefore, all studies that report cell line-based data should authenticate the cell lines used. Some recommended methods for authenticating cell lines can be found here: https://www.atcc.org/en/Services/Testing_Services/Cell_Authentication/Testing_Articles/PMC4907466/Authentication. The authors should make an explicit statement in the Materials and Methods section that their specific cell lines have been verified using one of the above methods.

CYTOKINE policy on papers describing Genetic Polymorphisms

1) All genetic polymorphism (such as Single Nucleotide Polymorphism) analyses must include at least 400 individual samples.

2) SNP data must be accompanied with the measurement of specific immunological parameters such as cytokine measurement, flow cytometry, cellular responses, etc., demonstrating a comparison of biological data between subjects with the genetic variant and those who lack the genetic variant being studied. Expression of cell surface receptors by flow coupled with the genetics of that receptor, or looking at TH1/TH2 skewing or cellular maturation in the setting of particular variants are recommended.

3) Papers lacking such data will not be considered for review.

Types of paper

New policies following an editorial meeting at Vienna, Oct 20, 2019:

Since many manuscripts are taking longer than the usual time to publish from the date of first submission and it is becoming increasingly difficult to recruit reviewers, the editorial board in consultation with the Editor-in-Chief, and the publisher, made the following recommendations. These guidelines will be updated at the submission website too.

Manuscripts will be reviewed to a maximum of 3 rounds (i.e., original+ 2 rounds of revision). A revision of manuscript is indicated by the letter R. After the original review is completed, reviewer comments will be provided to authors. The authors must complete all major revisions in the R1 version. Major revisions include providing data from additional experiments, data presentation and analyses, and quality of the images and the correct use of scientific English. Only minor revisions such as modification of an interpretation, missing references, replotting the data or order of figure presentation(if necessary), and inclusion of a missing control will be allowed in the R2 version. If a manuscript is not suitably modified by the R2 stage, editors can reject a further review.

Author response(rebuttal) to review comments must be complete. Responses such as, "Done", "Completed", "Changed", "Modified as suggested" are no longer acceptable. The rebuttal must indicate the details of all modifications made in response to each question/concern raised in the review. Such details must include the exact page numbers, paragraphs, figure or table numbers, subsection of a manuscript. They also must detail all data changes (deleted or added) to the revised manuscript and references (added or deleted), the subpanels of a figure, or the columns and rows of the revised manuscript where the new data are presented. Manuscripts not adhering to these instructions will not be considered.

Authors must provide the name, position, institution, and e-mail contacts of at least 5 potential reviewers, who are not the collaborators, friends and relatives, and are working at the authors' organization/institution.

Authors cannot use broad terminologies, such as Cytokines, Chicken, Human, etc., at the time of submission of their manuscripts. Such terms are not useful for identifying potential reviewers. They should provide at least 6 keywords based on the content of the study. For example, if an author is submitting a paper, "Interleukin-6 effects on arthritis and the study describes therapy with a new drug and the discovery of biomarkers for the action of the said drug" they must provide some keywords like the following: IL-6, arthritis, transcriptome, signal transduction, inhibition, B-cells, macrophage, therapeutics.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of competing interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of competing interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. **Note: Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.** If there are no interests to declare, please choose the first option in the template. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical

and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submission address

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/YCYTO/default.aspx>

Referees

Authors must submit the names of 5 potential referees with relevant expertise, but not belonging to their home institutions, who are not the collaborators, friends, or relatives. The information should include name, position, institution, and e-mail address. Referees working in countries like the USA, Canada, Japan, Europe, Korea, China, India and Australia with expertise in the authors' work may be nominated.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final.

Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups.

[More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

Manuscripts will be reviewed to a maximum of 3 rounds (i.e., original+ 2 rounds of revision). A revision of the manuscript is indicated by the letter R. After the original review is completed comments will be provided to authors. The authors must complete all major revisions in the R1 version. Major revisions include providing data from additional experiments, data presentation and analyses, and the quality of the images and the correct use of scientific English. Only minor revisions such as modification of an interpretation, missing references, replotting the data or order of figure presentation(if necessary), and inclusion of a missing control will be allowed in the R2 version. If a manuscript is not suitably modified by the R2 stage, editors can reject a further review. Author response(rebuttal) to review comments must be complete. Responses such as, ?Done?, ?Completed?, ?Changed?, ?Modified as suggested? are no longer acceptable. The rebuttal must indicate the details of all modifications made in response to each question/concern raised in the review. Such details must include the exact page numbers, paragraphs, figure or table numbers, the subsection of a manuscript. They also must detail all data changes (deleted or added) to the revised manuscript and references (added or deleted), the subpanels of a figure, or the columns and rows of the revised manuscript where the new data are presented. Manuscripts not adhering to these instructions will not be considered.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. [More information.](#)

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. Authors cannot use broad terminologies, such as Cytokines, Chicken, Human, etc., at the time of submission of their manuscripts. Such terms are not good for identifying potential reviewers. They should provide at least 6 keywords based on the content of the study. For example, if an author is submitting a paper, ? Interleukin-6 effects on arthritis and the study describes therapy with a new drug and the discovery of biomarkers for the action of the said drug? they must provide some keywords like the following: IL-6, arthritis, transcriptome, signal transduction, inhibition, B-cells, macrophage, therapeutics. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry](#) for further information.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with the Authors.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

[7] E. Coon, M. Berndt, A. Jan, D. Svyatsky, A. Atchley, E. Kikinzon, D. Harp, G. Manzini, E. Shelef, K. Lipnikov, R. Garimella, C. Xu, D. Moulton, S. Karra, S. Painter, E. Jafarov, S. Molins, *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*, Zenodo, March 25, 2020. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>

APÊNDICE

B) ARTIGOS PRODUZIDOS DURANTE O MESTRADO

1. Association between interleukin 10 (IL-10) polymorphisms and leishmaniasis progression: a systematic review and meta-analysis

*Artigo publicado no Scientific Reports

SILVA, R. R. et al. *Sci Rep* **12**, 11136 (2022).

Doi: 10.1038/s41598-022-15377-2

2. Basic sanitation: a new indicator for the spread of COVID-19?

*Artigo publicado no Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

SILVA, R. R. et al. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2021 Jul 1;115(7):832-840.

Doi: 10.1093/trstmh/traa187

3. Coronavirus disease and basic sanitation: too early to be worried?

*Artigo publicado no Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Silva, R. R. et al. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 53 • 2020.

Doi: 10.1590/0037-8682-0345-2020

4. Percepção de estudantes do curso de Medicina Veterinária sobre a relação dos maus-tratos aos animais e a violência doméstica

*Artigo publicado no jornal de Medicina Veterinária (UFRPE)

Silva, A. S. et al. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 16, n. 4, p. 264-271, 2022.

5. Sensibilização de crianças sobre tutoria responsável em cães e gatos

*Artigo publicado na Pubvet

SILVA, R. R. et al. PUBVET v.14, n.7, a620, p.1-7, Jul., 2020.

Doi: 10.31533/pubvet.v14n7a620.1-7

6. O cão não é o vilão: Vamos falar sobre leishmaniose?

*Artigo publicado na Pubvet

SILVA, A. S. et al. PUBVET v.14, n.7, a601, p.1-7, Jul., 2020.

Doi: 10.31533/pubvet.v14n7a601.1-7

7. Ensino de bem-estar animal: uma experiência sobre ações de combate aos maus-tratos animais no âmbito escolar

*Artigo publicado na Brazilian Journal of Development

SILVA JR, A. et al. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 43955-43968, 2021.

Doi: 10.34117/bjdv7n5-017

8. Abandono de animais: um problema de saúde pública em região do nordeste, Brasil

*Artigo publicado na Brazilian Journal of Development

SILVA, A. S. et al. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 25666-25680, 2021.

Doi: 10.34117/bjdv7n3-324