

NATIELLE RODRIGUES WAJIMA

**METALOPROTEINASES 2 E 9 SÉRICA EM GATOS
NATURALMENTE INFECTADOS COM *LEISHMANIA* SPP.**

Araçatuba

2023

NATIELLE RODRIGUES WAJIMA

**METALOPROTEINASES 2 E 9 SÉRICA EM GATOS
NATURALMENTE INFECTADOS COM *LEISHMANIA* SPP.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Gisele Fabrino Machado

Araçatuba

2023

W145m Wajima, Natiele Rodrigues
METALOPROTEINASES 2 E 9 SÉRICA EM GATOS
NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA SPP. /
Natielle Rodrigues Wajima. -- Araçatuba, 2023
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba
Orientadora: Gisele Fabrino Machado

1. Leishmaniose. 2. Metaloproteínas. 3. Zimografia. 4.
Felinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: METALOPROTEINASE 2 E 9 SÉRICA EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS
COM *Leishmania spp*

AUTORA: NATIÉLLE RODRIGUES WAJIMA

ORIENTADORA: GISELE FABRINO MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Ciência Animal,
área: Fisiopatologia Médica e Cirúrgica pela Comissão Examinadora:

Profa. Associada GISELE FABRINO MACHADO (Participação Presencial)
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de
Araçatuba/UNESP

Dr. ALEX AKIRA NAKAMURA (Participação Presencial)
Doutor em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / USP

Dra. RAFAELA BEATRIZ PINTOR TORRECILHA (Participação Presencial)
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de
Jaboticabal/UNESP

Araçatuba, 15 de agosto de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Professora Gisele Fabrino Machado. Obrigada por me orientar e ser paciente comigo até nos momentos de desespero. Obrigada por confiar em mim. “Não pira, organiza”.

Agradeço a Jaque Bizi por me acolher no seu projeto primário, para que eu pudesse desenvolver o meu em conjunto. Obrigada pelas manhãs divertidas de castração, de PCR, e de peixinhos no *happy hour*.

Agradeço a estagiária Isadora Oliveira. Obrigada por ser tão dedicada e fazer do nosso projeto um momento de alegria e agilidade. Obrigada Lais Tubone, Letícia Santana, Renato Tavares e estagiários que nos auxiliaram nas castrações.

Obrigada Professora Valéria por sempre tirar minhas dúvidas e ser minha “co-orientadora”.

Obrigada Seiji e Professora Bertha que me acolheu em Botucatu para me ensinar a zimografia. Vocês foram muito maravilhosos, uma equipe excelente.

Obrigada Dra. Rafaela, Dr. Alex e Professor Wagner por serem da minha banca e ter acrescentado de forma positiva no meu trabalho.

Obrigada mãe, por sempre lutar por nós, e me receber em seus braços mesmo sendo tão nova e ser a inspiração de mulher forte que és para a gente.

Obrigada Carol por ter me feito companhia desde os meus nove anos de idade. Obrigada pelo companheirismo mesmo com suborno com pão doce, e por momentos de raiva da adolescência e euforia. Você é minha alegria, meu orgulho e minha irmãzinha “múmia” para sempre.

Agradeço a vida que tenho, e agradeço por ter vivido e aprendido tudo o que era preciso até chegar aqui. Obrigada Deus e universo.

Às minhas amigas de trabalho, Dayane, Samara, Débora. Obrigada pela equipe linda que formamos na Vida Animal. Obrigada Raquel, você é minha inspiração, obrigada por toda a ajuda nesse caminho difícil.

Obrigada amigo Jubinha, você foi mais que especial nesse momento da minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

WAJIMA, N. R. Metaloproteinases 2 e 9 sérica em gatos naturalmente infectados com *Leishmania* spp. 2023. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

Leishmaniose visceral é uma zoonose negligenciada causada pelo protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, e ocorre em regiões onde o clima é tropical e subtropical. Tem como hospedeiro definitivo o homem e o cão, porém estudos recentes têm demonstrado o gato como hospedeiro, capaz de disseminar a doença, participando, então do ciclo epidemiológico da enfermidade. A leishmaniose apresenta sinais clínicos diversos, variando conforme a imunidade do hospedeiro e da espécie de *Leishmania*, podendo ser subclínica em gatos, assim como ocorre em cães. O diagnóstico definitivo é dado através de exames laboratoriais sendo eles: citologia, histologia, imunohistoquímica, cultura celular e reação em cadeia pela polimerase (PCR), ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e reação de imunofluorescência indireta (RIFI). As metaloproteinases (MMPs) são gelatinases, endopeptidases dependentes de zinco, que são responsáveis pela degradação da membrana basal, apresentando importância na disseminação de neoplasia, remodelação de tecidos, modulação da inflamação, migração celular em processos inflamatórios. O papel das MMPs está relacionado com a patogenia de lesões da leishmaniose visceral em humanos e cães já relatados em literatura. Este é o primeiro trabalho avaliando a atividade das metaloproteinases em gatos com diagnóstico sorológico e/ou molecular para leishmaniose. Em uma região endêmica para leishmaniose visceral, 272 felinos foram testados por métodos paralelos (ELISA e qPCR), resultando em 26 animais positivos (grupo infectado). A atividade das metaloproteinases séricas foi avaliada pela técnica de zimografia. Tanto no grupo controle quanto no grupo infectado não houve a presença da atividade das MMP-2 e 9 na forma ativa, somente na forma inativa. Comparativamente, gatos com leucemia viral felina (FELV) não apresentaram atividade mais intensa das metaloproteinases, dessa forma não demonstrando que a imunossupressão pudesse aumentar a atividade das metaloproteinases. Portanto, gatos assintomáticos com leishmaniose visceral não apresentam alteração da atividade das metaloproteinases 2 e 9, não participando dessa via na disseminação da doença e da ativação da cascata de inflamação.

Palavras-chaves: Leishmaniose. Metaloproteinases. Zimografia. Felinos.

WAJIMA, N. R. Serum metalloproteinases 2 and 9 in cats naturally infected with *Leishmania* spp. 2023. 64 f. Dissertation (Master's Degree) - São Paulo State University (Unesp), School of Veterinary Medicine, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis is a neglected zoonosis caused by intracellular protozoan of the genus *Leishmania*, and occurs tropical and subtropical regions. Its definitive host is man and dog, but recent studies have shown the cat as a possible host, capable of spreading the disease, thus participating in the epidemiological cycle of the disease. Leishmaniasis presents different clinical signs, varying according to the host's immunity and the *Leishmania* species, and the disease may even be subclinical in cats, as it occurs in dogs. The definitive diagnosis is given through laboratory tests, which are: cytology, histology, immunohistochemistry, culture cells and PCR, ELISA and immunofluorescent antibody test (IFAT). Metalloproteinases (MMP) are gelatinases, zinc-dependent endopeptidases, which are responsible for the degradation of the basement membrane, presenting importance in the dissemination of neoplasia, tissue remodeling, modulation of inflammation and cell migration in inflammatory processes. The role of MMP is related to the development of visceral leishmaniasis in humans and dogs already reported in the literature. This is the first work evaluating the activity of metalloproteinases in cats positive for leishmaniasis. In a endemic region for visceral leishmaniasis, 272 cats were tested by parallel methods (ELISA and qPCR), resulting in 26 positive animals (infected group). Serum metalloproteinases activity was detected by zymography technique. In both the control and infected groups, there was no presence of MMP-2 and 9 activities in the active form, only in the inactive form. Comparatively, cats with feline viral leukemia (FELV) did not show high activity of these metalloproteinases, thus not demonstrating that immunosuppression could increase the activity of metalloproteinases. Therefore, asymptomatic cats with visceral leishmaniasis do not show activity of metalloproteinases 2 and 9, not participating in this pathway in the dissemination of the disease and in activation of inflammation cascade.

Keywords: Leishmaniasis. Metalloproteinases. Zymography. Feline.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Ciclo de transmissão vetorial da *Leishmania* spp. em felinos. 11
- Figura 2** – Algoritmo de diagnóstico de leishmaniose felina em gatos assintomáticos, doadores de sangue e reprodutores em área endêmica.....16
- Figura 3** – Distribuição dos gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum* de acordo com o método diagnóstico (ELISA ou qPCR), positividade para retrovírus e sinais clínicos..... 28
- Figura 4** – Zimograma representativo do soro de gatos controle (A) e gato infectado com *Leishmania infantum* (C). Nota-se a presença das bandas gelatinolíticas correspondentes à pro-MMP-9 (92 kDa), pro-MMP-2 (72 kDa). B: MW: peso molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards mixture of ten multicolor Bio-Rad)29
- Figura 5** – - Avaliação da atividade gelatinolítica de proMMP-2 e 9 entre o grupo controle e grupo infectado naturalmente com *Leishmania infantum*. 30
- Figura 6** – Comparação da atividade gelatinolítica de proMMP-2 e 9 entre o grupo controle e gatos infectados ou não com o vírus da leucemia felina (FELV)..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS

CCZSV	Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Vicente
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal
DO	Densidade Óptica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FCov	Coronavírus Entérico Felino
FELV	Leucemia Viral Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
LV	Leishmaniose Visceral
LVF	Leishmaniose Visceral Felina
MMP	Metaloproteinase
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PBA	Punção Biópsia Aspirativa
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real
RIFI	Imunofluorescência Indireta
SC	Subcutâneo
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1	Revisão de literatura	13
1.1.1	Aspeitos gerais da Leishmaniose Visceral	13
1.1.2	Leishmaniose visceral felina.....	15
1.1.3	Diagnóstico leishmaniose visceral felina	16
1.1.4	Resposta imune do felino com Leishmaniose Visceral	18
1.1.5	Metaloproteinases	19
2	CAPÍTULO 1 - METALOPROTEINASES 2 E 9 SÉRICA EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA SPP.	22
2.1	Resumo.....	23
2.2	Abstract.....	24
2.3	Introdução	25
2.4	Métodos	26
2.4.1	Triagem dos gatos e amostras	26
2.4.2	ELISA para pesquisa de anticorpo <i>anti-leishmania</i> spp. no soro	27
2.4.3	Extração do DNA e quantificação da carga parasitária da <i>L. infantum</i>	27
2.4.4	Imunocromatografia para vírus da leucemia felina (FELV) e para o vírus de imunodeficiência felina (FIV).	28
2.4.5	Delineamento experimental.....	28
2.4.6	Zimografia	29
2.5	Estatística.....	30
2.6	Resultados	30
2.6.1	Positividade para <i>Leishmania</i> spp.	30
2.6.2	Detecção de metaloproteinase 2 e 9 sérica.....	31
2.7	Discussão	32
2.8	Conclusão	36

2.9 Referências	36
APÊNDICE A - REFÊRENCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	47
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA.....	47
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	48
ANEXO C – NORMAS PARA SUBMISSÃO PLOS NEGLECTED.....	51
ANEXO D – TABELA RESULTADOS GERAIS POR ANIMAL	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Revisão de literatura

1.1.1 Aspectos gerais da Leishmaniose Visceral

Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose negligenciada causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum* (sinônimo *Leishmania chagasi*), pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (COTTON, 2017).

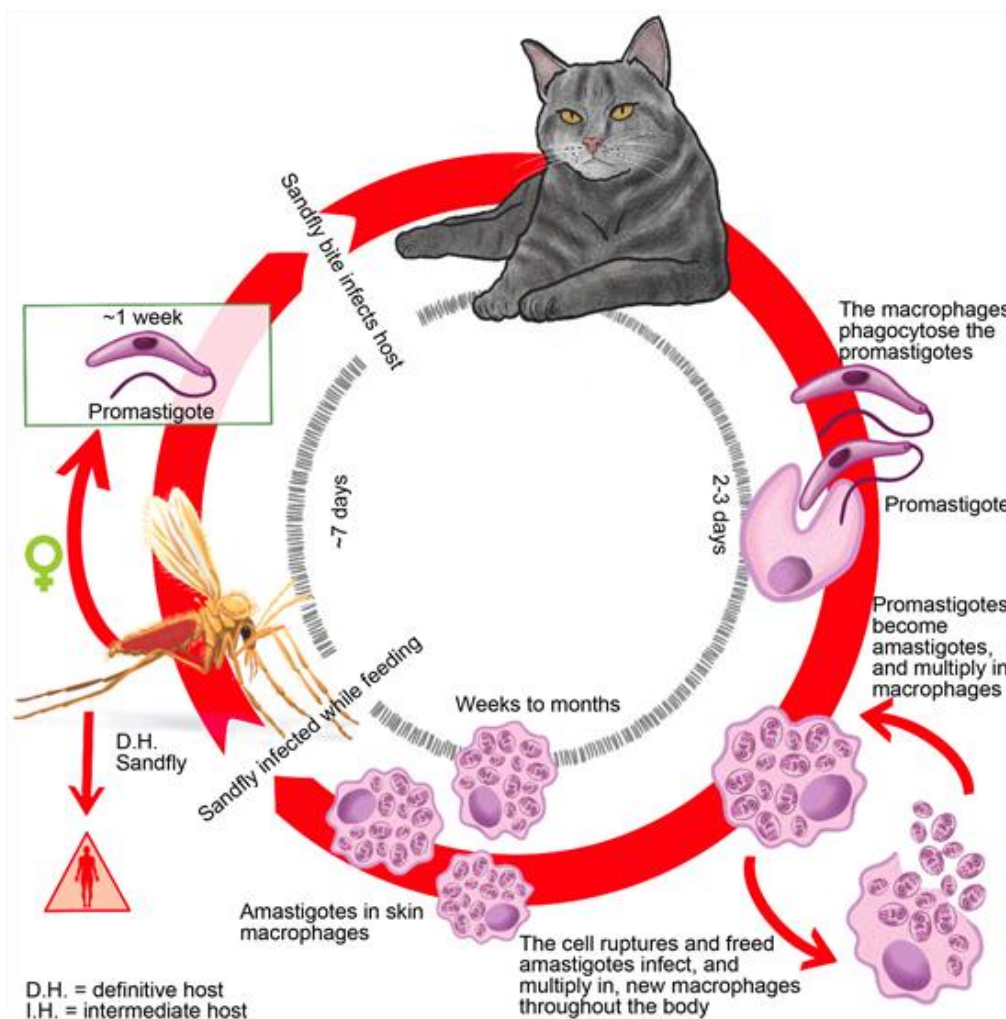
Estima-se que no mundo 556 milhões de pessoas correm o risco de desenvolver a doença na forma visceral (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS, 2018). No Brasil cerca de 3.500 casos em humanos são diagnosticados anualmente, com letalidade média de 8,1% (MARTINS-MELO et al., 2014). No entanto, nos últimos anos, o número global de casos de LV humana diminuiu substancialmente, de 200.000 a 400.000 casos em 2012 para aproximadamente 17.000 casos anualmente em 2018 (ALVAR et al. 2012; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE – OPAS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS, 2020).

A transmissão é realizada a partir da picada de mosquitos fêmeas do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* conhecidos popularmente como mosquito palha, Birigui ou tatuquiras, no qual já somam 98 espécies (MAROLI et al., 2013). A LV é endêmica em região tropical e subtropical, no qual em altas temperaturas, baixa luminosidade e a presença de matéria orgânica favorecem o desenvolvimento do mosquito (CARVALHO et. al., 2010; SOLANO-GALLEGO, 2009). A atividade desses vetores é crepuscular e noturna, sendo que no intra e peridomicílio é encontrado próximo a uma fonte de alimento (BRASIL, 2006).

Quando ocorre a hematofagia pelo flebótomo, há a inoculação da forma infectante do protozoário: promastigota metacíclica. O protozoário é fagocitado pelo sistema fagocítico mononuclear, especialmente por macrófagos, o parasito por sua vez, perde seu flagelo, passando para a forma imóvel, amastigota. Ocorrem então sucessivas divisões binárias e as células densamente parasitadas se rompem liberando as amastigotas, que serão fagocitadas por novos macrófagos. Desta forma se dá a disseminação hematogênica e linfática do protozoário (MAROLI et al., 2013). A

infecção do vetor ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea, quando a mesmaingere macrófagos parasitados, dando continuidade ao ciclo (Figura 1).

Figura 1 – Ciclo de transmissão vetorial da *Leishmania* spp. em felinos.



Fonte: Dias et al., 2021.

Os seres humanos e os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são os principais hospedeiros da leishmaniose considerados relevantes diante a Saúde Única (MAIA et al., 2012). Recentemente, vários estudos têm demonstrado a capacidade do gato doméstico (*Felis catus*) em se comportar como reservatório do parasito (GALLEGO et. al., 2020; MAIA; CAMPINO, 2011; MAROLI et al., 2007), compartilhando o mesmo parasito, *L. infantum* isolados tanto em cães quanto em humanos, indicando que essa espécie também é importante na epidemiologia da infecção de leishmaniose (CARDOSO, et al., 2021; PEREIRA et al., 2020). Os estudos

ainda não comprovaram se os gatos participam da transmissão direta da doença (NASCIMENTO et al., 2022), o que reforça a importância de estudos sobre a disseminação da doença, principalmente no Brasil (MENDONÇA et al., 2020).

1.1.2 Leishmaniose visceral felina

Hoogstraal e Dietlein, no ano de 1964, já descreviam a leishmaniose felina (LVF), porém a epidemiologia ainda permanecia incerta. Asfaram e colaboradores (2019) citaram o gato como uma peça relevante dentro da epidemiologia da doença, e no ano seguinte, Mendonça e colaboradores (2020) já citaram o gato como capaz de transmitir o protozoário para os flebotomíneos e ser considerado como reservatório da doença. Até o momento, seis espécies do subgênero *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* e uma do subgênero *Viannia* (*L. braziliensis*) foram descritas em gatos (PENNISI et al., 2015; PEREIRA; MAIA, 2021).

A prevalência da doença para a espécie felina apresenta grande variabilidade de acordo com o método de diagnóstico empregado e tipo de amostra, região geográfica avaliada e presença ou não de sinais clínicos. Em locais endêmicos, foram relatados prevalência de até 10% da LVF (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019). No Brasil, a prevalência é estimada entre 7 a 8%, dependendo do tipo de diagnóstico empregado, sendo as espécies mais comuns: *Leishmania braziliensis*, *L. infantum*, e *Leishmania amazonensis* (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; CARNEIRO et al., 2020; COSTA-VAL et al., 2020; COURA et al., 2018).

A leishmaniose visceral apresenta sinais clínicos variáveis, dependendo da complexidade de interação espécie vetor, espécie da *Leishmania* e imunidade do hospedeiro, podendo apresentar-se de forma subclínica ou assintomática em gatos, assim como ocorre em cães (PACE, 2014). Estudos sobre a doença em felinos já destacaram que a ocorrência de indivíduos assintomáticos é mais frequente que à daqueles que possuem manifestação de sinais clínicos (VIDES et al., 2011).

Os sinais clínicos mais comuns na LVF são: linfadenomegalia, lesões cutâneas e mucocutâneas (nódulos, úlceras, pápulas, alopecia) em região de face, membros distais e pescoço (FERNANDEZ-GALLEGO et al., 2020). A dermatite nodular é a principal lesão cutânea associada a LVF, encontrada principalmente nas pálpebras,

seguido de dermatite ulcerativa (FERNANDEZ-GALLEGO et al., 2020; SILVA et al., 2020). Os sinais sistêmicos incluem: letargia, perda de peso, anorexia, lesão oral (gengivoestomatite crônica) e ocular (uveíte) (COSTA-VAL et al., 2020).

Os principais achados laboratoriais são: anemia normocítica normocrônica (anemia arregenerativa), trombocitopenia, hiperproteinemia por hiperglobulinemia com gamopatia policlonal, e hipoalbuminemia (SILVA et al., 2023). Aproximadamente um quarto dos gatos doentes podem apresentar proteinúria, sugerindo uma possível associação entre LVF e doenças renais como descritas nos cães (FERNANDEZ-GALLEGO et al., 2020; MARCOS et al., 2009). Gatos com LVF tem concentrações mais elevadas de fósforo inorgânico do que os gatos não infectados, reforçando o pressuposto de doença renal associada a LVF (CHATZIS et al., 2020).

Os retrovírus têm grande impacto na saúde dos felinos, causando efeitos imunossupressivos importante, no qual pode elevar o risco de infecções oportunistas como doenças transmitidas por vetores (HARTMANN et al., 2012). Um terço dos animais apresentam coinfeção por outros agentes infecciosos, como o vírus da imunodeficiência felina (FIV), leucemia felina (FELV), Coronavírus felino (FCoV), *Bartonella henselae* e o *Toxoplasma gondii* (PEREIRA; MAIA, 2021).

1.1.3 Diagnóstico Leishmaniose Visceral Felina

O diagnóstico de LVF pode ser desafiador para os médicos veterinários, e deve ser considerado como diagnóstico diferencial com outras doenças, principalmente em áreas endêmicas, uma vez que o paciente pode ser assintomático (PEREIRA, MAIA, 2021). O diagnóstico definitivo é obtido através de exames laboratoriais sendo eles: testes diretos, que demonstram a presença do parasita ou seus componentes, como citologia, histologia, imunohistoquímica, cultura celular e teste de reação de cadeia em polimerase (PCR), e a forma indireta dos seus componentes como a sorologia, que avalia a resposta do hospedeiro à infecção, como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunofluorescência indireta (RIFI) (PENNISI et al., 2013; SOARES et al., 2015).

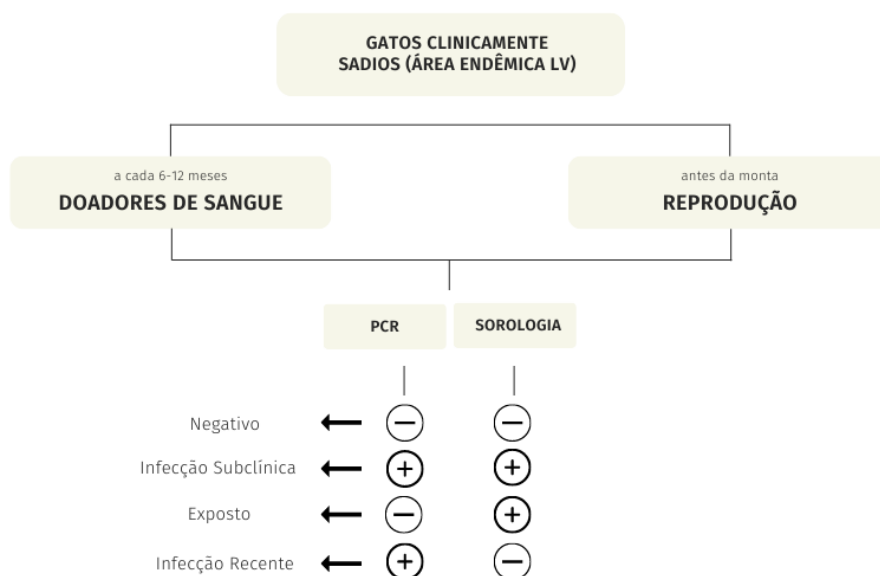
A citologia deve ser realizada quando o paciente apresenta alterações tegumentares como a presença de nódulos, ulcerações e linfadenomegalia. Para este exame pode-se realizar impressões dessas lesões e/ou punção biópsia aspirativa

(PBA) de linfonodo (SILVA et al., 2020). Também é possível realizar citologia de medula óssea, ou de outros órgãos, como o baço e fígado, em busca da forma amastigota da *Leishmania* spp. (MARCONDES et. al., 2018).

A cultura de parasitas é um teste preciso que permite o diagnóstico conclusivo da infecção ativa do parasita. No entanto, não é um teste adequado para um diagnóstico rápido e é restrito a laboratórios especializados a fins de pesquisa (PRATLONG et al., 2004). Embora amostras de sangue, medula óssea ou linfonodo possam ser utilizadas, alguns autores consideram que o sangue não é uma amostra adequada para cultura em gatos devido à baixa parasitemia, resultando em menor sensibilidade do método de cultura (MARTIN-SANCHES et al., 2007).

A reação de PCR permite a detecção de DNA da *Leishmania* em várias amostras, como sangue total, medula óssea, linfonodo, baço, *swab* conjuntival e pele. Apesar do PCR apresentar uma boa acurácia na detecção do DNA de *Leishmania* spp., é importante realçar que um resultado PCR-positivo pode apenas refletir uma infecção latente e, por esta razão, deve ser cuidadosamente interpretado num contexto clínico (PEREIRA, MAIA, 2021). O valor diagnóstico de cada teste depende de muitos fatores, incluindo a amostra biológica utilizada, reagentes, técnicas utilizadas, dessa forma o diagnóstico conclusivo da doença é dado através da soma de sinais clínicos e testes diagnósticos (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019) (Figura 2).

Figura 2 - Algoritmo de diagnóstico de leishmaniose felina em gatos assintomáticos, doadores de sangue e reprodutores em área endêmica.



Fonte: Adaptado de Pereira Maia (2021)

1.1.4 Resposta imune do felino com Leishmaniose Visceral

Há pouca informação sobre a resposta imune dos gatos naturalmente expostos e infectados com LVF, porém há evidências que sugerem que gatos apresentem resistência, resultando em uma baixa prevalência da doença na espécie e manifestação da doença clínica (AKHTARDANESH et al., 2018; SOLANO-GALLEGO et al. 2007). Sabe-se que resposta imune mediada por células T desempenham um papel crucial no controle da infecção por *Leishmania*, orientando a resposta imune por meio de produção de citocinas, e ação fagocítica dos macrófagos (BANET et al., 2008; MARTÍN-SÁNCHEZ et al., 2007). O desenvolvimento da doença é influenciado pelo perfil genético do hospedeiro, o que explica a diferença na resposta imune em cães e gatos (DAY, 2016).

A susceptibilidade a infecção e desenvolvimento de sinais clínicos em cães está intimamente ligada à resposta imune adaptativa: presença de resposta do tipo T *helper* 2 (Th2) e uma resposta prejudicada de T *helper* 1 (Th1) (SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Entretanto, em um estudo realizado em gatos infectados com *Leishmania* spp. foi observado a existência de uma baixa carga parasitária no sangue dos gatos,

juntamente com os baixos títulos de anticorpos, possivelmente devido à prevalência da resposta imune Th1 (BANETH et al., 2020; PRIOLO et al., 2019), o que é diferente do que é descrito em cães.

Tanto gatos saudáveis quando infectados por *Leishmania* spp. produzem IFN- γ específico em resposta ao parasito, porém os gatos com leishmaniose apresentaram uma maior produção de citocinas pró-inflamatória, indicando que há uma resposta celular na doença (PRIOLO et al., 2019). A presença de anticorpos contra *Leishmania* spp. em felinos demonstra que esses animais podem ser infectados, porém, em contrapartida, foi observado experimentalmente, que animais infectados apresentavam ausência de títulos de anticorpo, demonstrando uma baixa atividade de resposta humoral (AKHTARDANESH et al., 2018). Títulos baixos de anticorpos com diagnóstico parasitológico positivo indicam que os gatos podem não desenvolver uma resposta imune humoral intensa (SOBRINHO et al., 2012), e em contrapartida, apresentaram uma resposta celular mais eficaz.

1.1.5 Metaloproteinases

As metaloproteinases (MMPs) são gelatinases, endopeptidases dependentes de zinco, que são responsáveis pela degradação e remodelamento da matriz extracelular, participando de processos fisiológicos, como cicatrização de feridas, angiogênese, desenvolvimento embrionário, plasticidade sináptica, polaridade celular, migração e proliferação celular. As MMPs desempenham papéis importantes principalmente na invasão tumoral, sendo estudadas e relacionadas a metástases (KLEINER et al., 1999).

As MMPs atuam modulando secreção de quimiocinas e citocinas que impulsionam o recrutamento de células inflamatórias, realizam *feedback* negativo que reduzem a inflamação. Por fim, quando a infecção é eliminada, as MMPs iniciam os processos de reparo do tecido (ELKINGTON; O'KANE; FRIEDLAND, 2005), participando dessa forma de processos fisiológicos e patológicos, agudo ou crônico (MURPHY; NAGASE, 2008; SMITH et al., 2002; VISSE; NAGASE, 2003).

O excesso de atividade das MMPs resulta tanto do aumento da ativação de MMPs quanto da diminuição da secreção do inibidor tecidual de metaloproteinases

(TIMP), e pode levar a danos graves aos tecidos, e disseminação de patógenos. (GEURTS et al., 2012).

O papel das MMPs está relacionado com a patogenia de lesões da leishmaniose visceral em seres humanos e cães (GADISA et al., 2017; MACHADO et al., 2010; MARANGONI et al., 2011; MELO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). O hospedeiro estimula a produção de MMPs pelos macrófagos, levando à degradação da matriz celular, promovendo a disseminação do parasita para outros sítios em seres humanos (CARVALHAL et al., 2004). Embora os macrófagos sejam a principal via de eliminação da infecção, o parasita possui mecanismos de escape da resposta imune, permitindo sua sobrevivência e disseminação, o que altera a produção de citocinas e outros mediadores da resposta imune, principalmente a metaloproteinase (OLIVEIRA et al., 2013).

A avaliação da quantidade de MMPs tanto em tecido quanto em soro tem sido avaliada para servir como biomarcadores de monitoramento de tratamento, prevendo resultados clínicos favoráveis de leishmaniose visceral em seres humanos (GADISA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2013). Contudo, um estudo relatou que a MMP-9 pode representar um biomarcador de prognósticos desfavorável, que indica a disseminação do parasita e lesões mais agressivas na forma ulcerativa e na forma mucocutânea (MARETTI-MIRA et al., 2010). Apesar do aumento da MMP-9 estimular a migração leucocitária favorecendo o hospedeiro no controle da doença, há a destruição da matriz da membrana basal, que pode servir como facilitador de disseminação da doença em humanos para a fase ulcerativa, sugerindo que a progressão da doença para a fase ulcerativa pode estar associada ao aumento dos níveis de níveis de MMP-9, bem como por um desequilíbrio entre MMP-9 e seu inibidor TIMP (MURASE et al., 2018).

Embora as MMPs sejam essenciais para uma resposta inflamatória normal, a atividade descontrolada dessas proteases após a infecção acaba causando graves danos aos tecidos, disseminação microbiana e até morte do hospedeiro. Além de ser induzida a secreção de MMP pelas pelos macrófagos do hospedeiro, os próprios patógenos também podem produzir metaloproteases que são necessárias para a virulência, por exemplo a falcilisina pelos parasitas da malária (MURATA; GOLDBERG, 2003), GP63 pelos parasitas da *Leishmania* e metaloprotease

desintegrinas (ADAMS) (MCGWIRE et al., 2003) e a toxolisina 4 secretada pelos micronemas de *Toxoplasma gondii* (LALIBERTÉ; CARRUTHERS, 2011).

A metaloproteinase tem sido estudada em gatos principalmente como marcador de monitoramento de progressão de neoplasias, como metástases (TAMAMOTO et al., 2014; AKKOC et al., 2012). Apesar de haver trabalhos em cães sobre MMPs, estudos em gatos ainda se mostram escassos, principalmente em doenças infecciosas como a leishmaniose. Portanto, este trabalho, tem como objetivo avaliação da atividade sérica das metaloproteinases 2 e 9 em gatos naturalmente infectados por *Leishmania* spp. em região endêmica (Araçatuba-SP), sendo até então, um trabalho inédito.

2 CAPÍTULO 1 - METALOPROTEINASES 2 E 9 SÉRICA EM GATOS NATURALMENTE INFECTADOS COM LEISHMANIA SPP.

Natielle Rodrigues Wajima^a, Jaqueline Bizi^a, Isadora Oliveira^b, Karen Santos Março^a,
Edenilson Dona Frigério^a, Anderson Seiji Soares Fujimori^c, Valéria Marçal Felix de
Lima^a, Gisele Fabrino Machado^{a*}

^aDepartment of Clinical Medicine, Surgery and Animal Reproduction, São Paulo
State University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba.

^bCentro Universitário Católico Salesiano Auxilium – UniSALESIANO

^cPathophysiology in Clinical Medicine – FMB, São Paulo State University (UNESP),
Medicina School, FMB, Botucatu.

*Corresponding Author:

Department of Clinical, Surgery and Animal Reproduction, São Paulo State
University (UNESP), School of Veterinary Medicine, Araçatuba.

793 Clóvis Pestana St. - Jardim Dona Amélia - CEP 16050-680 - São Paulo, Brazil

Phone: +55-18-36361422

Email: Natielle Rodrigues Wajima: natielle.wajima@unesp.br

Gisele Fabrino Machado: gisele.fabrino@unesp.br

2.1 Resumo

Leishmaniose é uma zoonose negligenciada causada pelo protozoário intracelular do gênero *Leishmania*, no qual apresenta três formas principais em humanos: leishmaniose visceral, tegumentar e mucocutânea. Tem como hospedeiro definitivo o homem e o cão, porém estudos recentes têm demonstrado o gato como hospedeiro capaz de disseminar a doença, participando, então do ciclo epidemiológico da enfermidade. A leishmaniose apresenta sinais clínicos diversos, variando conforme a imunidade do hospedeiro (cão ou gato) e da espécie de *Leishmania*, podendo levar à doença subclínica. As metaloproteinases (MMPs) são gelatinases, endopeptidases dependentes de zinco, que são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular, apresentando importância na disseminação de neoplasias, remodelação de tecidos, e principalmente na modulação da inflamação. Este é o primeiro trabalho avaliando a atividade das metaloproteinases em gatos com leishmaniose assintomáticos. Em uma região endêmica para leishmaniose visceral, o soro de 26 gatos sororeagentes para ELISA e/ou PCR positivos para *Leishmania* spp. foram avaliados pela técnica de zimografia quanto a presença e atividade das metaloproteinases 2 e 9. A forma inativa das MMPs 2 e 9 foi detectada nos grupos controle e infectados. Não houve a detecção das formas ativas das MMP-2 e 9 nos grupos avaliados. A infecção pela leucemia viral não alterou o resultado para metaloproteinases na forma inativa. Portanto, gatos com leishmaniose visceral não apresentam atividade sérica das metaloproteinases 2 e 9 na forma ativa.

2.2 Abstract

Visceral leishmaniasis is a neglected zoonosis caused by intracellular protozoan of the genus *Leishmania*, and occurs tropical and subtropical regions. Its definitive host is man and dog, but recent studies have shown the cat as a possible host, capable of spreading the disease, thus participating in the epidemiological cycle of the disease. Leishmaniasis presents different clinical signs, varying according to the host's immunity and the *Leishmania* species, and the disease may even be subclinical in cats, as it occurs in dogs. The definitive diagnosis is given through laboratory tests, which are: cytology, histology, immunohistochemistry, culture cells and PCR, ELISA and immunofluorescent antibody test (IFAT). Metalloproteinases (MMP) are gelatinases, zinc-dependent endopeptidases, which are responsible for the degradation of the basement membrane, presenting importance in the dissemination of neoplasia, tissue remodeling, modulation of inflammation and cell migration in inflammatory processes. The role of MMP is related to the development of visceral leishmaniasis in humans and dogs already reported in the literature. This is the first work evaluating the activity of metalloproteinases in cats positive for leishmaniasis. In a endemic region for visceral leishmaniasis, 272 cats were tested by parallel methods (ELISA and qPCR), resulting in 26 positive animals (infected group). Serum metalloproteinases activity was detected by zymography technique. In both the control and infected groups, there was no presence of MMP-2 and 9 activities in the active form, only in the inactive form. Comparatively, cats with feline viral leukemia (FELV) did not show high activity of these metalloproteinases, thus not demonstrating that immunosuppression could increase the activity of metalloproteinases. Therefore, asymptomatic cats with visceral leishmaniasis do not show activity of metalloproteinases 2 and 9, not participating in this pathway in the dissemination of the disease and in activation of inflammation cascade.

2.3 Introdução¹

Leishmaniose visceral é uma zoonose negligenciada causada pelo protozoário intracelular *Leishmania infantum* pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. [1]. Estima-se que no mundo 556 milhões de pessoas correm o risco de desenvolver a doença na forma visceral [2]. No Brasil cerca de 3.500 casos em humanos são diagnosticados anualmente, com letalidade média de 8,1% [3].

Os seres humanos e os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) são os principais hospedeiros da *Leishmania* spp. considerados relevantes diante a Saúde Única [7]. Recentemente, vários estudos têm demonstrado a capacidade do gato doméstico (*Felis catus*) em se comportar como reservatório do parasito [4, 9,10], compartilhando o *L. infantum* isoladas tanto em cães quanto em humanos.

A leishmaniose apresenta sinais clínicos variáveis, se manifestando conforme a imunidade do hospedeiro e da espécie de *Leishmania*, podendo se apresentar de forma clínica ou assintomática/subclínica em gatos, assim como ocorre em cães [19]. Estudos sobre a doença em felinos já destacaram que a ocorrência de indivíduos assintomáticos é mais frequente que aqueles que possuem manifestações de sinais clínicos [20]. Os sinais clínicos mais comuns na leishmaniose felina são: linfadenomegalia, lesões cutâneas e mucocutânea (nódulos, úlceras, pápulas, alopecia) [10]. Os sinais sistêmicos incluem: letargia, perda de peso, anorexia, lesão oral (gengivoestomatite) e ocular (uveíte) [21]. Os retrovírus têm grande impacto na saúde dos felinos, causando efeitos imunossupressivos importantes, no qual podem elevar o risco de infecções oportunistas, como áquelas transmitidas por vetores [22].

As metaloproteinases (MMP) são gelatinases, endopeptidases dependentes de zinco, que são responsáveis pela degradação da matriz extracelular. Participam de processos fisiológicos e patológicos, sejam, agudos ou crônicos [25, 26, 27]. A MMP2 cliva e ativa CCL7 e CXCL12, contribuindo para a quimiotaxia e recrutamento de células imunes para locais de lesão. A MMP-9 aumenta o influxo de células imunes através da destruição dos componentes da membrana basal [28], participando do processo pró-inflamatório e/ou reparo tecidual.

¹ Normas da Revista PLOS NEGLECTED (Anexo C).

Além de induzir a secreção de MMP pelas células do hospedeiro, os próprios patógenos também podem produzir metaloproteases que são necessárias para a virulência, por exemplo a falcilisina pelos parasitas da malária [36], GP63 pelos parasitas da *Leishmania* [37] e a toxolisina 4 secretada pelos micronemas de *Toxoplasma gondii* [38].

O papel das MMPs está relacionado com a evolução da leishmaniose visceral em seres humanos [29, 30, 31, 32], e já foi descrita no soro, pele e tecido nervoso de cães com LV [29, 31, 55]. Nestas espécies, a estimulação da produção de MMPs pelos macrófagos do hospedeiro leva à degradação da matriz celular, promovendo a disseminação do parasito para outros sítios [33; 34]. A avaliação da quantidade de MMP tanto em tecido quanto em soro tem sido avaliada para servir como biomarcadores de monitoramento de tratamento de leishmaniose visceral em seres humanos [35, 32].

Estudos sobre a leishmaniose felina ainda é escasso, sobretudo em relação a resposta imune e inflamatória, portanto o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade sérica das metaloproteinasas 2 e 9 em gatos naturalmente infectados com *Leishmania* spp em região endêmica, a fim de elucidar se a LVF utiliza a via das metaloproteinasas para disseminação do parasito, e se a metaloproteinase é um bom sinalizador de via inflamatória. Será avaliado também se a presença dos retrovírus interfererem na ativação e/ou aumento da atividade das metaloproteinses.

2.4 Métodos

2.4.1 Triagem dos gatos e amostras

Foram avaliadas amostras de sangue e medula óssea de 272 felinos com idade superior a cinco meses, de ambos os sexos em um projeto de castração voluntária realizada em Araçatuba, São Paulo, região endêmica para leishmaniose visceral, no período de abril a novembro de 2020.

Todos os animais foram submetidos a anestesia dissociativa, utilizando cloridrato de tiletamina e zolazepam (Telazol®) 5mg/kg, acepromazina (0,01mg/kg) e morfina (0,3 mg/kg) por via intramuscular. Na sequência, foi realizado o bloqueio regional (peridural sacro-cocígea ou intratesticular) com lidocaína a 2% na dose de 3mg/kg. O sangue venoso (2 a 3 mL/animal) foi coletado por punção da veia jugular e

em tubo com ativador de coágulo para a obtenção do soro. A medula óssea (1-2mL/animal) foi obtida a partir da punção da porção crânio-lateral da tuberosidade maior do úmero ou crista ilíaca e armazenada em tubo com EDTA. Foi realizado medicação pós-operatória com antibiótico (amoxicilina 20 mg/kg/SC) e antiinflamatório (meloxicam 0,05 mg/kg/SC). As amostras de soro e medula óssea foram conservadas a -20°C até o processamento.

2.4.2 ELISA para pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* spp. no soro

A pesquisa de anticorpo foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA). Utilizando placas (Greiner Bio-One Microlon® 600, Alemanha) revestidas com 50 µL/poço de 20 µg de extrato do antígeno bruto, obtido a partir da cultura de promastigotas de *L. infantum* MHOM/BR00/MERO2 em tampão carbonato/bicarbonato (0,05 M, pH 9,6). A incubação foi realizada a 4 °C *overnight*. As lavagens foram realizadas com PBS (pH 7,0) e 0,05% Tween® 20 (tampão de lavagem com PBS contendo 10% de soro fetal bovino por uma hora à temperatura ambiente. As amostras de soro (50 µl) foram diluídas na concentração de 1:100 em PBS contendo 10% de soro fetal bovino e 0,05% de Tween 20® e adicionadas a cada poço, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado soro de um animal sintomático, positivo no exame parasitológico de punção de linfonodo (método ouro), proveniente de Andradina – SP, e como controle negativo soro de felino de área não endêmica (São Vicente - SP). As placas foram incubadas durante três horas à temperatura ambiente. Foram considerados positivos animais com (densidade óptica) D.O. acima de 0,372.

2.4.3 Extração do DNA e quantificação da carga parasitária de *Leishmania infantum*

O DNA genômico da medula óssea foi extraído usando o protocolo fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) e analisado no espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (NanoDrop™, Thermo Fisher, MA, USA) para avaliação de pureza (260/280) e quantificação. Posteriormente foi armazenado a -20°C, até a análise.

Para avaliação da qualidade do DNA foi utilizado o gene β-actina. Para a quantificação da carga parasitária de *L. infantum*, o qPCR foi realizado empregando iniciadores direcionados ao DNA circular do cinetoplasto do parasita (kDNA) (forward: 5'-GTGGGGGGAGGGGCGTTCT-3' e reverse: 5'-ATTTTACACCAACCCCGAGTT-

3'). A reação de qPCR foi padronizada com 10 ng de DNA genômico purificado, 4 µL de 5x HOT FIREPol® Evagreen® qPCR Supermix (Solis BioDyne, Tartu, Estónia), 0,5 µL de cada primer e 13 µL de H₂O ultrapura - em um volume final de reação de 20 µL. Também foi gerada uma curva padrão de regressão com seis faixas logares de pontos de concentração, usando DNA extraído de promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR 00/MER02). As reações ocorreram em sistema Mastercycler® RealPlex2 (Eppendorf, CT, USA), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 95°C por 12 min, seguido de 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15s), anelamento (65°C por 20 segundos) e extensão (72°C por 20 segundos). Após essas etapas, foi realizada curva de dissociação do fragmento amplificado (95°C por 15 s, depois 60°C a 95°C em 15 s/°C). O número de cópias amplificadas do DNA foi determinado e foram consideradas positivas se apresentassem um ciclo de limiar e temperatura de fusão correspondentes à curva padrão.

2.4.4 Imunocromatografia para vírus da leucemia felina (FELV) e para o vírus de imunodeficiência felina (FIV)

Tanto o grupo controle quanto o grupo infectado foram avaliados quanto a coinfeção para retrovíroses, por meio de testes rápidos realizados com o kit de ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA), (Teste Combo de Anticorpo SNAP® FIV/Antígeno FeLV: Laboratórios IDEXX, Westbrook, ME, EUA). O teste foi executado e interpretado seguindo as orientações do fabricante.

2.4.5 Delineamento experimental

Dos 272 felinos testados, 26 apresentaram sorologia e/ou PCR positivo para *Leishmania* ssp. Estes animais constituíram o grupo infectado. O grupo controle foi composto por oito felinos provenientes de região não-endêmica da cidade de São Vicente, litoral do estado de São Paulo, negativos na PCR e na sorologia com D.O menor que 0,372.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental Animal (COBEA), com a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) - processo número 76/2022 (ANEXO A).

2.4.6 Zimografia

A análise das metaloproteinases pelo método de zimografia foi realizado no laboratório de Botucatu (FMB-Unesp). Para a detecção da atividade metaloproteinases 2 e 9, o soro dos animais dos grupos infectado (n=26) e controle (n=8) foram submetidos à zimografia.

A proteína nas amostras do soro foi quantificada pelo método de Bradford. Soros com 10 µg de proteína foram, então diluídas em tampão com 0,5 M Tris pH 6,8, 50% de glicerol e 0,05% de azul bromofenol em uma proporção de 1:3, e carregadas nos poços.

O gel de separação (corrida) foi feito com 8% de SDS-poliacrilamida contendo 1% de gelatina bovina (G8150-100G, Sigma-Aldrich), e o gel de empilhamento a 5% sem a gelatina 1%. A corrida eletroforética foi efetuada a 120 V por duas horas (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%) a 8°C.

Após a corrida, o gel foi removido, lavado com 2,5% de Triton-X-100 durante uma hora, e após esse período lavado com 50 mM de Tris e pH 8,4 durante dez minutos. Após este procedimento, foi incubado em banho maria a 37 °C durante 20 horas em solução de ativação com 50 mM Tris pH 8,4, 5 mM CaCl sob constante agitação. A coloração foi realizada durante 30 minutos com azul cromassie R-250 0,5%, ácido acético glacial 10% e metanol 30%. A descoloração foi realizada em solução contendo 30 % de metanol e 10 % de ácido acético à temperatura ambiente em constante agitação até a visualização das bandas.

As imagens em gel foram avaliadas por meio de densitometria óptica (ImageQuant LAS 4000; GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suécia) e os resultados analisados através do software de domínio público ImageJ 1,45 s (Wayne Rasband, National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) e mensuradas em unidade arbitrárias (UA). A identificação das MMPs baseou-se nos seus pesos moleculares utilizando o marcador Precision Plus Protein Kaleidoscope.recombinant proteins (Bio-Rad). Os pesos moleculares correspondentes são: 92 kDa (MMP-9 inativa), 86 kDa (MMP-9 ativa) 72 kDa (MMP-2 inativa) e 66 (MMP-2 ativa).

2.5 Estatística

O resultado de cada reação foi normalizado, dividindo cada amostra pelo controle da reação, com a finalidade de reduzir as disparidades decorrentes da utilização de géis distintos. O teste Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo de Mann-Whitney considerando a distribuição não paramétrica dos dados.

Visando verificar se a coinfeção por FELV poderia causar alterações nas MMPS, os felinos do grupo infectado foram subdivididos em dois grupos: infectados FELV positivos (FELV +, n=7) e negativos (FELV -, n=19).

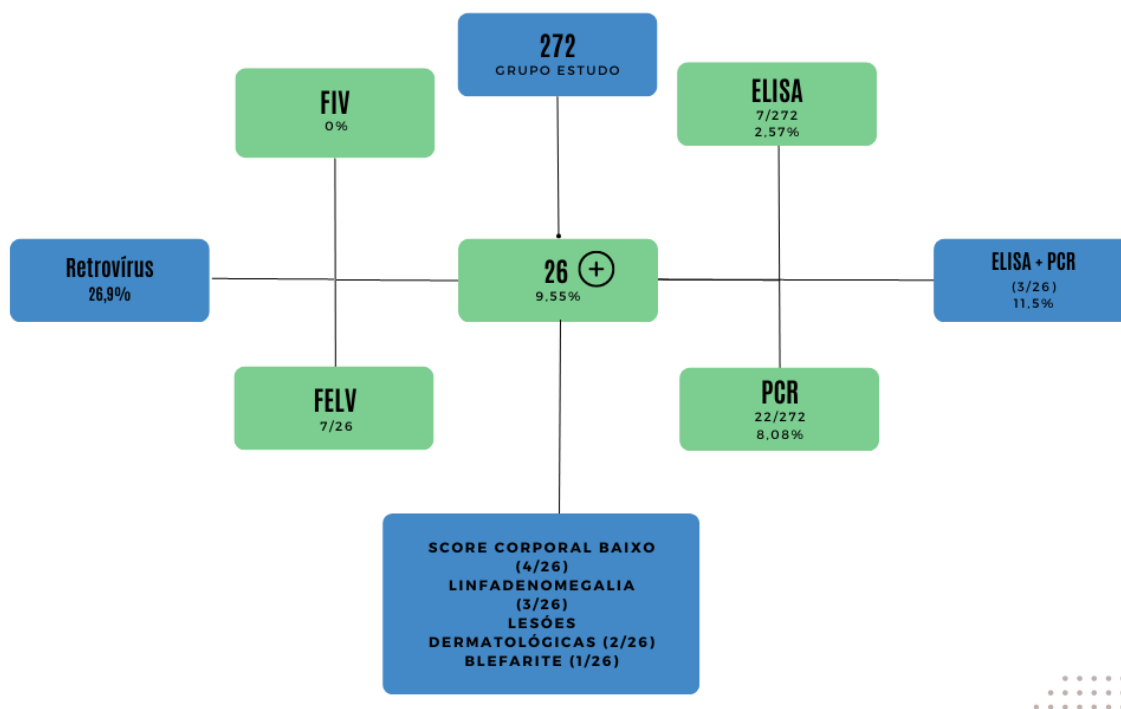
O teste Kruskal-Walis e Dunn foi utilizado para determinar diferenças entre os grupos, considerando variâncias não homoscedásticas e distribuição não paramétrica dos resíduos. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Prism (v8.0.1, GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

2.6 Resultados

2.6.1 Positividade para *Leishmania* spp

A positividade para leishmaniose visceral pelos seus respectivos testes e positividade para retrovirose é ilustrado pela figura 3, juntamente com seus sinais clínicos.

Figura 3 - Distribuição dos gatos naturalmente infectados por *Leishmania infantum* de acordo com o método diagnóstico (ELISA ou qPCR), positividade para retrovírus e sinais clínicos.

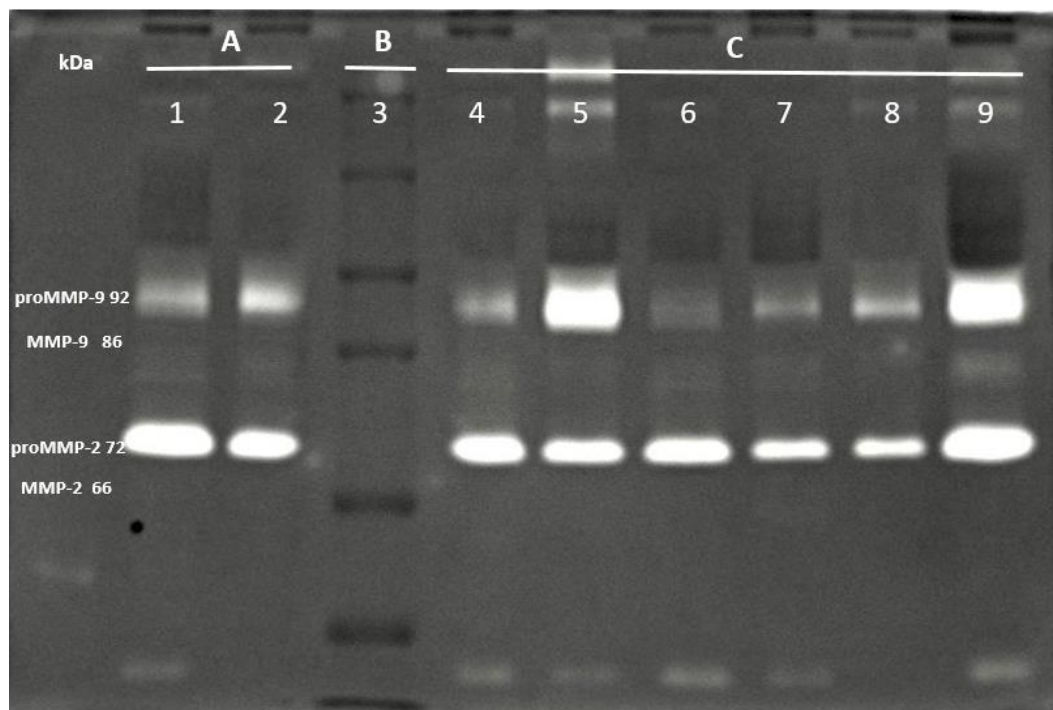


Fonte: Elaborado pela autora.

2.6.2 Detecção de metaloproteinases 2 e 9 sérica

Os zimogramas mostraram atividade gelatinolítica associada a proteínas de pesos moleculares 92 kDa (proMMP-9) e 72 kDa (proMMP-2) conforme ilustra a figura 4. A forma ativa da MMP-2 (66 kDa) e MMP-9 (92 kDa) não foi encontrada em nenhum dos grupos estudados.

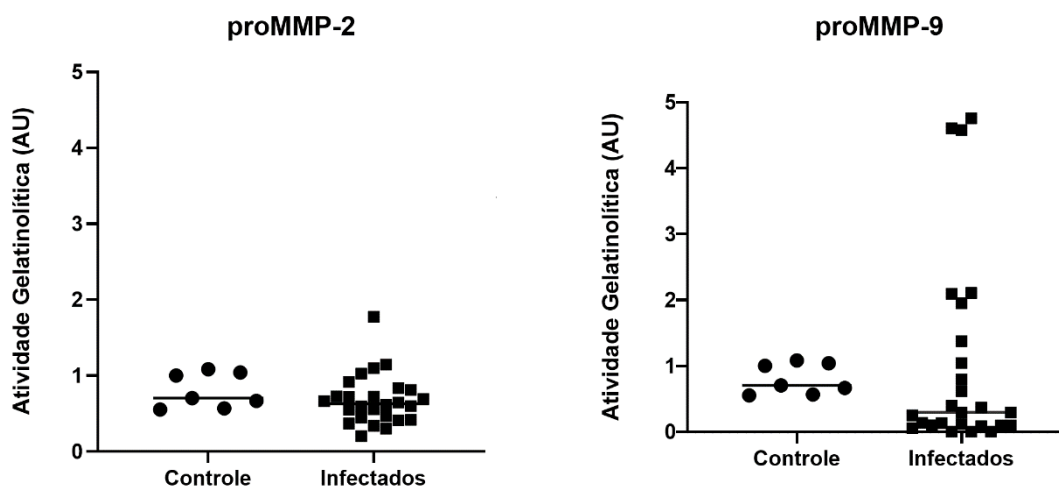
Figura 4 - Zimograma representativo do soro de gatos controle (A) e gato infectado com *Leishmania* spp (C). Nota-se a presença das bandas gelatinolíticas correspondentes à pro-MMP-9 (92 kDa), pro-MMP-2 (72 kDa). B: MW: peso molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards mixture of ten multicolor Bio-Rad).



Fonte: Elaborado pela autora.

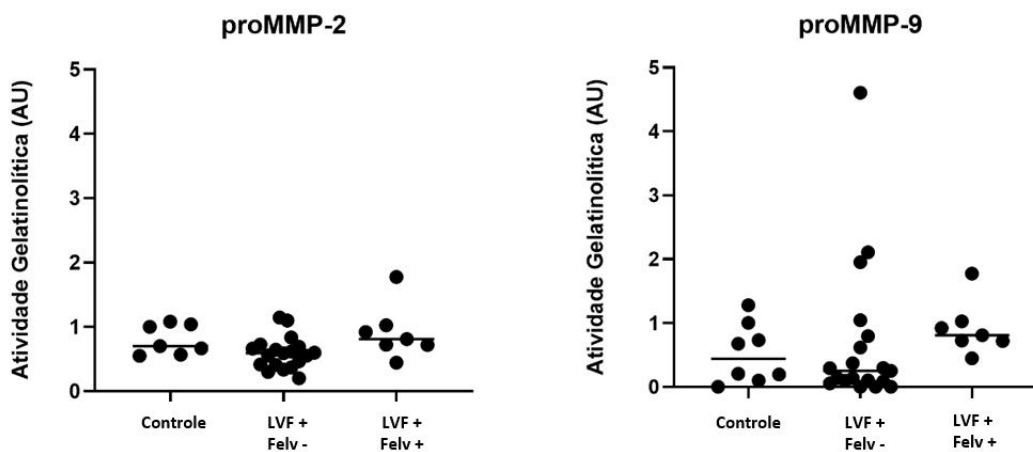
Quando comparamos os grupos estudados, não houve diferença estatística ($p > 0,005$) entre o grupo controle para pro-MMP-2 e pro-MMP-9, tanto nos grupos controle quanto no infectado (figura 5). Não foi observado diferença entre os grupos controle, grupo FELV positivo (FELV +), FELV negativo (FELV -), indicando que não há diferença da atividade gelatinolítica das metaloproteinases estudadas em gatos naturalmente infectados com *Leishmania* spp. que tenham a retrovirose. ($p = 0,1082$) (figura 6).

Figura 5 - Avaliação da atividade gelatinolítica de proMMP-2 e 9 entre o grupo controle e grupo infectado naturalmente com *Leishmania* spp.



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 6 - Comparação da atividade gelatinolítica de proMMP-2 e 9 entre o grupo controle e gatos infectados ou não com o vírus da leucemia felina (FELV).



Fonte: Elaborado pela autora.

2.7 Discussão

A ausência de doença sistêmica e/ou dermatológica durante a admissão foi critério de inclusão adotado para a seleção dos pacientes. Porém foram encontradas algumas alterações no exame físico, como: baixo escore corporal (4/26), linfadenomegalia (2/26), escoriação e alopecia (4/26) que são sinais inespecíficos, podendo ser relacionados às outras doenças que não foram investigadas nesta pesquisa.

Não foi observado nenhum gato com lesões sugestivas de leishmaniose visceral, como dermatite ulcerativa, nódulos e crostas em região de cabeça e pescoço, que são lesões dermatológicas mais comuns na leishmaniose felina [50]. Estudos sobre a doença em felinos já destacaram que a ocorrência de indivíduos assintomáticos é mais frequente que a manifestação de sinais clínicos [20] o que corrobora com o presente estudo.

Os animais positivos para ambos os testes tinham carga parasitária e D.O maior, em comparação aos outros animais do grupo, o que pode estar relacionado a forma ativa da doença, na qual o sistema imune esteja montando uma resposta contra a alta carga parasitária no gato, mesmo não apresentando sinais clínicos, principalmente os dermatológicos. Os gatos com sinais clínicos não apresentavam uma maior atividade de MMP-2 e 9 na forma inativa (pro).

A pesquisa de metaloproteinases 2 no soro dos gatos infectados revelou a presença da forma inativa (proMMP-2), mas não houve diferença com o grupo controle. Resultados semelhantes foram observados por Melo e colaboradores (2011) [53] que investigaram cães infectados com *Leishmania* spp.

Contudo, avaliando cães com sinal neurológico e sadios, notaram a presença da MMP-2 inativa e ativa no líquido cérebro-espinhal, sugerindo a atividade desta enzima em cães neurocomprometidos [54]. No estudo de Marangoni e colaboradores (2011) [30] foi relatada a presença da MMP-2 inativa em soro de cães não infectados e infectados sem distúrbios neurológicos, e nenhuma presença da forma ativa da MMP-2 nos dois grupos.

Machado e colaboradores (2010) avaliaram a atividade das MMP-2 em encéfalo de cães infectados com *Leishmania* spp., onde somente a forma inativa das enzimas foram detectadas, mesmo em animais sintomáticos.

A MMP-2 na forma ativa foi detectada em líquido cérebro espinal [53] e em pele de animais infectados (citar). Aparentemente, a forma ativa da MMP-2 está envolvida em casos no qual a infecção por *Leishmania* spp. apresenta um estágio mais avançado, e o animal apresente sinais e lesões característicos da doença, e a *Leishmania* spp. seja capaz de modular o sistema imune em seu próprio benefício, tornando as MMPs aliadas na disseminação através dos tecidos [54].

A MMP-9 foi encontrada somente na forma inativa no soro dos animais, tanto no grupo controle quanto no grupo infectado, não havendo diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Melo e colaboradores (2012) [54] não registraram diferença significativa nos níveis de proMMP-9 no soro dos cães infectados e do grupo controle, e os níveis de MMP-9 ativa somente foram encontradas no líquido cefalorraquidiano dos animais infectados. Em um estudo anterior Melo e colaboradores (2011) [53] já haviam observado que os soros dos animais avaliados não apresentaram MMP-9 ativa, e não houve significância na atividade entre MMP-9 e sinais clínicos, ou seja, animais com mais de um sinal clínico da leishmaniose não expressavam mais a MMP-9 ativa. Jacintho e colaboradores (2012) [55] relataram aumento de detecção de MMP-9 inativa e ativa em de pele de cães infectados.

Ao comparar a atividade gelatinolítica de proMMP-2 e 9 entre o grupo controle e gatos infectados ou não com o vírus da leucemia felina (FELV-N e FELV-P), não houve diferença estatística. Não há estudos até o presente momento que avalie a atividade dessas enzimas em pacientes com retrovírus.

Gatos de áreas endêmicas produzem IFN- γ após estimulação sanguínea *ex vivo* com antígeno solúvel de *L. infantum* e, portanto, são capazes de ativar uma resposta imune adaptativa mediada por células em resposta ao parasita que está variavelmente associado com anticorpo ou positividade de PCR no sangue [56]. A citocina inflamatória TNF (fator de fator de necrose tumoral), além de desempenhar um papel na apoptose celular e em outros processos biológicos, também participa da indução de MMPs 2 e 9 podem ser moduladas pelo IFN- γ [57]. Gatos assintomáticos podem ser representantes de uma resposta imune efetiva (Th1) e apresentam

ausência de lesões locais ou sistêmicas. A falta de lesões sistêmicas no grupo de felinos estudados justifica a ausência de detecção de alterações na detecção das formas ativas da MMP-9, uma vez que a MMP-9 é considerado marcador inflamatório [56].

Futuras pesquisas com gatos sintomáticos e tamanho amostral maior são necessário para esclarecer a contribuição das MMPs 2 e 9 na patogenia da leishmaniose em felinos.

2.8 Conclusão

Gatos infectados com *Leishmania* spp que são assintomáticos não apresentam alteração sérica das formas ativa e inativas da MMP-2 e MMP-9.

2.9 Referências

1. Cotton JA. The expanding world of human leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 2017;33(5): 341-344. doi: 10.1016/j.pt.2017.02.002.
2. Organização Panamericana da Saúde [Internet]. Leishmanioses: informe epidemiológico das américas, julho 2016. Washington, DC: OPAS; 2016 [cited 2020 Aug 31]. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51657>
3. Martins-Melo FR, Lima MS, Ramos Jr AN, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. *PLoS One.* 2014;9: e93770. doi: 10.1371/journal.pone.0093770.
4. Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2007;145(3-4): 357-360. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.11.009.
5. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009;165: 1-18. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.05.022.
6. Carvalho MR, Valença HF, Silva FJ, Pita-Pereira D, Pereira TA, Britto C, et al. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. *Acta Tropica.* 2010;116(1): 108-110. doi: 10.1016/j.actatropica.2010.03.009.
7. Maia Z, Lírio M, Mistro S, Mendes CMC, Mehta SR, Badaro R. Comparative study of rK39 *Leishmania* antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic

- review with meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6: e1484. doi: 10.1371/journal.pntd.0001484.
8. Maia C, Campino L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*. 2011;27(8): 341-344. doi: 10.1016/j.pt.2011.03.008.
 9. Fernandez-Gallego A, Bernabe LF, Dalmau A, Esteban-Saltiveri D, Font A, Leiva M, et al. Feline leishmaniasis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. *J Feline Med Surg*. 2020;22(10): 993-1007. doi: 10.1177/1098612X20902865.
 10. Pereira A, Parreira R, Cristóvão JM, Castelli G, Bruno F, Vitale F, et al. Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. *Infect Genet Evol*. 2020;77: 104069–104069. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104069.
 11. Cardoso L, Schallig H, Persichetti MF, Pennisi MG. New epidemiological aspects of animal leishmaniasis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. *Pathogens*. 2021;10(3): 307. doi: 10.3390/pathogens10030307.
 12. Mendonça IL, Batista JF, Lopes KSPP, Magalhães Neto FCR, Alcântara DS, Meriguetti YFFB, et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 2020;280: 109058. doi: 10.1016/j.vetpar.2020.109058.
 13. Nascimento LFJ, Cirilo TM, Gomes DS, Gomes ACA, Lima VFS, Scher R, et al. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. *Parasitol Res*. 2022;121(1): 21-34. doi: 10.1007/s00436-021-07372-9.
 14. Coura FM, Passos SKP, Pelegriño MOF, Leme FOP, Paz GF, Gontijo CMF, et al. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2018;27(4): 570-574. doi: 10.1590/S1984-296120180052.
 15. Asfaram S, Fakhar M, Teshnizi SH. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? a systematic review with meta-analysis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25: e20190012. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0012.
 16. Coura FM, Passos SKP, Pelegriño MOF, Leme FOP, Paz GF, Gontijo CMF, et al. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2018;27(4): 570-574. doi: 10.1590/S1984-296120180052.
 17. Carneiro MB, Lopes ME, Hohman LS, Romano A, David BA, Kratošil R, et al. Th1-Th2 cross-regulation controls early leishmania infection in the skin by modulating the size of the permissive monocytic host cell reservoir. *Cell Host Microbe*. 2020;27(5): 752-768.e7. doi: 10.1016/j.chom.2020.03.011.
 18. Costa-Val AP, Coura FM, Barbieri JM, Diniz L, Sampaio A, Reis JKP, et al. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). *Rev Bras Parasitol Vet*. 2020;29(2): e003520. doi: 10.1590/S1984-29612020023.
 19. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect*. 2014;69(S1): S10-S18. doi: 10.1016/j.jinf.2014.07.016.
 20. Vides JP, Schwardt TF, Vicente Sobrinho LS, Marinho M, Laurenti MD, Biondo AW, et al. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol*. 2011;178(1-2): 22-28. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.12.042.

21. Pimenta P, Alves-Pimenta S, Barros J, Barbosa P, Rodrigues A, Pereira MJ, et al. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2015;1-2: 65-69. doi: 10.1016/j.vprsr.2016.02.003.
22. Hartmann K, Day MJ, Thiry E, Lloret A, Frymus T, Addie D, et al. Feline injection site sarcoma: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg*. 2015;17(7): 606-613. doi: 10.1177/1098612X15588451.
23. Pereira A, Maia C. Leishmania infection in cats and feline leishmaniosis: an updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis*. 2021;1: 100035. doi: 10.1016/j.crvbd.2021.100035.
24. Elkington PTG, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(1): 12-20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02840.x.
25. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*. 2008;29(5): 290-308. doi: 10.1016/j.mam.2008.05.002.
26. Smith MS, Ricke WA, Bakke LJ, Dow MPD, Smith GW. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Mol Cell Endocrinol*. 2002;191(1): 45-56. doi: 10.1016/s0303-7207(02)00054-0.
27. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ Res*. 2003;92(8): 827-839. doi: 10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D.
28. Geurts N, Becker-Pauly C, Martens E, Proost P, Van den Steen PE, Stöcker W, et al. Meprins process matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/gelatinase B and enhance the activation kinetics by MMP-3. *FEBS Lett*. 2012;586(24): 4264-4269. doi: 10.1016/j.febslet.2012.10.033.
29. Machado GF, Melo GD, Moraes OC, Souza M S, Marcondes M, Perri SHV, et al. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010;136(3-4): 340-345. doi: 10.1016/j.vetimm.2010.03.024.
30. Marangoni NR, Melo GD, Moraes OC, Souza MS, Perri SHV, Machado GF. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2011;33(6): 330-334. doi: 10.1111/j.1365-3024.2011.01285.x.
31. Melo GD, Marangoni NR, Marcondes M, Lima VMF, Machado GF. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniosis: a preliminary report. *Vet J*. 2011;188(2): 243-245. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.03.017.
32. Gadisa E, Tasew G, Abera A, Gelaye W, Chanyalew M, Abebe M, et al. Serological signatures of clinical cure following successful treatment with sodium stibogluconate in Ethiopian visceral leishmaniasis. *Cytokine*. 2017;91: 6-9. doi: 10.1016/j.cyto.2016.11.016.
33. Liarte DB, Mendonça IL, Luz FC, Abreu EA, Mello GW, Farias TJ, et al. QBC for the diagnose of human and canine american visceral leishmaniasis: preliminary data. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(6): 577-581. doi: 10.1590/s0037-86822001000600013.
34. Carvalhal DGF, Barbosa Junior AA, Hermina MDR, Clarêncio J, Pinheiro Junior, NF, Veras PST, et al. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of Leishmania infection. *Exp Parasitol*. 2004;107(3-4):189-199. doi: 10.1016/j.exppara.2004.06.003.

35. Oliveira FA, Silva CVO, Damascena NP, Passos RO, Duthie MS, Guderian JA, et al. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2013;13: 331. doi: 10.1186/1471-2334-13-331.
36. Murata CE, Goldberg DE. Plasmodium falciparum falcilysin: a metalloprotease with dual specificity. *J Biol Chem.* 2003;278(39): 38022-38028. doi: 10.1074/jbc.M306842200.
37. Chang K-P, Reed SG, McGwire BS, Soong L. Leishmania model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003;85(3): 375-390. doi: 10.1016/s0001-706x(02)00238-3.
38. Laliberté J, Carruthers VB. Toxoplasma gondii toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. *Mol Biochem Parasitol.* 2011;177(1): 49-56. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.01.009.
39. Lima VMF, Biazzone L, Silva AC, Correa APFL, Luvizotto MCR. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis by an enzyme immunoassay using protein A in naturally infected dogs. *Pesq Vet Bras.* 2005;25(4): 215-218. doi: 10.1590/S0100-736X2005000400005.
40. Costa TAC, Rossi CN, Laurenti MD, Gomes AAD, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47(3): 213-217.
41. Silveira Neto L, Vicente Sobrinho LS, Martins CO, Machado RZ, Marcondes M, Lima VMF. Use of crude, FML and rK39 antigens in ELISA to detect anti-Leishmania spp. antibodies in Felis catus. *Vet Parasitol.* 2011;177(3-4): 374-377. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.11.055.
42. Vicente Sobrinho LS, Rossi CN, Vides JP, Braga ET, Gomes AAD, Lima VMF, et al. Coinfection of Leishmania chagasi with Toxoplasma gondii, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) in cats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2012;187(1-2): 302-306. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.01.010.
43. Silva DT, Alves ML, Spada JCP, Leonel FAF, Vioti G, Benassi JC, et al. Feline leishmaniasis: hematological and biochemical analysis. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2023;32(2): e003823. doi: 10.1590/S1984-29612023035.
44. Sousa KCM, Herrera HM, Domingos IH, Campos JBV, Santos IMC, Neves HH, et al. Serological detection of Toxoplasma gondii, Leishmania infantum and Neospora caninum in cats from an area endemic for leishmaniasis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(4): 449-455. doi: 10.1590/S1984-29612014078.
45. Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, et al. Current status of L. infantum infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis? *Parasit Vectors.* 2014;7: 112. doi: 10.1186/1756-3305-7-112.
46. Poffo D, Almeida ABPF, Nakazato L, Dutra V, Correa SHR, Mendonça AJ, et al. Feline immunodeficiency virus (FIV), feline leukaemia virus (FeLV) and Leishmania sp. in domestic cats in the Midwest of Brazil. *Pesq Vet Bras.* 2017;37(5): 491-494. doi: 10.1590/S0100-736X2017000500011.
47. Marcondes M, Hirata KY, Vides JP, Vicente Sobrinho LS, Azevedo JS, Vieira TSWJ, et al. Infection by Mycoplasma spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2018;11(1): 131. doi: 10.1186/s13071-018-2716-9.
48. Bezerra JAB, Oliveira IVP, Yamakawa AC, Nilsson MG, Tomaz KLR, Oliveira KDS, et al. Serological and molecular investigation of Leishmania spp. infection in

- cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2019;28: 790-796. doi: 10.1590/S1984-29612019082.
49. Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer, L. Canine leishmaniasis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24(7): 324-330. doi: 10.1016/j.pt.2008.04.001.
50. Pennisi MG, Cardoso L, Baneth G, Bourdeau P, Koutinas A, Miró G, et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniasis. *Parasit Vectors.* 2015;8(1): 302. doi: 10.1186/s13071-015-0909-z.
51. Alcover MM, Basurco A, Fernandez A, Riera C, Fisa R, Gonzalez A, et al. A cross-sectional study of *Leishmania infantum* infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR. *Parasit Vectors.* 2021;14(1): 178. doi: 10.1186/s13071-021-04682-w.
52. Silva RCN, Ramos RAN, Pimentel DS, Oliveira GMA, Carvalho GA, Santana MA, et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014;47: 108-109. doi: 10.1590/0037-8682-0005-2012.
53. Melo GD, Machado GF. Glial reactivity in dogs with visceral leishmaniasis: correlation with T lymphocyte infiltration and with cerebrospinal fluid anti-*Leishmania* antibody titres. *Cell Tissue Res.* 2011;346: 293-304. doi: 10.1007/s00441-011-1290-7.
54. Melo GS, Marcondes M, Machado GF. Canine cerebral leishmaniasis: potential role of matrix metalloproteinase-2 in the development of neurological disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012;148(3-4): 260–266. doi: 10.1016/j.vetimm.2012.05.007.
55. Jacintho APP, Melo GD, Machado GF, Bertolo PHL, Moreira PRR, Momo C, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the skin of dogs with visceral leishmaniasis. *Parasitol Res.* 2018;117: 1819-1827. doi: 10.1007/s00436-018-5868-9.
56. Priolo V, Martínez-Orellana P, Pennisi MG, Masucci M, Prandi D, Ippolito D, et al. *Leishmania infantum*-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniasis is endemic. *Parasit Vectors.* 2019;12(1): 133. doi: 10.1186/s13071-019-3386-y.

APÊNDICE A – REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

AKKOC, A.; INAN, S.; SONMEZ, G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. **Biotechnic & Histochemistry**, v.87, n.4, p.312–319, 2012.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M.; WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, artigo e35671, 12 p., 2012.

ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? a systematic review with meta-analysis. **The Journal of the Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 25, artigo e20190012, 10 p., jun. 2019.

AKHTARDANESH, B; KHEIRANDISH. R; SHARIFI, I; MOHAMMADI, A; MOSTAFAVI A; MAHMOODI, T. Low susceptibility of domestic cats to experimental *Leishmania infantum* infection. **J Vector Borne Dis**, v.55(3), p.230-234, 2018.

BANETH, G.; NACHUM-BIALA, Y.; ZUBERI, A.; ZIPORI-BARKI, N.; ORSHAN, L.; KLEINERMAN, G.; SHMUELI-GOLDIN, A.; BELLAICHE, M.; LESZKOWICZ-MAZUZ, M.; SALANT, H.; YASUR-LANDAU, D. *Leishmania* infection in cats and dogs housed together in an animal shelter reveals a higher parasite load in infected dogs despite a greater seroprevalence among cats. **Parasites & Vectors**, v. 13, n. 1, 20, 2020.

CARDOSO, L.; SCHALLIG, H.; PERSICHETTI, M. F.; PENNISI, M. G. New epidemiological aspects of animal leishmaniosis in Europe: the role of vertebrate hosts other than dogs. **Pathogens**, v.10, n.3, 2021.

CARNEIRO, M. B.; LOPES, M. E.; HOHMAN, L. S.; ROMANO, A.; DAVID, B. A.; KRATOFIL, R.; KUBES, P.; WORKENTINE, M. L.; CAMPOS, A. C.; VIEIRA, L. Q.; PETERS, N. C. Th1-Th2 cross-regulation controls early *Leishmania* infection in the skin by modulating the size of the permissive monocytic host cell reservoir. **Cell Host & Microbe**, v.27, n.5, p.752-768.e7, 2020.

CARVALHAL, D. G. F.; BARBOSA JR, A. A.; D'EL-REI HERMIDA, M.; CLARENCIO, J.; PINHEIRO JR, N. F.; VERAS, P. S. T.; SANTOS, W. L. C. The modelling of mononuclear phagocyte-connective tissue adhesion in vitro: application to disclose a specific inhibitory effect of *Leishmania* infection. **Experimental Parasitology**, v. 107, n.3-4, p.189-199, 2004.

CARVALHO, M. R.; VALENÇA, H. F.; SILVA, F. J.; PITA-PEREIRA, D.; PEREIRA, T. A.; BRITTO, C.; BRAZIL, R. P.; BRANDÃO FILHO, S. P. Natural *Leishmania infantum* infection in *Migonemyia migonei* (França, 1920) (Diptera:Psychodidae:Phlebotominae) the putative vector of visceral leishmaniasis in Pernambuco State, Brazil. **Acta Tropica**, v.116, n 1, p.108-110, 2010.

COSTA-VAL, A. P.; COURA, F. M.; BARBIERI, J. M.; DINIZ, L.; SAMPAIO, A.; REIS, J. K. P.; BUENO, B. L.; GONTIJO, C. M. F. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, n.2, 2020.

COTTON, J. A. The expanding world of human leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, Oxford, v.33, n.5, p.341-344, 2017.

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

DAY, M. J. Cats are not small dogs: is there an immunological explanation for why cats are less affected by arthropod-borne disease than dogs? **Parasites & Vectors**, v.9, n.1, p.20, 2016.

CHATZIS, M. K.; XENOULIS, P. G.; LEONTIDES, L.; KASABALIS, D.; MYLONAKIS, M. E.; ANDREADOU, M.; IKONOMOPOULOS, J.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. Evaluation of clinicopathological abnormalities in sick cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Heliyon**, v.6, n.10, p.e05177, 2020.

ELKINGTON, P. T. G.; O'KANE, C. M.; FRIEDLAND, J. S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.142, n.1, p.12-20, 2005.

FERNANDEZ-GALLEGO, A.; BERNABE, L. F.; DALMAU, A.; ESTEBAN-SALTIVERI, D.; FONT, A.; LEIVA, M.; ORTUÑEZ-NAVARRO, A.; PEÑA, M.-T.; TABAR, M.-D.; REAL-SAMPIETRO, L.; SALÓ, F.; LLORET, A.; BARDAGÍ, M. Feline leishmaniasis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, London, v. 22, n.10, p. 993-1007, 2020.

FERNANDEZ-GALLEGO, A.; FEO BERNABE, L.; DALMAU, A.; ESTEBAN-SALTIVERI, D.; FONT, A.; LEIVA, M.; ORTUÑEZ-NAVARRO, A.; PEÑA, M.-T.; TABAR, M.-D.; REAL-SAMPIETRO, L.; SALÓ, F.; LLORET, A.; BARDAGÍ, M. Feline leishmaniasis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v 10, p.1098612X2090286, 2020.

GADISA, E.; TASEW, G.; ABERA, A.; GELAYE, W.; CHANYALEW, M.; ABEBE, M.; LASKAY, T.; ASEFFA, A. Serological signatures of clinical cure following successful treatment with sodium stibogluconate in Ethiopian visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v.91, p.6-9, 2017.

GEURTS, N.; BECKER-PAULY, C.; MARTENS, E.; PROOST, P.; VAN DEN STEEN, P. E.; STÖCKER, W.; OPDENAKKER, G. Meprins process matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)/gelatinase B and enhance the activation kinetics by MMP-3. **FEBS Letters**, v 586, n 24, p.4264-4269, 2012.

HARTMANN, K. Clinical Aspects of Feline Retroviruses: A Review. **Viruses**, v.4, n.11, p.2684–2710, 2012.

KLEINER, D. E.; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix metalloproteinases and metastasis. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v 43, n 7, p.s42–S51, 1999.

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Toxoplasma gondii toxolysin 4 is an extensively processed putative metalloproteinase secreted from micronemes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.177, n.1, p.49-56, 2011.

MACHADO, G. F; MELO, G. .; MORAES, O. .; SOUZA, M. S; MARCONDES, M.; PERRI, S. H. ; VASCONCELOS, R. O. Differential alterations in the activity of matrix metalloproteinases within the nervous tissue of dogs in distinct manifestations of visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.136, n.3-4, p.340-345, 2010.

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

MAIA, C.; CAMPINO, L. Cytokine and phenotypic cell profiles of Leishmania infantum infection in the dog. **Journal of Tropical Medicine**, Cairo, v. 2012, artigo 541571, 7 p., 2012.

MAIA, Z.; LÍRIO, M.; MISTRO, S.; MENDES, C. M. C.; MEHTA, S. R.; BADARO, R. Comparative study of rK39 Leishmania antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review with meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.1, artigo e1484, 8 p, 2012.

MARANGONI, N. R.; MELO, G. D.; MORAES, O. C.; SOUZA, M. S.; PERRI, S. H. V.; MACHADO, G. F. Levels of matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 in the cerebrospinal fluid of dogs with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.33, n.6, p.330–334, 2011.

MARETTI-MIRA, A. C.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; DA-CRUZ, A. M.; PEREIRA, M.; CRAFT, N.; PIRMEZ, C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. **Clinical and Experimental Immunology**, v.163, n 2, p 207–214, 2010.

MARCONDES, M.; HIRATA, K. Y.; VIDES, J. P.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; AZEVEDO, J. S.; VIEIRA, T. S. W. J.; VIEIRA, R. F. C. Infection by Mycoplasma spp., feline immunodeficiency virus and feline leukemia virus in cats from an area endemic for visceral leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v.11, n.1, artigo 131, 8 p., mar. 2018.

MARCOS, R.; SANTOS, M.; MALHÃO, F.; PEREIRA, R.; FERNANDES, A. C.; MONTENEGRO, L.; ROCCABIANCA, P. Pancytopenia in a cat with visceral leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, n.2, p.201-205, 2009.

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

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v.27, n.2, p.123–147, 2012.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. S.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **PLoS ONE**, v 9, n.4, artigo e93770, 14 p., 2014.

MARTIN-SANCHEZ, J.; ACEDO, C.; MUNOZPEREZ, M.; PESSON, B.; MARCHAL, O.; MORILLASMARQUEZ, F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: Epidemiological study in Spain. **Veterinary Parasitology**, v.145, n.3-4, p.267–273, 2007.

MCGUIRE, J, K; LI, Q; PARKS, W.C. Matrilysin (matrix metalloproteinase-7) mediates E-cadherin ectodomain shedding in injured lung epithelium. **Am J Pathol**, v.162, p.1831–1843, 2003.

MELO, G. D.; MARANGONI, N. R.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F.; MACHADO, G. F. High levels of serum matrix metalloproteinases in dogs with natural visceral leishmaniasis: a preliminary report. **The Veterinary Journal**, v.188, n 2, p 243-245, 2011.

MENDONÇA, I. L.; BATISTA, J. F.; LOPES, K. S. P. P.; MAGALHÃES NETO, F. C. R.; ALCÂNTARA, D. S.; MERIGUETI, Y. F. F. B.; COSTA, C. H. N. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary Parasitology**, v.280, artigo 109058, 4p., 2020.

MURASE, L. S.; SOUZA, J. V. P.; LIMA NETO, Q. A.; MELLO, T. F. P.; CARDOSO, B. M.; LERA-NONOSE, S. S. S. L.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C.; DEMARCHI, I. G. The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review. **Parasitology**, v.145, n.12, p.1499-1509, 2018.

MURATA, C. E.; GOLDBERG, D. E. Plasmodium falciparum falcilysin: a metalloprotease with dual specificity. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.39, p.38022-38028, 2003.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. **Molecular Aspects of Medicine**, v.29, n.5, p.290-308, 2008.

NASCIMENTO, L. F. J.; CIRILO, T. M.; GOMES, D. S.; GOMES, A. C. A.; LIMA, V. F. S.; SCHER, R.; JAIN, S.; FUJIWARA, R. T.; DOLABELLA, S. S. Epidemiological and diagnostic aspects of feline leishmaniasis with emphasis on Brazil: a narrative review. **Parasitology Research**, v.121, n.1, p 21-34, 2022.

OLIVEIRA, F. A.; SILVA, C. V. O.; DAMASCENA, N. P.; PASSOS, R. O.; DUTHIE, M. S.; GUDERIAN, J. A.; BHATIA, A.; MOURA, T. R.; REED, S. G.; ALMEIDA, R. P.; JESUS, A. R. High levels of soluble CD40 ligand and matrix metalloproteinase-9 in

serum are associated with favorable clinical evolution in human visceral leishmaniasis. **BMC Infection Diseases**, v.13, artigo 331, p.9 , 2013.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v.69, p.S10-S18, 2014.

PENNISI, M. G.; HARTMANN, K.; LLORET, A.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HOSIE, M. J.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Leishmaniosis in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 638–642, 2013.

PENNISI, M. G.; CARDOSO, L.; BANETH, G.; BOURDEAU, P.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; OLIVA, G.; SOLLANO-GALEGO, L. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites and Vectors**, v.8, artigo 302, p.18, 2015.

PEREIRA, A.; MAIA, C. Leishmania infection in cats and feline leishmaniosis: an updated review with a proposal of a diagnosis algorithm and prevention guidelines. **Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases**, v.1, artigo 100035, p.21, 2021.

PEREIRA, A.; PARREIRA, R.; CRISTÓVÃO, J. M.; CASTELLI, G.; BRUNO, F.; VITALE, F.; CAMPINO, L.; MAIA, C. Phylogenetic insights on Leishmania detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. **Infection, Genetics and Evolution - Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v.77, artigo 104069, p.10, 2020.

PRATLONG, F.; RIOUX, J.-A.; MARTY, P.; FARAUT-GAMBARELLI, F.; DEREURE, J.; LANOTTE, G.; DEDET, J.-P. Isoenzymatic analysis of 712 strains of Leishmania infantum in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p.40774082, 2004.

PRIOLO, V.; MARTÍNEZ-ORELLANA, P.; PENNISI, M. G.; MASUCCI, M.; PRANDI, D.; IPPOLITO, D.; BRUNO, F.; CASTELLI, G.; SOLANO-GALLEGO, L. Leishmania infantum-specific IFN- γ production in stimulated blood from cats living in areas where canine leishmaniosis is endemic. **Parasites & Vectors**, v.12, n.1, 2019.

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

SILVA, R. B. S.; PORTELA, R. A.; ARRUDA, L. F. B.; FERREIRA, J. S.; SOUTO, E. P. F.; ARAÚJO, A. L.; MADEIRA, M. F.; DANTAS, A. F. M.; MELO, M. A. Natural infection by Leishmania infantum in domestic cats (Felis catus) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.29, n 4, artigo e016620, p.10, 2020.

SILVA, D.T; ALVES, M.L; SPADA, J.C.P; LEONEL, J.A.F; VIOTI, G; BENASSI, J.C. Feline leishmaniosis: hematological and biochemical analysis. **Braz J Vet Parasitol**, v.32, p. e003823, 2023.

SMITH, M. F.; RICKE, W. A.; BAKKE, L. J.; DOW, M. P. D.; SMITH, G. W. Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, n.1, p.45-56, 2002.

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

SOBRINHO, L.S; ROSSI, C.N; VIDES, J.P; BRAGA, E.T; GOMES, A.A; LIMA, V.M. Coinfection of *Leishmania chagasi* with *Toxoplasma gondii*, Feline Immunodeficiency Virus (FIV) and Feline Leukemia Virus (FeLV) incats from an endemic area of zoonotic visceral leishmaniasis. **Vet Parasitol.** v.187, n.1-2, p302-306, 2012.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v.165, n.1-2, p.1-18,2009.

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

TAMAMOTO, T; OHNO, K.; TAKAHASHI, M.; FUKUSHIMA, K.; KANEMOTO, H.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Plasma matrix metalloproteinase-9 activity in cats with lymphoma. **Veterinary and Comparative Oncology**, v.15, n.1, p.1–5, 5, 2014.

VIDES, J. P.; SCHWARDT, T. F.; VICENTE SOBRINHO, L. S.; MARINHO, M.; LAURENTI, M. D.; BIONDO, A. W.; LEUTENEGGER, C.; MARCONDES, M. *Leishmania chagasi* infection in cats with dermatologic lesions from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.178, n.1-2, p.22-28, 2011.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. **Circulation Research**, v.92, n.8, p.827-839, 2003.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

ATESTADO Nº. 009/2022 - CEUA

ATESTO, para os devidos fins, que a **Professora Assistente Doutora Débora de Barros Barbosa** foi **parecerista** do Projeto de Pesquisa intitulado **“Perfil de metaloproteínase 2 a 9 em soro de gatos naturalmente infectados com Leishmania spp.”**, Processo FOA-0076/2022, do(a) Pesquisador(a) Gisele Fabrino Machado.

Araçatuba, 04 de fevereiro de 2022.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO GATO E RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do Gato:		
Raça:	Sexo:	Idade do animal:

1. Responsável Legal:		
Documento de Identidade nº	Sexo:	Data de Nascimento:
Endereço:	Cidade: Araçatuba	

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Título do projeto de pesquisa: Exposição ao <i>Lutzomia</i> spp. e infecção por <i>Leishmania</i> spp. em felinos domésticos de área endêmica.	
Pesquisador responsável: Valéria Marçal Felix de Lima	
Cargo/função: Prof. Ass.	Unidade ou Departamento do Solicitante: DCCRA
3. Avaliação do risco da pesquisa: (probabilidade de que o gato sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo).	

SEM RISCO	RISCO MÍNIMO	X RISCO MÉDIO	RISCO MAIOR
<p>4. Justificativa e os objetivos da pesquisa (explicitar):</p> <p>- Coleta de sangue periférico e medula óssea, bem como a realização de ensaios sorológicos para detecção de IgG anti-saliva e IgG anti-MAX, em resposta a possível exposição ao <i>Lutzomia longipalpis</i> (vetor da Leishmaniose Visceral) assim como pesquisa de anticorpos IgG anti-Leishmania e PCR para investigar infecção por <i>Leishmania infantum</i>;</p>			

<p>5. Procedimentos que serão realizados com os animais:</p> <p>De cada animal serão coletados 3 ml de sangue por punção da veia cefálica ou jugular divididos em três alíquotas em tubo sem anticoagulante. Será também coletado 3 ml de medula óssea armazenado em tubo com EDTA por meio da punção da região epifisária proximal do úmero ou da crista ilíaca.</p> <p>Para a coleta desse material, os animais serão submetidos a uma anestesia dissociativa. Dessa forma, animais que não estejam saudáveis não devem participar do projeto, sendo obrigação do tutor certificar-se que a saúde do animal esteja em dia. Sempre que possível, é recomendado que o mesmo solicite exames laboratoriais prévios, como hemograma e avaliação bioquímica com perfil renal e hepático, antes da realização da castração.</p> <p>É importante salientar que a castração realizada nas fêmeas (ovariosalpingohisterectomia - OSH) e nos machos (orquiectomia) não fazem parte da metodologia do projeto de pesquisa. Como a maioria dos felinos que participam do projeto são animais sem tutela, de ONGS ou abrigos, a castração é oferecida pensando no benefício no controle de natalidade desses animais e, conseqüentemente, na redução da população de gatos errantes no município de Araçatuba-SP. Dessa forma, o pós-operatório e quaisquer complicações que o animal possa apresentar são de responsabilidade do tutor, devendo o mesmo garantir que o animal receba os cuidados necessários, incluindo a retirada de pontos.</p>
<p>6. Desconfortos e riscos esperados:</p> <p>Coleta de sangue e medula: dor local após coleta, claudicação transitória.</p> <p>Em relação a castração, podem ocorrer durante o procedimento hemorragias ou complicações decorrentes da anestesia. Vale reforçar que todo procedimento anestésico pode acarretar riscos, incluindo o óbito do animal.</p> <p>Já os riscos referentes ao pós-operatório do procedimento de castração em fêmeas ou machos dependem diretamente dos cuidados que cabem ao tutor, como uso de antibioticoterapia e analgesia prescritas, evitar que o animal consiga ter contato com a ferida cirúrgica ou que tenha acesso a rua. Caso não sejam realizadas as medidas recomendadas, tais complicações são inteiramente responsabilidade do tutor.</p>

<p>7. Benefícios que poderão ser obtidos:</p> <p>Clarificação quanto a exposição da espécie felina ao vetor da Leishmaniose Visceral, bem como da sua relação com o risco da infecção por <i>L. infantum</i>. Permitindo dessa forma suporte científico para auxiliar no desenvolvimento de medidas de prevenção adequadas para gatos.</p> <p>Castração do animal, melhorando comportamentos relacionados ao estado reprodutivo, como fugas, auxiliando na prevenção de problemas do trato reprodutivo ou gestação indesejada em fêmeas</p>
<p>8. Benefícios aos animais:</p> <p>Conhecimento, por parte do tutor da positividade para <i>L. infantum</i>; além da contribuição para possíveis medidas de prevenção para controle da doença em gatos. Controle populacional através da esterilização cirúrgica desses animais.</p>

III - EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO REPRESENTANTE LEGAL

<p>1. Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(s) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(s) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s).</p>
<p>2. A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.</p>
<p>3. Esclarecimentos sobre a garantia de resposta a qualquer pergunta, a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.</p>
<p>5. Esclarecimento sobre a disposição e o compromisso de receber informações obtidas durante o estudo, quando solicitada.</p>

IV – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador, conforme registro nos itens 1 a 5 do inciso III, consinto em permitir a participação de meu(s) cão(ões), no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

Assinatura

ANEXO C- NORMAS PARA SUBMISSÃO PLOS NEGLEDTED

06/08/2023, 18:11

Submission Guidelines | PLOS Neglected Tropical Diseases

[About the Journal](#)
[Style and Format](#)
[Manuscript Organization](#)
Parts of a Submission
[Title](#)
[Author list](#)
[Author contributions](#)
[Cover letter](#)
[Title page](#)
[Abstract](#)
[Author Summary](#)
[Introduction](#)
[Methods](#)
[Results](#)
[Discussion](#)
Acknowledgments
[References](#)
[Supporting information](#)
[Figures and Tables](#)
[Data reporting](#)
[Accession numbers](#)
[Small and macromolecule
crystal data](#)
[Striking image](#)
[Additional Information](#)
[Requested at Submission](#)
[Guidelines for Specific Study
Types](#)
[Other Article Types](#)
[You may be eligible for APC
support](#)

Submission Guidelines

About the Journal

PLOS Neglected Tropical Diseases publishes original research articles of importance to the NTDs community and the wider health community. We will consider manuscripts of any length; we encourage the submission of both substantial full-length bodies of work and shorter manuscripts that report novel findings that might be based on a more limited range of experiments.

The writing style should be concise and accessible, avoiding jargon so that the paper is understandable for readers outside a specialty or those whose first language is not English. Editors will make suggestions for how to achieve this, as well as suggestions for cuts or additions that could be made to the article to strengthen the argument. Our aim is to make the editorial process rigorous and consistent, but not intrusive or overbearing. Authors are encouraged to use their own voice and to decide how best to present their ideas, results, and conclusions.

Related information for authors

- > [PLOS Writing Center](#)
- > [Submission system](#)
- > [Journal scope and publication criteria](#)
- > [Getting started guide](#)
- > [Guidelines for other article types](#)
- > [Guidelines for revisions](#)
- > [Publication fees](#)

Style and Format

- ❗ When you first submit to the journal, providing you include all the necessary information needed for editorial assessment and review, we will not ask you to make any formatting changes. During resubmission, we may ask you to meet formatting requirements.

<p>About the Journal</p> <p>Style and Format</p> <p>Manuscript Organization</p> <p>Parts of a Submission</p> <p>Title</p> <p>Author list</p> <p>Author contributions</p> <p>Cover letter</p> <p>Title page</p> <p>Abstract</p> <p>Author Summary</p> <p>Introduction</p> <p>Methods</p> <p>Results</p> <p>Discussion</p> <p>Acknowledgments</p> <p>References</p> <p>Supporting information</p> <p>Figures and Tables</p> <p>Data reporting</p> <p>Accession numbers</p> <p>Small and macromolecule crystal data</p> <p>Striking image</p> <p>Additional Information</p> <p>Requested at Submission</p> <p>Guidelines for Specific Study Types</p> <p>Other Article Types</p> <p>You may be eligible for APC support</p>	<p>File format Manuscript files can be in the following formats: DOC, DOCX, RTF or PDF. Microsoft Word documents should not be locked or protected.</p> <p>LaTeX manuscripts must be submitted as PDFs. Read the LaTeX guidelines.</p> <hr/> <p>Length Manuscripts can be any length. There are no restrictions on word count, number of figures, or amount of supporting information.</p> <p>We encourage you to present and discuss your findings concisely.</p> <hr/> <p>Font Use a standard font size and any standard font, except for the font named "Symbol". To add symbols to the manuscript, use the Insert → Symbol function in your word processor or paste in the appropriate Unicode character.</p> <hr/> <p>Headings Limit manuscript sections and sub-sections to 3 heading levels. Make sure heading levels are clearly indicated in the manuscript text.</p> <hr/> <p>Layout and spacing Manuscript text should be double-spaced.</p> <p>Do not format text in multiple columns.</p> <hr/> <p>Page and line numbers Include page numbers and line numbers in the manuscript file. Use continuous line numbers (do not restart the numbering on each page).</p> <hr/> <p>Tables Insert tables immediately after the first paragraph in which they are cited.</p> <hr/> <p>Supporting information Upload Supporting Information (SI) files separately.</p> <hr/> <p>Footnotes Footnotes are not permitted. If your manuscript contains footnotes, move the information into the main text or the reference list, depending on the content.</p> <hr/> <p>Language Manuscripts must be submitted in English.</p> <p>You may submit translations of the manuscript or abstract as supporting information. Read the supporting information guidelines.</p> <hr/> <p>Abbreviations Define abbreviations upon first appearance in the text.</p> <p>Do not use non-standard abbreviations unless they appear at least three times in the text.</p> <p>Keep abbreviations to a minimum.</p> <hr/> <p>Reference style PLOS uses "Vancouver" style, as outlined in the ICMJE sample references.</p> <p>See reference formatting examples and additional instructions below.</p> <hr/> <p>Equations We recommend using MathType for display and inline equations, as it will provide the most reliable outcome. If this is not possible, Equation Editor or Microsoft's Insert→Equation function is acceptable.</p> <p>Avoid using MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function to insert single variables (e.g., "a" + b² = c³), Greek or other symbols (e.g., β, Δ, or ' [prime]), or mathematical operators (e.g., x, ≥, or ±) in running text. Wherever possible, insert single symbols as normal text with the correct Unicode (hex) values.</p> <p>Do not use MathType, Equation Editor, or the Insert→Equation function for only a portion of an equation. Rather, ensure that the entire equation is included. Equations should not contain a mix of different equation tools. Avoid "hybrid" inline or display equations, in which part is text and part is MathType, or part is MathType and part is Equation Editor.</p> <hr/> <p>Nomenclature Use correct and established nomenclature wherever possible.</p> <p><i>Units of measurement</i> Use SI units. If you do not use these exclusively, provide the SI value in parentheses after each value. Read more about SI units.</p> <p><i>Drugs</i> Provide the Recommended International Non-Proprietary Name (rINN).</p>
--	---

About the Journal		
Style and Format	<i>Species names</i>	Write in italics (e.g., <i>Homo sapiens</i>). Write out in full the genus and species, both in the title of the manuscript and at the first mention of an organism in a paper. After first mention, the first letter of the genus name followed by the full species name may be used (e.g., <i>H. sapiens</i>).
Manuscript Organization		
Parts of a Submission		
Title		
Author list	<i>Genes, mutations, genotypes, and alleles</i>	Write in italics. Use the recommended name by consulting the appropriate genetic nomenclature database (e.g., HGNC for human genes). It is sometimes advisable to indicate the synonyms for the gene the first time it appears in the text. Gene prefixes such as those used for oncogenes or cellular localization should be shown in roman typeface (e.g., v-fes, c-MYC).
Author contributions		
Cover letter		
Title page		
Abstract		
Author Summary	<i>Allergens</i>	The systematic allergen nomenclature of the World Health Organization/International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-committee should be used for manuscripts that include the description or use of allergenic proteins. For manuscripts describing new allergens, the systematic name of the allergen should be approved by the WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee prior to manuscript publication. Examples of the systematic allergen nomenclature can be found at the WHO/IUIS Allergen Nomenclature site .
Introduction		
Methods		
Results		
Discussion		
Acknowledgments	Copyediting manuscripts	
References		
Supporting information		Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from in-depth professional copyediting are encouraged to use language-editing and copyediting services. Obtaining this service is the responsibility of the author and should be done before initial submission. These services can be found on the web using search terms like "scientific editing service" or "manuscript editing service".
Figures and Tables		
Data reporting		
Accession numbers		<i>Note that if your manuscript is accepted, PLOS will not perform a detailed copyediting step. Therefore, please carefully review your manuscript, paying special attention to spelling, punctuation, and grammar, as well as scientific content.</i>
Small and macromolecule crystal data		
Striking image		
Additional Information Requested at Submission		
Guidelines for Specific Study Types		
Other Article Types		
You may be eligible for APC support		

Manuscript Organization

Most manuscripts should be organized as follows. Instructions for each element appear below.

- > Title
- > Authors and Affiliations
- > Abstract
- > Author Summary
- > Introduction
- > Methods
- > Methods
- > Results
- > Discussion
- > Acknowledgments
- > References
- > Supporting information Captions

Uniformity in format facilitates the experience of readers and users of the journal. To provide flexibility, however, the Results and Discussion can be combined into one Results/Discussion section.



Ready to format your provisionally accepted manuscript?

Refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- > [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)
- > [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)



Ready to format your provisionally accepted manuscript?

Refer to our downloadable sample files to ensure that your submission meets our formatting requirements:

- > [Download sample title, author list, and affiliations page \(PDF\)](#)

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Title

Author list

Author contributions

Cover letter

Title page

Abstract

Author Summary

Introduction

Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

References

Supporting information

Figures and Tables

Data reporting

Accession numbers

Small and macromolecule crystal data

Striking image

Additional Information Requested at Submission

Guidelines for Specific Study Types

Other Article Types

You may be eligible for APC support

> [Download sample manuscript body \(PDF\)](#)

Viewing Figures and Supporting Information in the compiled submission PDF

The compiled submission PDF includes low-resolution preview images of the figures after the reference list. The function of these previews is to allow you to download the entire submission as quickly as possible. Click the link at the top of each preview page to download a high-resolution version of each figure. Links to download Supporting Information files are also available after the reference list.

Parts of a Submission

Title

Include a full title and a short title for the manuscript.

Title	Length	Guidelines	Examples
Full title	250 characters	Specific, descriptive, concise, and comprehensible to readers outside the field	Impact of cigarette smoke exposure on innate immunity: A <i>Caenorhabditis elegans</i> model Solar drinking water disinfection (SODIS) to reduce childhood diarrhoea in rural Bolivia: A cluster-randomized, controlled trial
Short title	70 characters	State the topic of the study	Cigarette smoke exposure and innate immunity SODIS and childhood diarrhoea

Titles should be written in sentence case (only the first word of the text, proper nouns, and genus names are capitalized). Avoid specialist abbreviations if possible. For clinical trials, systematic reviews, or meta-analyses, the subtitle should include the study design.

Author list

Authorship requirements

All authors must meet the criteria for authorship as outlined in the [authorship policy](#). Those who contributed to the work but do not meet the criteria for authorship can be mentioned in the Acknowledgments. [Read more about Acknowledgments](#).

The corresponding author must provide an ORCID iD at the time of submission by entering it in the user profile in the submission system. [Read more about ORCID](#).

Author names and affiliations


Enter author names on the title page of the manuscript and in the online submission system.

On the title page, write author names in the following order:

- > First name (or initials, if used)
- > Middle name (or initials, if used)
- > Last name (surname, family name)

Each author on the list must have an affiliation. The affiliation includes department, university, or organizational affiliation and its location, including city, state/province (if applicable), and country. Authors have the option to include a current address in addition to the address of their affiliation at the time of the study. The current address should be listed in the byline and clearly labeled "current address." At a minimum, the address must include the author's current institution, city, and country.

If an author has multiple affiliations, enter all affiliations on the title page only. In the submission system, enter only the preferred or primary affiliation. Author affiliations will be listed in the typeset PDF article in the same order that authors are listed in the submission.

-  Author names will be published exactly as they appear in the manuscript file. Please double-check the information carefully to make sure it is correct.

Corresponding author

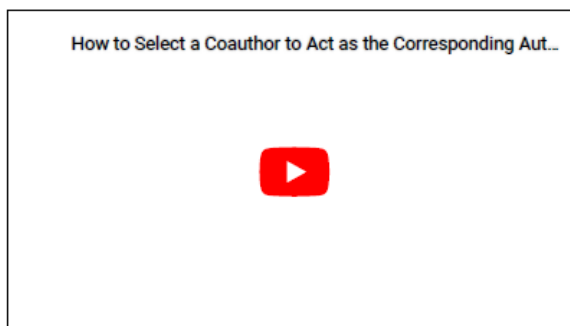
The submitting author is automatically designated as the corresponding author in the submission system. The corresponding author is the primary contact for the journal office and the only author able to view or change the manuscript while it is under editorial consideration.

- About the Journal
- Style and Format
- Manuscript Organization
- Parts of a Submission**
- Title
- Author list
- Author contributions
- Cover letter
- Title page
- Abstract
- Author Summary
- Introduction
- Methods
- Results
- Discussion
- Acknowledgments**
- References
- Supporting information
- Figures and Tables
- Data reporting
- Accession numbers
- Small and macromolecule crystal data
- Striking image
- Additional Information
- Requested at Submission
- Guidelines for Specific Study Types
- Other Article Types
- You may be eligible for APC support

The corresponding author role may be transferred to another coauthor. However, note that transferring the corresponding author role also transfers access to the manuscript. (To designate a new corresponding author while the manuscript is still under consideration, watch the video tutorial below.)

Only one corresponding author can be designated in the submission system, but this does not restrict the number of corresponding authors that may be listed on the article in the event of publication. Whoever is designated as a corresponding author on the title page of the manuscript file will be listed as such upon publication. Include an email address for each corresponding author listed on the title page of the manuscript.

▶ How to select a new corresponding author in Editorial Manager



Consortia and group authorship

If a manuscript is submitted on behalf of a consortium or group, include its name in the manuscript byline. Do not add it to the author list in the submission system. You may include the full list of members in the Acknowledgments or in a supporting information file.

PubMed only indexes individual consortium or group author members listed in the article byline. If included these individuals must qualify for authorship according to our [criteria](#).

▶ Read the group authorship policy.

Author contributions

Provide at minimum one contribution for each author in the submission system. Use the CRediT taxonomy to describe each contribution. [Read the policy and the full list of roles](#).

Contributions will be published with the final article, and they should accurately reflect contributions to the work. The submitting author is responsible for completing this information at submission, and we expect that all authors will have reviewed, discussed, and agreed to their individual contributions ahead of this time.

PLOS Neglected Tropical Diseases will contact all authors by email at submission to ensure that they are aware of the submission.

Cover letter

Upload a cover letter as a separate file in the online system.

The cover letter should address the following questions:

- › Why is this manuscript suitable for publication in *PLOS Neglected Tropical Diseases*?
- › Why will your study inspire the NTDs community, and how will it drive the understanding of NTD pathobiology, epidemiology, prevention, treatment, control, or policy?

The cover letter will only be available to the editor and the journal staff.

Title page

The title, authors, and affiliations should all be included on a title page as the first page of the manuscript file.

▶ Download our sample title, author list, and affiliations page (PDF)

Abstract

The Abstract comes after the title page in the manuscript file. The abstract text is also entered in a separate field in the submission system.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
`http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI]`

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other **non-laboratory** investigations may be uploaded as supporting information.

We recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in protocols.io, where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).

To include a link to a protocol in your article:

1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io
2. Select **Get DOI** to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI)
3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io:
`http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI]`

At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting **Publish** on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

About the Journal	<i>PLOS ONE</i> offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io articles. Read more information on Lab Protocol articles .
Style and Format	Results
Manuscript Organization	The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.
Parts of a Submission	
Title	
Author list	<i>PLOS</i> journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.
Author contributions	
Cover letter	Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories .
Title page	
Abstract	For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).
Author Summary	
Introduction	
Methods	For more information on how best to provide data, read our policy on data availability . <i>PLOS</i> does not accept references to "data not shown."
Results	
Discussion	As outlined in the Uniform Requirements , authors that present statistical data in the Results section should do the following:
Acknowledgments	
References	<i>Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample."</i>
Supporting information	
Figures and Tables	
Data reporting	
Accession numbers	
Small and macromolecule crystal data	Discussion
Striking image	The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.
Additional Information Requested at Submission	You may wish to discuss the following points also:
Guidelines for Specific Study Types	<ul style="list-style-type: none"> > How do the conclusions affect the existing knowledge in the field? > How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?
Other Article Types	Acknowledgments
You may be eligible for APC support	Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.
	Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.
	<p>i <i>PLOS</i> journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.</p> <p>Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.</p>
	Submit detailed protocols for newer or less established methods. Well-established protocols may simply be referenced. Protocol documents for clinical trials, observational studies, and other non-laboratory investigations may be uploaded as supporting information.
	We recommend and encourage you to deposit laboratory protocols in protocols.io , where protocols can be assigned their own persistent digital object identifiers (DOIs).
	To include a link to a protocol in your article:
	<ol style="list-style-type: none"> 1. Describe your step-by-step protocol on protocols.io 2. Select Get DOI to issue your protocol a persistent digital object identifier (DOI) 3. Include the DOI link in the Methods section of your manuscript using the following format provided by protocols.io: http://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.[PROTOCOL DOI]
	At this stage, your protocol is only visible to those with the link. This allows editors and reviewers to consult your protocol when evaluating the manuscript. You can make your protocols public at any time by selecting Publish on the protocols.io site. Any referenced protocol(s) will automatically be made public when your article is published.

About the Journal	<i>PLOS ONE</i> offers an option for publishing peer-reviewed Lab Protocol articles, which describe protocols hosted on protocols.io articles. Read more information on Lab Protocol articles .
Style and Format	Results
Manuscript Organization	The Results section should include all relevant positive and negative findings. The section may be divided into subsections, each with a concise subheading. The Results section should be written in past tense.
Parts of a Submission	
Title	<i>PLOS</i> journals require authors to make all data underlying the findings described in their manuscript fully available without restriction, with rare exception.
Author list	
Author contributions	Large data sets, including raw data, may be deposited in an appropriate public repository. See our list of recommended repositories .
Cover letter	
Title page	For smaller data sets and certain data types, authors may provide their data within supporting information files accompanying the manuscript. Authors should take care to maximize the accessibility and reusability of the data by selecting a file format from which data can be efficiently extracted (for example, spreadsheets or flat files should be provided rather than PDFs when providing tabulated data).
Abstract	
Author Summary	For more information on how best to provide data, read our policy on data availability . <i>PLOS</i> does not accept references to "data not shown."
Introduction	As outlined in the Uniform Requirements , authors that present statistical data in the Results section should do the following:
Methods	
Results	
Discussion	
Acknowledgments	
References	<i>Give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical significance attached to them, if any. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess supporting data. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid nontechnical uses of technical terms in statistics, such as "random" (which implies a randomizing device), "normal," "significant," "correlations," and "sample."</i>
Supporting Information	
Figures and Tables	
Data reporting	
Accession numbers	
Small and macromolecule crystal data	Discussion
Striking image	The Discussion should be concise and tightly argued. It should start with a brief summary of the main findings. It should include paragraphs on the generalizability, clinical relevance, strengths, and limitations of your study.
Additional Information Requested at Submission	You may wish to discuss the following points also:
Guidelines for Specific Study Types	<ul style="list-style-type: none"> > How do the conclusions affect the existing knowledge in the field? > How can future research build on these observations and what are the key experiments that must be done?
Other Article Types	Acknowledgments
You may be eligible for APC support	Those who contributed to the work but do not meet our authorship criteria should be listed in the Acknowledgments with a description of the contribution.
	Authors are responsible for ensuring that anyone named in the Acknowledgments agrees to be named.
	<p>! <i>PLOS</i> journals publicly acknowledge the indispensable efforts of our editors and reviewers on an annual basis. To ensure equitable recognition and avoid any appearance of partiality, do not include editors or peer reviewers—named or unnamed—in the Acknowledgments.</p> <p>Do not include funding sources in the Acknowledgments or anywhere else in the manuscript file. Funding information should only be entered in the financial disclosure section of the submission system.</p>

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization

Parts of a Submission

Title
Author list
Author contributions
Cover letter
Title page
Abstract
Author Summary
Introduction
Methods
Results
Discussion

Acknowledgments

References

Supporting information

Figures and Tables

Data reporting

Accession numbers

Small and macromolecule
crystal data

Striking image

Additional Information

Requested at Submission

Guidelines for Specific Study
Types

Other Article Types

You may be eligible for APC
support

work even in light of the post-publication notice, include in your manuscript citations and full references for both the affected article and the post-publication notice. Email the journal office if you have questions.

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., "We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data"). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

i Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpl9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i> . 2011;10: 1578-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i> . 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. arXiv:1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1

References

Any and all available works can be cited in the reference list. Acceptable sources include:

- > Published or accepted manuscripts
- > Manuscripts on preprint servers, providing the manuscript has a citable DOI or arXiv URL.

Do not cite the following sources in the reference list:

- > Unavailable and unpublished work, including manuscripts that have been submitted but not yet accepted (e.g., "unpublished work," "data not shown"). Instead, include those data as supplementary material or deposit the data in a publicly available database.
- > Personal communications (these should be supported by a letter from the relevant authors but not included in the reference list)
- > Submitted research should not rely upon retracted research. You should avoid citing retracted articles unless you need to discuss retracted work to provide historical context for your submitted research. If it is necessary to discuss retracted work, state the article's retracted status in your article's text and reference list.

Ensure that your reference list includes full and current bibliography details for every cited work at the time of your article's submission (and publication, if accepted). If cited work is corrected, retracted, or marked with an expression of concern before your article is published, and if you feel it is appropriate to cite the

About the Journal
Style and Format
Manuscript Organization
Parts of a Submission
Title
Author list
Author contributions
Cover letter
Title page
Abstract
Author Summary
Introduction
Methods
Results
Discussion
Acknowledgments
References
Supporting information
Figures and Tables
Data reporting
Accession numbers
Small and macromolecule crystal data
Striking image
Additional Information Requested at Submission
Guidelines for Specific Study Types
Other Article Types
You may be eligible for APC support

work even in light of the post-publication notice, include in your manuscript citations and full references for both the affected article and the post-publication notice. Email the journal office if you have questions.

References are listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. In the text, cite the reference number in square brackets (e.g., "We used the techniques developed by our colleagues [19] to analyze the data"). PLOS uses the numbered citation (citation-sequence) method and first six authors, et al.

Do not include citations in abstracts.

Make sure the parts of the manuscript are in the correct order *before* ordering the citations.

Formatting references

i Because all references will be linked electronically as much as possible to the papers they cite, proper formatting of references is crucial.

PLOS uses the reference style outlined by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), also referred to as the "Vancouver" style. Example formats are listed below. Additional examples are in the [ICMJE sample references](#).

A reference management tool, EndNote, offers a current [style file](#) that can assist you with the formatting of your references. If you have problems with any reference management program, please contact the source company's technical support.

Journal name abbreviations should be those found in the [National Center for Biotechnology Information \(NCBI\) databases](#).

Source	Format
Published articles	Hou WR, Hou YL, Wu GF, Song Y, Su XL, Sun B, et al. cDNA, genomic sequence cloning and overexpression of ribosomal protein gene L9 (rpl9) of the giant panda (<i>Ailuropoda melanoleuca</i>). <i>Genet Mol Res</i> . 2011;10: 1576-1588. Devaraju P, Gulati R, Antony PT, Mithun CB, Negi VS. Susceptibility to SLE in South Indian Tamils may be influenced by genetic selection pressure on TLR2 and TLR9 genes. <i>Mol Immunol</i> . 2014 Nov 22. pii: S0161-5890(14)00313-7. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005. Note: A DOI number for the full-text article is acceptable as an alternative to or in addition to traditional volume and page numbers. When providing a DOI, adhere to the format in the example above with both the label and full DOI included at the end of the reference (doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.005). Do not provide a shortened DOI or the URL.
Accepted, unpublished articles	Same as published articles, but substitute "Forthcoming" for page numbers or DOI.
Online articles	Huynen MMTE, Martens P, Hilderink HBM. The health impacts of globalisation: a conceptual framework. <i>Global Health</i> . 2005;1: 14. Available from: http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14
Books	Bates B. Bargaining for life: A social history of tuberculosis. 1st ed. Philadelphia: University of Pennsylvania Press; 1992.
Book chapters	Hansen B. New York City epidemics and history for the public. In: Harden VA, Risse GB, editors. <i>AIDS and the historian</i> . Bethesda: National Institutes of Health; 1991. pp. 21-28.
Deposited articles (preprints, e-prints, or arXiv)	Krick T, Shub DA, Verstraete N, Ferreiro DU, Alonso LG, Shub M, et al. Amino acid metabolism conflicts with protein diversity. arXiv:1403.3301v1 [Preprint]. 2014 [cited 2014 March 17]. Available from: https://128.84.21.199/abs/1403.3301v1

<p>About the Journal</p> <p>Style and Format</p> <p>Manuscript Organization</p> <p>Parts of a Submission</p> <p>Title</p> <p>Author list</p> <p>Author contributions</p> <p>Cover letter</p> <p>Title page</p> <p>Abstract</p> <p>Author Summary</p> <p>Introduction</p> <p>Methods</p> <p>Results</p> <p>Discussion</p> <p>Acknowledgments</p> <p>References</p> <p>Supporting information</p> <p>Figures and Tables</p> <p>Data reporting</p> <p>Accession numbers</p> <p>Small and macromolecule crystal data</p> <p>Striking image</p> <p>Additional Information</p> <p>Requested at Submission</p> <p>Guidelines for Specific Study Types</p> <p>Other Article Types</p> <p>You may be eligible for APC support</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Source</th> <th style="text-align: left; padding: 5px;">Format</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 5px;">Masters' theses or doctoral dissertations</td> <td style="padding: 5px;">Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Databases and repositories (Figshare, arXiv)</td> <td style="padding: 5px;">Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214</td> </tr> <tr> <td style="padding: 5px;">Multimedia (videos, movies, or TV shows)</td> <td style="padding: 5px;">Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.</td> </tr> </tbody> </table> <p>Supporting Information</p> <p>Authors can submit essential supporting files and multimedia files along with their manuscripts. All supporting information will be subject to peer review. All file types can be submitted, but files must be smaller than 20 MB in size.</p> <p>Authors may use almost any description as the item name for a supporting information file as long as it contains an "S" and number. For example, "S1 Appendix" and "S2 Appendix," "S1 Table" and "S2 Table," and so forth.</p> <p>Supporting information files are published exactly as provided, and are not copyedited.</p> <p>Supporting Information captions</p> <p>List supporting information captions at the end of the manuscript file. Do not submit captions in a separate file.</p> <p>The file number and name are required in a caption, and we highly recommend including a one-line title as well. You may also include a legend in your caption, but it is not required.</p> <p style="text-align: center;">Example caption</p> <p style="text-align: center;">S1 Text. Title is strongly recommended. Legend is optional.</p> <p>In-text citations</p> <p>We recommend that you cite supporting information in the manuscript text, but this is not a requirement. If you cite supporting information in the text, citations do not need to be in numerical order.</p> <p>i Read the supporting information guidelines for more details about submitting supporting information and multimedia files.</p> <p>Figures and Tables</p> <p>Figures</p> <p>You can include figures in the main manuscript file at initial submission. If the manuscript reaches the revise stage, prepare and submit each figure as an individual file.</p> <p>Cite figures in ascending numeric order at first appearance in the manuscript file.</p> <p>i Read the guidelines for figures.</p>	Source	Format	Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09	Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214	Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.
Source	Format								
Masters' theses or doctoral dissertations	Wells A. Exploring the development of the independent, electronic, scholarly journal. M.Sc. Thesis, The University of Sheffield. 1999. Available from: http://cumincad.scix.net/cgi-bin/works/Show?2e09								
Databases and repositories (Figshare, arXiv)	Roberts SB. QPX Genome Browser Feature Tracks; 2013 [cited 2013 Oct 5]. Database: figshare [Internet]. Available from: http://figshare.com/articles/QPX_Genome_Browser_Feature_Tracks/701214								
Multimedia (videos, movies, or TV shows)	Hitchcock A, producer and director. Rear Window [Film]; 1954. Los Angeles: MGM.								

About the Journal

Style and Format

Manuscript Organization

Parts of a Submission

Title

Author list

Author contributions

Cover letter

Title page

Abstract

Author Summary

Introduction

Methods

Results

Discussion

Acknowledgments

References

Supporting information

Figures and Tables

Data reporting

Accession numbers

Small and macromolecule crystal data

Striking image

Additional Information Requested at Submission

Guidelines for Specific Study Types


Other Article Types

You may be eligible for APC support

Cite tables in ascending numeric order upon first appearance in the manuscript file.


Place each table in your manuscript file directly after the paragraph in which it is first cited (read order). Do not submit your tables in separate files.

Tables require a label (e.g., "Table 1") and brief descriptive title to be placed above the table. Place legends, footnotes, and other text below the table.

 [Read the guidelines for tables.](#)

Data reporting

All data and related metadata underlying the findings reported in a submitted manuscript should be deposited in an appropriate public repository, unless already provided as part of the submitted article.

 [Read our policy on data availability.](#)

Repositories may be either subject-specific (where these exist) and accept specific types of structured data, or generalist repositories that accept multiple data types. We recommend that authors select repositories appropriate to their field. Repositories may be subject-specific (e.g., GenBank for sequences and PDB for structures), general, or institutional, as long as DOIs or accession numbers are provided and the data are at least as open as CC BY. Authors are encouraged to select repositories that meet accepted criteria as trustworthy digital repositories, such as criteria of the Centre for Research Libraries or Data Seal of Approval. Large, international databases are more likely to persist than small, local ones.

 [See our list of recommended repositories.](#)

To support data sharing and author compliance of the PLOS data policy, we have integrated our submission process with a select set of data repositories. The list is neither representative nor exhaustive of the suitable repositories available to authors. Current repository integration partners include [Dryad](#) and [FlowRepository](#). Please contact data@plos.org to make recommendations for further partnerships.

Instructions for PLOS submissions with data deposited in an integration partner repository:

- > Deposit data in the integrated repository of choice.
- > Once deposition is final and complete, the repository will provide you with a dataset DOI (provisional) and private URL for reviewers to gain access to the data.
- > Enter the given data DOI into the full Data Availability Statement, which is requested in the Additional Information section of the PLOS submission form. Then provide the URL passcode in the Attach Files section.

If you have any questions, please [email us](#).

Accession numbers

All appropriate data sets, images, and information should be deposited in an appropriate public repository. [See our list of recommended repositories.](#)

Accession numbers (and version numbers, if appropriate) should be provided in the Data Availability Statement. Accession numbers or a citation to the DOI should also be provided when the data set is mentioned within the manuscript.

In some cases authors may not be able to obtain accession numbers of DOIs until the manuscript is accepted; in these cases, the authors must provide these numbers at acceptance. In all other cases, these numbers must be provided at full submission.

Identifiers

As much as possible, please provide accession numbers or identifiers for all entities such as genes, proteins, mutants, diseases, etc., for which there is an entry in a public database, for example:

- > [Ensembl](#)
- > [Entrez Gene](#)
- > [FlyBase](#)
- > [InterPro](#)
- > [Mouse Genome Database \(MGD\)](#)
- > [Online Mendelian Inheritance in Man \(OMIM\)](#)
- > [PubChem](#)

Identifiers should be provided in parentheses after the entity on first use.

About the Journal	
Style and Format	
Manuscript Organization	
Parts of a Submission	
Title	
Author list	
Author contributions	
Cover letter	
Title page	
Abstract	
Author Summary	
Introduction	Small and macromolecule crystal data
Methods	
Results	
Discussion	
Acknowledgments	
References	
Supporting information	
Figures and Tables	
Data reporting	
Accession numbers	
Small and macromolecule crystal data	
Striking image	
Additional Information Requested at Submission	
Guidelines for Specific Study Types	
Other Article Types	
You may be eligible for APC support	

Small and macromolecule crystal data

Manuscripts reporting new and unpublished three-dimensional structures must include sufficient supporting data and detailed descriptions of the methodologies used to allow the reproduction and validation of the structures. All novel structures must have been deposited in a community endorsed database prior to submission (please see our list of [recommended repositories](#)).

Small molecule single crystal data

Authors reporting X-Ray crystallographic structures of small organic, metal-organic, and inorganic molecules must deposit their data with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC), the Inorganic Crystal Structure Database (ICSD), or similar community databases providing a recognized validation functionality. Authors are also required to include the relevant structure reference numbers within the main text (e.g. the CCDC ID number), as well as the crystallographic information files (.cif format) as Supplementary Information, along with the checkCIF validation reports that can be obtained via the International Union of Crystallography (IUCr).

Macromolecular structures

Authors reporting novel macromolecular structures must have deposited their data prior to submission with the Worldwide Protein Data Bank (wwPDB), the Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB), the Electron Microscopy Data Bank (EMDB), or other community databases providing a recognized validation functionality. Authors must include the structure reference numbers within the main text and submit as Supplementary Information the official validation reports from these databases.

Striking Image

You can upload a visually striking image alongside your submission, which we may use to showcase your article through PLOS' online channels. We choose the monthly issue image from the striking images submitted with articles scheduled for publication.

Submission Criteria

- > Choose an image that represents the article in a striking and eye-catching way.
- > It can be derived from a figure or supporting information file from the paper, and it may be a cropped portion of an image or the entire image.
- > Alternatively, you can create or source an image, as long as it adheres to our CC BY license.
- > High resolution: between 300-600 dpi
- > Single panel
- > Ideally avoid added details like text, scale bars, and arrows.

How to Submit

1. Submit your striking image to the submission system using the file type "Striking Image".
2. Upload a separate file with the corresponding caption.

If no striking image is uploaded, a member of the journal team will choose an appropriate image, which may be a figure from the submission or a separately sourced CC BY image.

- ❗ Striking images should not contain potentially identifying images of people. [Read our policy on identifying information](#).
The PLOS licenses and copyright policy also applies to striking images.

Additional Information Requested at Submission

Financial Disclosure Statement

This information should describe sources of funding that have supported the work. If your manuscript is published, your statement will appear in the Funding section of the article.

Include your statement in the Financial Disclosure section of the initial submission form.

The statement should include:

- > Specific grant numbers
- > Initials of authors who received each award
- > URLs to sponsors' websites

Also state whether any sponsors or funders (other than the named authors) played any role in:

- > Study design
- > Data collection and analysis
- > Decision to publish
- > Preparation of the manuscript

ANEXO D – TABELA DE RESULTADOS GERAIS POR ANIMAL

Amostra	Sexo	Idade (meses)	D.O Elisa	Carga Parasitária PCR Cópias de DNA/ul	proMMP9	proMMP2	FELV
2	M	12	0,409	5,30	4,6044	0,4092	N
8	M	5	0,455	N	0,2493	0,6651	N
41	M	12	0,549	5,78	4,7567	0,9195	1
42	M	24	0,123	1,54	2,1079	0,7265	N
4	M	6	0,094	3,70	0,7951	0,4188	N
44	F	12	0,118	1,07	0,0000	0,6914	N
51	F	7	0,175	3,17	0,0979	0,7234	P
56	F	12	0,112	3,760	0,3686	0,6167	N
70	M	24	0,122	3,570	0,1021	0,2030	N
80	M	16	0,532	2,030	0,0862	0,3019	N
81	F	6	0,067	2,320	0,1347	0,5538	N
135	M	8	0,089	24,600	0,0000	0,5945	N
141	F	10	0,454	N	1,9523	0,8356	N
160	M	8	0,418	N	0,2944	0,3711	N
177	M	12	0,087	14,500	0,2963	0,4681	N
208	M	12	0,098	21,200	0,0956	1,1461	N
222	M	24	0,418	3279,000	0,3991	0,4465	P
234	M	24	0,159	6,880	0,1181	0,7190	P
238	F	6	0,136	11,600	2,0942	0,8099	P
248	M	11	0,069	26,400	0,0544	0,3379	N
263	M	6	0,084	0,235	0,1334	0,6005	N
269	F	24	0,161	0,125	4,5788	1,7753	P
275	M	12	0,132	0,120	1,0430	0,6468	N
302	F	6	0,151	0,194	0,0000	1,1000	N
317	F	24	0,094	2,350	1,3772	1,0276	P
328	M	12	0,665	N	0,6175	0,5579	N
C1	M	12	0,135	N	1,0000	1,0000	N
C2	F	6	0,155	N	0,0986	0,5525	N
C3	F	5	0,121	N	2,2316	1,0639	N
C4	F	9	0,118	N	0,2057	0,7040	N
C5	F	6	0,207	N	0,5469	1,0722	N
C6	M	5	0,185	N	0,0000	0,5680	N
C7	F	12	0,0645	N	1,2791	0,6666	N
C8	M	24	0,1215	N	0,1961	1,0835	N