

**Universidade Federal de Sergipe
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Doutorado em Ciências da Saúde**

ROSEANE NUNES DE SANTANA CAMPOS

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL
EM SERGIPE E LIBERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EM HUMANOS E CÃES NA INFECÇÃO POR
*LEISHMANIA INFANTUM***

ARACAJU

2016

Roseane Nunes de Santana Campos

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL
EM SERGIPE E LIBERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EM HUMANOS E CÃES NA INFECÇÃO POR
*LEISHMANIA INFANTUM***

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito para à obtenção do grau de
Doutor em Ciências da Saúde.

Aracaju

2016

Roseane Nunes de Santana Campos

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE VISCERAL
EM SERGIPE E LIBERAÇÃO DE REDES EXTRACELULARES DE
NEUTRÓFILOS EM HUMANOS e CÃES NA INFECÇÃO POR
*LEISHMANIA INFANTUM***

Tese apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal de
Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de
Doutora em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida

1º Examinador: Profª. Drª. Tatiana Rodrigues de Moura

2º Examinador: Profª. Drª. Cristiane Bani Corrêa

3º Examinador: Prof. Dr. Gabriel Isaias Lee Tuñon

4º Examinador: Prof. Dra. Jamile Prado dos Santos

DEDICATÓRIA

À minha filha Clarice e aos meus animais pela
demonstração da mais pura inocência e por
tanto amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me proporcionar força e coragem de seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos;

A meus pais Enaldo e Rutelma, obrigada por me oferecer uma educação de boa qualidade e pelo apoio sempre. Agradeço também a meus queridos irmãos Edinho e Élder. Vocês são muito importantes para mim! Amo vocês!!

A minha pequena família, meus amores Clarice e Fabrício, obrigada pelo carinho e por ter paciência nessa fase da minha vida. Amo vocês!!

Agradeço imensamente ao meu orientador professor Dr. Roque Pacheco que mesmo sem me conhecer confiou no meu trabalho e me ajudou bastante. Obrigada pelos conselhos e por toda atenção. Tenho muita admiração por ser essa pessoa tão dedicada ao Hospital Universitário, aos pacientes, ao laboratório e a pesquisa. Agradeço a professora Amélia por todo apoio científico e por todo auxílio na minha vida pessoal, obrigada por me mostrar um exemplo de profissionalismo e bondade. Vocês formam um casal muito especial!

À professora Tatiana Moura por sempre estar disposta a contribuir valiosamente com a pesquisa e pelos conselhos, muito obrigada!! A professora Patrícia de Souza pelo apoio no projeto inicial e aos professores do grupo de pesquisa: Cristiane Bani, Shirlei Octacílio, Nalu Peres e Diego Tanajura obrigada pela contribuição de cada um de vocês na pesquisa.

Aos parceiros deste trabalho: grupo do laboratório Dra Maria Elvira da UFRJ e a aluna Natália Rochael por me ajudar nos experimentos e por me receber no Rio de Janeiro com tanto carinho. Agradeço também ao Dr. Antônio Pacheco e ao aluno Sanmy do grupo de pesquisa em geomorfologia e geoprocessamento aplicados às geociências pelo auxílio na análise espacial dos dados de leishmaniose.

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Molecular que foram essenciais neste doutorado, sem vocês essa tese não estaria pronta. Agradeço imensamente a Thaís, Lucas e Márcio pela ajuda especial nesta pesquisa, também sou muito grata a Fabrícia, Michele, Ricardo, Rodrigo, Luana, Lays, Priscila, Aline Barreto, Alynne Karen, Mônica, Cecília e Meirielly, obrigada a todos pelos ensinamentos, convivência e conversas. Agradeço também aos funcionários da patologia: Rosa, Solange, Jô, Tati, Ana e Sérgio.

Aos professores e amigos do departamento de medicina veterinária da UFS: Jamile Prado, Gabriel Lee e Patrícia Meira vocês foram de grande inspiração para minha formação profissional, obrigada pelo apoio sempre. Agradeço também ao professor Hermínio da Faculdade Pio Décimo, sempre demonstrando muita atenção comigo e com minha família.

Aos servidores do Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju, principalmente a Sr. Wilson, Aparecido, Celiângela, Cassandra, Seu Antônio e Dênia. Obrigada pela ajuda de vocês!!

À minha sogra Clese, pela ajuda diária, a meu sogro Wellington, minha sogra do coração Elisdete e as minhas queridas amigas Cyntia, Thássia, Márcelia, Bárbara, Fabiana, Laura, Jamile, Margarida, Nilza, Edina, Ana Nery e Dra Eliete. Obrigada pelas palavras de apoio e incentivo e por estarem sempre presentes em minha vida, mesmo muitas vezes estando tão ocupada com o doutorado.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade de tempo e sugestões para melhoria do trabalho.

À CAPES, CNPq, FAPITEC/SE e UFS pelo apoio material e financeiro.

RESUMO

Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral em Sergipe e liberação de redes extracelulares de neutrófilos em cães e humanos na infecção por *Leishmania infantum*. Roseane Nunes de Santana Campos. Aracaju-SE, 2016.

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença infecciosa grave e está em crescente expansão geográfica e urbanização. Os padrões de transmissão da doença são alterados devido às ações antrópicas. O cão é considerado o principal reservatório do parasito. O desenvolvimento da doença depende em parte do sistema imune do hospedeiro. Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos e importantes no controle da LV. Estas células têm um mecanismo adicional para eliminar microorganismos que ocorre com a liberação de redes extracelulares (Neutrophil Extracellular Traps -NETs). Este trabalho teve dois objetivos gerais, sendo o primeiro um estudo epidemiológico da LV em Sergipe e o segundo a avaliação da formação de NETs em neutrófilos de humanos e cães com LV estimulados com *L. infantum*, assim essa tese foi dividida em capítulos, para melhor compreensão. Na avaliação epidemiológica foram utilizados dados do SINAN e inquéritos sorológicos caninos do Zoonoses de Aracaju-SE. Foi realizada uma análise descritiva dos dados e construção de mapas de distribuição da doença. Em Sergipe e Aracaju de 2008 a 2014 o coeficiente de incidência em humanos com LV aumentou e o percentual de cães infectados dobrou na capital. A porcentagem de casos positivos para LV humana por sexo, de acordo com a faixa etária do paciente, mostrou que acima de 15 anos a doença acomete mais o sexo masculino. A análise de distribuição espacial permitiu visualizar áreas da cidade com maior concentração de LV humana e canina. Os bairros situados em áreas com situação econômica desfavorável ou em zonas de expansão foram os que apresentaram maior incidência da doença em humanos e cães. Os resultados demonstram que apresenta caráter endêmico para a LV humana e canina. Com a finalidade de avaliar a formação de NETs foram utilizados grupos humanos: Controle; Tratados LV e DTH positivos. Os cães foram divididos em: Controle; Assintomáticos e sintomáticos. Foram isolados neutrófilos de pacientes com LV do Hospital Universitário/UFS e de cães diagnosticados com LV pelo Zoonoses foram incubadas, com e sem estímulo do parasito e NETs medidas no sobrenadante das culturas após 90 minutos. A Carga parasitária determinada após 24 e 48 horas de interação com neutrófilos tratados, através da técnica de diluição limitante. Na avaliação da indução de NETs, os neutrófilos de humanos e cães com LV liberam maior quantidade de NETs quando estimulados com *L. infantum*. Quando comparado entre os grupos indivíduos DTH positivos liberam menor quantidade de NETs estimulados ou não com o parasito. Em 24 e 48 horas indivíduos tratados com LV apresentam maior carga parasitária e os DTH positivos demonstraram menor quantidade do parasito do que os outros grupos testados. Os cães com sinais de LV liberam maior quantidade de NETs quando estimulados com *L. infantum* e apresentam maior carga parasitária após 48 horas. Observa-se que a liberação de NETs e o controle da carga parasitária através dos neutrófilos variam de acordo com a forma clínica da LV, em humanos e cães.

Descritores: Leishmaniose visceral; Perfil epidemiológico; *Canis familiaris*; Armadilhas extracelulares.

ABSTRACT

Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Sergipe and release of extracellular networks of neutrophils in dogs and humans on infection with *Leishmania infantum*. Roseane Nunes de Santana Campos. Aracaju- SE, 2016.

Visceral Leishmaniasis (VL) is a serious infectious disease and is increasing geographical expansion and urbanization. patterns of transmission of the disease are altered due to human actions. The dog is considered the main reservoir of the parasite. The development of the disease depends in part on the host immune system. Neutrophils are considered the first line of defense against pathogens and important agents in the control of LV. These cells have an additional mechanism to eliminate microorganisms that occur with the release of extracellular networks (Neutrophil Extracellular Traps -NETs). This work has two overall objectives, the first being an epidemiological study of LV in Sergipe and the second evaluation of NETs formation in human neutrophils and dogs with LV stimulated with *L. infantum*, so this thesis was divided into chapters, for better understanding. Epidemiological evaluation were used SINAN data and serosurveys canines Zoonosis Aracaju-SE. A descriptive analysis of the data and construction of distribution maps of disease was performed. Sergipe Aracaju and from 2008 to 2014 the incidence rate in humans with LV increased and the percentage of infected dogs has doubled in the capital. The percentage of cases positive for human VL by sex, according to the age of the patient group, showed that over 15 years the disease affects more males. The spatial distribution analysis allowed to view areas of the city with the highest concentration of human and canine VL. The neighborhoods located in poor areas or growing areas were those with the highest incidence of the disease in humans and dogs. The results show that presents endemicity for human and canine VL. In order to evaluate the formation of NETs were used human groups: Control; LV treated and positive DTH. The dogs were divided into control; Asymptomatic and symptomatic. Neutrophils were isolated from patients with LV University Hospital / UFS and dogs diagnosed with VT by Zoonoses were incubated with and without stimulation of parasite and NETs measures in the supernatant of the cultures after 90 minutes. The parasitic load determined after 24 and 48 hours of interaction with neutrophils treated by the limiting dilution technique. In the evaluation of NETs induction of human neutrophils and release dogs with LV greater amount of NETs when stimulated with *L. infantum*. When compared between the groups individuals positive DTH release fewer NETs stimulated or not with the parasite. At 24 and 48 hours LV treated subjects have a higher parasite load and showed positive DTH fewer parasite than the other groups tested. Dogs with LV release signals greater amount of NETs when stimulated with *L. infantum* and have higher parasitic load after 48 hours. It is observed that the release of NETs and control of parasitic load by neutrophils varies according to the clinical form of the LV, in humans and dogs.

Key words: Visceral leishmaniasis; epidemiological profile; *Canis familiaris*; Extracellular Traps.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BOD	Biochemical Oxygen Demand (Incubadora para demanda bioquímica de oxigênio)
CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
CD	Células dendríticas
DTH	Delayed Type Hypersensitivity (Hipersensibilidade tardia)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção enzimática)
FELV	Vírus da Leucemia Felina
HU	Hospital Universitário
IFI	Imunofluorescência indireta
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon gama
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
NET	Neutrophil Extracellular Traps – Redes extracelulares de neutrófilos
NK	Natural killer
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle médium (meio de cultura)
PAMPS	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
rcf	Força centrífuga relativa
SIG	Sistema de Informação Geográfica
SINAN	Sistema de Notificação de Agravos de Notificação
SRD	Sem Raça Definida
Th1	Linfócitos T helper tipo 1
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral	15
2.3 Reservatórios	16
2.4 Aspectos epidemiológicos	17
2.4.1 Geoprocessamento	19
2.5 Formas clínicas da LV em humanos	20
2.6 Leishmaniose visceral em cães	21
2.7 Aspectos imunológicos na leishmaniose	22
2.8 Neutrófilos na leishmaniose visceral	24
2.9 Redes extracelulares de neutrófilos (NETs).....	26
CAPÍTULO 2	28
1. OBJETIVOS	29
1.1 Geral.....	29
1.2 Específicos	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.1 Desenho dos objetivos 1 e 2	30
2.2 Área do estudo.....	30
2.3 Coleta de dados	31
2.4 Análise estatística dos dados descritivos	31
2.5 Análise espacial	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Resultados do Objetivo 1 e 2	33
<i>Artigo 1</i>	33
4. DISCUSSÃO	41

5. CONCLUSÃO	44
CAPÍTULO 3	45
1. OBJETIVOS	46
1.1 Geral	46
1.2 Específicos	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS	47
2.1 Desenho dos objetivos 1; 2; 3; 4 e 5	47
2.2 Grupos experimentais	47
2.2.1 Seleção dos humanos	47
2.2.2 Seleção dos cães	48
2.3 Separação dos neutrófilos	49
2.4 Parasitos	49
2.5 Estímulo dos neutrófilos com parasitos	50
2.6 Quantificação das NETs	50
2.7 Carga parasitária	50
2.8 Análise estatística	50
2.9 Aspectos éticos	51
3. RESULTADOS	51
3.1 Resultados do objetivo 1	51
3.2 Resultados dos objetivos 2 e 3	55
3.3 Resultados dos objetivos 4 e 5	59
4. DISCUSSÃO	61
5. CONCLUSÃO	66
6. PERSPECTIVAS	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	89

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Com este trabalho propõem-se uma avaliação epidemiológica da LV em Sergipe e município de Aracaju e análise da formação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) em humanos e cães com LV provenientes do estado de Sergipe. Assim a tese será dividida em três capítulos. O primeiro capítulo é composto pela introdução e revisão de literatura sobre o assunto, no segundo descrito a epidemiologia da LV em Sergipe e Aracaju e no terceiro capítulo da tese avaliado como será a liberação de NETs e o controle do parasito por neutrófilos de humanos e cães com leishmaniose visceral.

A Leishmaniose visceral (LV) nas Américas é uma zoonose causada pelo protozoário *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*) (1–4). É transmitida através do repasto sanguíneo por fêmeas de flebótomos do gênero *Lutzomia spp.* Apresenta uma alta mortalidade, se não tratada precocemente (5,6) Esta é uma patologia de grande importância para saúde pública no Brasil (3,7).

A LV é considerada uma doença reemergente, devido a alterações no ciclo epidemiológico da doença. Estudos têm demonstrado aumento da incidência em áreas não tradicionalmente endêmicas. Vários fatores epidemiológicos podem explicar este fato: áreas periurbanas de ocupação recente, urbanização inadequada, processo de migração constante, desmatamento acentuado e a invasão de florestas residuais com adaptação dos flebótomos a esses locais (8,9)

Em 2014, segundo dados do Ministério da saúde, a região Nordeste foi a que apresentou maior quantidade de casos novos de leishmaniose, sendo 2.022 casos. Neste mesmo ano o Estado de Sergipe notificou 61 casos novos de LV, sendo a capital Aracaju responsável pela maior parte do número de casos da doença, tendo 31 casos da doença notificados e confirmados (10).

Com o processo de urbanização da doença, o cão (Sub-espécie: *Canis lupus familiaris*) é considerado o reservatório mais importante do parasito (11,12), pois são altamente suscetíveis à infecção, apresentam intenso parasitismo na pele e são animais que convivem muito próximo aos seres humanos (13). Estudos epidemiológicos mostraram que os casos de LV em cães ocorrem antes dos casos humanos (14), estes animais desempenham um papel fundamental na introdução da leishmaniose em novas áreas (15,16).

A leishmaniose poderá se apresentar nas formas: assintomáticas e sintomáticas em humanos e cães (17). Segundo (3,18) para eliminação efetiva do protozoário no hospedeiro vertebrado existe uma ação coordenada do sistema imunológico, aspectos genéticos do

indivíduo acometido e dos mecanismos de evasão do parasito. Assim o estabelecimento da doença será parcialmente decidido pela resposta imune do hospedeiro. Sendo componentes importantes para o controle da *Leishmania* a imunidade inata e adaptativa do indivíduo infectado.

Os neutrófilos são as primeiras células que chegam ao local da injúria provocada pelo repasto sanguíneo do flebótomo. O principal objetivo destas células é reparar os danos teciduais, sendo também capaz de fagocitar os parasitos inoculados pelo inseto vetor (19). No sistema imune os neutrófilos apresentam várias funções como capacidade de influenciar a resposta imune inata e adaptativa e produção de um grande número de citocinas e quimiocinas (20). De modo geral, estes granulócitos tentam eliminar os microorganismos por fagocitose, degranulação (21) e por um novo mecanismo microbicida como a liberação de redes extracelulares dos neutrófilos (NETs) (22).

As NETs são estruturas complexas compostas por “filamentos” de aproximadamente 15 nm de diâmetro, formados por DNA, histonas e proteínas granulares (22–24). Estes componentes atribuem as NETs uma capacidade de degradar muitos fatores de virulência dos patógenos (22). Essas redes são capazes de se ligar às bactérias, fungos, protozoários e também estão em grande quantidade em locais de inflamação (22,25,26).

O mecanismo microbicida de liberação das NETs denominado de NETose, foi demonstrado por (22) e descrito na presença de bactérias como *Staphylococcus aureus* (27), na inflamação (23), mastite bovina ocasionada por *Escherichia coli* (28) como mecanismo de resistência para aves (29), em peixes (30), em gatos quando portadores do vírus da leucemia felina (31) e recentemente em cães com anemia hemolítica imunomediada ((32).

Guimarães-costa et al., 2009 demonstraram que promastigotas de *Leishmania amazonensis* induzem a formação de redes extracelular de neutrófilos (NETs) e são mortas por estas redes.

Este trabalho apresenta uma importância para a LV no Brasil e no mundo, já que estudaremos a epidemiologia da doença em Aracaju e Sergipe, sendo relevante informar que o estado e município já são considerados endêmicos para esta patologia e que estudos imunológicos com humanos e cães em áreas afetadas por LV são necessários para obtenção de resultados explicando quais mecanismos celulares os indivíduos não afetados pela doença utilizam para adquirir resistência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose visceral

As doenças parasitárias afetam de forma considerável a população mundial e dentre elas, as leishmanioses têm um grande impacto na saúde pública (33). A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada (3,7,34).

As leishmanioses são causadas por protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*, a família Tripanossomatidae e a ordem Kinetoplastida, sendo transmitidas ao homem através da picada de insetos flebotomíneos infectados (3,4,35).

A leishmaniose visceral (LV) tem como agente etiológico causador da doença no Brasil a espécie *Leishmania infantum* e o vetor encontrado com maior frequência o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* (33,36,37).

Os flebótomos vivem em ambientes variados, as formas imaturas se desenvolvem em ambientes terrestres úmidos, ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa, os adultos apresentam atividade crepuscular e noturna e as fêmeas necessitam realizar repasto sanguíneo para maturação ovariana (38) Estes insetos se adaptaram ao ambiente domiciliar e peridomiciliar, tornando-se o mais importante vetor da leishmaniose visceral nas Américas, sendo sua presença considerada um elemento essencial na cadeia de transmissão da doença (39).

Humanos são os reservatórios para LV na Índia e em partes da África. Na Américas Latina esta doença é zoonótica e os parasitos são transmitidos para humanos pela picada de um flebotomíneo que se alimentou de sangue de mamíferos domésticos (cão doméstico) ou selvagens (raposas, marsupiais) infectados (40).

2.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

A *Leishmania* apresenta ciclo biológico heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. São microorganismos intracelulares obrigatórios, com uma forma aflagelada tissular amastigota que se multiplica em fagossomos de macrófagos de hospedeiros mamíferos e uma forma flagelada denominada promastigota (41).

LV é uma enfermidade metaxênica, na qual o agente passa por transformações no organismo do vetor, neste caso o flebotomíneo (37).

O ciclo biológico da LV inicia quando uma fêmea de flebotomíneo, que ao realizar o repasto sanguíneo, em um animal infectado, ingere as formas amastigotas presentes nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (42). No interior do trato digestivo do flebótomo, a forma amastigota do protozoário evolui para a forma flagelar denominada promastigota. No hospedeiro invertebrado estas formas promastigotas se diferenciam em formas infectantes, promastigotas metacíclicas. Assim, o ciclo da *Leishmania* no inseto se completa em torno de sete dias (43).

A transmissão ocorre para o homem e para os hospedeiros mamíferos durante o repasto sanguíneo das fêmeas desses insetos quando infectadas. O *Lutzomia* regurgita formas promastigotas metacíclica na derme dos hospedeiros vertebrados. Após inoculação, estas formas são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos da pele. No interior dos macrófagos se modificam para formas aflagelados e ovóides conhecidas como amastigotas (44).

As amastigotas multiplicam-se intensamente até o rompimento dos macrófagos. O processo ininterrupto de divisão das amastigotas determina o aumento de parasitos dentro dos macrófagos, até que esses sejam lisados, com liberação das amastigotas que infectarão novas células. Desta forma, as amastigostas são liberadas das células e fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea. Além disso, podem ser ingeridas durante novo repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo, reiniciando o ciclo (44).

2.3 Reservatórios

A LV é considerada zoonótica no Brasil (45). Para esta doença existem hospedeiros vertebrados naturais que são os mamíferos das ordens: Edentata (tatus, preguiças), Carnívora (cães, gatos), Rodentia (ratos), Primatas (humanos, macacos), Marsupialia (gambás) e Perissodactyla (cavalos) (40,46).

A alta ocorrência da infecção tem sido relatada em cachorro do mato, gambás, gato doméstico, rato preto e já foi confirmado que estes animais podem infectar flebótomos, porém para afirmar que estas espécies podem transmitir a LV e são reservatórios da doença, são necessários mais estudos (43).

Tunon et al., 2015 demonstraram que os macrófagos da espécie *Cerdocyon. thous*, conhecida popularmente como cachorro-do-mato controlam rapidamente a infecção por *Leishmania* quando comparado a cães. Assim é provável que estes animais selvagens não sejam

importantes na manutenção da transmissão do parasito para o flebótomo e não participem tão efetivamente do ciclo epidemiológico da doença como o cão doméstico.

Com o crescente processo de urbanização, os animais domésticos têm assumido um importante papel como reservatório da infecção no ciclo de transmissão da leishmaniose. Cães são encontrados naturalmente infectados por diferentes espécies de *Leishmania* e tem sido apontado como o principal reservatório de *L. infantum* na China, na bacia do Mediterrâneo e nas Américas (46,48). No Brasil, o cão também é considerado o principal reservatório doméstico da leishmaniose visceral (49).

Os cães infectados desempenham um papel fundamental na transmissão da LV aos seres humanos, já que a doença nos cães precede a dos humanos e consequentemente colaboram para a disseminação da LV (50). Este animal doméstico é altamente susceptível a infecção, apresenta intenso parasitismo cutâneo e possuem uma estreita relação com o homem, tanto em áreas rurais como urbanas (11,51,52). A alta taxa reprodutiva dos cães, juntamente com o crescente abandono destes animais, a maior adaptação e dispersão do vetor ao ambiente urbano, proporcionam condições para que ocorra uma epidemia desta doença (9,53).

2.4 Aspectos epidemiológicos

A LV apresenta quadros graves de endemias e epidemias, havendo uma propagação da doença por vários estados do Brasil que antes não possuíam casos notificados de pessoas e animais (3). A distribuição geográfica da LV possui íntima relação com movimentos populacionais, disponibilidade de reservatórios, modificações ambientais baixa condição econômica e distribuição do vetor (9).

Esta doença tem demonstrando um nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nos últimos anos nas áreas onde não ocorria tradicionalmente. Encontra-se em franca expansão e em processo crescente de urbanização, devido ações antrópicas que resultaram em alterações ambientais e paisagísticas, como processo de urbanização desordenada e a alta densidade populacional(54).

Um total de 98 países nos 5 continentes são endêmicos para leishmaniose. Foi reportado 58.000 casos por ano de LV no mundo, sendo que mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do sul, Etiópia e Brasil (35). O Brasil é responsável por mais de 90% de leishmaniose visceral nas américas (55), entre os anos de 2009 a 2013 apresentou uma incidência média de mais de 3.000 novos casos por ano, sendo a região

nordeste responsável por mais de 2.000 casos (56). A LV está apresentando uma expansão das áreas rurais para as urbanas em muitas regiões do Brasil (57).

Em Teresina foi identificado a primeira epidemia urbana de LV com mais de 1.000 casos humanos notificados entre 1981 e 1986 (58). A LV é endêmica em várias cidades do Nordeste, em São Luiz (MA) a taxa de incidência aumentou de 1,7 casos por 100.000 habitantes com LV para 29,6 casos por 100.000 habitantes, do ano de 2007 para 2009 (59). No estado do Ceará (CE) entre 2007 a 2011, foram notificados 598 casos da doença (60), em Mossoró (RN) foram notificados 206 humanos com LV de 2006 a 2012 (51),

A LV é um problema de saúde pública no município de Aracaju, com um coeficiente de incidência elevada de casos humanos, alta taxa de mortalidade e distribuição generalizada em vários ambientes da cidade (61). Casos humanos de LV são notificados em Sergipe desde 1934 a doença atinge todas as regiões do Estado (62). No ano de 2014, Sergipe apresentou 61 casos de humanos notificados com LV, sendo que desses casos 31 indivíduos residiam em Aracaju (56).

Assim, o conhecimento das áreas urbanas e socioambientais de regiões afetadas por LV é um importante parâmetro a ser considerado em estudos de epidemiologia da doença (57). Silva et al., 2005 afirmam que nas epidemias urbanas de LV, a presença de cães infectados tem sido constantemente relatada.

Os cães infectados com Leishmaniose Visceral Canina (LVC) são importantes na manutenção da doença, sendo a doença nos cães considerada mais importante que a LV no humano, pois estes animais são responsabilizados pela dispersão da doença. Além disso, a realização de inquéritos sorológicos caninos é fundamental na detecção de focos silenciosos da leishmaniose e na delimitação de regiões ou setores de maior ocorrência da doença (50,53,64).

Estudos epidemiológicos da LV servem para medir a frequência, descrever a distribuição das doença conforme fatores de risco e assim planejar serviços e programas de saúde (64). Dados ambientais, demográficos e estatísticos sobre a ecologia de LV podem fornecer a base para o desenvolvimento de modelos de risco, preditivos espaciais e o sistema de informação geográfica (SIG) pode ser aplicado para mapeamento dos riscos e identificação de áreas endêmicas da doença (65).

Dessa forma, a demonstração dos aspectos epidemiológicos e a análise espacial da LV em Aracaju serão importante para ações futuras dos serviços de saúde, centro de zoonoses do município e como observação geral de locais importantes para reprodução de flebótomos e assim obtenção dos parâmetros comuns de áreas propícias para disseminação do parasito e da doença.

2.4.1 Geoprocessamento

O termo geoprocessamento se refere a um conjunto de técnicas de processamento de dados que reúne ferramentas de digitalização da informação, cartografia automatizada, metodologias, conversão e gerenciamento de banco de dados, modelagem digital, localização, processamento de imagens, estatísticas espaciais e informação geográfica em uma base de dados georreferenciada, a partir de programas computacionais (66).

O uso do geoprocessamento em conjunto com imagens de satélite são ferramentas extremamente úteis porque permitem maior dinamismo na geração de informações, permitindo maior produtividade, atualização rápida e versatilidade na manipulação de dados (67) Essas técnicas também têm sido utilizados em estudos epidemiológicos de doenças endêmicas transmitidas por vetores, ou concentrando-se em determinar áreas de risco de transmissão a distribuição espacial e temporal ou incidência da doença (66,68).

O desenvolvimento de tecnologias de mapeamento digital abriu novos caminhos para investigações epidemiológicas. Na saúde pública, os mapas georreferenciados têm sido utilizados, frequentemente, na avaliação minuciosa da saúde populacional, pois permitem observar a distribuição geográfica da doença (66).

Estudos sobre aglomerados de casos de doenças envolvem a identificação de áreas com maior risco de transmissão no espaço e no tempo ou a avaliação de risco elevado em torno de fontes potenciais de perigo (69). A análise desses aglomerados é um tipo de análise espacial que tem como objetivo observar diferenças no padrão de distribuição

O Sistema de Informação Geográfica (SIG) é classificado como a mais completa das técnicas de geoprocessamento. É descrito como um sistema de computadores, que envolve específicos “softwares”, para serem utilizados no armazenamento, captura, manipulação e análise de dados georreferenciados que podem ser relacionadas entre si e com outros dados não espaciais de um banco de dados (BURSTEIN, 2002).

O SIG pode utilizar técnicas para mapear e analisar a distribuição de eventos relacionados à saúde. Os princípios da multidisciplinaridade do SIG vêm sendo largamente empregados no estudo das inter-relações dos vários determinantes da frequência e distribuição de doenças numa população, perfil epidemiológico de eventos e processos de saúde, nas atividades de urbanização, no meio-ambiente e na avaliação dos serviços de saúde (64,65).

Margonari et al., 2006 e Barbosa et al., 2014 enfatizaram a importância da utilização de áreas geográficas como unidades de observação no estudo ecológico da LV e com base nos

resultados foi observado associações positivas entre incidência de LV e a residência em locais com baixo nível sócio-econômico ou áreas com fragmentos de vegetação verde.

Técnicas de geoprocessamento são importantes para demonstrar o padrão da LV de humanos e cães em regiões ou municípios. Esse tipo de estudo direciona a implementação de medidas de controle e prevenção da leishmaniose visceral de forma mais eficaz (59,67,72).

2.5 Formas clínicas da LV em humanos

A LV em humanos pode apresentar-se sob três formas clínicas distintas: assintomática, oligossintomática e clássica (73). A apresentação da forma clínica da doença está diretamente associada à espécie do parasito e a resposta imune do hospedeiro, que por sua vez é influenciada por fatores genéticos e nutricionais (41,74).

Na LV assintomática não há evidência de manifestações clínicas da doença, sendo que esta forma acomete comumente pacientes moradores de áreas endêmicas da doença. Estas apresentações subclínicas são detectadas na maioria das vezes em estudos epidemiológicos. O diagnóstico é realizado pela intradermoreação de Montenegro e os indivíduos que desenvolvem uma hipersensibilidade tardia tipo I são denominados DTH positivos e são considerados como resistentes a doença (75,76). A maioria das infecções por leishmaniose se resolvem espontaneamente. Os indivíduos DTH+ não apresentam sintomas clínicos da doença e estão imunes a uma reinfecção subsequente (77).

Na forma oligossintomática o quadro clínico é discreto com manifestação de febre. Na maioria dos casos há um leve aumento no tamanho do fígado e o baço não é palpável. Em geral, apresentam hemograma e provas de função hepática pouco alteradas (78).

O perfil clínico da forma clássica da doença é caracterizada pela presença de febre, anorexia, caquexia e hepatoesplenomegalia, além de alterações hematológicas tais como anemia, leucopenia e trombocitopenia (73,78). Além disso, neutropenia induzida por LV tem sido descrita clinicamente, sendo um fator de risco para infecções secundárias em doentes com LV (79). Costa et al., 2010 relatam que a neutropenia é provavelmente relacionada a depuração aumentada de granulócitos no baço e a esplenomegalia é um sinal clássico da LV, que pode levar a queixa de dor e distensão abdominal e tem sido observado em 94 a 95% dos casos de LV.

De um modo geral, os principais órgãos acometidos pela LV são: baço, fígado, pulmões e rins. Em pacientes não tratados, a doença progride e pode atingir altos níveis de mortalidade.

Embora as alterações provocadas pelo parasito possam determinar a morte dos pacientes, a mortalidade é frequentemente atribuída a infecções secundárias (5).

2.6 Leishmaniose visceral em cães

A leishmaniose visceral canina (LVC) é causada no Brasil pelo protozoário *Leishmania infantum*. É uma ameaça zoonótica a doença causada em humanos (81).

Cães com LVC podem apresentar a doença na forma sintomática, apresentando sinais clínicos e assintomáticos quando estão sorologicamente positivo para doença, mas não apresentam sinais de leishmaniose (82,83). Existem discussões para que a LVC seja sendo dividida em doença clínica e não clínica, já que os cães não apresentam sintomas e sim sinais clínicos, porém a nomenclatura ainda mais utilizada é de LVC sintomática e assintomática (15,84).

Os cães assintomáticos são diferentes dos DTH positivos humanos, pois os humanos com reação ao teste são considerados como resistentes a doença e os cães assintomáticos não apresentam sinais clínicos no momento, mas no futuro podem desenvolver a doença, além disso os cães assintomáticos não são considerados animais saudáveis (85). Segundo Laurenti; Marcondes, 2014 cães assintomáticos também apresentam alta infectividade dos flebótomos.

No Brasil ainda não foi observado cães resistentes a doença em nenhuma raça, porém na Europa já foi relatado uma raça de cão que apresenta resistência a LV, como por exemplo a *Ibizan hounds* (16).

Os sinais clínicos e anormalidades clínico-patológicas ocorrem por causa dos mecanismos patogênicos envolvidos no parasito e a resposta imunitária particular produzida no hospedeiro (84,87). Os principais sinais clínicos dos cães são: perda de peso, letargia, atrofia muscular, anemia, linfadenomegalia, esplenomegalia, epistaxe, diarreia, disfunção hepática e /ou renal, lesões oculares, poliartrite, onicogribose e lesões na pele (17,84).

O cão desenvolve muitas lesões cutâneas, principalmente descamações, eczema, ulcerações na pele localizadas frequentemente na orelha, focinho, cauda e articulações, além disso o pelo do animal fica opaco (76). Na fase avançada observa-se onicogribose, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, alopecia, ceratoconjutivite, coriza, apatia, vômito, hemorragia intestinal, edema de membros e hiperqueratose (78,88,89). Na fase terminal ocorre paresia dos membros posteriores, caquexia, insuficiência renal, inanição e morte (90).

No Brasil existem alternativas para o controle e prevenção da LVC, como o uso de coleiras impregnadas com deltametrina e outros inseticidas (91). Estas coleiras repelentes são

reconhecidas pelo ministério da saúde como medidas de proteção individual, mas ainda não são adotadas em programas de saúde pública (7). Diversas vacinas estão sendo testada para uso profilático na leishmaniose visceral em cães. Porém nenhuma concluiu a fase de estudos para liberação pelo ministério da saúde (92). Uma vacina tendo como base o antígeno A2 e saponina como adjuvante já está sendo vendida e utilizada pelos veterinários e está na fase IV dos estudos clínicos (93).

O diagnóstico laboratorial da LV pode ser efetuado através de técnicas parasitológicas que realiza a demonstração do parasito, técnicas imunológicas que objetivam a identificação de anticorpos específicos contra o parasito e testes que empregam recursos de biologia molecular, amplificando fragmentos específicos do DNA do parasito (84).

O tratamento da LVC não é recomendado e as tentativas de tratamento da LVC por meio de drogas tradicionalmente empregadas tem tido baixa eficácia (87). O uso constante de medicamentos em cães provoca à remissão temporária dos sinais clínicos, mas não previne a ocorrência de recidivas, tem efeito limitado na infectividade de flebotomíneos, além de ter o risco de selecionar parasitos resistentes às drogas utilizadas para o tratamento humano, por isso portaria interministerial proíbe o tratamento de cães com medicamentos de uso humano (94).

Assim a recomendação do Ministério da Saúde é o sacrifício do animal quando reagente ao exame sorológico ELISA para *Leishmania* (7). Apesar de controverso o sacrifício do cão está respaldado, na consideração de que esse animal é um importante reservatório da doença e pode aumentar o número da LV humana (95).

A eutanásia dos cães soropositivos é apontada como a principal estratégia de controle para a LVC, entretanto, a mesma não é bem aceita pela população, principalmente pelos proprietários de cães. Além disso, há muitas discussões sobre este ainda ser o único método de controle da leishmaniose em cães (87,96).

O papel da resposta imune na LV canina ainda não foi bem definido como na leishmaniose em humanos (97). A resistência a LVC está associada a ativação da resposta Th1 e produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α (98). Porém o papel da citocinas na resposta Th2 em cães ainda não foi estabelecido (97).

2.7 Aspectos imunológicos na leishmaniose

O sistema imunológico apresenta funcionamento complexo e envolve interações específicas entre os componentes, conferindo imunidade inata e adquirida ao indivíduo. A

integração entre os sistemas inato e adaptativo trabalha de uma maneira orquestrada para a manutenção da homeostase do organismo (18).

O estabelecimento de uma infecção em um hospedeiro susceptível, envolve vários mecanismos, sendo um dos mais relevantes o modo de interação do microorganismo com o sistema imune e a resposta desse contra o agente invasor. Nas leishmanioses, o parasitismo depende da genética do hospedeiro, da resposta do sistema imune do indivíduo e capacidade de evasão que a *Leishmania* possui de ambos os sistemas imunes (inato e adaptativo) (18).

A resposta imune a *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito, através das células (macrófagos, células dendríticas) nas quais as formas promastigotas são interiorizadas, promovendo a ativação da resposta imunitária. A interação de PAMPs (Padrões moleculares associados à patógenos) dos parasitos com receptores do tipo Toll-Like Receptors das células do hospedeiro desencadeará a ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B e NF-AT, que estão envolvidos na ativação de genes que codificam citocinas, como TNF- α , IL-1 e IL-12, quimiocinas, e a óxido nítrico sintetase induzível. Estes mecanismos são importantes para degradação do parasito (99).

Muitos PAMPs de *Leishmanias* já foram identificadas e são expressos na forma amastigota e na forma promastigota do parasito. Alguns PAMPs são proteínas que estão relacionadas com a virulência do protozoário e a resposta imunitária do hospedeiro acontece quando os receptores TLRs reconhecem (100).

A *Leishmania* em hospedeiros vertebrados é um parasito intracelular e dessa forma, a imunidade mediada por células T efectoras é reconhecida um dos principais mecanismos de defesa contra o parasito. Os linfócitos T desempenham papel importante na geração de respostas específicas e de memória para parasitos intracelulares. Estas células apresentam duas subpopulações com funções distintas e com produção de citocinas a depender da resposta imune. Interações coordenadas entre os componentes da resposta imune-celular, como ativação de células T específicas para a produção de citocinas do padrão Th1, o recrutamento de células imunes efectoras para o local da infecção induzidas é importante para a resolução de infecção causada pela *Leishmania*. Em humanos e no modelo experimental o desenvolvimento de resposta Th1 está associado com o controle de infecção e a resposta Th2 com a progressão da doença (18). A resposta imune direcionada por Th1, mediada por IL-2, INF- γ e TNF- α , tem sido relacionada à resistência da doença, enquanto que a resposta imune mediada por Th2, com produção de IL-4 e IL-10, é relatada nos casos em que o indivíduo apresenta sinais clínicos da doença (99,100).

A resposta Th1 é caracterizada pela secreção de citocinas inflamatórias especialmente IFN- γ , o TNF- α e a IL-12 (101). Essas citocinas estão envolvidas na ativação de macrófagos e consequente produção de moléculas microbidas tais como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, essenciais para a eliminação do parasito. No entanto, a infecção por LV é uma doença caracterizada por uma deficiência na resposta imune mediada por células (Th1) frente ao antígeno de *Leishmania* (18). No desenvolvimento da leishmaniose visceral há uma supressão da resposta imune mediada pela IL-10, a qual diminui a ação das citocinas inflamatórias, contribuindo com a proliferação do parasito e o aparecimento e continuidade da doença, acredita-se que a manifestação clínica da LV está associada à supressão da resposta Th1 e consequente desenvolvimento e progressão da doença (102,103). Elevados níveis séricos de IL-10, bem como elevados níveis de RNAm de IL-10 no baço e na medula óssea, são encontrados nos pacientes com LV (102). Além disso, segundo Dos santos et al., 2016 níveis elevados de IL-6 estão associados com os casos mais graves da LV e morte dos indivíduos com a doença.

Trabalhos recentes têm demonstrado que o papel das células da imunidade inata, como neutrófilos, monócitos, NK e CD são de grande importância para proteção dos hospedeiros contra a leishmaniose. Novos mecanismos de defesa contra microorganismos estão sendo observados nestas células, como exemplo a formação de redes extracelular de neutrófilos (NETs) que ocorre quando o neutrófilo entra em contato com a *Leishmania* e estes parasitos são apreendidos por estas redes (26).

2.8 Neutrófilos na leishmaniose visceral

Os neutrófilos são classicamente considerados como primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. Estas células migram rapidamente em números elevados para os locais da infecção (105,106). Estas células são rapidamente mobilizadas e essenciais para a defesa do hospedeiro contra uma variedade de patógenos (18,105). Estes granulócitos respondem a quimioatrativos e moléculas de adesão expressas nas células endoteliais dos indivíduos (18,21).

Atualmente os neutrófilos são reconhecidos como células versáteis e sofisticadas atuando tanto na resposta imune inata como na adaptativa e influenciam nesta última através de interações com células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos (20).

Os neutrófilos tentam eliminar os microorganismos por fagocitose, degranulação e redes extracelulares dos neutrófilos (NETs) (22,26).

O envolvimento dos neutrófilos na infecção pelos parasitos do gênero *Leishmania* e a constatação da habilidade destes fagócitos em responder de forma rápida e eficiente a uma variedade de microrganismos patogênicos, sugerem que tais células podem ser um alvo inicial da leishmaniose (107), pois estas são as primeiras células que chegam ao local da injúria provocada pela picada do flebotomo na leishmaniose visceral e tem como principal objetivo reparar os danos teciduais causados pelo repasto sanguíneo do inseto, sendo também capaz de fagocitar os parasitos inoculados (108). Existem vários estudos sobre o papel dos neutrófilos na *Leishmania* (109; 110; 111; 112;105; 108; 113;). Porém é observado de uma forma geral o papel dubio dos neutrófilos nas infecções *in vitro* por *Leishmania* (114).

Alguns autores relatam a participação do neutrófilo como veículo de disseminação estudos *in vitro* ou em modelos experimentais demonstraram que os neutrófilos podem sofrer morte celular programada e servirem de veículo para os protozoários, permitindo a entrada silenciosa dos mesmos no organismo do hospedeiro, assumindo um papel importante para o estabelecimento da infecção, sendo esta forma denominada de “Cavalo de tróia” do neutrófilo (107,112). Outros estudos evidenciam que células como neutrófilos são insuficientes para conter a *Leishmania* no local da infecção, além disso promovem a persistência do parasito no hospedeiro, já que que promastigotas podem sobreviver longos períodos em neutrófilos sem sofrer alterações (115).

Por outro lado, estudos envolvendo os parasitos *Leishmania donovani* e/ou *Leishmania infantum/chagasi* têm demonstrado o papel protetor destas células, contrariando a hipótese do “Cavalo de Tróia”(114,116).

Alguns trabalhos foram realizados para compreender o papel de defesa do neutrófilo no hospedeiro contra leishmaniose e demonstraram o rápido recrutamento de neutrófilos para o local de infecção por promastigota na pele e afirmaram que estas células possuem atividade leishmanicida *in vitro*, sugerindo assim que os neutrófilos podem representar um importante componente da resposta imune contra a entrada de promastigotas (79,117). Outros estudos afirmam que estes granulócitos podem modular o desenvolvimento de uma resposta imune anti-*Leishmania*, devido a capacidade de secretar citocinas, quimiocinas e conteúdo granular e pela interação direta com células residentes no local da infecção (109).

Alguns autores, relatam que os neutrófilos contribuem para o desenvolvimento de uma imunidade protetora durante a infecção inicial por *Leishmania*, assumindo um papel de defesa ao estabelecimento da infecção no organismo hospedeiro (118), já que as formas promastigotas de *Leishmania* são fagocitadas pelos neutrófilos (18,118) e estes protozoários podem ser destruídos através da ação de produtos do metabolismo oxidativo dos neutrófilos, como o

peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico. Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1 β moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção (21), (107).

Vários trabalhos com neutrófilos *in vitro* e *Leishmania* observaram resultados diferentes com relação ao crescimento do parasito e carga parasitária a depender da espécie da *Leishmania* e a genética do hospedeiro (79,105,108–110,112). Devido à diversidade dos estudos, o impacto da resposta neutrofílica na resistência ou susceptibilidade do hospedeiro à infecção por *Leishmania* continua a ser ainda um assunto controverso (107).

Embora novos mecanismos relacionados ao envolvimento entre os neutrófilos e os parasitos do gênero *Leishmania* tenham sido demonstrados, como a liberação de redes extracelulares de neutrófilos que apreendem e matam a *L. amazonensis* *in vitro* (26), mais estudos necessitam ser realizados para desvendar qual o papel desta célula na infecção por leishmaniose (114).

2.9 Redes extracelulares de neutrófilos (NETs)

Um novo mecanismo microbicida dos neutrófilos denominado de NETose o qual redes extracelulares de neutrófilos, “Neutrophil Extracellular Traps” (NETs), foi descrito por Brinkmann et al., 2004. As NETs são estruturas complexas compostas por “filamentos” de aproximadamente 15 nm de diâmetro, formados por DNA, histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4), e proteínas granulares (elastase, mieloperoxidase, catepsina G, lactoferrina, e gelatinase) (22,23).

Autores afirmam que estas redes são liberadas quando os neutrófilos entram em contato com microorganismos e são abundantes em locais com inflamação e infecção (22,25,26,119) além disso, a liberação destas redes são estimulados com PMA, IL-8 e LPS (26,27,120,121).

O mecanismo microbicida de liberação das NETs é denominado de NETose, neste os neutrófilos liberam o próprio DNA nuclear associado com proteínas citoplasmáticas e granulares para o meio extracelular e assim aprisionam e matam microorganismos (22,26,115). A NETose, foi recentemente dividida em NETose clássica ou suicida que ocorre com a ruptura da membrana plasmática e perda das funções dos neutrófilos (122,123) e está associada com a morte celular, porém de forma diferente da necrose e apoptose (25). Nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos, na qual há liberação de NETs não são encontrados marcadores de necrose e apoptose (25,123,124). Segundo YIPP; KUBES, 2013, existem evidências de uma NETose vital ou rápida na qual não há ruptura da membrana celular e as células permanecem vivas e com as funções normais como, o recrutamento de leucócitos, a quimiotaxia e fagocitose.

Assim o mecanismo de NETose pode ser dividido em NETose rápida ou vital ou NETose clássica ou suicida (27,123,125).

A liberação de redes de neutrófilos já foi descrita quando a célula entra em contato com bactérias (22) fungos (126) protozoários (127) e na inflamação (119). Já foi observado NETs em animais como na mastite bovina ocasionada por *Escherichia coli* (28) sendo um mecanismo de resistência em aves (29), em peixes tendo o processo de liberação das redes extracelulares inibido por stress nesses animais (23) e em gatos quando portadores do vírus da leucemia felina (31).

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani* induzem a formação de redes extracelular de neutrófilos (NETs) e são mortas por estas redes (26,128). Promastigotas de *L. amazonenses* provocam a NETose clássica depois de uma interação *in vitro* com neutrófilos humanos (26, 121). Esta NETose é dependente de espécies reativas de oxigênio (ROS), NADPH oxidase e das enzimas (PAD4), elastase (NE) e mieloperoxidase (MPO) (125,130).

A liberação de NETS é independente de caspase e quinase (REMIJSEN et al., 2011). A maioria dos microrganismos induzem a NETose clássica e a decondensação da cromatina é mediada por (PAD4), elastase e mieloperoxidase, recentemente foi demonstrado que promastigotas de *Leishmania* desencadeiam ambos os mecanismos NETose, sendo que os neutrófilos em contato com a *Leishmania* começam a liberar NETs após 5 minutos (117, 121).

A formação das NETs faz com que ocorra um controle da carga parasitária, já que os protozoários aprisionados pelas redes de neutrófilos, ficam imóveis e dessa forma a fagocitose pelos macrófagos é facilitada esse fato contribue com o controle dos parasitos (127,132).

Apesar das redes apresentarem uma capacidade microbicida de capturar microorganismos, já foi demonstrado que alguns parasitos têm a capacidade de escapar das redes de neutrófilos, como exemplo a *L. donovani* resiste a atividade microbicida destas redes (128). Foi demonstrado que a enzima 3 nucleotidase / nuclease que está envolvida na nutrição e infecção parasitária, faz com que ocorra a evasão das *Leishmanias* dos efeitos tóxicos das redes extracelulares dos neutrófilos (NETs) (34). Além disso, em determinadas condições a liberação excessiva de NETs pode estar associada a danos nos tecidos do hospedeiro e doenças auto-imunes (133–135).

CAPÍTULO 2

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Analisar a série temporal da LV em Sergipe e incidência e a distribuição geográfica de LV humana e canina no município de Aracaju-SE, no período de 2008 a 2014;

1.2 Específicos

- 1 Descrever as características epidemiológicas da LV em Sergipe no período de 2008 a 2014;
- 2 Analisar a incidência e distribuição espacial da LV humana e canina no município de Aracaju/SE de 2008 a 2014;

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho dos objetivos 1 e 2

1 Descrever os dados epidemiológicos da LV em Sergipe no período de 2008 a 2014;

2 Analisar a incidência, distribuição espacial e os determinantes da LV humana e canina no município de Aracaju/SE de 2008 a 2014;

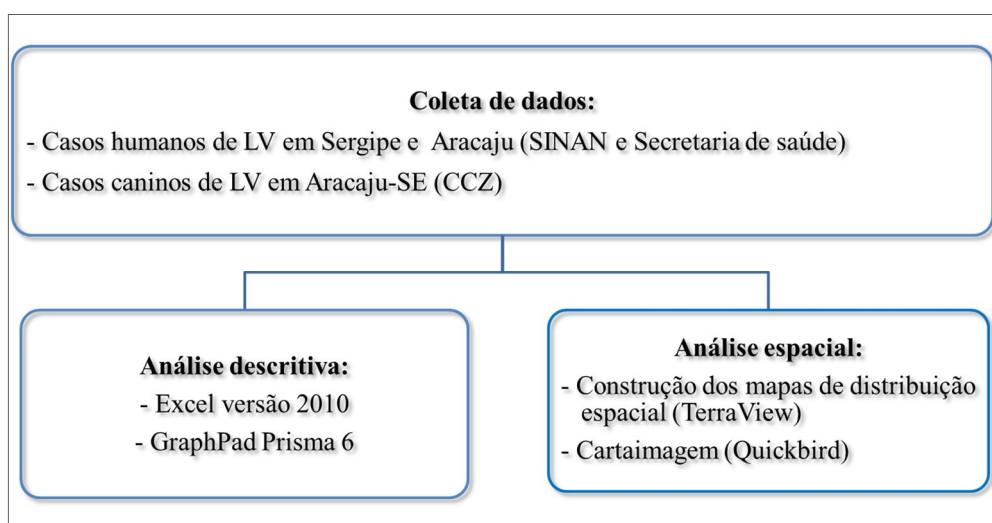


Figura 1. Desenho experimental do objetivo geral 1

2.2 Área do estudo

Um estudo de séries temporais epidemiológico foi realizado, usando dados secundários, obtidos do Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN) e do Centro de Controle de Zoonoses.

Sergipe está localizado no litoral da região nordeste e possui a menor área territorial dentre os estados brasileiros, ocupando uma área total de 21 915,116 km² e 2.068.017 habitantes e clima tropical (136). Aracaju é a capital do estado de Sergipe e está localizado na região leste do Estado (Figura 2), no Nordeste do Brasil (10054'38.23 W "S e 3703'35.57"). A cidade tem uma área total de 181,8 km² e uma população estimada em 587.701 habitantes em 2012, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. O clima de Aracaju é quente úmido. Temperatura média é de 26 ° C, precipitação anual de 1.590 mm, com estação das chuvas de março a agosto. Aracaju é dividida em 39 distritos (136).

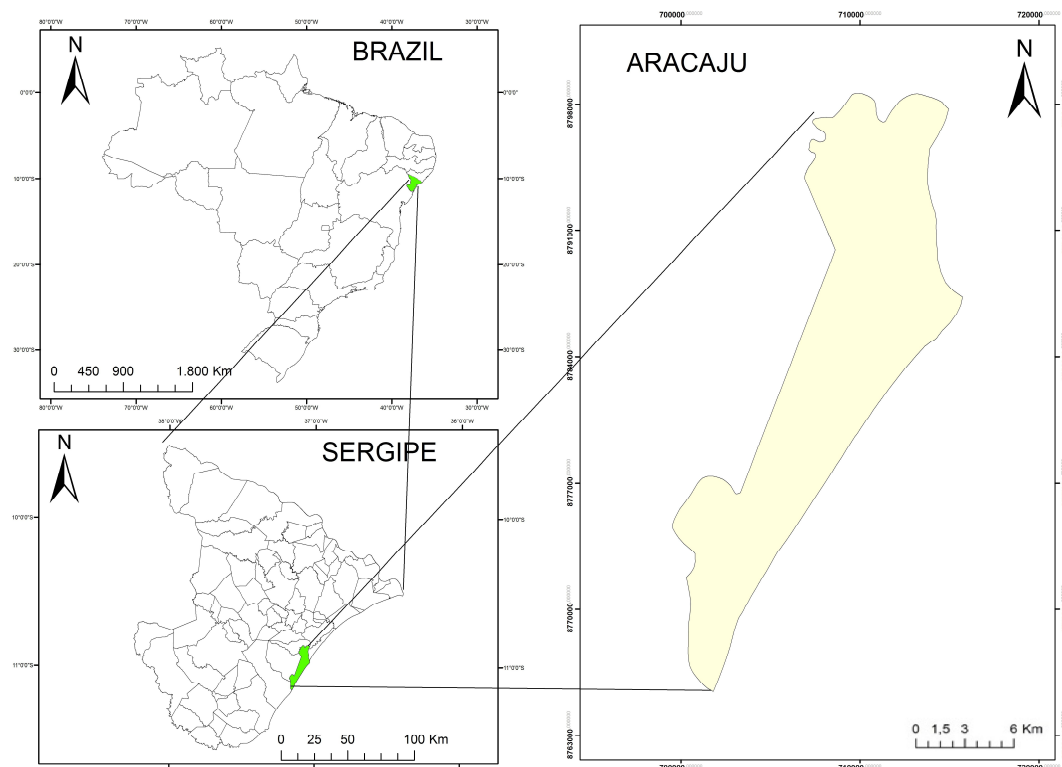


Figura 2. Brasil com destaque para o estado de Sergipe e capital Aracaju.

2.3 Coleta de dados

Os casos humanos foram coletados das notificações e confirmados a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no Estado de Sergipe e município de Aracaju.

Os dados da LV canina foram obtidos a partir dos registros de cães diagnosticados em inquéritos sorológicos, recomendado pelo Ministério da Saúde (137) realizado pelo Centro de Controle de Zoonoses do município de Aracaju, sendo utilizado como exame de triagem o teste rápido (DPP-Biomanguinhos) e confirmatório o ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

Dados espaciais foram obtidos através dos endereços de casos humanos notificados com LV e análise dos bairros de Aracaju os quais existiam cães sorologicamente positivos para a doença.

2.4 Análise estatística dos dados descritivos

Um banco de dados foi criado em programa Microsoft Excel (versão 2010). Os dados descritivos foram analisados por meio do cálculo de média, mediana, frequências, prevalência e incidência. Para avaliar a força da associação entre as variáveis, a razão de prevalência foi

calculada pelo teste do qui-quadrado, com o nível de significância de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prisma (versão 6).

2.5 Análise espacial

Com os dados da série epidemiológica, o banco de dados foi construído em Excel (versão de 2010). Os mapas de distribuição e análise espacial foram realizadas pelo software TerraView (versão 4.2.2). A grade cartográfica da cidade Aracaju com divisão por bairros foi fornecida pelo setor de geoprocessamento de Aracaju da Secretaria Municipal de Saúde. A cartaimagem foi produzida através de imagens orbitais adquiridas pelo satélite QuickBird cedidas pelo grupo de pesquisa em geomorfologia e geoprocessamento aplicados às geociências, coordenado pelo professor Dr. José Antônio Pacheco de Almeida.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados do Objetivo 1 e 2

Artigo 1

Análise espacial e aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral humana e canina em uma área endêmica no Nordeste do Brasil.

Spatial analysis and epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil.

A análise dos dados em série temporal de 2008 a 2014 em Aracaju-SE, mostrou que o coeficiente de incidência (CI) de LV humana manteve-se estável entre 2008 (CI = 0,34) e 2009 (CI = 0,31). No entanto, em 2010 houve um aumento no CI (0,68) em comparação com anos anteriores (3A). Nos anos seguintes foi observado uma diminuição em relação a 2010, porém com maior CI quando comparado com 2008 e 2009 (0,34 e 0,31). Foi observado um aumento da porcentagem de cães com LV, em 2013 (9,21%) e 2014 (12,69%) quando comparado a 2008 (4,73%) (Figura 3B).

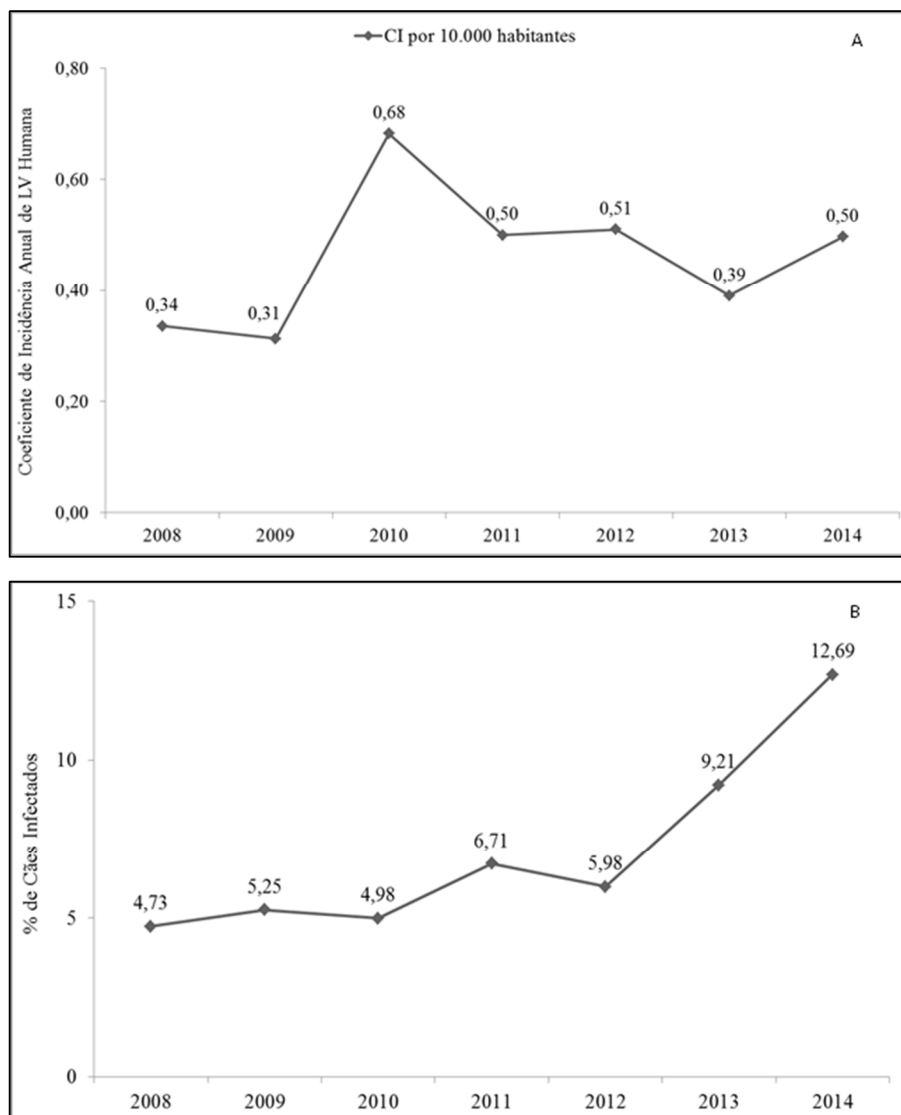


Figura 3. Coeficiente de incidência de humanos com leishmaniose visceral (A) e porcentagem de cães sorologicamente positivos para LV (B) no município de Aracaju-SE, entres os anos de 2008 a 2014.

O número total de casos humanos com LV no estado de Sergipe entre os anos de 2008 e 2014 foi de 406 casos confirmados da doença. O município de Aracaju, neste mesmo período, teve 159 casos confirmados da doença, responsável pela maioria das notificações de leishmaniose visceral no estado. Os coeficientes de incidência da doença em Aracaju nos anos de 2008 a 2014 foram superiores aos de Sergipe (Figura 4).

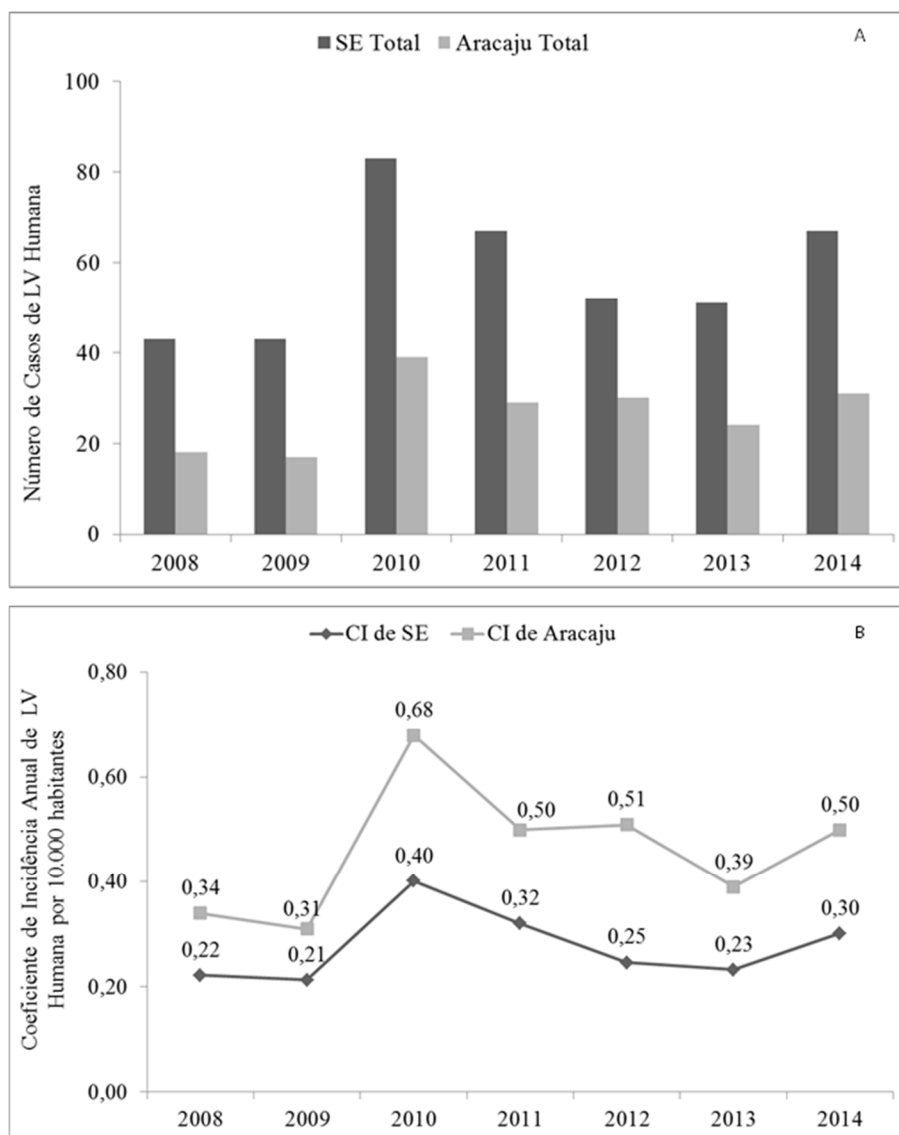


Figura 4: Número de casos e taxa de incidência anual de humanos com LV na cidade de Aracaju e Estado de Sergipe, 2008 a 2014.

Entre 2008 a 2012, o coeficiente de incidência da LV no município estudado, foi maior no sexo masculino, sendo em 2008 CI=0,34 no sexo masculino e CI=0,22 no feminino, em 2009 CI=0,31 no sexo masculino e CI=0,21 no feminino em 2010 CI=0,34 no sexo masculino e CI=0,22 no feminino, em 2011 e 2012. A diferença foi apresentada em maior proporção ano de 2010 (Figura 5).

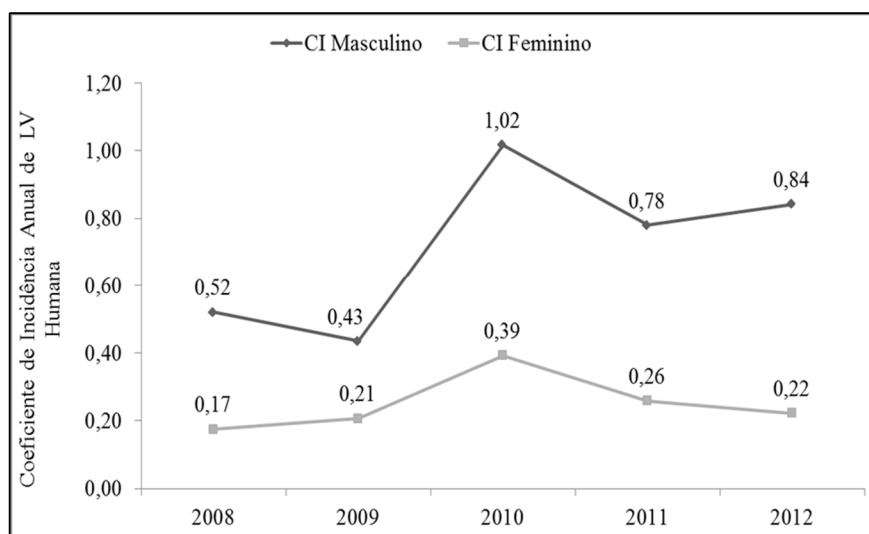


Figura 5. Coeficiente de incidência (CI) de humanos com LV de acordo com sexo em Aracaju-SE de 2008 a 2012.

No presente estudo, em todos os anos analisados (2008 a 2012), exceto em 2009, o risco de LV foi significativamente maior no sexo masculino (Tabela 1). Em 2012 o risco de LV foi 3,78 vezes maior nos homens.

Tabela 1. Distribuição de humanos com LV, de acordo com sexo, Risco Atribuível (RA) e Intervalo de Confiança (IC) e valor de p em Aracaju/SE, 2008-2012.

Ano	Masculino	Feminino	RA	IC	*p
2008	72.2	27.8	2.99	1.06 - 8.38	0.028
2009	64.7	35.3	2.11	0.78 - 5.70	0.21
2010	69.2	30.8	2.59	1.31 - 5.11	0.007
2011	72.4	27.6	3.02	1.33 - 6.82	0.009
2012	76.7	23.3	3.78	1.62 - 8.81	0.001

*Teste qui quadrado

Analisando a distribuição entre os sexos e idade de LV, nossa pesquisa não encontrou diferenças entre os sexos, de 0 a 14 anos. A diferença sexual na incidência foi observada apenas nas faixas etárias acima de 15 anos ($p = 0,0021$). A maior diferença foi observada na faixa etária de 15 a 19 anos, em que a proporção de homens com LV foi de 10,9%, quando comparado ao feminino (1,27%) (Figura 6).

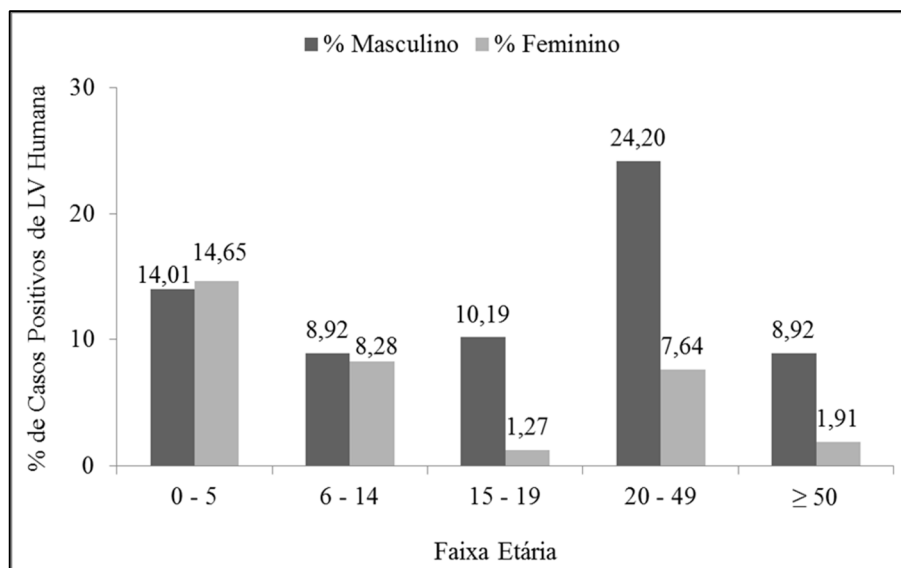


Figura 6. Distribuição de frequência de casos positivos de humanos com LV de acordo com sexo e idade. Dados de 2008 a 2013. Aracaju/SE. Qui quadrado (* $p=0.0021$).

Devido à importância do LV no cão, já que são os animais domésticos mais afetados pela doença e uma importante fonte de infecção também foi analisada a influência do sexo do cão no desenvolvimento da doença. A frequência de cães infectados também foi maior em machos do que em fêmeas, em todos os anos analisados (Figura 7).

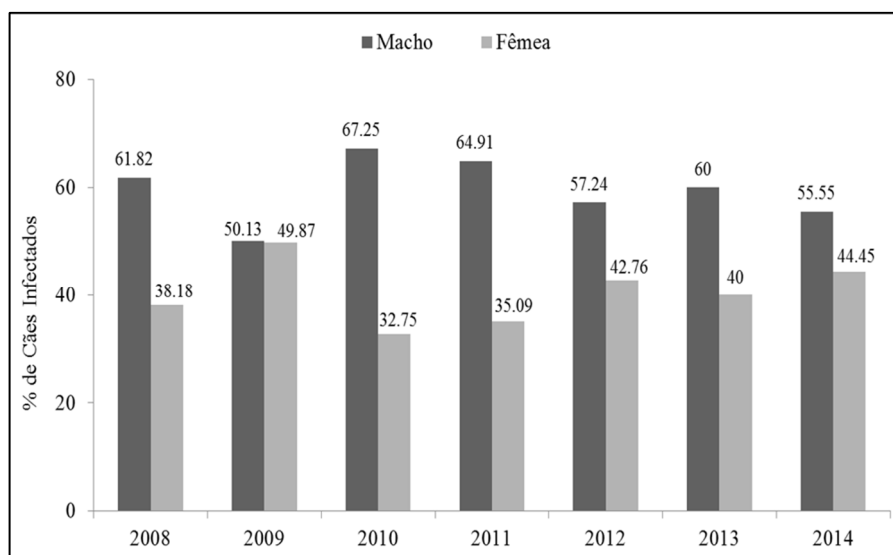


Figura 7. Frequência de cães positivos para LV, de acordo com sexo entre 2008 a 2014. Aracaju, Sergipe, Brasil.

Como já foi relatado que a ocorrência de casos caninos precedem os casos humanos (BELO et al., 2013), além disso no município de Aracaju existe uma adaptação do flebotomíneo (138) o risco de transmissão da doença do cão para o homem é maior (139). No presente estudo, foi realizado uma análise da distribuição espacial dos casos humanos e porcentagem de cães

com LV nos distritos de Aracaju entre de 2008-2014, para verificar quais os bairros de Aracaju predominam os casos de LV (Figura 8).

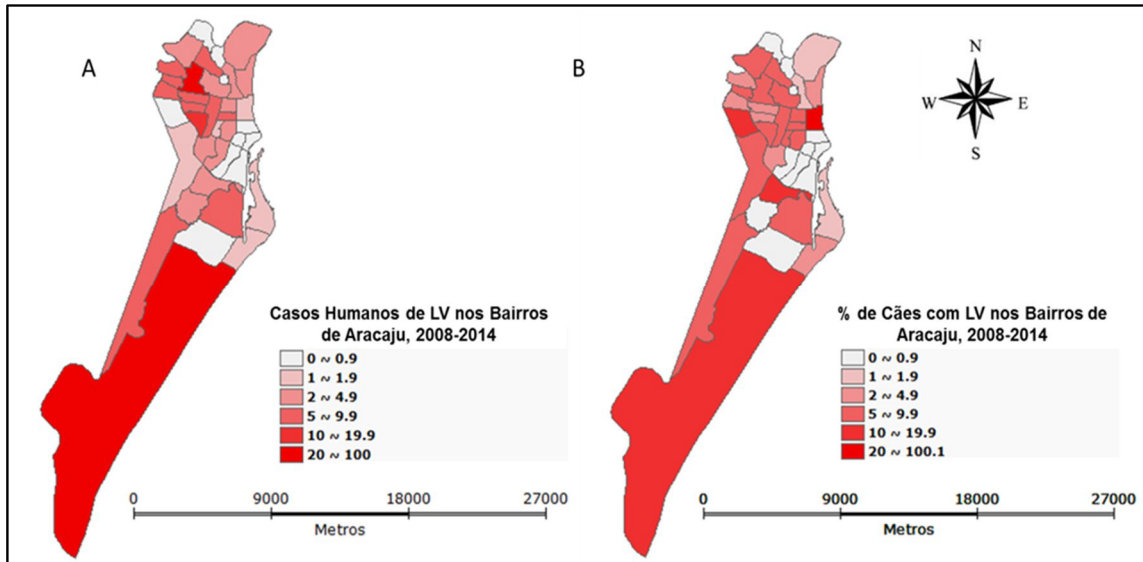


Figura 8. Distribuição de frequência de LV em cães nos bairros de Aracaju (A) e casos humanos de LV nos bairros de Aracaju (B), de 2008 a 2014.

No ano de 2014 foi observada uma proximidade nas notificações dos casos humanos com LV em Aracaju - SE. Assim produziu-se uma imagem através de satélite, para analisar a região na qual ocorreu o maior número de casos e se este local estava propício à disseminação do vetor da doença. As áreas com maior risco de transmissão para leishmaniose visceral ocorreram próximas a lugares com alta densidade de vegetação, rios e canais e quintais de domicílios com muita vegetação e entulhos. Os bairros mais afetados pela doença, como Bugio, Santos Dumont, 18 do forte apresentam população com menor poder aquisitivo (Figura 9).

Leishmaniose visceral humana na zona norte de Aracaju-SE

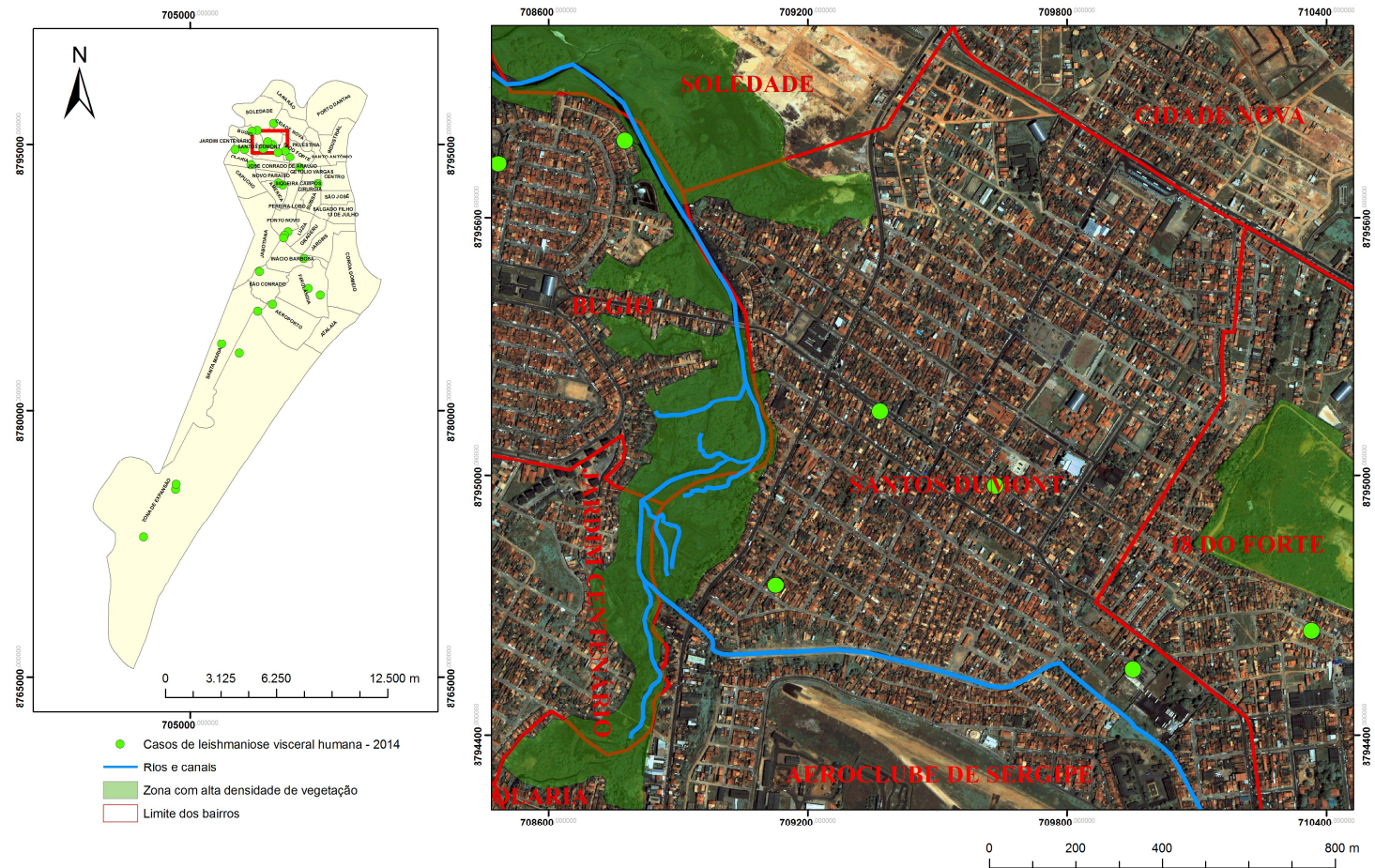


Figura 9. Carta imagem, realizada através do satélite Quickbird. Mostrando áreas com alta prevalência de casos humanos com LV em Aracaju SE, no ano de 2014. Observado a região norte da cidade de Aracaju, SE, evidenciando peculiaridades mapeadas associadas à transmissão da doença e reprodução do vetor, com locais próximos de rios, canais e áreas de vegetação permeando áreas urbanas.

Os domicílios ou residências próximas a casos humanos notificados e confirmados com LV tinham quintais com alta densidade de vegetação, matéria orgânica e entulhos, estavam em áreas que não apresentavam saneamento básico, apresentavam um ambiente rural, como a criação de aves e equídeos e na maioria dos domicílios ou vizinho a estes existiam cães com sorologia positiva para LV (Figura 10).



Figura 10. Imagens de domicílios ou residências próximas a casos de humanos com leishmaniose visceral em Aracaju - SE. As residências fotografadas demonstram diferentes habitats favoráveis a reprodução do flebótomo. A imagem A foi obtida em quintal com presença de lixo e matéria orgânica no bairro Santos Dumont; a imagem B demonstra um local com ausência de saneamento básico, no bairro Mosqueiro; na imagem C é observado um animal comum do ambiente rural e entulhos, no bairro Olaria e imagem D presença de um cão assintomático, mas sorologicamente positivo para LV em ambiente propício ao vetor, bairro América.

4. DISCUSSÃO

A leishmaniose atualmente está presente em todo o território brasileiro (10). Houve uma mudança do comportamento de transmissão da doença da zona rural para área urbana ou peri-urbana (6,140). No continente americano, o Brasil é o país de maior prevalência, com registros de casos em todas as regiões brasileiras, com destaque para região Nordeste (64), esta região é considerada de alto risco para LV e precisa de atenção prioritária (6,141). O estado de Sergipe e o município de Aracaju são considerados endêmicos para LV (10,61,62).

O presente estudo descreve a ocorrência de casos notificados de LV em humanos e de cães sorologicamente positivos em Sergipe e Aracaju, entre 2008 e 2014, bem como alguns determinantes associados à transmissão da doença. Em Sergipe um total de 406 casos foram notificados e 159 confirmados em Aracaju de LV em humanos entre 2008 e 2014. Observa-se que os coeficientes de incidência da doença em Aracaju a partir de 2008-2014 foram superiores aos de Sergipe, com um aumento no coeficiente de incidência em Aracaju de 2014 (0,50), quando comparado a 2008 (0,34).

O ano de 2010 foi o que apresentou maior coeficiente de incidência de humanos com LV (0,68). Verificou-se que no ano de 2008, no município de Aracaju, SE, houve aumento significativo da proporção de casos de dengue em relação aos demais anos e após esse ano houve uma aumento na intensificação de ações de prevenção e controle da doença (142).

A dinâmica de transmissão da leishmaniose é sazonal e depende da distribuição de flebotomíneos (5,38). Um fato que pode explicar o aumento do coeficiente de incidência de humanos em Aracaju com LV é a grande capacidade de adaptação do *Lutzomyia longipalpis* aos ambientes urbanos (38,39). De todos os animais identificados como reservatórios da LV, o cão é considerado o reservatório doméstico mais importante (143,144). O crescimento urbano de Aracaju, especialmente em áreas periféricas ou em zonas de expansão recente, com infraestrutura precária e mantendo áreas de vegetação nativa, faz com que homem e cães domésticos entrem no ambiente natural do flebótomo e aumente o risco de infecção por *Leishmania* (145).

Observa-se um aumento da porcentagem de cães sorologicamente positivos para leishmaniose visceral de 2008 a 2014, com três vezes mais número de casos no ano de 2014 quando comparado a 2008. Além da presença do flebotomíneo em diversos bairros de Aracaju (138), o aumento dos casos caninos foi em parte devido à mudança no diagnóstico da LV canina, a qual era feita pelo método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e

confirmados por imunofluorescência indireta (IFI). A recomendação do Ministério da Saúde da triagem feita pelo Teste Rápido (Dual Path Platform -DPP®) e ELISA para confirmação (Nota Técnica 01/2011), iniciada em Junho de 2012 no Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju pode ter favorecido a identificação de novos casos de LV canina. Além disso, o aumento de cães com LV, nos anos de 2013 e 2014, também pode estar associada à proibição da eutanásia desses animais pelo Centro de Controle de Zoonoses de Aracaju, em 2013.

Foi demonstrado que a leishmaniose visceral é uma doença causada por múltiplos fatores, incluindo ambientais, biológicos (resposta imune, hormônios e polimorfismo genético) e interação do parasito com o hospedeiro. O ambiente desempenha um papel importante no ciclo de transmissão do VE. As condições de áreas com menor poder aquisitivo associada com a expansão rápida e desordenada de áreas periurbanas das grandes cidades, leva à formação de bairros com ausência de infra-estrutura para habitação e saneamento básico, favorecendo a disseminação da doença (9,64).

Em geral, há um consenso sobre a maior prevalência da doença no sexo masculino (5,138,146). Um estudo de séries temporais em Aracaju 1999-2008 também mostrou que, na maioria dos anos, o risco de LV foi maior em homens (risco relativo = 1,98, $p < 0,00001$) (138,145). No presente estudo observamos coeficiente de incidência maiores no sexo masculino entre os anos de 2008 a 2014. Além disso, não foi encontrado diferenças entre os gêneros até 14 anos, porém foi observada prevalência do sexo masculino nas faixas etárias acima de 15 anos ($p = 0,0021$), entre os anos de 2008 a 2013.

Estudos apontam para o aumento da susceptibilidade de homens para LV ao avaliar as taxas de incidência anuais por sexo (61,147). Esta doença afeta especialmente o sexo masculino, na faixa etária de 14 a 64 anos (60). Guerra-silveira; Abad-franch, 2013 afirmam que essa suscetibilidade diferencial entre os gêneros não foi observada em crianças menores de quatro anos e (145) identificaram em Aracaju uma proporção maior no sexo masculino, principalmente nas faixas etárias acima de dez anos.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar as diferenças no risco de LV segundo o sexo. Autores afirmam que a razão para esta diferença é a maior extensão de área do corpo expostas ao vetor em homens, como no Nordeste, devido ao calor, é comum trabalhadores do sexo masculino permanecer sem camisa durante o dia, enquanto as mulheres ficam com o tronco protegido. Além disso, as mulheres permanecem mais tempo em suas casas e estão, portanto, mais protegidos contra o vetor (5,147). No entanto, os autores não descartam a possibilidade de uma modulação determinada geneticamente e susceptibilidade ligada ao sexo para LV. A hipótese fisiológica sugere que os fatores hormonais influenciam a susceptibilidade

à LV, como por exemplo, as interações entre os hormônios sexuais, principalmente de testosterona e os seus efeitos no sistema imunitário, fazem os machos mais susceptíveis a infecções (146). Adolescentes do sexo masculino têm 63% mais risco do que do sexo feminino para adquirir a doença. Além disso, os homens têm três vezes mais chance de adquirir LV que uma mulher em idade fértil (146).

Estudos avaliaram os fatores de risco para a LV canina e encontraram também maior prevalência em cães machos (53,63,148). Porém, há poucos estudos sobre cães que demonstram predisposição sexual, racial ou idade relacionadas com esta infecção (147). Na nossa pesquisa, foi encontrado maior percentual de animais machos sorologicamente positivos para LV entre os anos de 2008 a 2014.

A análise da distribuição espacial dos casos de cães e humanos com LV nos distritos de Aracaju informa que a doença nos cães ocorre próxima às áreas com casos humanos. Assim a presença de cães infectados pode manter a transmissão de *L. infantum* entre as espécies, aumentando a incidência de LV em cães e em seres humanos, causando um impacto direto sobre o programa de controle da doença (14,16,43,148).

Vale ressaltar que e cães doentes na zona urbana do município podem favorecer a ocorrência de casos de LV em seres humanos, uma vez que a infecção canina precede a doença em seres humanos e consequentemente contribui para disseminação na população (11,51,143).

O diagnóstico canino no município de Aracaju é realizado através da busca ativa e o inquérito por amostragem, normalmente é realizado no bairro o qual residem familiares de pacientes notificados e confirmados com LV. Embora estes dados indiquem que há uma transmissão de ambos os mamíferos nas mesmas áreas, não significa que nas áreas sem ocorrência de casos humanos, não exista infecção em cães.

Esta informação é capaz de subsidiar estratégias de intervenções combinadas em níveis municipais, do Ministério da Saúde e Centro de Controle de Zoonoses direcionado para as áreas mais afetadas, o que pode reduzir o custo-eficácia das medidas de controle para combater a leishmaniose.

O geoprocessamento provou ser um método muito útil para definir áreas de risco, permitindo observar em quais locais é necessário maior controle da doença e demonstra a necessidade de acompanhamento e estratégias de prevenção (64,149). A distribuição espacial dos casos e análise de uso do solo permite também abordar os determinantes epidemiológicos que interferem na transmissão da doença.

A análise espacial dos casos de LV em Aracaju entre os anos de 2008 a 2014 apontam para a existência de três regiões como as principais áreas de transmissão da doença no

município: Zona de expansão, zonas periféricas e Zona Norte. No ano de 2014 foi observado através de satélite que a zona norte apresentou um aglomerado de casos de LV em humanos. Estas regiões têm peculiaridades ambientais (desmatamento, alta umidade e quintais com acúmulo de detritos e vegetação) e condições socioeconômicas desfavoráveis que justificam uma maior transmissão da doença nestes bairros.

Outros estudos também mostram que as taxas de incidência de LV, o perfil e os indicadores socioeconômicos e demográficos são espacialmente correlacionados, indicando que os surtos estão associados com as condições precárias (33,149,150). Alguns autores estudaram a urbanização da LV e relataram que a ocorrência da doença resulta tanto das condições precárias existentes na periferia das cidades, como a articulação destas áreas com o ambiente rural (57,64,151). Além disso, o quadro de exclusão social é crucial para as políticas econômicas e sociais que contribuem para a formação de uma transição epidemiológica, com transferência do meio rural para o ambiente urbano (6,140). Os fatores locais que interagem com as condições de pobreza, permitem não só o aumento da incidência e morbidade da LV, mas também a expansão geográfica e geração de diferentes cenários epidemiológicos (3,64,152).

5. CONCLUSÃO

A LV em Aracaju está em crescente urbanização, o município apresenta um cenário preocupante em relação à distribuição, transmissão e manutenção da doença. No entanto, os conhecimentos adquiridos a partir desse estudo podem ser usados em estratégias de intervenção no controle desta doença em Aracaju.

CAPÍTULO 3

1. OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar a formação das NETs em humanos e cães em resposta à infecção por *L. infantum*;

1.2 Específicos

1 Avaliar a indução de NETs em neutrófilos humanos e caninos, estimulados com *L. infantum*;

Hipótese: O estímulo ou infecção com L. infantum é capaz de induzir liberação de NETs.

2 Comparar a indução de NETs em neutrófilos obtidos de pacientes tratados para LV e indivíduos DTH+, estimulados com *L. infantum*;

Hipótese: Indivíduos assintomáticos DTH+ produzem maior quantidade de NETs como mecanismo de resistência a doença e eliminação do parasito do que os que apresentaram LV.

3 Verificar o papel das NETs no controle da carga parasitária in vitro em neutrófilos humanos;

Hipótese: A liberação de NETs pelos neutrófilos de humanos controlam melhor o parasitismo.

4 Comparar a indução de NETs, após estímulo com *L. infantum* em cães sorologicamente positivos para LV assintomáticos e sintomáticos para a doença;

Hipótese: Cães assintomáticos produzem maior quantidade de NETs do que os sintomáticos.

5 Verificar o papel das NETs no controle da carga parasitária in vitro em neutrófilos caninos.

Hipótese: A liberação de NETs pelos neutrófilos de cães controlam melhor o parasitismo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Desenho dos objetivos 1; 2; 3; 4 e 5

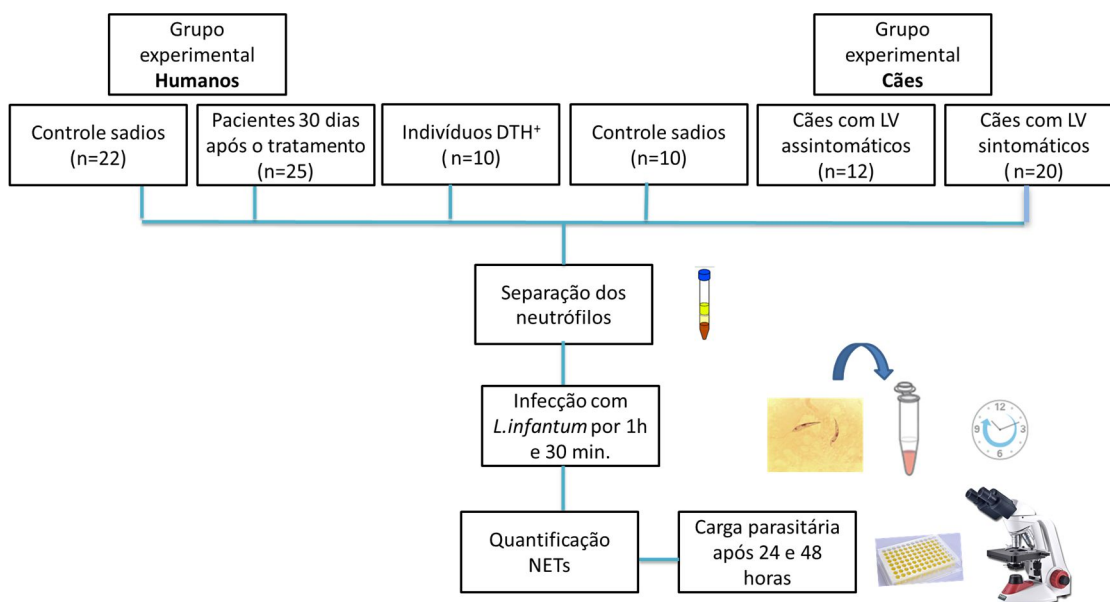


Figura 11: Desenho experimental do objetivo 1; 2; 3; 4 e 5.

2.2 Grupos experimentais

A avaliação de NETS nos seguintes grupos experimentais: Humanos: 1-Controle saudáveis; 2- Pacientes tratados para LV (mais de 30 dias de tratamento) e 3- indivíduos DTH+ (entraram em contato com o parasito e não desenvolveram a doença). Para os cães 1- Controle saudáveis; 2- Assintomáticos (sorologicamente positivos para LV e com ausência de sinais clínicos da doença) e 3- Sintomáticos (sorologicamente positivos para LV e com sinais clínicos da doença).

2.2.1 Seleção dos humanos

Os pacientes com leishmaniose visceral que participaram do estudo foram selecionados no Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), sendo este hospital referência para a LV em Sergipe.

Para inclusão nos grupos experimentais os doentes com LV foram confirmados através do teste sorológico (Rk39- KalazarDetect® Rapid Test) e/ou aspirado de medula óssea com

cultura positiva para *Leishmania* no meio NNN (Sigma Aldrich®). Os critérios de exclusão utilizados foram gravidez, diabetes e pacientes com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV).

Indivíduos DTH+ foram familiares ou vizinhos dos pacientes com LV que não tinham sintomas de LV, mas que apresentaram teste de intradermoreação de Montenegro positivo para leishmaniose visceral.

Os humanos que participaram do estudo foram avaliados clinicamente e após avaliação médica foi coletado 20 ml de sangue e armazenado em tubo plástico com anticoagulante (Heparina 1%).

Para quantificação das NETs foram selecionados: controle sadios (n= 22); pacientes tratados para LV após 30 dias (n= 25) e indivíduos DTH + (n= 10) e para leitura da carga parasitária: controle sadios (n= 9); pacientes tratados para LV após 30 dias (n= 6) pacientes tratados para LV após 180 dias (n=12) e indivíduos DTH + (n=12).

2.2.2 Seleção dos cães

A realização desse trabalho existe uma parceria do laboratório de biologia molecular da Universidade Federal de Sergipe (UFS) com o Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) do município de Aracaju- SE.

A seleção dos animais foi feita através do diagnóstico laboratorial preconizado pelo Ministério da saúde (nota técnica n. 01/2011 do Ministério da Saúde - SVS/MS) sendo o exame de triagem o teste de imunocromatografia Dual Path Platform DPP® (Bio-Manguinhos®) e como confirmatório o exame sorológico de ensaio imunoenzimático (*Enzyme linked Immunosorbent Assay*, ELISA).

Como critérios de inclusão, foram utilizados cães com ou Sem Raça Definida (S.R.D) de 2 a 10 anos de idade, machos ou fêmeas que foram diagnosticados com leishmaniose visceral canina (LVC).

Os animais com exames sorologicamente positivo para LVC foram avaliados clinicamente e divididos em grupo assintomáticos e sintomáticos. Os animais sadios também passaram por avaliação clínica veterinária e deveriam apresentar vermífugos e vacinas atualizados. Após avaliação era coletado 5 a 10 ml de sangue do cão, por punção da veia cefálica ou jugular do animal e colocado em um tubo plástico com o anticoagulante Heparina (1%).

Os tubos foram acondicionados em um local refrigerado e levados para o laboratório de biologia molecular do Hospital Universitário, da Universidade Federal de Sergipe (UFS).

Para quantificação das NETs foram selecionados: cães saudáveis ($n= 10$); assintomáticos ($n= 12$) e sintomáticos ($n= 20$) e para leitura da carga parasitária: cães saudáveis ($n= 8$); assintomáticos ($n= 7$) e sintomáticos ($n= 11$).

2.3 Separação dos neutrófilos

Os neutrófilos foram separados do sangue periférico por gradiente de Ficoll Histopaque® (Sigma). Assim para o sangue de humanos foi utilizado o Ficoll de densidade 1,077. Para os cães utilizado o Ficoll de densidade 1,119 e depois o 1,077.

Tanto para humanos e cães o sangue total é dispensado sob o gradiente de Ficoll, sendo a concentração de ficoll e sangue (1:1). Depois centrifugação a 400 rcf (Relative Centrifugal Force) durante 30 minutos sem freio e aceleração, à temperatura de 23°C. Após a centrifugação os granulócitos estavam acima dos eritrócitos. Os neutrófilos eram coletados e hemolisados com solução de lise hipotônica e após 6 minutos de movimentos para homogeneização e lise das células era feito uma centrifugação a 400 rcf durante 10 minutos com freio e aceleração, à temperatura de 23°C, após a lise as células os neutrófilos eram lavados com PBS® Sigma (Phosphate Buffered Saline) e centrifugadas a 400 rcf por 10 minutos, à temperatura de 23°C. Depois de purificados os neutrófilos ressuspensos em 1 mililitro (ml) de meio RPMI 1640 (Sigma).

2.4 Parasitos

Promastigotas de *L. infantum* foram descongeladas e mantidas a 26°C em meio Schneider®Sigma suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina.

As culturas de *Leishmanias* foram mantidas em estufa BOD e para os experimentos foram utilizadas culturas de fase estacionária com 5 ou 6 dias de cultivo.

Para experimento de humanos foram utilizadas *Leishmanias* extraídas de humanos com LV e para o estudo em cães foram utilizadas *Leishmanias* extraídas de cães com LV.

Antes da infecção os parasitos foram descongelados e lavados com PBS® Sigma. Sendo utilizado para humanos: dez neutrófilos para uma *Leishmania* (1; 0,1); um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) e um neutrófilo para dez *Leishmanias* (1:10) e para os cães um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) e um neutrófilo para cinco *Leishmanias* (1:5) (Adaptado da metodologia de Guimarães-costa et al., 2009).

2.5 Estímulo dos neutrófilos com parasitos

Os neutrófilos foram incubados com ou sem promastigotas de *Leishmania infantum* em estufa incubadora de CO₂ a 35⁰c. Após 90 minutos, foi realizada a centrifugação a 400 rcf por 10 minutos com temperatura de 4⁰c, retirado o sobrenadante, sendo este armazenado a- 20⁰c para posterior quantificação das NETs na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), no Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses.

2.6 Quantificação das NETs

Esse estudo foi realizado em parceria do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), coordenado pela professora Dra Elvira Maria Saraiva.

O DNA existente no sobrenadante do estímulo/ infecção (leishmania e neutrófilo) e dos neutrófilos como controle, dos grupos experimentais do estudo foi quantificado pelo kit Picogreen dsDNA (Invitrogen) de acordo com as informações do fabricante. A leitura foi realizada através da Spectramax® Paradigm®, no laboratório de imunobiologia das leishmanioses da UFRJ.

2.7 Carga parasitária

A carga parasitária dos neutrófilos infectados com *L. infantum* foi determinada pela adaptação da técnica da diluição limitante (153). Depois de coletado o sobrenadante da infecção para quantificação das NETs, o sedimento foi ressuspensionado em 1ml com o meio Schneider e realizada a diluição limitante de 1 até 10⁶. O experimento foi feito em triplicata e armazenado em uma placa de 96 poços na estufa a 26⁰ c. A leitura da placa foi realizada em 24 horas e 48 horas, avaliando-se a presença do parasito nos poços. O número de parasitos viáveis foi determinado pela máxima diluição na qual foram encontrados.

2.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o programa GraphPad Prisma (versão 6). Os dados foram avaliados quanto às diferenças estatísticas, utilizando alguns testes a

dependem dos resultados obtidos. Na comparação entre dois grupos quando os dados foram pareados e paramétricos foi realizado o teste t pareado, e quando não paramétricos utilizado o teste de Wilcoxon pareado. Quando os dados foram não pareados e paramétricos, foi utilizado teste t não pareado e quando não paramétricos o teste realizado foi o de Mann-Whitney.

Para a correlação entre a liberação de NETs e carga do parasito foi utilizada correlação de Spearman. Intervalos de confiança de 95% e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

2.9 Aspectos éticos

Foram respeitadas as boas práticas de pesquisa, estando à equipe à disposição para solucionar quaisquer dúvidas antes e depois do consentimento dos humanos que participaram do projeto e dos proprietários de cães.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, sendo o CAAE-0123.0.107.000.11 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da UFS, sendo o número 96/2011.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados do objetivo 1

1 Avaliar a indução de NETs em neutrófilos humanos e caninos, estimulados com Leishmania infantum;

Embora já tenha sido observado que neutrófilos sejam capazes de liberar NETs com a presença de *Leishmanias* (26,128), não foi constatado a liberação de NETs em humanos e cães infectados com *L. infantum*.

Nesse estudo, foi realizado uma curva para padronização dos experimentos, assim utilizamos dez neutrófilos para uma *Leishmania*, concentração de (1:0,1); um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) e um neutrófilo para dez *Leishmanias* (1:10), nos grupos controle sadios e tratados para LV (26) (Figura 12).

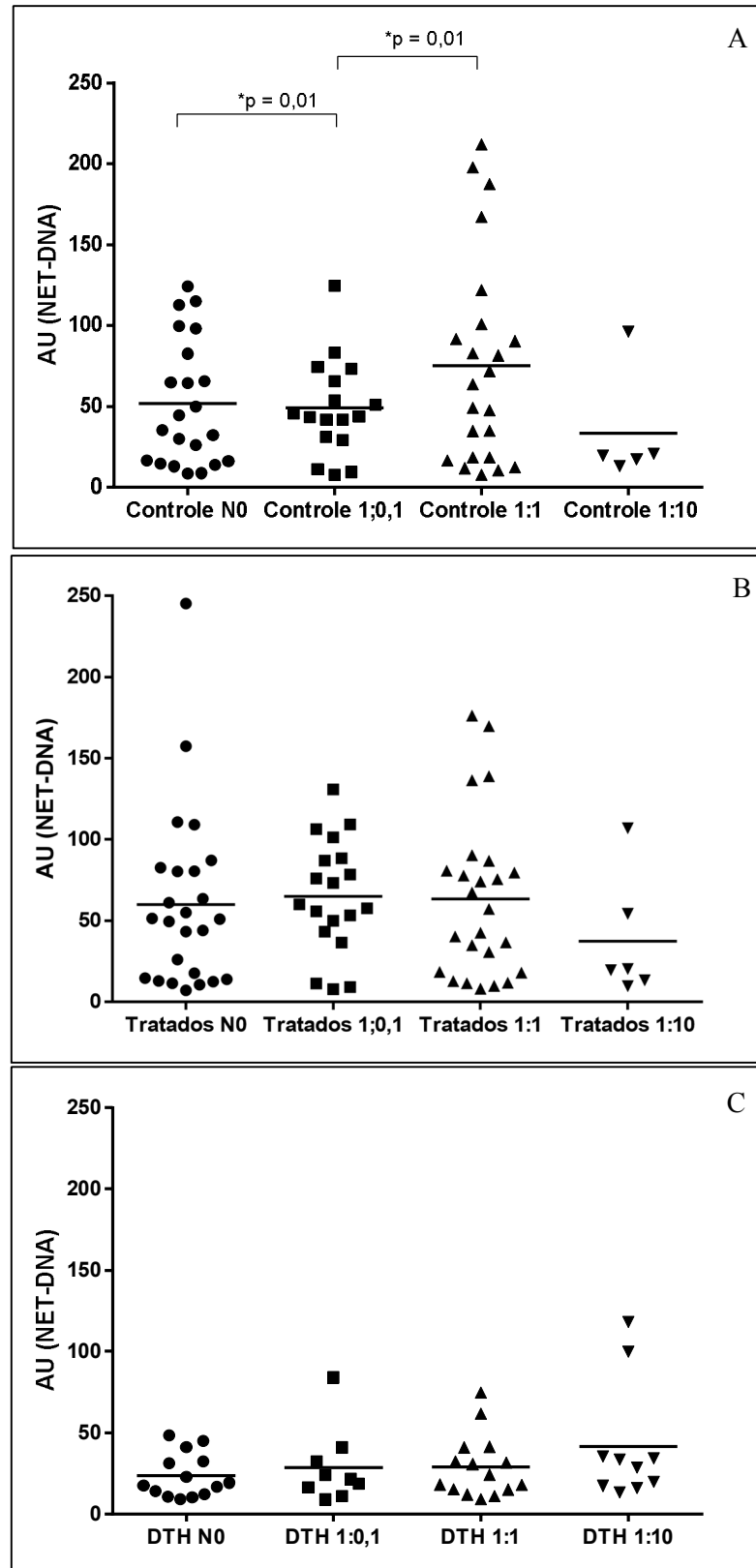


Figura 32. Liberação de NETs em neutrófilos de humanos controles não infectados com LV (A), pacientes tratados para LV (B) e indivíduos DTH+ (C). Neutrófilos de indivíduos controles aparentemente saudáveis e de pacientes com 30 dias pós-tratamento de LV com antimonial pentavalente foram isolados por gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque e estimulados por 90 minutos com promastigotas de *L. infantum*. As Nets foram dosadas pelo método de picogreen nos sobrenadantes dos grupos experimentais, sem estímulo e expostos a dez

neutrófilos para uma *Leishmania*, concentração de (1:0,1); um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) e um neutrófilo para dez *Leishmanias* (1:10) (*Teste Wilcoxon pareado).

Após o estímulo com *L. infantum*, houve liberação de NETs pelos neutrófilos humanos. As NETs são liberadas em maior quantidade, quando existe a exposição de uma *Leishmania* para um neutrófilo, nos indivíduos controle sadios (Figura 12 A). No grupo de pacientes tratados para leishmaniose também houve um aumento na liberação de NETs, quando os indivíduos foram expostos na concentração de 1:1, apesar de não existir diferença estatística (Figura 12 B), porém nos indivíduos DTH positivos não houve diferença na liberação de NETs após estímulos com *L. infantum* (Figura 12 C).

Uma tendência a diminuição na liberação de NETs no grupo de humanos controles e tratados para LV foi observada quando um neutrófilo era exposto a 10 *Leishmanias* (Figura 12 A e B), embora os dados não apresentem significância estatística devido ao tamanho amostral.

A concentração que teve maior liberação de NETs no grupo controle foi a de 1:1, embora não haja diferenças no grupo tratados com LV entre as razões 1:0,1 e 1:1. Os experimentos com humanos foram realizados com a razão 1:1 (1 neutrófilo para 1 *Leishmania*).

A liberação de NETs foi relatada recentemente em cães com anemia hemolítica (JEFFERY et al., 2015). Porém esta liberação de redes extracelulares de neutrófilos ainda não foi descrita em cães infectados com *L. infantum*. Assim, foram realizados experimentos para observar se a presença de *Leishmania* induz a liberação de redes extracelulares de neutrófilos nesses animais. Observamos que os neutrófilos de cães controles sadios não liberam NETs após estímulo com *L. infantum*. No entanto, cães com LV liberam NETs quando estimulados com *Leishmania in vitro* (Figura 13).

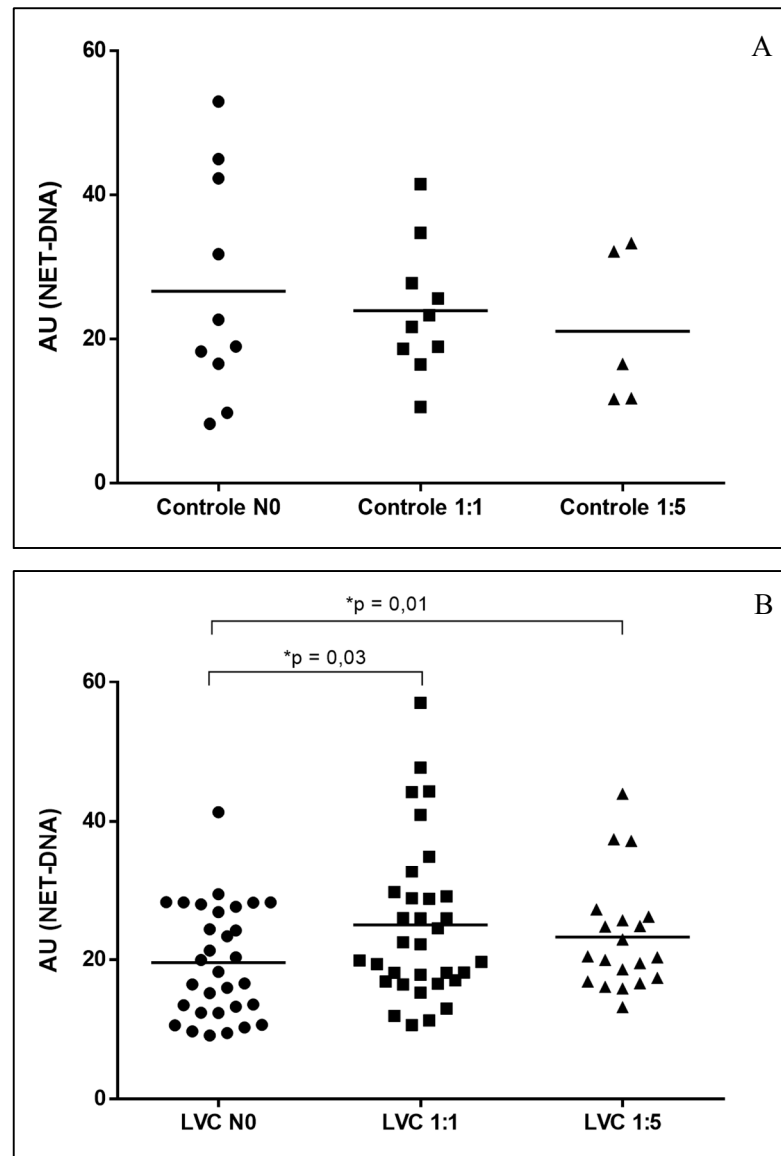


Figura 43. Liberação de NETs em neutrófilos de cães controles sadios (A) e com LV (B). Neutrófilos de cães controles aparentemente sadios e de cães com LV foram isolados por gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque e estimulados por 90 minutos com promastigotas de *L. infantum*. As NETs foram dosadas pelo método de picogreen nos sobrenadantes dos grupos experimentais, sem estímulo e expostos a um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) e um neutrófilo para cinco *Leishmanias* (1:5) (*Teste Mann-Whitney).

Quando comparamos a liberação de NETs nas duas espécies, utilizando os humanos e caninos aparentemente sadio, observamos que a indução da liberação de NETs é bem maior em neutrófilos humanos do que nos de cães (Figura 14).

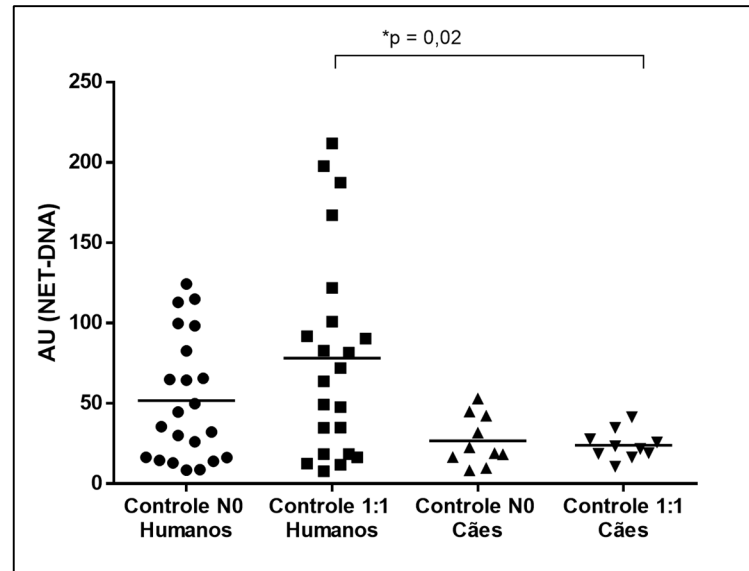


Figura 14. Liberação de NETs em neutrófilos de humanos e cães controles saudáveis. Neutrófilos de humanos e cães controles aparentemente saudáveis foram isolados por gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque e estimulados por 90 minutos com promastigotas de *L. infantum*. As NETs foram dosadas pelo método de picogreen nos sobrenadantes dos grupos experimentais, sem estímulo e expostos a um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) (*Teste Man-whitney).

3.2 Resultados dos objetivos 2 e 3

2 Comparar a indução de NETs em neutrófilos obtidos de pacientes tratados para LV e indivíduos DTH+, estimulados com *Leishmania infantum*;

3 Verificar o papel das NETs no controle da carga parasitária *in vitro*, em neutrófilos humanos

Observamos que os indivíduos DTH+ são os que produzem menor quantidade de NETs sem estímulo, quando comparados aos pacientes tratados para LV (Figura 15 A), com a exposição a *Leishmania*, os indivíduos DTH+ também são os que liberam menos NETs, quando comparado entre os grupos (Figura 15 B).

Os indivíduos DTH+, além de ser o grupo o qual os neutrófilos liberam menor quantidade de NETs, a Liberação das redes de neutrófilos destes não é influenciada com a presença da *Leishmania*.

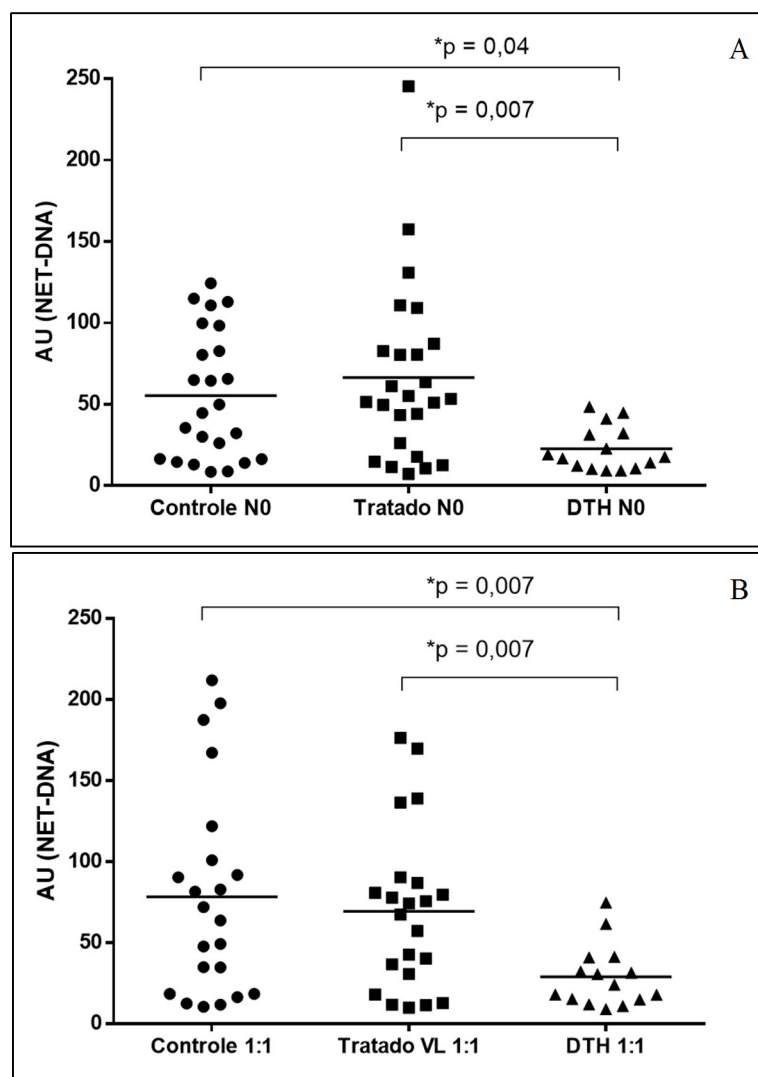


Figura 15. Liberação de NETs em neutrófilos de controle saudáveis, pacientes tratados para LV e indivíduos DTH+, sem estímulo N0 (A) e após estímulo com *L. infantum* (B). Neutrófilos de indivíduos controles aparentemente saudáveis, de pacientes com 30 dias pós-tratamento de LV com antimonial pentavalente e de indivíduos DTH+ sem sinais de LV foram isolados por gradiente de centrifugação com Ficoll-Hypaque e estimulados por 90 minutos com promastigotas de *L. infantum*. As Nets foram dosadas pelo método de picogreen nos sobrenadantes dos grupos experimentais, sem estímulo e expostos um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) (*Teste Mann-Whitney).

Os neutrófilos são as primeiras células que chegam ao local da injúria provocada pela picada do inseto na leishmaniose visceral, sendo um dos objetivos destes granulócitos fagocitar os parasitos inoculados pelo flebótomo (108) e como já foi demonstrado por GUIMARÃES-COSTA et al., 2009 que NETs podem apreender e matar *L. amazonensis* foi realizado um experimento para observar se o neutrófilo poderia controlar a quantidade de parasitos, nas primeiras horas após infecção. Assim, foi analisada a carga parasitária, por diluição limitante, em 24 e 48 horas, após estímulo de um neutrófilo para uma *Leishmania*, em humanos controles

3.3 Resultados dos objetivos 4 e 5

4 Comparar a indução de NETs, após estímulo com *L. infantum* nos cães sorologicamente positivos para LV assintomáticos e sintomáticos;

5 Verificar o papel das NETs no controle da carga parasitária *in vitro* em neutrófilos caninos.

Foi também comparada a quantificação de redes extracelulares de neutrófilos (NETs) nos sobrenadantes de neutrófilos de cães saudáveis, sorologicamente positivos para leishmaniose visceral sintomáticos e assintomáticos, sem estímulos (N0) e expostos a *Leishmania infantum* sendo utilizado um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1) (Figura 18).

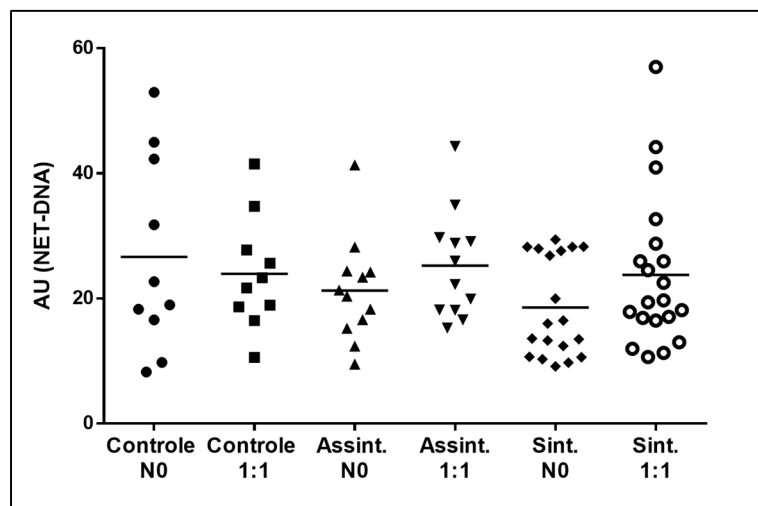


Figura 187. Liberação de NETs em neutrófilos de cães controle saudáveis sorologicamente positivos para leishmaniose assintomáticos e sintomáticos sem estímulo N0 e expostos a *L. infantum*, sendo um neutrófilo para uma *Leishmania* (1:1).

Na análise foi observado que a liberação de NETs em cães sorologicamente positivos para LV apresentaram um aumento, apesar de não ser estatisticamente significativo, resolvemos aumentar a quantidade de *Leishmanias* utilizada no estímulo, expondo um neutrófilo a cinco *Leishmanias* 1:5, foi observado que os cães sintomáticos para LV, produzem mais NETs, quando um neutrófilo, foi exposto a cinco *Leishmanias* (Figura 19).

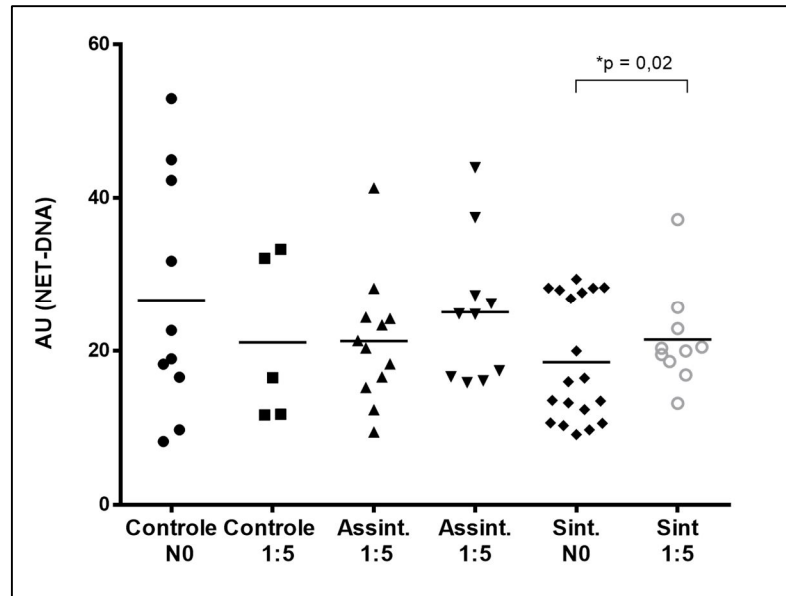


Figura 19. Liberação de NETs em neutrófilos de cães controle sadios sorologicamente positivo para leishmaniose assintomáticos e sintomáticos sem estímulo N0 e expostos a *L. infantum*, sendo um neutrófilo para cinco *Leishmanias* (1:5) (*Teste Wilcoxon pareado).

Foi observada a carga parasitária, por diluição limitante na concentração de 1 neutrófilo para 1 *Leishmania* (1:1), em 24 e 48 horas, em cães sadios, assintomáticos e sintomáticos para LV. Após 48 horas os neutrófilos dos indivíduos sintomáticos, apresentaram maior quantidade de parasitos, quando comparado a cães sadios e assintomáticos (Figura 20).

Observamos que como ocorre com a *L. amazonensis* (26) e *L. donovani* (128) a presença de *L. infantum* induz a liberação de NETs em humanos saudáveis. CARLSEN et al., 2015a relatam que amastigotas de *L. braziliensis* induzem maior ativação de neutrófilos, burst oxidativo, degranulação e liberação de citocinas do que amastigotas de *L. amazonensis*, desse modo podemos associar que diferentes espécies de leishmanias podem induzir diversas quantidades de NETs.

A interação *in vitro* de neutrófilos e promastigotas de *Leishmania* leva à liberação de NETs por estes granulócitos. Estas redes podem apreender as promastigotas no local da inoculação, facilitando assim a apreensão das *Leishmanias* pelos fagócitos (26,125,128,132), além disso, a incubação de alguns protozoários com sobrenadante de NETs faz com que estes tenham uma atenuação da virulência do parasito, com a diminuição da capacidade de invasão e replicação deste (24).

Em cães foi demonstrado que ocorre maior liberação de NETs em animais com LVC quando neutrófilos são expostos a uma razão de uma célula para cinco *Leishmanias*. Um trabalho recente observou a liberação de NETs por neutrófilos de cães saudáveis e com anemia hemolítica imunomediada, quando estimulados com acetato miristato de forbol (PMA) (32).

Porém foi observado que cães quando expostos a *L. infantum in vitro* liberam menor quantidade de NETs, quando comparado a humanos com LV, provavelmente cada espécie de indivíduos apresente diferenças na quantidade de NETs liberada, como por exemplo de NETs liberadas em bovinos, peixes, aves e gatos (23,28,29,31). Apesar do desenvolvimento da LVC depender em parte da resposta imune e a imunidade inata ter um papel importante na proteção da doença (155) a resposta imunológica nos cães com leishmaniose ainda não está caracteristicamente bem definida (97,156). E a maioria dos cães não conseguem controlar a infecção apropriadamente. Neste sentido, é possível que uma menor liberação de NETs quando comparado ao homem pode justificar a maior susceptibilidade desses animais a doença.

No presente estudo foi observado que indivíduos DTH+ liberaram uma menor quantidade de NETs nos neutrófilos e o estímulo da *Leishmania* não leva à liberação das NETs, quando comparados aos indivíduos controles saudáveis e pacientes tratados para LV. Quando analisamos as cargas parasitárias dos neutrófilos nestes experimentos, os pacientes tratados para LV são os que apresentam maior quantidade do parasito, e os indivíduos DTH+ são os que conseguem controlar melhor a carga parasitária da *L. infantum*. Assim, esses dados nos sugerem que a Netose não é um mecanismo de proteção importante para os indivíduos DTH+.

Além disso, alguns estudos relataram que a grande quantidade de NETs no organismo pode levar a danos nos tecidos dos hospedeiros (134,157), causando vasculites (158), hepatite

(159), trombozes (160), pode estar associada a algumas doenças como parkinson e alzheimer (161), além de estar envolvida na progressão do câncer (162). Um recente estudo afirma que a liberação de NETs não é importante para eliminação de *L. major* e que a ausência ou menor quantidade de redes extracelulares pode favorecer a integridade tecidual do hospedeiro (135).

A resposta DTH positiva está associada ao desenvolvimento de uma resistência adquirida à leishmaniose, assim a proteção dos DTH+ pode estar relacionada à outros mecanismos imunológicos, controlados pela genética desses indivíduos (163). Como a carga parasitária dos neutrófilos nesses indivíduos é menor do que os humanos que apresentaram LV, outros mecanismos do neutrófilo devem estar envolvidos no controle dos parasitos, a exemplo de enzimas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (77), porém serão necessários mais estudos, para elucidar quais mecanismos de defesa dos neutrófilos são utilizados pelos indivíduos DTH+ para controlar o parasito. Além disso, considerando o número pequeno de indivíduos DTH+ avaliados, a confirmação desses achados com um número maior de indivíduos deve ser realizada.

O tempo do início do tratamento dos pacientes com LV não influencia no controle da carga parasitária, já que indivíduos com 30 dias e 180 dias após tratamento não apresentam diferenças significativas com relação à carga parasitária. Assim sugerimos que estes indivíduos apresentem alguma alteração genética nos neutrófilos, pois não conseguem controlar de forma eficaz o parasito nas primeiras horas após infecção. Alguns autores afirmam que genes de suscetibilidade podem influenciar no desenvolvimento ou não da LV (77,164,165).

Em cães sintomáticos e assintomáticos para LV houve uma tendência a aumento na liberação de NETs quando estimulados com uma *Leishmania* para um neutrófilo (1:1), apesar de não apresentar diferença estatística. Quando estas células foram expostas a cinco *Leishmanias* para um neutrófilo (1:5) *in vitro*, foi observado que apenas os neutrófilos de cães sintomáticos mostraram aumento significativo.

Pode ser que a liberação de NETs seja uma tentativa de eliminar a leishmaniose em cães que já estão com leishmaniose visceral, ou que talvez seja um marcador de progressão da doença. (31) demonstraram que o mecanismo de liberação de NETs é superativado em gatos sintomáticos para o vírus da leucemia felina (FELV) e estimulados com *L. amazonensis*, quando comparado a gatos negativos ou assintomáticos para FELV. Assim, os autores comentam que esse mecanismo pode ser considerado um biomarcador da progressão da doença na infecção por FELV. Em um trabalho recente foi demonstrado um aumento na liberação de NETs em cães com anemia hemolítica (32).

As formas clínicas da LV são moduladas por diversos fatores próprios do indivíduo infectado, como estado nutricional e idade, além, do padrão de resposta imune (77,164,165). Os cães suscetíveis a LV são caracterizados por uma resposta imune exacerbada, imunossupressão celular e sinais clínicos da doença (166,167).

A presença de NETs já foi associada com complicações clínicas em algumas doenças. Segundo WONG et al., 2015, as redes podem prejudicar a cicatrização de feridas, particularmente em indivíduos com diabetes. E a liberação de Nets na pneumonia pode aumentar as lesões pulmonares (169), sendo que sinais como presença de feridas, dermatites, tosse e pneumonias são característicos de cães com LVC (88), assim a maior produção de NETs em cães sintomáticos para LV pode estar associada a clínica desses animais.

Uma regulação na liberação de NETs é necessária para limitar os danos colaterais. O menor tamanho das redes podem minimizar os danos teciduais causados por estas redes (157).

Quando analisado a carga parasitária em cães, foi observado que em 48 horas, os cães com sinais clínicos de leishmaniose foram os que apresentaram maior quantidade de parasito.

Cães com muitos sinais clínicos de leishmaniose apresentaram maior quantidade de DNA de *Leishmania* nos gânglios linfáticos, o que indica uma relação positiva entre a carga do parasito e manifestações clínicas da doença (170).

Alguns autores afirmam que a viabilidade dos neutrófilos variam com a fase de leishmaniose visceral canina e sugerem que a diminuição na quantidade de neutrófilos danifica a primeira linha de defesa do organismo, favorecendo a ocorrência de infecções (113)

Como resultado de um processo de co-evolução longo de hospedeiro-parasito, a *Leishmania* utiliza diferentes estratégias para o estabelecimento da infecção. Somente através da evasão do sistema imunológico a *Leishmania* pode completar o ciclo de vida e sobreviver no hospedeiro vertebrado (18,34,128).

O parasito *L. donovani* evade da atividade microbicida das redesde neutrófilos e Guimaraes-costa et al., 2014 afirmam que a enzima 3 nucleotidase/ nucleasse que existe no parasito e participa da nutrição dos protozoários faz com que estes protozoários escapem do atividade das redes (128). Com isso foi demonstrado que mesmo que as leishmanias induzam a liberação de redes de neutrófilos, estes parasitos já apresentam mecanismos de evasão para as armadilhas.

Em conclusão, os dados do presente estudo nos sugere que uma maior quantidade de NETs é liberada pelos humanos e cães que apresentaram ou apresentam LV. E que o controle da infecção *in vitro* não é feita pelas NETs. Os indivíduos DTH+ produzem menor quantidade de NETs quando estimulados ou não com *L. infantum*, no entanto, considerando o número

pequeno de DTH⁺ incluídos no estudo, esses dados devem ser confirmados, bem assim os mecanismos envolvidos no controle da infecção melhor elucidados. A quantidade de parasitos após 48 horas de infecção do neutrófilo é menor em humanos DTH⁺ é maior em cães com sintomas clínicos da LVC.

5. CONCLUSÃO

A Liberação de redes extracelulares varia de acordo com a forma clínica da LV em humanos e cães. O presente estudo não demonstra que a liberação de NETs é eficiente no controle da *L. infantum*. Assim, novos estudos devem ser realizados para avaliar outros mecanismos que os neutrófilos podem utilizar para controle deste parasito.

6. PERSPECTIVAS

1. Aumentar o número de indivíduos DTH+ para quantificação de NETs e dosar a quantidade das redes na razão de um neutrófilo para dez *Leishmanias*;
2. Dosar outros produtos dos neutrófilos que possam ter ação anti-parasitária, a exemplo de enzimas como elastase, mieloperoxidase;
3. Verificar a/as via/as de sinalização para a liberação das NETs, desencadeadas pelo estímulo com *Leishmania*;

REFERÊNCIAS

1. Penna H. Leishmaniose visceral no Brasil. **Bras Méd.** 1934;48:949–50.
2. Handman E. Cell biology of Leishmania. **Adv Parasitol** [Internet]. 1999 Jan [cited 2016 Jan 28];44:1–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10563394>
3. Belo VS, Struchiner CJ, Werneck GL, Barbosa DS, de Oliveira RB, Neto RGT, et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with Leishmania infantum infection in dogs in Brazil. **Vet Parasitol** [Internet]. 2013;195(1-2):1–13. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401713001556>
4. Pace D. Leishmaniasis. **J Infect** [Internet]. 2014;69:S10–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016344531400228X>
5. Alvarenga DG De, Maria P, Escalda F, Sylvio A, Tereza M, Duenhas F. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade Visceral leishmaniasis : retrospective study on factors associated with lethality. **Rev Soc Bras Med Trop.** 2010;43(2):194–7.
6. Harhay MO, Oliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol** [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;27(9):403–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S147149221100064X>
7. Brasil. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014. 120 p.
8. Ribeiro VM, da Silva SM, Menz I, Tabanez P, Nogueira Fdos S, Werkhauser M, et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasit Vectors** [Internet]. 2013;6(1):8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23311342>
9. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control. **Rev Saude Publica** [Internet]. 2014;48(5):851–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102014000500851&lng=en&nrm=iso&tlng=en
10. WHO. WHO | Leishmaniasis. **World Health Organization**; 2016 [cited 2016 Jan 27]; Available from: <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>
11. Nunes CM, Lima VM, Paula HB, Perri SH, Andrade AM, Dias FE, et al. Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. **Vet Parasitol** [Internet]. 2008;153(1-2):19–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18314275>
12. Maroli M, Gradoni L, Oliva G, Castagnaro M, Crotti A, Lubas G, et al. Guidelines for

- prevention of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc** [Internet]. 2010;236(11):1200–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513198>
13. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends Parasitol** [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;29(7):339–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2013.05.003>
 14. Lopes EGP, Magalhães DF, Silva J a., Haddad JP a, Moreira EC. Distribuição temporal e espacial da leishmaniose visceral em humanos e cães em Belo Horizonte-MG, 1993 a 2007. **Arq Bras Med Vet e Zootec**. 2010;62(5):1062–71.
 15. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends Parasitol** [Internet]. 2008;24(7):324–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514028>
 16. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. **Trends Parasitol** [Internet]. 2012;28(12):531–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995719>
 17. Miro G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G. Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. **Trends Parasitol** [Internet]. 2008;24(8):371–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18603476>
 18. Carvalho L, Araújo MI a S, Carvalho EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Contin Med Educ** [Internet]. 2004;79(6):647–64. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0365-05962004000600002&script=sci_arttext
 19. Leliefeld PHC, Koenderman L, Pillay J. How Neutrophils Shape Adaptive Immune Responses. **Front Immunol** [Internet]. 2015;6(September):1–8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00471>
 20. Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. **Blood** [Internet]. 2014 Jul 31 [cited 2016 Jan 27];124(5):710–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24923297>
 21. Mantovani A, Cassatella M a, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. [Internet]. **Nature reviews**. Immunology. 2011. p. 519–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3024>
 22. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science** [Internet]. 2004 Mar 5 [cited 2014

- Dev Comp Immunol** Jul 9];303(5663):1532–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15001782>
23. Palić D, Ostojić J, Andreasen CB, Roth J a. Fish cast NETs: neutrophil extracellular traps are released from fish neutrophils. **Dev Comp Immunol** [Internet]. 2007 Jan [cited 2015 Jan 21];31(8):805–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17222907>
 24. Sousa-Rocha D, Thomaz-Tobias M, Diniz LFA, Souza PSS, Pinge-Filho P, Toledo KA. Trypanosoma cruzi and Its Soluble Antigens Induce NET Release by Stimulating Toll-Like Receptors. **PLoS One** [Internet]. 2015 Jan [cited 2016 May 17];10(10):e0139569. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4591979&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 25. Fuchs T a, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. **J Cell Biol** [Internet]. 2007 Jan 15 [cited 2014 Jul 9];176(2):231–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063942&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 26. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc Natl Acad Sci U S A** [Internet]. 2009 Apr 21 [cited 2015 Nov 25];106(16):6748–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2672475&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 27. Pilszczek FH, Salina D, Poon KKH, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, et al. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. **J Immunol** [Internet]. 2010 Dec 15 [cited 2014 Dec 4];185(12):7413–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21098229>
 28. Grinberg N, Elazar S, Rosenshine I, Shpigel NY. Beta-hydroxybutyrate abrogates formation of bovine neutrophil extracellular traps and bactericidal activity against mammary pathogenic *Escherichia coli*. **Infect Immun** [Internet]. 2008 Jun [cited 2015 Jan 21];76(6):2802–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2423099&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 29. Chuammitri P, Ostojić J, Andreasen CB, Redmond SB, Lamont SJ, Palić D. Chicken heterophil extracellular traps (HETs): novel defense mechanism of chicken heterophils.

- Vet Immunol Immunopathol** [Internet]. 2009 May 15 [cited 2015 Jan 21];129(1-2):126–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19178950>
30. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN V, Zbytnuik LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. **Nat Med** [Internet]. 2012;18(9):1386–93. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.2847>
 31. Wardini AB, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Nadaes NR, Danelli MGM, Mazur C, et al. Characterization of neutrophil extracellular traps in cats naturally infected with feline leukemia virus. **J Gen Virol** [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Jan 21];91(Pt 1):259–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19793908>
 32. Jeffery U, Kimura K, Gray R, Lueth P, Bellaire B, LeVine D. Dogs cast NETs too: Canine neutrophil extracellular traps in health and immune-mediated hemolytic anemia. **Vet Immunol Immunopathol** [Internet]. 2015 Dec 15 [cited 2016 Jan 28];168(3-4):262–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26574161>
 33. Tauil PL. Perspectivas de controle de doenças transmitidas por vetores no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2006;39(3):275–7.
 34. Guimarães-Costa AB, DeSouza-Vieira TS, Paletta-Silva R, Freitas-Mesquita AL, Meyer-Fernandes JR, Saraiva EM. 3'-nucleotidase/nuclease activity allows *Leishmania* parasites to escape killing by neutrophil extracellular traps. **Infect Immun** [Internet]. 2014 Apr [cited 2015 Jan 18];82(4):1732–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3993383&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 35. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Kirk M, editor. **PLoS One** [Internet]. 2012 May 31;7(5):e35671. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>
 36. Penna H. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Méd*. 1934. p. 949–50.
 37. de Pita-Pereira D, Cardoso MA, Alves CR, Brazil RP, Britto C. Detection of natural infection in *Lutzomyia cruzi* and *Lutzomyia forattinii* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) by *Leishmania infantum chagasi* in an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil using a PCR multiplex assay. **Acta Trop** [Internet]. 2008;107(1):66–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502392>
 38. de Oliveira AG, Marassa AM, Consales CA, Dorval ME, Fernandes CE, de Oliveira GR, et al. Observations on the feeding habits of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)

- (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) in Campo Grande, an endemic area of visceral leishmaniasis in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Acta Trop** [Internet]. 2008;107(3):238–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18611387>
39. De Oliveira EF, Silva EA, Casaril AE, Fernandes CE, Paranhos Filho AC, Gamarra RM, et al. Behavioral aspects of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) in urban area endemic for visceral leishmaniasis. **J Med Entomol** [Internet]. 2013;50(2):277–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540114>
 40. Gramiccia M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: Epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Vet Parasitol** [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;181(1):23–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.04.019>
 41. Handman E, Elso C, Foote S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. **Adv Parasitol** [Internet]. 2005 Jan [cited 2016 Jan 28];59:1–75. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X05590018>
 42. Lainson R, Shaw JJ. Observations on the development of *Leishmania* (L.) *chagasi* Cunha and Chagas in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum comparée** [Internet]. 1988 Jan [cited 2015 Dec 11];63(2):134–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3421641>
 43. Lara-Silva FDO, Michalsky ÉM, Fortes-Dias CL, Fiuza VDOP, Pessanha JEM, Regina-Silva S, et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Trop** [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;148:128–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X15000881>
 44. Rittig MG, Bogdan C. Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitol Today** [Internet]. 2000 Jul [cited 2016 Jan 28];16(7):292–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10858648>
 45. Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. **Parasitology** [Internet]. 2009 Dec [cited 2016 Jan 27];136(14):1915–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19835643>
 46. Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulalio MC, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg** [Internet]. 1998;59(1):53–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9684628>
 47. Tunon GIL, de Moura TR, de Jesus AR, de Almeida RP. In vitro infection by *Leishmania infantum* in the peripheral blood mononuclear cell-derived macrophages from crab-

- eating foxes (*Cerdocyon thous*). **Vet Parasitol** [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;212(3-4):417–21. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401715003222>
48. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. **Parasit Vectors** [Internet]. 2009;2 Suppl 1:S1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19426440>
 49. Dantas-Torres F. Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo** [Internet]. 2006;48(4):219–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119679>
 50. da Silva AVM, de Paula AA, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad Saúde Pública**. 2005;21(1):324–8.
 51. Felipe K, Costa DL, Santos S, Amóra A, Fernandes C, Couto DA, et al. Awareness of visceral leishmaniasis and its relationship to canine infection in riverside endemic areas in Northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2014;47(October):607–12.
 52. Rosypal AC, Tripp S, Kinlaw C, Sharma RN, Stone D, Dubey JP. Seroprevalence of canine leishmaniasis and American trypanosomiasis in dogs from Grenada, West Indies. **J Parasitol** [Internet]. 2010;96(1):228–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19712013>
 53. Penaforte KM, Belo VS, Teixeira-Neto RG, Ribeiro RA, de Oliveira RB, Schettini DA, et al. *Leishmania* infection in a population of dogs: an epidemiological investigation relating to visceral leishmaniasis control. **Rev Bras Parasitol Vet** [Internet]. 2013;22(4):592–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24473887>
 54. Bevilacqua PD, Alves WA. 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. **Cad Saude Publica**. 2004;20(1):259–65.
 55. WHO | Burden and distribution. **World Health Organization**; [cited 2016 Feb 23]; Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
 56. **Ministério da Saúde**. Situação Epidemiológica - Dados [Internet]. 2016 [cited 2016 Mar 29]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/situacao-epidemiologica-dados-zika>
 57. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. [Internet]. **Trends in parasitology**. 2011. p. 1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596622>
 58. Coura-Vital W. Estudo epidemiológico prospectivo em cães assintomáticos infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum* e identificação de biomarcadores de infecção.

- Univ Fed Minas Gerais** [Internet]. 2011;169. Available from: [http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estudo+epidemiol?gico+prospectivo+em+c?es+assintom?ticos+infectados+por+Leishmania+\(Leishmania\)+infantum+e+identifica??o+de+biomarcadores+de+infec??o#0](http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estudo+epidemiol?gico+prospectivo+em+c?es+assintom?ticos+infectados+por+Leishmania+(Leishmania)+infantum+e+identifica??o+de+biomarcadores+de+infec??o#0)
59. Barbosa DS, Belo VS, Rangel MES, Werneck GL. Spatial analysis for identification of priority areas for surveillance and control in a visceral leishmaniasis endemic area in Brazil. **Acta Trop** [Internet]. 2014 Mar [cited 2016 Mar 12];131:56–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X13003513>
 60. Cavalcante ÍJM, Vale MR. Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Ceará in the period 2007 to 2011. **Rev Bras Epidemiol** [Internet]. 2014;17(4):911–24. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-790X2014000400911&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 61. Góes MADO, Melo CM De, Jeraldo VDLS. Time series of visceral leishmaniasis in Aracaju, state of Sergipe, Brazil (1999 to 2008): human and canine aspects. **Rev Bras Epidemiol** [Internet]. 2012;15(2):298–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782095>
 62. Tavares LMS de A, Tavares ED. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da Leishmaniose Visceral em Sergipe. **Inf Epidemiológico do Sus** [Internet]. Centro Nacional de Epidemiologia / Fundação Nacional de Saúde / Ministério da Saúde; 1999 Mar [cited 2016 Mar 10];8(1):47–52. Available from: http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-16731999000100006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
 63. Silva AVM Da, Paula AA De, Cabrera MAA, Carreira JCA. Leishmaniose em cães domésticos: aspectos epidemiológicos. **Cad Saude Publica**. 2005;21(1):324–8.
 64. De Almeida AS, Medronho RDA, Werneck GL. Identification of risk areas for visceral leishmaniasis in Teresina, Piauí State, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. 2011;84(5):681–7.
 65. Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol Infect** [Internet]. 2007 Feb [cited 2016 Mar 12];135(2):195–201. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2870576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 66. Aparicio C, Bitencourt MD. Modelagem espacial de zonas de risco da leishmaniose tegumentar americana. **Rev Saude Publica** [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2016 Mar

- 12];38(4):511–6. Available from: <http://www.revistas.usp.br/rsp/article/view/31751>
67. Paulan S de C, Silva HR, Lima EAC de F, Flores EF, Tachibana VM, Kanda CZ, et al. Spatial distribution of canine Visceral Leishmaniasis in Ilha Solteira, São Paulo, Brazil. **Eng Agrícola** [Internet]. Associação Brasileira de Engenharia Agrícola; 2012 Aug [cited 2016 Mar 14];32(4):765–74. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69162012000400016&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 68. Carvalho MS, Souza-Santos R. Análise de dados espaciais em saúde pública: métodos, problemas, perspectivas. **Cad Saude Publica** [Internet]. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2005 Apr [cited 2016 Mar 12];21(2):361–78. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2005000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=pt
 69. Bailey TC. Spatial statistical methods in health. **Cad Saude Publica** [Internet]. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2001 Oct [cited 2016 Mar 12];17(5):1083–98. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2001000500011&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 70. Burstein R T. Sistemas de información geográfica y su aplicación en la salud pública. **Rev Peru Med Exp Salud Publica** [Internet]. Instituto Nacional de Salud; 2002 [cited 2016 Mar 12];19(3):107. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342002000300001&lng=es&nrm=iso&tlng=es
 71. Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** [Internet]. Fundação Oswaldo Cruz; 2006 Feb [cited 2016 Mar 14];101(1):31–8. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762006000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 72. Carneiro D. Identificação de áreas de risco para a leishmaniose visceral americana, através de estudos epidemiológicos e sensoriamento remoto orbital, em Feira de Santana-BA **Rev Baiana Saúde Pública** [Internet]. 2014 [cited 2016 Mar 15]; Available from: http://inseer.ibict.br/rbsp/index.php/rbsp/article/view/1188/pdf_500
 73. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis** [Internet]. 1986

- Dec [cited 2016 Jan 28];154(6):1003–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3782864>
74. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol** [Internet]. 2007 Nov [cited 2016 Jan 28];5(11):873–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938629>
 75. de Carvalho RF, Ribeiro IF, Miranda-Vilela AL, de Souza Filho J, Martins OP, Cintra e Silva Dde O, et al. Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA-DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice. **Exp Parasitol** [Internet]. 2013;135(2):217–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23891944>
 76. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A, Navarro Mari JM, et al. Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries** [Internet]. 2014 Aug 13 [cited 2015 Dec 12];8(8):961–72. Available from: <http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/25116660>
 77. Jeronimo SMB, Duggal P, Ettinger NA, Nascimento ET, Monteiro GR, Cabral AP, et al. Genetic predisposition to self-curing infection with the protozoan *Leishmania chagasi*: a genomewide scan. **J Infect Dis** [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2016 Jan 30];196(8):1261–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2330094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 78. Pastorino AC, Jacob CMA, Oselka GW, Carneiro-Sampaio MMS. [Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects]. **J Pediatr** (Rio J) [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jan 28];78(2):120–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14647793>
 79. Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clin Exp Immunol** [Internet]. 2015 Nov [cited 2016 Apr 14];182(2):109–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126690>
 80. Costa CHN, Werneck GL, Costa DL, Holanda TA, Aguiar GB, Carvalho AS, et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic inflammatory response syndrome? A case control study. **Rev Soc Bras Med Trop** [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Jan 28];43(4):386–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802936>
 81. Baneth G, Harrus S, Ohnnona FS, Schlesinger Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia*

- canis in experimental infection with comparison to natural infection. **Vet Microbiol** [Internet]. 2009;136(3-4):321–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128893>
82. Alexandre-Pires G, de Brito MT, Alguero C, Martins C, Rodrigues OR, da Fonseca IP, et al. Canine leishmaniasis. Immunophenotypic profile of leukocytes in different compartments of symptomatic, asymptomatic and treated dogs. **Vet Immunol Immunopathol** [Internet]. 2010;137(3-4):275–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20615553>
 83. de Queiroz NMGP, de Assis J, Oliveira TMFS, Machado RZ, Nunes CM, Starke-Buzetti W a. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Rev Bras Parasitol Vet.** 2010;19(1):32–8.
 84. Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, et al. Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc** [Internet]. 2010;236(11):1184–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513195>
 85. Dantas-Torres F, Otranto D. When is an “asymptomatic” dog asymptomatic? **Vet Parasitol** [Internet]. 2014 May 28 [cited 2016 Mar 9];202(3-4):341–2. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401714000818>
 86. Laurenti MD, Marcondes M. Asymptomatic or infect dog, symptomatic or sick/severely sick dog: The nomenclature did not change the clinical pathological classification in canine leishmaniasis. **Vet Parasitol** [Internet]. 2014;202(3-4):339–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24630711>
 87. Oliva G, Roura X, Crotti A, Maroli M, Castagnaro M, Gradoni L, et al. Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. **J Am Vet Med Assoc** [Internet]. 2010;236(11):1192–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513197>
 88. Baneth G, Aroch I. Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge. **Vet J** [Internet]. 2008;175(1):14–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17215150>
 89. Ribeiro RR, da Silva SM, Fulgencio Gde O, Michalick MS, Frezard FJ. Relationship between clinical and pathological signs and severity of canine leishmaniasis. **Rev Bras Parasitol Vet** [Internet]. 2013;22(3):373–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24142168>
 90. Nicolato RDC, de Abreu RT, Roatt BM, Aguiar-Soares RDDO, Reis LES, Carvalho

- MDG, et al. Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **PLoS One** [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Nov 18];8(12):e82947. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3871677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
91. Gavgani AS, Hodjati MH, Mohite H, Davies CR. Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. **Lancet** [Internet]. 2002;360(9330):374–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12241778>
 92. Foroughi-Parvar F, Hatam G. Vaccines for canine leishmaniasis. **Adv Prev Med** [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jan 27];2014:569193. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4297634&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 93. Testasica MC de S, dos Santos MS, Machado LM, Serufo AV, Doro D, Avelar D, et al. Antibody responses induced by Leish-Tec®, an A2-based vaccine for visceral leishmaniasis, in a heterogeneous canine population. **Vet Parasitol** [Internet]. 2014 Aug 29 [cited 2016 Feb 4];204(3-4):169–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24863572>
 94. Brasil. Ministério da Agricultura [Internet]. **Ministério da saúde**. 2008 [cited 2016 Jan 27]. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri1426_11_07_2008.html
 95. da Silva A V, de Paula AA, de Pita Pereira D, Brazil RP, Carreira JC. Canine leishmaniasis in Brazil: serological follow-up of a dog population in an endemic area of american visceral leishmaniasis. **J Parasitol Res** [Internet]. 2009;2009. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798762>
 96. Travi BL. Ethical and epidemiological dilemmas in the treatment of dogs for visceral leishmaniasis in Latin America. **Biomédica Rev del Inst Nac Salud** [Internet]. 2014 Jan [cited 2016 Jan 27];34(1):7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967853>
 97. Barbiéri CL. Immunology of canine leishmaniasis. [Internet]. **Parasite immunology**. 2006. p. 329–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16842269>
 98. Pinelli E, Gebhard D, Mommaas AM, van Hoeij M, Langermans JA, Ruitenberg EJ, et al. Infection of a canine macrophage cell line with leishmania infantum: determination of nitric oxide production and anti-leishmanial activity. **Vet Parasitol** [Internet]. 2000

- Oct 1 [cited 2016 Feb 4];92(3):181–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10962155>
99. Kumar R, Nylén S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front Immunol** [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 May 15];3:251. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 100. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunol Rev** [Internet]. 2011 Mar [cited 2016 May 15];240(1):286–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349100>
 101. Alexander J, Bryson K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunol Lett** [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2016 Mar 21];99(1):17–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894106>
 102. Nylén S, Sacks D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol** [Internet]. 2007 Sep [cited 2016 Mar 14];28(9):378–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689290>
 103. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl Trop Dis** [Internet]. Public Library of Science; 2016 Jan [cited 2016 Mar 23];10(1):e0004375. Available from: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004375>
 104. Dos Santos PL, de Oliveira FA, Santos MLB, Cunha LCS, Lino MTB, de Oliveira MFS, et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl Trop Dis** [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 Jan 28];10(1):e0004375. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814478>
 105. Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection. **J Immunol** [Internet]. 2009 Dec 15 [cited 2014 Dec 18];183(12):8088–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923470>
 106. Marques CS, Passero LFD, Vale-Gato I, Rodrigues A, Rodrigues OR, Martins C, et al. New insights into neutrophil and Leishmania infantum in vitro immune interactions. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** [Internet]. 2015 Jun [cited 2015 Nov 18];40:19–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857442>
 107. Ribeiro-Gomes FL, Sacks D. The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. **Front Cell Infect Microbiol** [Internet]. 2012

- Jan [cited 2015 Nov 25];2:59. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3417510&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
108. Peters NC, Sacks DL. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol** [Internet]. 2009 Sep [cited 2015 Nov 16];11(9):1290–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3431610&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 109. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, et al. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania* major infection. **J Immunol** [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2016 Jan 28];172(7):4454–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034061>
 110. Urban CF, Lourido S, Zychlinsky A. How do microbes evade neutrophil killing? **Cell Microbiol** [Internet]. 2006 Nov [cited 2015 Nov 20];8(11):1687–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16939535>
 111. Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MCA, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, et al. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania* major through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **J Immunol** [Internet]. 2007 Sep 15 [cited 2016 Jan 8];179(6):3988–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17785837>
 112. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology** [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Jan 22];213(3-4):183–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406366>
 113. Almeida BFM, Narciso LG, Bosco a M, Pereira PP, Braga ET, Avanço S V, et al. Neutrophil dysfunction varies with the stage of canine visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol** [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2015 Jan 21];196(1-2):6–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498648>
 114. Malafaia G, Rezende SA. O papel dúbio dos neutrófilos na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*: uma breve discussão [Internet]. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**. 2009 [cited 2016 Apr 5]. Available from: <http://revista.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/140>
 115. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. **J Innate Immun** [Internet]. 2009 Jan [cited 2015

- Dec 24];1(3):176–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375575>
116. Tacchini-Cottier F, Zweifel C, Belkaid Y, Mukankundiye C, Vasei M, Launois P, et al. An immunomodulatory function for neutrophils during the induction of a CD4⁺ Th2 response in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. **J Immunol** [Internet]. 2000 Sep 1 [cited 2016 Jan 28];165(5):2628–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10946291>
 117. Carlsen ED, Hay C, Henard C a, Popov V, Garg NJ, Soong L. *Leishmania amazonensis* amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. **Infect Immun** [Internet]. 2013 Nov [cited 2015 Jan 21];81(11):3966–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3811833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 118. McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J, et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infect Immun** [Internet]. 2008 Feb [cited 2016 Jan 27];76(2):532–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 119. Schauer C, Janko C, Munoz LE, Zhao Y, Kienhöfer D, Frey B, et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nat Med** [Internet]. 2014;20(5):511–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24784231>
 120. Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. **Cell Microbiol** [Internet]. 2006 Apr [cited 2014 Dec 29];8(4):668–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16548892>
 121. Baker VS, Imade GE, Molta NB, Tawde P, Pam SD, Obadofin MO, et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. **Malar J** [Internet]. 2008 Jan [cited 2016 Jan 16];7:41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2275287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 122. Peschel A, Hartl D. Anuclear neutrophils keep hunting. **Nat Med** [Internet]. Nature Publishing Group; 2012;18(9):1336–8. Available from:

- <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2918>
123. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? **Blood** [Internet]. 2013;122(16):2784–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24009232>
 124. Remijsen Q, Kuijpers TW, Wirawan E, Lippens S, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. Cell Death Differ [Internet]. **Nature** Publishing Group; 2011;18(4):581–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.1>
 125. Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia E Souza LF, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. **Sci Rep** [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Dec 18];5:18302. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4682131&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 126. Remijsen Q, Vandenabeele P, Willems J, Kuijpers TW. Reconstitution of protection against Aspergillus infection in chronic granulomatous disease (CGD). **Blood** [Internet]. 2009;114(16):3497; author reply 3498. Available from: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/114/16/3497.full.pdf>
 127. Abi Abdallah DS, Denkers EY. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. [Internet]. **Front Immunol**. 2012. p. 382. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3522045&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 128. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A. Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **J Immunol** [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2014 Dec 29];185(7):4319–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20826753>
 129. de Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasit Vectors** [Internet]. 2016 Jan [cited 2016 May 6];9(1):264. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4857439&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 130. Metzler KD, Fuchs T a., Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. **Blood**. 2011;117(3):953–9.
 131. Remijsen Q, Berghe T Vanden, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et

- al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* [Internet]. **Nature** Publishing Group; 2011;21(2):290–304. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cr.2010.150>
132. Morgado FN, Nascimento MTC, Saraiva EM, Oliveira-Ribeiro C de, Madeira M de F, Costa-Santos M da, et al. Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? **PLoS One** [Internet]. 2015;10(7):e0133063. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0133063>
 133. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Parthoens E, Asselbergh B, Vandenabeele P, Willems J. Inhibition of spontaneous neutrophil apoptosis by paratubopirin acts independently of NADPH oxidase inhibition but by lipid raft-dependent stimulation of Akt. **J Leukoc Biol**. 2009;85(3):497–507.
 134. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, Lochnit G, Barreto G, Galuska SP, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. **PLoS One** [Internet]. Public Library of Science; 2012 Jan [cited 2016 May 17];7(2):e32366. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0032366>
 135. Ricci-Azevedo R, Oliveira AF, Conrado MCA V, Carvalho FC, Roque-Barreira MC. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on *Leishmania major*. **PLoS Negl Trop Dis** [Internet]. 2016 Apr [cited 2016 Apr 12];10(4):e0004609. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4825989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 136. **IBGE**. IBGE | Cidades | Sergipe | Aracaju [Internet]. 2015 [cited 2016 Mar 22]. Available from: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=280030>
 137. Brasil. Esclarecimento sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina. **Nota técnica conjunta nº 01/2011**. 2011. p. 1–3.
 138. Jeraldo V de LS, Góes MA de O, Casanova C, Melo CM de, Araújo ED de, Brandão Filho SP, et al. Sandfly fauna in an area endemic for visceral leishmaniasis in Aracaju, State of Sergipe, Northeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2012;45(3):318–22.
 139. Laurenti MD, Rossi CN, da Matta VLR, Tomokane TY, Corbett CEP, Secundino NFC, et al. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi to the natural vector. **Vet Parasitol** [Internet]. 2013 Sep 23 [cited 2016

- Mar 9];196(3-4):296–300. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401713001623>
140. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control [Internet]. **Revista de Saúde Pública**. 2014. p. 851–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102014000500851&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 141. **Brasil**. Situação Epidemiológica - Dados [Internet]. Ministério da saúde. 2013 [cited 2016 Jan 27]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>
 142. Alves JAB, Santos JR, de Mendonça EN, Abud ACF, Nunes M da S, Fakhouri R, et al. Epidemiological aspects of dengue in Aracaju, State of Sergipe, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop** [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Jan 28];44(6):670–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231240>
 143. Maroli M, Mizzon V, Siragusa C, D'Oorazi A, Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. **Med Vet Entomol** [Internet]. 2001;15(4):358–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11776454>
 144. Nunes CM, Pires MM, da Silva KM, Assis FD, Goncalves Filho J, Perri SH. Relationship between dog culling and incidence of human visceral leishmaniasis in an endemic area. **Vet Parasitol** [Internet]. 2010;170(1-2):131–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20181428>
 145. Góes MAO, Jeraldo V de LS, Oliveira AS. Urbanização da leishmaniose visceral: aspectos clínicos e epidemiológicos em Aracaju, Sergipe, Brasil. **Rev Bras Med Família e Comunidade** [Internet]. 2013;9(31):119. Available from: <http://rbmfc.org.br/rbmfc/article/view/685>
 146. Guerra-Silveira F, Abad-Franch F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS One**. 2013;8(4).
 147. Belo VS, Werneck GL, Barbosa DS, Simões TC, Nascimento BWL, da Silva ES, et al. Factors associated with visceral leishmaniasis in the americas: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis** [Internet]. 2013;7(4):e2182. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 148. Amóra SSA, Santos MJP, Alves ND, Costa SCG Da, Calabrese KDS, Monteiro AJ, et

- al. Fatores relacionados com a positividade de cães para leishmaniose visceral em área endêmica do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Ciência Rural** [Internet]. 2006;36(6):1854–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782006000600029&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
149. Tsegaw T, Gadisa E, Seid A, Abera A, Teshome A, Mulugeta A, et al. Identification of environmental parameters and risk mapping of visceral leishmaniasis in Ethiopia by using geographical information systems and a statistical approach. **Geospat Health**. 2013;7(2):299–308.
 150. Bhunia GS, Kesari S, Jeyaram A, Kumar V, Das P. Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: A study based on remote sensing and geographical information system. **Geospat Health**. 2010;4(2):155–65.
 151. Dantas-Torres F, de Paiva-Cavalcanti M, Figueredo LA, Melo MF, da Silva FJ, da Silva AL, et al. Cutaneous and visceral leishmaniasis in dogs from a rural community in northeastern Brazil. **Vet Parasitol** [Internet]. 2010;170(3-4):313–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227186>
 152. Bhunia GS, Kesari S, Jeyaram A, Kumar V, Das P. Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: A study based on remote sensing and geographical information system. **Geospat Health**. 2010;4(2):155–65.
 153. Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA. A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunol** [Internet]. 1985 Sep [cited 2015 Dec 21];7(5):545–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3877902>
 154. Carlsen ED, Jie Z, Liang Y, Henard CA, Hay C, Sun J, et al. Interactions between Neutrophils and *Leishmania braziliensis* Amastigotes Facilitate Cell Activation and Parasite Clearance. **J Innate Immun** [Internet]. Karger Publishers; 2015 Jan 27 [cited 2016 May 23];7(4):354–63. Available from: <http://www.karger.com/Article/FullText/373923>
 155. Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. **Trends Parasitol** [Internet]. 2002 Sep [cited 2016 Jan 9];18(9):399–405. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12377257>
 156. Miranda LH, Quintella LP, Santos IB, Oliveira R V, Menezes RC, Figueiredo FB, et al. Comparative histopathological study of sporotrichosis and American tegumentary leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro. **J Comp Pathol** [Internet]. 2010;143(1):1–7.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20100620>
157. Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, Wang Q, Gutierrez MG, Brown GD, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. **Nat Immunol** [Internet]. 2014 Sep 14 [cited 2014 Sep 15];15(11):1017–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4236687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 158. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, Back W, Gross WL, Werb Z, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. **Nat Med** [Internet]. 2009 Jun [cited 2015 Dec 4];15(6):623–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2760083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 159. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. **Nat Med** [Internet]. 2007 Mar 25 [cited 2015 Oct 22];13(4):463–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384648>
 160. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** [Internet]. 2010 Sep 7 [cited 2015 Sep 28];107(36):15880–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2936604&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 161. Pepys MB. Amyloidosis. **Annu Rev Med** [Internet]. 2006 Jan [cited 2015 Nov 3];57:223–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409147>
 162. Najmeh S, Cools-Lartigue J, Giannias B, Spicer J, Ferri LE. Simplified Human Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Isolation and Handling. **J Vis Exp** [Internet]. 2015 Jan 16 [cited 2016 Feb 10];(98):e52687. Available from: <http://www.jove.com/video/52687/simplified-human-neutrophil-extracellular-traps-nets-isolation>
 163. Miles SA, Conrad SM, Alves RG, Jeronimo SMB, Mosser DM. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen *Leishmania*. **J Exp Med** [Internet]. 2005 Mar 7 [cited 2016 Jan 30];201(5):747–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1351290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 164. Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al.

- Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunol** [Internet]. 2009 May [cited 2016 Jan 30];31(5):254–66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3160815&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
165. Ettinger NA, Duggal P, Braz RFS, Nascimento ET, Beaty TH, Jeronimo SMB, et al. Genetic admixture in Brazilians exposed to infection with *Leishmania chagasi*. **Ann Hum Genet** [Internet]. 2009 May [cited 2016 Jan 30];73(Pt 3):304–13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2731584&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 166. Maia C, Campino L. Cytokine and Phenotypic Cell Profiles of *Leishmania infantum* Infection in the Dog. **J Trop Med** [Internet]. 2012 Jan [cited 2016 Jan 30];2012:541571. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3154519&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 167. Maia CSF, Monteiro MC, Gavioli EC, Oliveira FR, Oliveira GB, Romão PRT. Neurological disease in human and canine leishmaniasis - clinical features and immunopathogenesis. **Parasite Immunol** [Internet]. 2015;37(8):385–93. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12203>
 168. Wong SL, Demers M, Martinod K, Gallant M, Wang Y, Goldfine AB, et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. **Nat Med** [Internet]. 2015;21(7):815–9. Available from: http://www.nature.com/nm/journal/v21/n7/full/nm.3887.html?WT.ec_id=NM-201507&spMailingID=49045495&spUserID=MTc2NTI1MDY5NgS2&spJobID=720844904&spReportId=NzIwODQ0OTA0S0
 169. Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew A-A, et al. Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis. **Am J Pathol** [Internet]. 2011 Jul [cited 2016 Jan 30];179(1):199–210. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3123873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 170. Lima L V, Carneiro LA, Campos MB, Chagas EJ, Laurenti MD, Corbett CE, et al. Canine visceral leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum chagasi* in Amazonian Brazil: comparison of the parasite density from the skin, lymph node and visceral tissues between symptomatic and asymptomatic, seropositive dogs. **Rev Inst Med Trop Sao**

Paulo [Internet]. 2010;52(5):259–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049230>

ANEXOS

ANEXO A – Artigo submetido

Dear Mrs Campos,

Thank you for submitting your manuscript,
"Spatial analysis and epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil", to Parasitology Research

The submission id is: PARE-D-16-00569

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://pare.edmgr.com/>

Your username is: Roseane

Your password is: available at this

link http://pare.edmgr.com/Default.aspx?pg=accountFinder.aspx&firstname=Roseane&lastname=Campos&email_address=roseane_nunes@hotmail.com

With kind regards,

Journals Editorial Office PARE
Springer

ANEXO B – Participação em artigos

Artigos submetidos

✓ Théo Araújo-Santos; Bruno B. Andrade; Nivea F. Luz; Priscila L. dos Santos; Fabricia Alvisi Oliveira; Meirielly L. Almeida; **Roseane N.S. Campos**; Patricia T. Bozza; Roque P. Almeida; Valeria Matos Borges

"Patients with active visceral leishmaniasis exhibit an imbalance between systemic levels of prostanoids and cytokines." On **PLOS Neglected Tropical Diseases**

✓ Author: Pedro Alcolea; Co-Authors: Gabriel I L Tuñón; Ana Alonso; Francisco García-Tabares; Sergio Ciordia; María C Mena; **Roseane N S Campos**; Roque P Almeida; Vicente Larraga

"Gene expression profiling of nitric oxide-sensitive and resistant promastigote isolates of *Leishmania chagasi*." On **Journal of Proteomics**

ANEXO C- Termo de consentimento livre e esclarecido de humanos

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: Avaliação Epidemiológica, Clínica e Imunológica de familiares e pacientes com Leishmaniose Visceral.

NOME DO PACIENTE: _____

Nº do Projeto: _____

Investigador Principal: Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil. Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concordem participar desta pesquisa.

Convite e Objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral que foram atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento.

Participação voluntária: Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

Finalidade do estudo: Identificar indivíduos assintomáticos que residem no mesmo ambiente de pacientes com leishmaniose visceral através da resposta ao teste de Montenegro e Sorologia positiva para *L. infantum*, avaliando também a resposta imune inata através da liberação de redes extracelulares de neutrófilos nos indivíduos

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Procedimento: Será retirado por punção venosa, 20 ml de sangue, que ao deve levar a riscos para sua saúde, podendo apresentar dor discreta no local da punção. O teste de Montenegro será aplicado no seu braço e é o mesmo procedimento quando você toma uma vacina e também não é prejudicial para sua saúde. Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade: O melhor conhecimento sobre a leishmaniose visceral poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

Custos: Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos: Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79) 8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Assinatura ou impressão do participante

Data Hora

Nome/Assinatura do pesquisador

Data Hora

Nome/Assinatura da testemunha

Data Hora

ANEXO D - Termo de consentimento e livre esclarecido dos cães**TERMO DE CONSENTIMENTO****IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL**

Nome: _____ Espécie _____

Raça _____ Idade _____ Cor _____ Sexo _____

Eu, _____,

RG: _____ CPF: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Telefone: _____

Eu, Proprietário do cão acima identificado, autorizo a coleta de sangue do meu animal pela médica veterinária Roseane Nunes de Santana Campos (CRMV-SE 410), doutoranda de um projeto de pesquisa do Núcleo de pós - graduação em ciências da saúde da Universidade Federal de Sergipe sob a orientação do Professor Dr. Roque Pacheco.

Fui informado que o proprietário tem a garantia de receber respostas a qualquer pergunta e esclarecimento de qualquer dúvida quanto aos assuntos relacionados à pesquisa. Além disso, os animais serão acompanhados pela médica veterinária, durante todo o experimento.

O proprietário do animal tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, não acarretando nenhum dano ao proprietário e ao animal. Qualquer dúvida entrar em contato com Roseane Nunes Tel: (79) 9993-5212 Ou Dr. Roque Pacheco Tel.: (79) 8823-7244

Aracaju- SE, _____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do proprietário

ANEXO E - Ficha Clínica dos cães

Data: ____/____/____		
Nome: _____	Idade _____	Sexo _____
Raça: _____	Pelagem: _____	Peso: _____
Proprietário: _____		
Endereço: _____		

Telefone res: _____ Telefone celular: _____		
Anamnese		
Vacinação: _____		
Vermifugação: _____		
Alimentação: _____		
Observações: _____		

Exame Clínico		
Estado do animal: _____		
Temperatura: _____	Freq. cardíaca: _____	Freq. respiratória _____
Linfonodos: _____		

Olhos: _____		

Ouvidos: _____		
Focinho _____	Cavidade oral: _____	
Peles e anexos: _____		

Abdômen: _____		
Sistema músculo esquelético: _____		
Sistema Genito urinário: _____		
Observações: _____		
