

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

LIDIANE GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BETA-DEFENSINA 1 E A
POSITIVIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES**

**Recife
2017**

LIDIANE GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BETA-DEFENSINA 1 E A
POSITIVIDADE LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Valdir de Queiroz Balbino
Coorientador: Dr. Filipe Dantas Torres

**Recife
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Lidianne Gomes da

Avaliação de polimorfismos no gene Beta-defensina 1 e a positividade para *Leishmania infantum* em cães. / Recife: O Autor, 2017.

72 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Coorientador: Filipe Dantas Torres

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, Recife, 2017.

Inclui referências e anexos

- 1. Leishmaniose visceral 2. Polimorfismo- genética 3. Cães-
doenças I. Balbino, Valdir de Queiroz (orient.) II. Torres, Filipe
Dantas (coorient.) III. Título**

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 572

LIDIANE GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE BETA-DEFENSINA 1 E A
POSITIVIDADE PARA LEISHMANIOSE VISCERAL EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de Doutor em
Genética.

Aprovada em 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Valdir de Queiroz Balbino / Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Filipe Dantas Torres / Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Carlos Brisola Marcondes / Universidade Federal de Santa
Catarina

Dra. Luciana Aguiar Figueredo / Instituto Aggeu Magalhães

Dr. Sinval Pinto Brandão Filho / Instituto Aggeu Magalhães

**Aos meus pais e irmãos, que são
fonte do meu esforço, aos meus
sobrinhos, razão das minhas
alegrias e aos grandes amigos por
todo apoio.**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Valdir de Queiroz Balbino e Dr. Filipe Dantas Torres, pela oportunidade, paciência, confiança e principalmente pelos grandes ensinamentos.

Ao Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva do Departamento de Genética da UFPE e ao Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela viabilização deste trabalho.

Aos colaboradores do Centro de Controle de Zoonoses e da Secretaria de Saúde dos municípios de Sobral-CE e São Raimundo Nonato-PI, pelo apoio durante todo o período de coleta.

Ao meu noivo, amigo, companheiro e colaborador Lucas Sousa-Paula, por todo apoio, incentivo, paciência e amor.

Aos companheiros de Laboratório: Kláudia, Moisés, Marcos, Nádia, Carlos, César (amigos muito especiais, que estiveram comigo em todos os momentos!); Kamila, Gabriela e Luciana pelo apoio diário, amizade sincera e paciência; Sérgio, Wilson, Débora, Joanna, Abigail, Yury, Marcela pela amizade e convívio saudável.

Às amigas Paula Janaine e Patrícia Rocha que sempre me apoiaram.

Aos colegas e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética.

À Capes, Ministério da Saúde e Bayer, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais e irmãos, por tanto amor, apoio, paciência, confiança, incentivo e por serem tão presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus sobrinhos Luan, Júlia, Lívia e João Pedro onde me renovo encontrando os mais sinceros e amáveis sorrisos.

À Deus, por tudo!

RESUMO

Leishmaniose visceral canina (LVC), causada por *Leishmania infantum* é uma doença parasitária de grande importância veterinária. Alguns cães infectados por *L. infantum* podem desenvolver uma forte resposta imune celular contra o invasor e eliminar a infecção, enquanto outros podem responder com uma produção exagerada de anticorpos contra o parasita e desenvolver a doença, que pode ser fatal se não tratada. Contudo, os fatores que desencadeiam a resposta imune, bem como marcadores de resistência e susceptibilidade à infecção por *L. infantum* e o desenvolvimento da doença em cães, não estão totalmente compreendidos. Portanto, o presente estudo visa determinar a prevalência de cães infectados em áreas endêmicas, bem como avaliar possíveis associações de polimorfismos genéticos e a positividade para *L. infantum* em cães. Inicialmente foram selecionadas amostras de sangue canino do município de Sobral, Ceará, utilizadas para detecção da prevalência de cães infectados por *L. infantum*. Além disso, amostras de São Raimundo Nonato, Piauí e amostras da Itália foram selecionadas para serem utilizados no estudo de associação entre polimorfismos no gene β -defensina-1 canina (*CBD1*) e a infecção por *L. infantum*. Para o estudo de prevalência de LVC em Sobral, foram avaliadas 676 amostras, destas 377 (55,7%) foram positivas para *L. infantum*. Estes resultados apontam para uma endemicidade de LVC no município. Em seguida, para o estudo de associação, 387 cães (Sobral, São Raimundo Nonato e Itália) foram avaliados para presença de *L. infantum* por PCR em tempo real e 34,6% deles foram positivos. As amostras foram submetidas a análises do gene *CBD1* e nove sítios polimórficos foram detectados, dentre eles, os SNPs 3 e 8 foram associados com o risco de infecção por *L. infantum* e os SNPs 4 e 7 foram associados com a proteção contra infecção por *L. infantum* em cães da Itália. Para as populações brasileiras, não houve associação. Este estudo serve como base para outras análises utilizando o gene *CBD1* como um marcador de infecção por *L. infantum* em cães. Além de detectar uma alta prevalência de LVC em áreas endêmicas para a doença.

Palavras-chave: Gene β -defensina 1 canino. SNPs. Leishmaniose visceral canina. Cães.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL), caused by *Leishmania infantum*, is a parasitic disease of great veterinary importance. Some dogs infected with *L. infantum* may develop a strong cellular immune response against the invader and eliminate the infection. Others may respond with an overproduction of antibodies against the parasite and develop the disease, which can be fatal if left untreated. However, the factors that trigger the initial polarization of the immune response as well as markers of resistance and susceptibility to *L. infantum* infection and the development of the disease in dogs are not fully understood. Therefore, the present study aims to determine the prevalence of infected dogs in endemic areas, as well as evaluate possible associations of genetic polymorphisms and positivity for *L. infantum* in dogs. Initially, samples of canine blood from the municipality of Sobral, Ceará, were used to detect the prevalence of dogs infected with *L. infantum*. In addition, samples from São Raimundo Nonato, Piauí and samples from Italy were selected to be used in the study of association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the canine β -defensin-1 gene (*CBD1*) and infection by *L. infantum*. For the study of CVL prevalence in Sobral, 676 samples were evaluated, of which 377 (55.7%) were positive for *L. infantum*. These results point to an endemicity of CVL in the municipality. Then, for the association study, 387 dogs (Sobral, São Raimundo Nonato and Italy) were evaluated for presence of *L. infantum* by real-time PCR and 34.6% of them were positive. The samples were analyzed for the *CBD1* gene and nine polymorphic sites were detected, among them, SNPs 3 and 8 were associated with the risk of infection by *L. infantum* and SNPs 4 and 7 were associated with protection against infection by *L. infantum* in dogs from Italy. For the Brazilian populations, there was no association. This study serves as a basis for further analysis using the *CBD1* gene as a marker of *L. infantum* infection in dogs. In addition to detecting a high prevalence of VCL in areas endemic for the disease.

Key words: Canine β -defensin-1 gene. SNPs. visceral leishmaniasis. Dogs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

(REVISÃO DA LITERATURA)

FIGURA 1: CICLO DE VIDA DA <i>Leishmania</i>	18
FIGURA 2: LEISHMANIOSE VISCERAL – CASOS CONFIRMADOS NOTIFICADOS NO SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO – BRASIL, NOS ANOS ENTRE 2003-2013.	20
FIGURA 3: CÃES APRESENTANDO CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE.	21
FIGURA 4: REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE AMPLIFICAÇÃO (A) E CURVA PADRÃO (B), VARIANDO DE 1 NG A 0.1 FG), PARA OBTENÇÃO DE DNA DE <i>Leishmania infantum</i> POR ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL. NTC, NO-TEMPLATE CONTROL.	24
FIGURA 5: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E CARACTERÍSTICAS IMUNOLÓGICAS DA INFECÇÃO POR <i>Leishmania infantum</i> EM CÃES.	26

(CAPÍTULO I)

FIGURE 1: DISTRIBUTION OF THE COLLECTION POINTS OF DOGS BY NEIGHBORHOOD OF THE MUNICIPALITY OF SOBRAL, CEARÁ STATE. (A): CEARÁ STATE; (B): SOBRAL MUNICIPALITY; (C): COLLECTION POINTS IN THE URBAN AREA (RED = POSITIVE SAMPLES AND GREEN = NEGATIVE SAMPLES); (D): POSITIVE SAMPLE; (E): NEGATIVE SAMPLE.	38
--	----

LISTA DE TABELAS

(REVISÃO DA LITERATURA)

TABELA 1: INCIDÊNCIA E ESTIMATIVA GLOBAL DE LEISHMANIOSE VISCERAL	19
--	----

(CAPÍTULO I)

TABLE 1: COMPARATIVE RESULTS OBTAINED BY TR DPP® (DPP) AND REAL TIME PCR ASSAYS FOR DETECTION OF <i>Leishmania infantum</i> IN SAMPLES FROM DOGS OF SOBRAL, CEARÁ STATE (BRAZIL).	36
TABLE 2: TOTAL NUMBER AND PERCENTAGE OF POSITIVE DOGS IN NEIGHBORHOODS FROM SOBRAL, CEARÁ STATE (BRAZIL).	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Item	Definição
%	- Porcentagem
°C	- Grau Celsius
α	- Alfa
β	- Beta
θ	- Teta
ACD	- Ácido citrato dextrose
AMP	- Antimicrobial peptides
CanL	- Canine leishmaniasis
CBD1	- Canine Beta-defensin 1
CCZ	- Centro de Controle de Zoonoses
CEUA	- Comitê de Ética Animal
CD4+	- <i>Cluster of Differentiation 4</i>
CD8+	- <i>Cluster of Differentiation 8</i>
CD14+	- <i>Cluster of Differentiation 14</i>
CD21+	- <i>Cluster of Differentiation 21</i>
CE	- Ceará
DNA	- Deoxyribonucleic acid
DPP	- Dual-Path Platform
ELISA	- Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Fg	- Fentograma
FIS	- Intra-population genetic variability
FST	- Inter-population differentiation
IFN	- Interferon
IgA	- Imunoglobulina da classe A

IgE	- Imunoglobulina da classe E
IgG	- Imunoglobulina da classe G
IgM	- Imunoglobulina da classe M
IL-10	- Interleucina-10
MHC II	- Major histocompatibility complex II
NRAMP1	- Formerly named resistance-associated macrophage protein 1
N/A	- Not applicable
NTC	- No-template control
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PAMs	- Peptídeos antimicrobianos
pb	- pares de bases
PCR	- Polymerase chain reaction
PI	- Piauí
qPCR	- Quantitative PCR
RIFI	- Reação de imunofluorescência indireta
SLC11A1	- solute carrier family 11 member 1 gene
SINAN	- Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SNP	- Single nucleotide polymorphism
SOB	- Sobral
SRN	- São Raimundo Nonato
Th1	- Células T Helper -1
Th2	- Células T Helper -2
T _m	- Temperatura de <i>melting</i>
TGF-β	- Transforming growth factor - beta
TNF-α	- Tumor necrosis factor – alfa
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
VL	- Visceral leishmaniasis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 <i>Leishmania infantum</i> E A LEISHMANIOSE VISCERAL.....	17
2.1.1 <i>Leishmania infantum</i>	17
2.1.2 Leishmaniose visceral canina	18
2.1.3 Epidemiologia	19
2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA.....	21
2.2.1 Diagnóstico Parasitológico.....	22
2.2.2 Diagnóstico Sorológico.....	22
2.2.3 Diagnóstico Molecular.....	23
2.3 FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL	24
2.4 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA	25
2.4.1 Genes de Resposta Imunológica.....	27
2.4.2 Peptídeos Antimicrobianos.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 CAPÍTULO I.....	30
5 CAPÍTULO II.....	40
6 DISCUSSÃO GERAL	48
7 CONCLUSÕES GERAIS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....	59
ANEXO B – MODELO DE FICHA UTILIZADA NA COLETA DE AMOSTRAS NO MUNICÍPIO DE SOBRAL	60
ANEXO C - MODELO DE FICHA UTILIZADA NA COLETA DE AMOSTRAS NO MUNICÍPIO DE SOBRAL	61

ANEXO D – ARTIGO COMPLEMENTAR (GENETIC STRUCTURING AND FIXED POLYMORPHISMS IN THE GENE <i>PERIOD</i> AMONG NATURAL POPULATIONS OF <i>Lutzomyia longipalpis</i> IN BRAZIL)	62
ANEXO E – ARTIGO COMPLEMENTAR (ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF ALLOPATRIC POPULATIONS OF <i>Lutzomyia umbratilis</i> USING THE <i>PERIOD</i> CLOCK GENE)	63
ANEXO F – ARTIGO COMPLEMENTAR (PHENOTYPIC AND GENOTYPIC VARIATIONS AMONG THREE ALLOPATRIC POPULATIONS OF <i>Lutzomyia umbratilis</i> , MAIN VECTOR OF <i>Leishmania guyanensis</i>).....	64
ANEXO G – ARTIGO COMPLEMENTAR (<i>Leishmania</i> -FAST15: A RAPID, SENSITIVE AND LOW-COST REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF <i>Leishmania infantum</i> AND <i>Leishmania braziliensis</i> KINETOPLAST DNA IN CANINE BLOOD SAMPLES.....	65
ANEXO H – ARTIGO COMPLEMENTAR (IMPEDIMETRIC SENSOR FOR <i>Leishmania infantum</i> GENOME BASED ON GOLD NANOPARTICLES DISPERSED IN POLYANILINE MATRIX	66
ANEXO I – ARTIGO COMPLEMENTAR (CYTOCHROME OXIDASE I AS TOOL TO EVALUATE THE <i>Lutzomyia longipalpis</i> COMPLEX: USEFUL MOLECULAR MARKER OR NOT?	67
<i>Curriculum vitae</i> (Lattes)	68

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença parasitária causada por espécies de *Leishmania* (e.g. *Leishmania infantum*), transmitidas por fêmeas de dípteros chamados de flebotomíneos. Presente em praticamente todos os continentes, exceto Antártida e Oceania, é uma doença com elevado risco de morte nos cães e é geralmente caracterizada por diversos sinais clínicos não específicos, tais como perda de peso, aumento dos linfonodos, baço e fígado, letargia, lesões cutâneas e oculares. No entanto, a maioria dos cães infectados por *L. infantum* não apresentam qualquer sinal clínico evidente ou anormalidade clínica-patológica. De fato, cães infectados que vivem em áreas onde a leishmaniose canina é endêmica normalmente são assintomáticos. Os cães são considerados como os principais reservatórios da *L. infantum* no ambiente doméstico, sendo frequentemente alvo de autoridades de saúde pública durante as campanhas de controle da leishmaniose visceral, uma vez que, uma das principais medidas de controle no Brasil ainda é eutanásia de cães positivos, para o Ministério da Saúde.

A variação clínica da LVC depende principalmente da resposta imune do cão após o contato com o parasita. A *L. infantum* pode espalhar-se a partir de células sanguíneas (macrófagos) para vários órgãos, causando, uma infecção crônica com risco de vida. Sabe-se que uma resposta imune mediada por células predominantemente Th1 pode levar a uma resolução da infecção, considerando-se que uma proliferação de células Th2 exagerada pode levar a uma alta produção de anticorpos, com a formação de complexos imunitários, e aparecimento de sinais clínicos. No entanto, ainda existem muitas lacunas a respeito dos fatores desencadeantes da resposta imune, bem como de marcadores de suscetibilidade e resistência para infecção *L. infantum* em cães.

Níveis elevados de expressão de IL-10 e TGF- β , carga parasitária e os níveis elevados de anticorpos anti-*Leishmania* específicos de IgG, IgM, IgA e são observados em cães sintomáticos, sendo associados à susceptibilidade a doenças. Por outro lado, o aumento dos níveis de expressão do IFN- γ e TNF- α , células T (CD4+ e CD8+) e células B (CD21+ e CD14+), são observados em animais assintomáticos, sendo associado à resistência em cães naturalmente

infectados. Desta forma, o perfil da resposta imune do hospedeiro sintomático e assintomático pode ser utilizado como marcadores de resistência ou susceptibilidade à infecção por *L. infantum*, em cães, no entanto esses parâmetros ainda necessitam de novos estudos já que o perfil não é uniforme.

No sistema imune inato dos vertebrados são encontrados diversos componentes, dentre eles os peptídeos antimicrobianos (PAMs), que atuam contra bactérias, fungos e vírus envelopados na interface pele/ambiente. Já foi observado que a segurança e eficácia de peptídeos antimicrobianos contra a leishmaniose visceral (LV) em humanos, está associada a polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes *DLL1* e *FAM120B*. Contudo, ainda são necessários estudos de novos agentes leishmanicidas para o tratamento da LV, que possam elucidar melhor quais fatores estão envolvidos do desenvolvimento da doença, visto que, um tratamento eficaz depende não só da atividade leishmanicida, mas também da interação entre o parasita e o sistema imunitário do hospedeiro.

Vários genes têm sido relacionados com a presença de *L. infantum*, como é o caso do gene *Slc11a1* que codifica uma proteína que atua como transportadora de soluto que faz parte da imunidade inata e desempenha um papel importante na resistência de mamíferos, além de apresentar susceptibilidade a diversos agentes patogênicos, como é o caso de *L. infantum* em cães. Outro componente muito importante e bastante avaliado do sistema imune é a lectina ligadora de manose (MBL), uma proteína sérica sintetizada pelo fígado, que desempenha um importante papel na imunidade inata do hospedeiro. Estudos indicam que altos níveis de MBL estão relacionados ao risco de desenvolvimento da LV e complicações clínicas em casos de infecção por *L. infantum*.

Contudo, os genes do sistema imune podem apresentar mutações que interferem na resposta aos parasitas. Entre as mutações, os SNPs têm revolucionado estudos genéticos, sendo utilizados como marcadores moleculares em estudos de associação. A associação entre SNPs e infecção por *L. infantum* ou desenvolvimento de doenças em cães não são muito clara, devido ao fato de a LV ser uma doença complexa e a sua progressão durante o curso da infecção por *L. infantum* estar associada a múltiplos locos.

Análise de SNPs de genes da imunidade inata em cães, tais como β -defensina canino (*CBD1*) (cromossomo 16), podem fornecer subsídios para estabelecer uma relação entre os seus polimorfismos funcionais e a infecção por *L. infantum*, em cães.

Neste estudo, foram utilizadas ferramentas de biologia molecular para determinar a infecção por *L. infantum* em cães, que vivem em áreas onde a leishmaniose canina é endêmica, além disso, o estudo objetivou avaliar polimorfismos no gene *CBD1* a fim de avaliar a possível relação com a positividade dos animais para *L. infantum*.

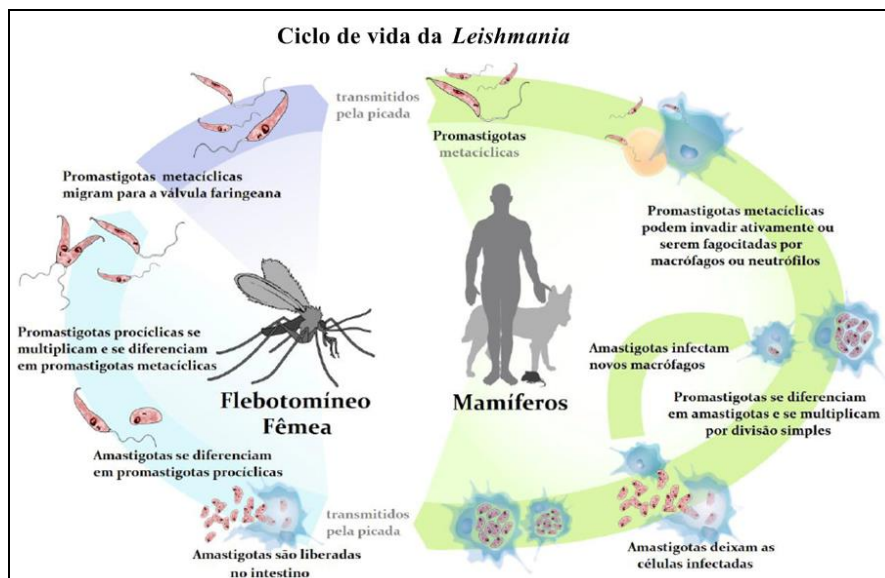
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Leishmania infantum* E A LEISHMANIOSE VISCERAL

2.1.1 *Leishmania infantum*

Dentre os protozoários parasitas do homem, *Leishmania* é o que abrange o maior número de espécies patogênicas. Das 52 espécies de *Leishmania* descritas, 23 espécies são patogênicas para seres humanos (AKHOUNDI et al., 2016; CUPOLILLO; BOITÉ, 2014; DESJEUX, 2004; ESPINOSA et al., 2016). Além dessas, outra espécie patogênica para os seres humanos seria a “*Leishmania colombiensis*”, porém essa foi recentemente transferida para o gênero *Endotrypanum* (ESPINOSA et al., 2016).

Todos os membros do gênero *Leishmania* são parasitos heteroxênicos, e têm os flebotomíneos como hospedeiros invertebrados, e os mamíferos como hospedeiros vertebrados (LAINSON; SHAW, 1987). O ciclo de vida da *Leishmania* depende de ambos os hospedeiros e por isso o ciclo se completa em duas etapas. O flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere a forma amastigota da *Leishmania* que, em seu trato digestivo, passa por vários estágios de desenvolvimento e multiplicação (KAMHAWI, 2006), até o desenvolvimento das formas promastigotas metacíclicas (formas infectantes). Ao se alimentar em um hospedeiro, o vetor infectado regurgita as promastigotas metacíclicas, as quais infectam os macrófagos, transformando-se em amastigotas reiniciando o ciclo do parasita (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004) (Figura 1).

Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*

Fonte: <http://www.canalciencia.ibict.br>

A *Leishmania infantum* é o protozoário parasita causador da LV, doença que acomete órgãos e vísceras do sistema linfohematopoiético, podendo também estar presentes em outros órgãos, tais como rins e pulmão (BRASIL, 2011). Em se tratando da LV, existem dois tipos principais de ciclos de transmissão: antroponótica e zoonótica. A transmissão antroponótica, onde os seres humanos são os reservatórios do parasita, ocorre principalmente nos subcontinentes indiano e da África Oriental. A transmissão zoonótica normalmente é observada em países do Mediterrâneo, nas Américas e Ásia (WHO, 2010).

2.1.2 Leishmaniose visceral canina

A leishmaniose canina (LVC) é uma doença de grande importância veterinária, também causada pelo patógeno *L. infantum* e é transmitida através da picada de fêmeas infectadas de dípteros flebotomíneos, e ocorre em praticamente todos os continentes (DANTAS-TORRES et al., 2012).

A LVC apresenta várias manifestações clínicas, que podem variar de assintomáticas a manifestações sistêmicas caracterizadas por febre, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia, alterações renais, doenças de pele, lesões oculares, doenças do sistema cardiovascular e respiratória (REIS et al., 2009). Apesar de ser uma doença prevalente em áreas rurais, foi recentemente

estabelecida em áreas urbanas ou periurbanas, onde as condições ambientais são favoráveis para a manutenção de seu ciclo de vida (REIS et al., 2009).

2.1.3 Epidemiologia

A LV é considerada um grande problema de saúde pública no mundo, que pode resultar em morte, senão tratada. Sua ocorrência a cada ano é de aproximadamente 200 a 400 milhões de novos casos humanos, associada a uma taxa de mortalidade que varia de 10 a 20% (ALVAR et al., 2012).

Dados oficiais publicados por Alvar et al. (2012), mostraram aproximadamente 58 mil casos de LV por ano, e mais de 90% dos casos globais ocorreram em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A Tabela 1 mostra a incidência e estimativa global de LV humana.

Tabela 1 - Incidência e estimativa global de leishmaniose visceral

	Casos de LV reportados por ano	Países com dados de 5 anos	Estimativa anual de incidência por LV		
América	3662	8/11 (73%)	4500	a	6800
África sub-sahariana	1	3/11 (27%)			
Leste da África	8569	5/8 (63%)	29.400	a	56.700
Mediterrâneo	875	21/26 (81%)	1200	a	2000
Oriente Médio à Ásia Central	2496	14/17 (82%)	5000	a	10.000
Sul da Ásia	42.623	3/6 (50%)*	162.100	a	313.600
Total Global	58.227	54/79 (68%)	202.200	a	389.100

*3/3 (100%) de países de grande importância (Índia, Bangladesh, Nepal) dados reportados de 5 anos. Relatórios incompletos para Sri Lanka, Bhutan e Tailândia.

Doi:10.1371/journal.pone.0035671.t013

Fonte: Adaptada de Alvar et al. (2012).

A taxa de letalidade relatada para LV humana no Brasil em 2006 foi de 7,2%. No subcontinente indiano, as taxas de letalidade variaram de 1,5% (93 óbitos / 6224 casos de LV de 2004-2008) em Bangladesh para 2,4% (853 / 34,918) na Índia e 6,2% (91/1477) no Nepal (ALVAR et al., 2012).

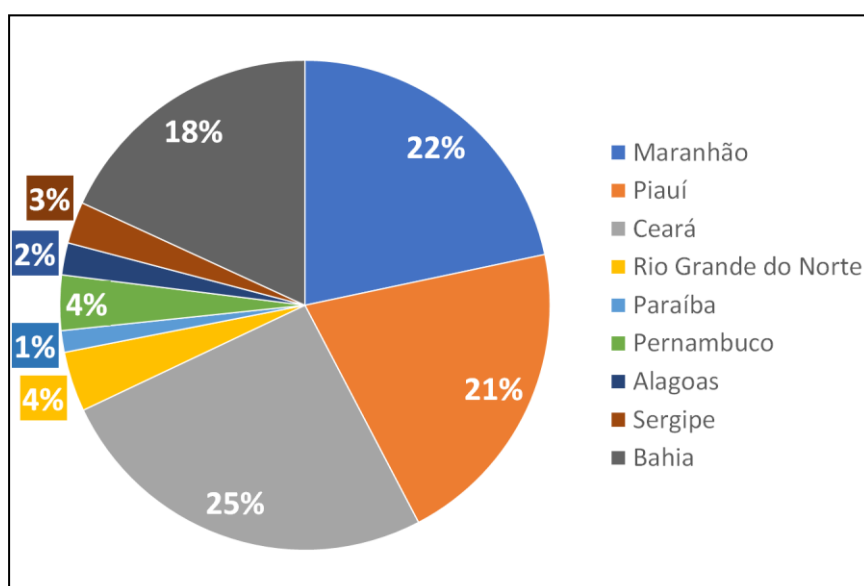
Uma análise sobre a letalidade das leishmanioses revelou uma taxa global de 10%. Assumindo que praticamente todas as mortes são pela forma visceral da

doença, Alvar et al. (2012) estimaram a ocorrência de 20.000 a 40.000 mortes humanas pela LV no mundo.

A LV é muito comum na América Latina e está entre as mais importantes doenças transmitidas por vetores que ocorrem na região. O Brasil é responsável pela grande maioria dos casos notificados na América Latina (MONTEIRO et al., 2005; BRASIL, 2016).

No Brasil, a LV ocorre de acordo com os diferentes aspectos geográficos, climáticos e sociais, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde, no período entre 2003-2013, o Nordeste foi responsável por aproximadamente 53% dos casos avaliados. Os estados que apresentam maior número de casos são Ceará, Maranhão, Piauí e Bahia (Figura 2).

Figura 2 - Leishmaniose visceral - Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil, nos anos entre 2003-2013.



Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net.

Nesta região, o Ceará é o estado com maior número de casos, responsável por 4995 dos casos notificados, o que corresponde a 25,62%. O estado do Piauí é o terceiro estado do Nordeste em número de casos e com 4026 (~20% dos casos) (BRASIL, 2016).

2.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Devido à complexidade da LVC, é necessário que vários parâmetros sejam avaliados (e.g. sinais clínicos, epidemiológicos, técnicas parasitológicas, histológicas, sorológicas e ferramentas moleculares), tornando possível o diagnóstico correto e consequentemente o tratamento adequado (ANDRADE et al., 2005).

O diagnóstico da LVC pode ser feito inicialmente a partir de características clínicas que variam de formas assintomáticas até o quadro clássico da doença, apresentando sinais como febre, fadiga, perda de peso, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Figura 3) (MANNA et al., 2006).

Figura 3: Cães apresentando características clínicas de leishmaniose.



Fonte: Veras et al. (2014).

O diagnóstico da LVC é uma tarefa muito difícil, visto que os sinais clínicos da doença podem ser confundidos com outras doenças (VERAS et al., 2014). Tendo em vista as dificuldades do diagnóstico da LVC por sinais clínicos, é necessário para um bom diagnóstico uma associação entre dados clínicos, laboratoriais e epidemiológicos (VERAS et al., 2014).

O diagnóstico laboratorial da LVC é semelhante ao realizado em humanos, podendo ser baseado na utilização de métodos parasitológicos, sorológicos e moleculares (LAURENTI, 2009; BRASIL, 2014; VERAS et al., 2014).

2.2.1 Diagnóstico Parasitológico

O exame parasitológico é considerado um dos melhores testes para o diagnóstico da LVC, visto que o mesmo demonstra a presença do parasito e apresenta baixo custo. Entretanto, é uma técnica normalmente invasiva e pode eventualmente representar um risco para o animal, tornando-se de difícil aplicação em larga escala (BRASIL, 2014). A sensibilidade da técnica depende de vários fatores, como tipo de amostra e grau de parasitismo (LAURENTI, 2009). Para aumentar a sensibilidade e a especificidade das técnicas parasitológicas podem ser realizadas as técnicas de imunohistoquímica (LAURENTI, 2009; TAFURI et al., 2004).

2.2.2 Diagnóstico Sorológico

Os testes sorológicos para diagnóstico de LVC são baseados na presença de resposta imune humoral específica contra o patógeno ou proteína recombinante do patógeno (VERAS et al., 2014). Estes testes permitem a detecção de níveis da imunoglobulina G (IgG), sendo considerado uma ferramenta essencial para o diagnóstico da LVC.

Este tipo de diagnóstico é relativamente simples e frequentemente utilizado para determinar a prevalência da LVC em estudos epidemiológicos. Vários métodos sorológicos estão disponíveis para diagnóstico da LVC, e eles apresentam muitas variações em sensibilidade e especificidade. Essa variação depende do tipo de antígeno e do método utilizado (VERAS et al., 2014).

Os testes sorológicos mais comumente utilizados são ensaios imunoenzimáticos (ELISA), reações de imunofluorescência indireta (RIFI) e teste de aglutinação direta (TAD) e testes rápidos imunocromatográficos (VERAS et al., 2014).

Na presença de sinais clínicos sugestivos, o teste sorológico positivo, reforça o diagnóstico da LVC (BRASIL, 2014). Entretanto, os resultados de testes

sorológicos devem ser interpretados com cautela e são necessários outros testes em conjunto, principalmente em áreas endêmicas, visto que a sorologia pode apresentar resultados falsos positivos devido a reação cruzadas (INIESTA et al., 2002).

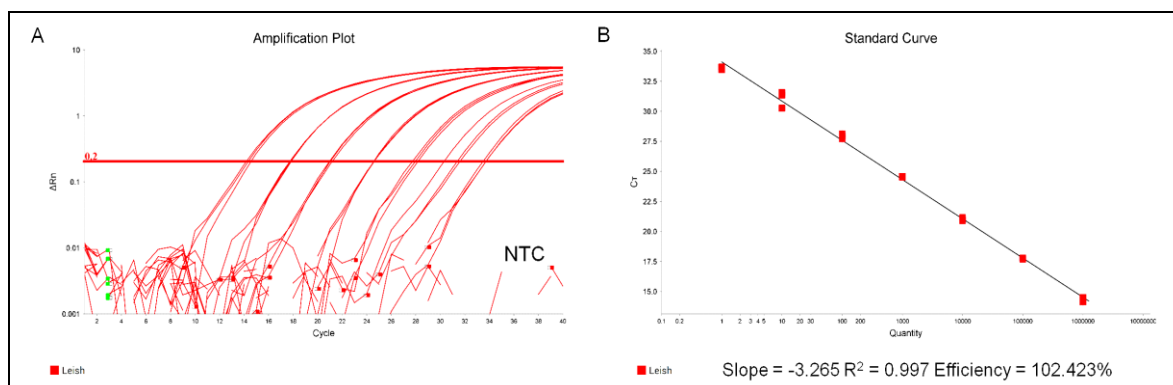
2.2.3 Diagnóstico Molecular

Técnicas de biologia molecular têm sido desenvolvidas para detectar e identificar parasitos do gênero *Leishmania*, sem a necessidade de se isolar o parasito em uma cultura (GONTIJO; MELO, 2004). A técnica molecular conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) é baseada na utilização de oligonucleotídeos para amplificação de uma sequência de DNA conhecida do parasita (FARIA; ANDRADE, 2012).

A PCR vem se tornando uma ferramenta importante no diagnóstico da LV, através da detecção do DNA do parasita em diversos tipos de amostras, como sangue, medula, linfonodo e pele (MICHALSKY et al., 2011). Essa técnica é bastante sensível e capaz de detectar um número muito baixo de parasitas nas amostras de tecidos (DE QUEIROZ et al., 2010).

A PCR tem mostrado significativos avanços em sua tecnologia, como no caso da PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR). A técnica foi desenvolvida por Christian A. Heid em 1996, e tem sido muito utilizada para diagnóstico da LV (FARIA; ANDRADE, 2012). Dentre várias vantagens, a qPCR permitir o monitoramento contínuo da amplificação do DNA do parasito (Figura 4) e a quantificação da carga parasitária em diferentes amostras (MAIA; CAMPINO, 2008). Dessa maneira, a quantificação dos parasitos por essa técnica pode ser usada para elucidar o *status* de cães positivos para a PCR convencional (FRANCINO et al., 2006).

Figura 4: Representação da curva de amplificação (A) e curva padrão (B), variando de 1 ng a 0.1 fg), para obtenção de DNA de *Leishmania infantum* por ensaios de PCR em tempo real. NTC, no-template control.



Fonte: Dantas-Torres *et. al.* (2017).

A qPCR pode ser utilizada tanto para análises qualitativas quanto quantitativas. O monitoramento em tempo real pode ser realizado por diversas moléculas fluorescentes, como corantes SYBR Green, que são moléculas repórteres de DNA dupla fita específicos, ou sondas de hidrólise TaqMan™, que são sequências específicas (BARRA *et al.*, 2011).

A qPCR proporciona rapidez e praticidade por combinar a amplificação e análise em um único passo. Além disso, a técnica apresenta outros benefícios no que diz respeito a ensaios diagnósticos e a contaminação do laboratório com produtos de PCR é diminuída. Assim, ensaios mais rápidos, e mais confiáveis podem ser realizados (BARRA *et al.*, 2011).

2.3 FATORES ASSOCIADOS AO DESENVOLVIMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL

Os fatores de risco associados à infecção por *L. infantum* em cães estão relacionados a exposição desses animais aos flebotomíneos vetores. Os resultados de estudos conduzidos em deferentes áreas endêmicas nem sempre sejam concordantes, por diferenças metodológicas e diferenças nas populações estudadas. Contudo, alguns fatores como sexo, idade, raça, tamanho do pelo, tipo de moradia, presença de outros animais e de áreas verdes no peri-domicílio

parecem influenciar o risco de exposição (BELO et al., 2013; DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

O curso da infecção por *Leishmania* é definido por uma série de fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro vertebrado. Dependendo desses fatores, a interação entre a multiplicação do parasita e a resposta imune do hospedeiro poderá resultar em variados níveis de gravidade da infecção (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014; GRIMALDI; TESH; MCMAHONPRATT, 1989).

Fatores genéticos estão relacionados ao risco de desenvolvimento da LVC podendo levar a diferentes formas clínicas da doença, isso justifica a busca de genes associados a LVC, como possíveis marcadores de susceptibilidade (ETTINGER et al., 2009; QUILEZ et al., 2012a; SANCHEZ-ROBERT et al., 2008).

Assim, o estudo dos fatores associados ao desenvolvimento da LVC e a identificação dos mecanismos modulatórios envolvidos na interação parasita-hospedeiro, podem auxiliar na compreensão da imunopatogênese da doença (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014).

2.4. IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

A apresentação clínica variável de LVC depende da resposta imune do cão após o contato com os parasitas inoculados pela picada do vetor (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Dependendo da resposta imune do cão, as leishmânias podem se espalhar a partir de macrófagos para vários órgãos, causando assim uma infecção crônica.

Sabe-se que uma resposta imune mediada por células Th1 pode levar a um desfecho da infecção, ao passo que uma proliferação de células Th2 exagerada pode levar a uma alta produção de anticorpos, com a formação de complexos imunitários, e, conseqüentemente, o aparecimento de sinais clínicos da doença (Figura 5) (SOLANO-GALLEGO et al., 2011). No entanto, ainda existem muitas lacunas a respeito dos fatores desencadeantes iniciais a polarização da resposta imune, bem como marcadores de susceptibilidade e resistência para infecção por *L. infantum* em cães.

Figura 5: Manifestações clínicas e características imunológicas da infecção por *Leishmania infantum* em cães.



Fonte: Solano-Gallego *et al.* (2011).

Vários estudos avaliaram a utilidade de diferentes marcadores de susceptibilidade e resistência para a infecção por *L. infantum* em cães. Por exemplo, em cães sintomáticos um aumento dos níveis de expressão de IL-10 e TGF- β , a carga parasitária e os elevados níveis de anticorpos específicos de *Leishmania* IgG, IgM, IgA e IgE são observados, sendo associados a susceptibilidade a doença (AHMED *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2009). Por outro lado, em cães assintomáticos, o aumento dos níveis de parâmetros, tais como a proliferação de células, o IFN- γ e a expressão do TNF- α , níveis elevados de células T (CD4 + e CD8 +) bem como um aumento das células B (CD21 + e CD14 +) são observadas, estando relacionado com a resistência em cães naturalmente infectados (CARRILLO *et al.*, 2007; CHAMIZO; MORENO; ALVAR, 2005).

Assim, o perfil de resposta imune do hospedeiro tem sido utilizado como um marcador de resistência à infecção por *L. infantum* em cães, mas os resultados não são sempre uniformes (PANARO *et al.*, 2009).

2.4.1 Genes de Resposta Imunológica

A epidemiologia e as características clínicas das leishmanioses variam muito e estão relacionados com a interação de múltiplos fatores, como por exemplo, as espécies dos parasitas e vetores, bem como a fatores genéticas do hospedeiro (ROATT et al., 2014).

Alterações em genes espécie-específicos, polimorfismos em genes, pseudogenes, níveis de expressão para virulência e genes de resposta ao estresse podem contribuir para as diferentes formas clínicas da doença (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013).

Vários estudos têm mostrado associações entre polimorfismos e as leishmanioses em humanos (MEHROTRA et al., 2012) e cães (QUILEZ et al., 2012b; QUINNELL et al., 2003; SANCHEZ-ROBERT et al., 2005, 2008) indicando que fatores genéticos podem estar relacionados com a susceptibilidade à infecção por *L. infantum* e desenvolvimento da doença. Estudos conduzidos por Sanchez-Robert et al. (2005; 2008) mostraram uma associação entre haplótipos (TAG-8-141) o que inclui um SNP na região promotora e um microsatélite no íntron 1, e dois SNPs (A4549G no íntron 6 e C4859T no éxon 8) localizados no gene *Slc11a1* e a susceptibilidade para LV em cães. Além disso, foram observadas associações entre polimorfismos nos *IL7R*, *Lifr*, *C6*, *C7* and *Csf1r* genes e leishmaniose canina (QUILEZ et al., 2012b).

2.4.2 Peptídeos Antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) fazem parte do sistema imune inato de vertebrados. Nos mamíferos, os PAMs são expressos por células epiteliais e leucócitos fagocíticos, e possuem uma ampla atividade antimicrobiana atuando contra bactérias, fungos e vírus envelopados (KAGAN et al., 1990; YANG et al., 1999; ZASLOFF, 2002) na interface pele-ambiente (LEONARD; AFFOLTER; BEVINS, 2012). A maioria dos peptídeos antimicrobianos apresentam modos de ação semelhantes, com base na interação com a membrana celular dos microrganismos (BROGDEN, 2005; SHAI, 1999).

Para LV, o uso de PAMs no tratamento da doença em cães tem mostrado que o resultado do tratamento está correlacionado com a quantidade de sintomas e a normalização da proteína total no soro (ALBEROLA et al., 2004).

Alguns estudos envolvendo PAMs e o tratamento de LV têm sido conduzidos (ALBEROLA et al., 2004) e associações entre SNPs no gene *DLL1/FAM120B* e leishmanioses têm sido observados (MEHROTRA et al., 2012). Contudo, novos agentes leishmanicidas para o tratamento da LV são necessários, considerando que para o tratamento efetivo deve-se avaliar não só da atividade leishmanicida, como também da interação entre o parasita e o sistema imune (ALTET et al., 2002; SACKS; SHER, 2002; SOLANO-GALLEGO et al., 2000).

O mais importante dos peptídeos antimicrobianos é uma família de peptídeos catiônicos que incluem as defensinas, que são classificadas em α , β e θ -defensinas, sendo a classe das β -defensinas a maior delas (BAGNICKA et al., 2008). As α -defensinas são encontradas em primatas, mas não nos cães (PATIL et al., 2005), enquanto que as β -defensinas foram documentados em todos os mamíferos (GANZ, 2003). Já as θ -defensinas são as únicas encontradas no genoma de seres humanos e primatas não-humanos (LEONARD; AFFOLTER; BEVINS, 2012).

Estudos têm sido realizados para avaliar fatores relacionados com o mecanismo de expressão e função das β -defensina em cães e patógenos (ERLES; BROWNLIE, 2010; MAGNUSON; EKIM; FINGAR, 2012), que complicam doenças na pele dos cães (FAZAKERLEY et al., 2010; SANG et al., 2007), que influenciam na cor da pelagem canina (CANDILLE et al., 2007) e na observação da expressão de β -defensina aumentada em dermatite atópica canina, quando comparada com indivíduos saudáveis (SANTORO et al., 2013; VAN DAMME et al., 2009).

Sendo assim, os polimorfismos encontrados em genes de resposta imunológica como o gene β -defensina, podem fornecer subsídios para observar a possível associação desses polimorfismos com a infecção por *L. infantum* em cães. A avaliação desses genes candidatos é necessária para avançar ainda mais o nosso conhecimento e compreensão dos fatores imunológicos que fundamentam a LVC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar possíveis associações entre polimorfismos no gene *DEFB1* e positividade para *L. infantum* em cães.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar as taxas de infecção por *L. infantum* em cães de diferentes populações brasileiras e uma população italiana mediante o uso de qPCR;
- b) Avaliar a carga parasitária nos cães infectados;
- c) Avaliar a relação entre polimorfismos do gene *DEFB1* em cães e a infecção pela *L. infantum*;

4 CAPÍTULO I

PREVALENCE OF *LEISHMANIA INFANTUM* INFECTION IN DOGS FROM AN AREA OF ACTIVE ZOONOTIC VISCERAL LEISHMANIASIS TRANSMISSION IN NORTH-EASTERN BRAZIL

Lidiane Gomes da Silva¹

Email: lidianegomesp@hotmail.com

Lucas Christian de Sousa-Paula²

Email: lcsousapaula@gmail.com

Kamila Gaudêncio Sales³

Email: kamilasalesg@gmail.com

Valdir de Queiroz Balbino^{1,2}

Email: vqbalbino@gmail.com

Filipe Dantas-Torres^{3,4,*}

Email: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

³Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy

⁴Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Centre-Fiocruz, Recife, Brazil

*Correspondence: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

Abstract

Canine leishmaniasis (CanL) caused by *Leishmania infantum* is considered as a serious public health problem and can be highly lethal if untreated. The present study aimed to estimate the prevalence of infection by *L. infantum* in dogs from the municipality of Sobral, Ceará, where CanL is endemic. A total of 676 blood samples were collected from dogs and the prevalence of infection was determined using a rapid serological test (DPP) and a real time PCR assay. The prevalence rate was 55.77% (377/676), considering dogs positive for any of the tests. By serology, 274 (40.53%) were positive, whereas by real time PCR, 182 (26.92%) of the dogs were positive. Most of the analyzed dogs were considered asymptomatic 85.06% (N = 575). The districts Alto do Cristo, Cidade Doutor José Euclides, Campos dos Velhos, Junco and Vila União presented the highest positivity rates. Thirty-six engorged female sand flies belonging to the species *Lutzomyia longipalpis* were tested by real time PCR and two of them were positive for *L. infantum*. Our results demonstrate a high prevalence of *L. infantum* infection in dogs and the presence of infected sand flies, which denotes the eminent risk of infection in humans.

Introduction

Canine leishmaniasis is a disease of great veterinary importance, transmitted by the bite of infected females of sandflies, being species *Lutzomyia longipalpis* the main vector in the New World that transmits a large number of *Leishmania* species, among them *Leishmania infantum*, the etiologic agent of Visceral Leishmaniasis (VL), and occurs on practically all continents (Dantas-Torres et al., 2012). Canine leishmaniasis is very common in South America and is among the most important vector-borne canine diseases occurring in the region (Dantas-

Torres, 2009). In Brazil, it is endemic in all geographic regions and the Northeast is responsible for more than 50% of the reported cases (Brasil, 2016).

Between 2005 and 2015, Ceará was the state with the highest number of VL cases reported in Brazil, accounting for 14.6% and 27.7% of notifications in the country and in the Northeast, respectively. During this period, 6062 cases were reported in the State, of which 697 occurred only in the municipality of Sobral, corresponding to 11.5% and 3.2% of the disease cases in the whole state and in the Northeast, respectively, according to data provided by the Information System of Notification Diseases of the Ministry of Health - SINAN (Brasil, 2016).

The municipality of Sobral has great epidemiological and historical importance, because presents as an intense transmission area for LV and where the first epidemic outbreak in the country was observed, which, in turn, awoke to the importance of VL, encouraged and contributed to the development of studies in this area and throughout Brazil (Lainson and Rangel, 2005).

The determination of the natural infection rate of dogs by *L. infantum* is a fundamental parameter in the epidemiological monitoring of VL, since the dog is the main domestic reservoir and extremely important for the control of this pathology (Otranto and Dantas-Torres, 2013). The occurrence of the disease in a given area depends basically on the presence of the susceptible vector and an equally susceptible host/reservoir (Gontijo and Melo, 2004).

Due to the scarcity of control measures for leishmaniasis worldwide, studies aimed at understanding the relationship between positive dog prevalence and clinical symptoms may directly aid in new control measures. Considering that for an effective planning of appropriate approaches for the control of leishmaniasis, an update of the bases of epidemiological evidences is necessary (Alvar et al., 2012).

In this sense, the goal of this study was to correlate the positivity of the main domestic reservoir with the presence/absence of clinical signs presented in an endemic municipality for VL transmission.

Material and methods

a. Ethical approval

The project (process number 23076.051904/2013-48) was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Brazil.

b. Study area

Sobral, municipality located in the northwest mesoregion of the Ceará State, Brazil, with coordinates of 03°40'26 "S and 40°14'20" W, which is considered an area of active visceral leishmaniasis transmission. The average altitude in relation to sea level is 70 meters. The climate of the municipality is typically tropical, hot and dry, with average annual temperatures of 30 °C. The estimated population for the year 2016 was 203,682 inhabitants, with an area of 2,122 Km².

c. Sample collection

Blood samples were obtained from 676 domestic dogs. The samples were collected by the Sobral's Zoonosis Control Center (CCZ/Sobral). The animals were evaluated for clinical signs of VL, being classified as symptomatic or asymptomatic.

The blood samples were collected by veterinarians from CCZ/Sobral. Venous puncture was performed to remove a total of 6 ml of the sample, of these, 3 ml was destined for the DNA analyzes and 3 ml for the serological tests. Total

blood was stored in ACD anticoagulant (0.0038M citric acid, 0.075M tribasic sodium citrate, 0.133M dextrose) and the blood for serology was centrifuged. All samples were stored at -20 °C until the moment of the tests.

The samples obtained were sent monthly to the Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology of the Department of Genetics of the Federal University of Pernambuco (LABBE/UFPE - www.bioinfo.ufpe.br), where all molecular biology experiments were carried out.

d. Serology Diagnostic

For the diagnosis of Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay (ELISA) the Calazar Canine ELISA/S7 Diagnostic Kit was used, moreover The Dual-Path Platform (DPP) (Bio-Manguinhos - Rio de Janeiro, Brazil) rapid test was performed at CCZ/Sobral. All tests were performed following the manufacturers' instructions.

e. DNA extraction and Real Time PCR for *Leishmania* detection

The DNA extraction from whole blood was performed using the Mini Salting Out method, described by Miller *et al.* (1988), which consists of the following steps: leukocytes dissolution, proteins digestion and elimination, DNA precipitation and washing. Each sample of the DNA obtained was quantified by NanoDrop to determine its concentration and purity.

For *L. infantum* detection, the primers LEISH-1 (5'-AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG-3'), LEISH-2 (5'-ACCCCCAGTTTCCCGCC-3') and the TaqMan® probe FAM-5'-AAAAATGGGTGCAGAAAT-3'-non-fluorescent quencher-MGB described by Francino *et al.* (2006), were used as described and optimized elsewhere by Dantas-Torres *et al.* (2017). Thus a standard DNA curve ranging from 1 ng and 0.1 fg of *L. infantum* (MHOM/BR/76/M4192) genomic DNA and a negative control (no template DNA)

were included in each PCR run, which were performed on an QuantStudio® 5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems), in a final volume of 15 µl, containing 2 µl of DNA, 2.5 µl of nuclease-free water, 1.35 µl of each primer at 900nM, 0.3 µl of TaqMan® probe at 200nM and 7.5 µl of TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 20 s, 40 cycles at 95 °C for 1 s and 60 °C for 20 s (Dantas-Torres *et al.*, 2017). Data analysis was performed using QuantStudio® Design and Analysis Software v1.3.1 (Applied Biosystems).

f. Data analysis

To evaluate the frequencies of the results obtained from the clinical samples of the dogs of each group (symptomatic and asymptomatic), the χ^2 test and the ANOVA with a significance level of 5% were used.

For the statistical analysis of the sensitivity and specificity of each test, the statistical package R was used with the pROC library. The specificity and sensitivity values were calculated by the pROC package as well as the ROC curve value that determines the discriminant power of each test. The kappa statistic was performed to evaluate the concordance of the tests (molecular and serological). All statistical calculations were performed in the Bioestat program version 5.3 (<http://www.mamiraua.org.br/downloads/programas>).

Results and Discussion

In this study, we analyzed dogs and sandflies, the main domestic vertebrate hosts and disease vectors, respectively. From this, it was possible to detect the presence of *L. infantum*, etiological agent of Visceral Leishmaniasis, in both hosts.

A total of 676 blood samples were collected from dogs in 10 neighborhoods of Sobral, CE, and the prevalence of CanL in these regions was 55.77%, that is,

377 of the 676 dogs were positive in one of the tests (DPP® LVC and real-time PCR). According to the DPP® immunochromatographic test, 274 (40.53%) were CanL seropositive. Using real time PCR, 182 (26.92%) of the dogs tested were positive for parasite DNA. These results point to an endemicity of this pathology in the municipality of Sobral.

Another fact worthy of note in the study was the number of canine samples positive for *L. infantum*, but asymptomatic for the clinical signs of the disease. Most of the analyzed dogs were considered asymptomatic 85.06% (N = 575) and the other dogs were considered symptomatic 14.94% (N = 101) (Table 1). The parasite detection allowed us to observe that the presence of the parasite does not imply the appearance of clinical signs, which in an endemic area may hamper the measures of control and surveillance of this endemic disease.

Table 1

Comparative results obtained by TR DPP® (DPP) and real time PCR assays for detection of *Leishmania infantum* in samples from dogs of Sobral, Ceará State (Brazil).

Clinical Group	Dogs n (%)	DPP+ n (%)	PCR+ n (%)
Symptomatic	101 (14.94)	41 (40.59)	8 (7.92)
Asymptomatic	575 (85.05)	155 (26.96)	96 (61.93)
Total	676 (100)	196 (28.99)	104 (15.38)

n: number of dogs; TR DPP®: Rapid Test Dual Path Platform; PCR: *Leishmania infantum* DNA detection by real time PCR.

The 676 dogs were distributed in 10 neighborhoods (e.g. Alto do Cristo (N=170), Campos dos Velhos (N=83), Cidade Doutor José Euclides (N=121), Dom José (N=53), Junco (N=87), Nossa Senhora de Fátima (N=5), Padre Palhano (N=15), Parque Silvana (N=56), Renato Parente (N=18) and Vila União (N=68), in all areas studied the CanL is endemic. Among these, the neighborhoods that

presented the highest number of dogs infected by *L. infantum* in some test DPP[®] LCV and/or real time PCR were: Alto do Cristo, Cidade Doutor José Euclides, Campos dos Velhos, Junco and Vila União. Each of these neighborhoods contributed a number of dogs above the total population mean and had a positivity rate above 50%. On the other hand, the neighborhood Nossa Senhora de Fátima presented 80% of the dogs positive for *L. infantum*, however, this neighborhood contributes only 0.5% (5/676) of the total population, and is not considered by us a significant sampling when compared to total sampling (Table 2).

Table 2

Total Number and percentage of positive dogs in neighborhoods from Sobral, Ceará State (Brazil).

Neighborhoods	Dogs Total	% Population Neighborhood/Total	Positives Dogs	% Positives/Neighborhood	% Positivity Neighborhood/Total
Alto do Cristo	170	25,15	86	50,0	12,722
Campos dos Velhos	83	12,28	49	59,0	7,249
José Euclides	121	17,90	78	64,0	11,538
Dom José	53	7,84	23	43,0	3,402
Junco	87	12,87	48	55,0	7,101
N. S ^a de Fátima	5	0,74	4	80,0	0,592
Padre Palhano	15	2,22	4	26,0	0,592
Parque Silvana	56	8,28	27	48,0	1,331
Renato Parente	18	2,66	9	50,0	1,331
Vila União	68	10,06	49	72,0	7,249
	676	100,00	377	-	55,769

A uniform distribution of positive dogs was observed throughout all of the studied neighborhoods. This suggests that in the municipality of Sobral the Canine Leishmaniasis is widely distributed throughout the study area, and no focus of the disease are observed in specific areas, as observed in Figure 1.

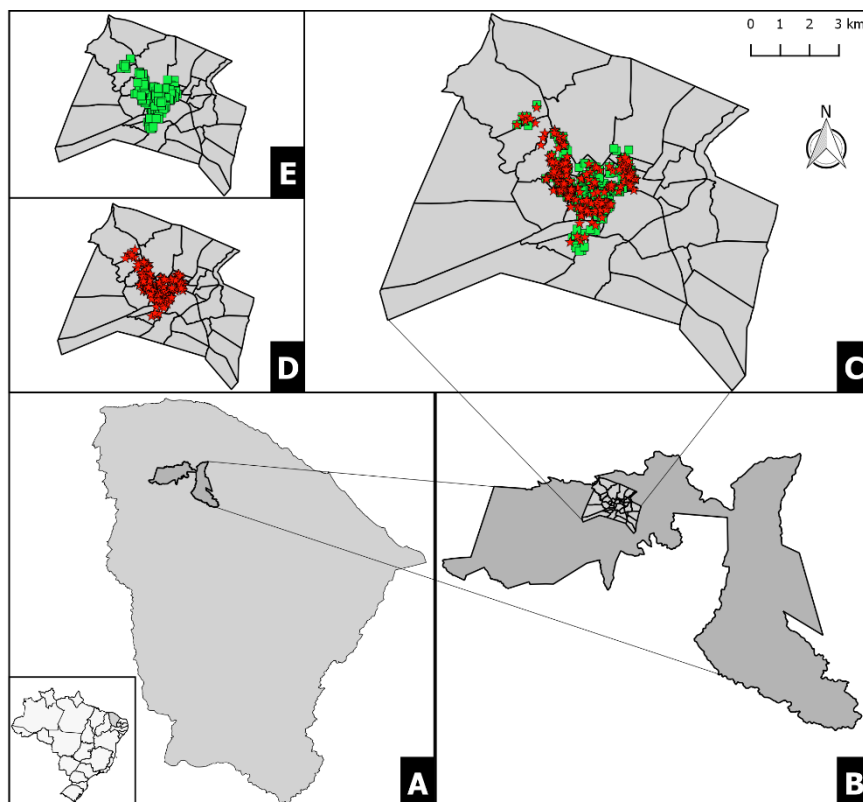


Figure 1: Distribution of the collection points of dogs by neighborhood of the municipality of Sobral, Ceará state. (A): Ceará state; (B): Sobral municipality; (C): Collection points in the urban area (red = positive samples and green = negative samples); (D): Positive sample; (E): Negative sample.

In addition to blood samples collected from dogs, catches of sandflies were also carried out at the same points of the aforementioned collections, in order to evaluate all the components involved in the cycle of transmission of the disease. Until now, 36 engorged *Lutzomyia longipalpis* females have been analyzed, of which 2 were positive for *L. infantum*.

Sobral has been the target of many studies on Leishmaniasis, with some entomological surveys (Deane and Deane, 1956; Macêdo et al., 2008; Silva et al., 2016). These studies show the presence and prevalence of the main vector of *L. infantum*, *Lutzomyia longipalpis*. This fact motivated the evaluation of the natural infection by *L. infantum* in these diptera.

Conclusion

Being our pioneering work in molecular epidemiology in this region, we can verify that in addition to the strong presence of the main vector of the disease, the dog has behaved as a domestic reservoir, which has possibly assisted in the maintenance of Visceral Leishmaniasis in the municipality of Sobral along of so many years.

Reference

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. PLoS ONE 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde (2016) – Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Brasília, DF, Ministério da Saúde.
- Dantas-Torres F (2009) Canine leishmaniosis in South America. Parasit Vectors. 2, S1.
- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M and Otranto D (2012) Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. Trends Parasitol 28: 531-538.
- Gontijo, CMF e Melo MN (2004) Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev. Bras. Epidemiol. 7, 338-349.
- Laison R and Rangel EF (2005) Lutzomyia longipalpis and eco-epidemiology of American Visceral Leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 811-827.
- Otranto D, Dantas-Torres F (2013) The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol. 29: 339-345.

5 CAPÍTULO II

Canine β -defensin-1 (*CBD1*) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs

Lidiane Gomes da Silva¹
Email: lidianegomesp@hotmail.com

César Raimundo Lima Costa Júnior¹
Email: cjrs@ig.com.br

Carlos Alberto Santiago Figueiredo Júnior¹
Email: cjsantifigo@hotmail.com

Tereza Cristina Leal-Balbino³
Email: cristina@cpqam.fiocruz.br

Sergio Crovella¹
Email: crovelser@gmail.com

Domenico Otranto²
Email: domenicotranto@gmail.com

Valdir de Queiroz Balbino^{1,#}
Email: vqbalbino@gmail.com

Filipe Dantas-Torres^{2,3,#*}
Email: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

²Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy

³Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Centre, Recife, Brazil

*Correspondence: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

#These authors contributed equally to this work.

SHORT REPORT

Open Access



Canine β -defensin-1 (*CBD1*) gene as a possible marker for *Leishmania infantum* infection in dogs

Lidiane Gomes da Silva¹, César Raimundo Lima Costa-Júnior¹, Carlos Alberto Santiago Figueiredo-Júnior¹, Tereza Cristina Leal-Balbino², Sergio Crovella¹, Domenico Otranto³, Valdir de Queiroz Balbino^{1†} and Filipe Dantas-Torres^{3,4*†}

Abstract

Background: Canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is a parasitic disease of great veterinary significance. Some dogs infected by *L. infantum* may mount a strong cellular immune response and clear the infection, while others may respond with exaggerated antibody production against the parasite and develop an overt disease, which may be fatal, if left untreated. The initial factors triggering the polarization of the immune response towards a predominantly T-helper 1 or T-helper 2 cytokines, as well as the markers of resistance and susceptibility to *L. infantum* infection and disease development in dogs, are not fully understood. Herein, we assessed the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the canine β -defensin-1 (*CBD1*) gene and the infection by *L. infantum* in two dog populations from Brazil (Sobral in Ceará State and São Raimundo Nonato in Piauí State) and one dog population from Italy.

Results: A total of 387 dogs were assessed for *L. infantum* by real time PCR and 34.6% of them were positive. In *CBD1* gene sequences from these positive dogs, nine polymorphic sites were detected, but only SNPs 3, 4, 7 and 8 were associated with *L. infantum*, in dogs from southern Italy. No association was found with dogs from Brazil.

Conclusion: This study sets the basis for further studies on the usefulness of *CBD1* as a marker of *L. infantum* infection susceptibility in dogs.

Keywords: Canine β -defensin-1 gene, Single nucleotide polymorphisms, Canine leishmaniasis, Dogs

Background

Canine leishmaniasis (CanL) is a disease caused by sand fly-transmitted protozoa of the genus *Leishmania*, which affects dogs in all continents, except Oceania [1]. From a global perspective, the most common causative agent of the disease is *Leishmania infantum*, the agent of zoonotic visceral leishmaniasis in humans. CanL caused by *L. infantum* is a widespread, life-threatening disease characterized by several, usually non-specific, clinical signs, such as weight loss, enlargement of lymph nodes, spleen and liver, lethargy, cutaneous and ocular lesions [2]. However, most of the *L. infantum*-infected dogs present neither evident

clinical signs nor clinico-pathological abnormalities, being generally resistant to the infection [1, 2].

The variable clinical presentation of CanL depends on several predisposing factors, including breed, age and genetic background [2]. The development of overt disease is also dependent on the predominant type of immune response mounted by the dog against the parasites. It is known that a dominant T-helper 1 (Th1) cell-mediated immune response may lead to the resolution of infection, whereas an exaggerated T-helper 2 (Th2) cell proliferation can lead to a high antibody production, with the formation of immune complexes, which lead to clinical signs such as vasculitis, arthritis, uveitis, and glomerulonephritis [2, 3]. Undoubtedly, still many gaps remain about the initial factors triggering the polarization of the immune response as well as regarding

* Correspondence: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br

†Equal contributors

³Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy

⁴Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

the susceptibility and resistance markers for *L. infantum* infection in dogs.

Several studies have assessed the usefulness of immunological markers of susceptibility and resistance to *L. infantum* infection in dogs. For example, interleukin 10 (IL-10), tumour growth factor beta (TGF- β) and interleukin 4 (IL-4) are associated with increased B-cell and plasma-cell activity and hyperglobulinemia, and with disease susceptibility in dogs [3]. On the other hand, increased levels of interferon gamma (IFN- γ), interleukin 2 (IL-2) and tumour necrosis factor alpha (TNF- α) induce macrophage activation and nitric oxide intracellular killing of parasites, which is associated to resistance in naturally infected dogs [3–6]. Thus, the profile of the host immune response has been used as a marker of susceptibility or resistance to *L. infantum* infection in dogs.

It has been suggested that host genetics play a role in the susceptibility to CanL. For instance, the solute carrier family 11 member 1 gene (*SLC11A1*), formerly named resistance-associated macrophage protein 1 (*NRAMP1*) gene, and certain alleles of the major histocompatibility complex II (MHC II) genes have been associated with susceptibility to CanL [7, 8]. In a recent study, ~170,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were genotyped in dogs and associations between *L. infantum* infection and polymorphisms were found in several genes (e.g. *IL7R*, *Lifr*, *C6*, *C7* and *Csf1r* genes), within a locus involved in lesion development in murine *Leishmania major* infection [9].

The association between SNPs and *L. infantum* infection or disease development in dogs is not so clear, since leishmaniasis is a complex disease whose progression is associated with multiple gene loci [10]. SNP analysis of innate immunity genes, such as those coding for antimicrobial peptides (AMPs), could provide interesting insights into the relationship between host's genetics and *L. infantum* infection in dogs. Herein, we used molecular tools to determine the infection by *L. infantum* in dogs, living in three areas where CanL is endemic, and investigated the possible relationship between polymorphisms in the canine β -defensin-1 (*CBD1*) gene and positivity to *L. infantum*, as previous studies have demonstrated the association of polymorphisms in this gene and diseases in dogs [11, 12].

Methods

Dog populations and samples

A total of 387 mongrel dogs were included in this study, of which 95 from São Raimundo Nonato (09°00'54"S, 42°41'56"W), Piauí State, and 190 from Sobral (3°41'15"S, 40°21'5"W), Ceará State, north-eastern Brazil. Additionally, 102 dogs from Putignano (40°51'N, 17°7'E), Apulia region in southern Italy, were also included. Samples from Brazil were primarily collected for this study. The

samples from Italy came from a previous study [13]. The selected populations live in known endemic areas of CanL. Venous blood samples (5 ml) from all dogs were collected in tubes containing anticoagulant and stored at 4 °C until DNA extraction.

Molecular procedures

DNA extraction

DNA extraction from whole blood samples was performed using the salting-out method [14], for the Brazilian samples, and a commercial kit (MagAttract DNA Blood kit, Qiagen, Valencia, California, USA), for the Italian samples. Each extracted DNA sample was quantified by NanoDropTM 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA) to determine its concentration and purity.

Leishmania DNA detection

For *L. infantum* detection, the primers LEISH-1 (5'-AAC TTT TCT GGT CCT CCG GGT AG-3'), LEISH-2 (5'-ACC CCC AGT TTC CCG CC-3') and the TaqMan[®] probe FAM-5'-AAA AAT GGG TGC AGA AAT-3'-non-fluorescent quencher-MGB were used as described elsewhere [13, 15]. These primers target the conserved region of *L. infantum* of the kinetoplast DNA minicircles conserved region and amplify a fragment of 120 bp [16]. Parasite load was estimated using a standard DNA curve ranging from 1 ng to 0.1 fg of *L. infantum* (MHOM/BR/76/M4192) genomic DNA, as described elsewhere [15]. The standard curve and a negative control (no template DNA) were included in each PCR run, which were performed on an QuantStudio[®] 5 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), in a final volume of 15 μ l, containing 2 μ l of DNA, 2.5 μ l of nuclease-free water, 1.35 μ l of each primer at 900 nM, 0.3 μ l of TaqMan[®] probe at 200 nM and 7.5 μ l of TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 20 s, 40 cycles at 95 °C for 1 s and 60 °C for 20 s [15].

Data analysis was performed using QuantStudio[®] Design and Analysis Software v1.3.1 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). PCR-positive dogs were defined as cases and PCR-negative dogs as controls. The parasite load was categorized as described elsewhere [15], considering the estimated number of parasites per ml of blood as follows: low (0–10 parasites), medium (11–100 parasites), high (101–1000 parasites) or very high (>1000 parasites).

CBD1 gene and SNP analysis

Primers for *CBD1* (DEFEX1FW 5'-ATC CCT GCC CTA TAA ATA CCG-3' and DEFEX1RW 5'-CCA AAC ACA GTC AGG GAT G-3') were designed using the

Primer3Plus software [17], using *Canis lupus familiaris* genomic sequences deposited in the GenBank (NC_006598 for the *DEFB1* gene). The primers were designed to amplify the region between the promoter and intron 1 of the *CBD1* gene with an expected amplicon size of 582 bp. The OligoAnalyzer software (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>) was used to verify the quality of the selected primers based on the observation of the following criteria: melting temperature definition, primer dimer and hairpins formation. PCR standardization was performed in a final volume of 25 µl containing: 1.5 µl of each primer at a concentration of 10 pmol/µl; 7.5 µl of nuclease-free water, 12.5 µl of GoTaq Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) and 2 µl of DNA. The amplification profile was defined according to the melting temperature of the primer. A

gradient was performed to find the perfect annealing temperature and the number of cycles was defined by the size of the fragment specific to the primer.

The amplification conditions for the *CBD1* gene were as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, 35 cycles of (94 °C/30 s, 55 °C/30 s and 72 °C/30 s), and final extension at 72 °C for 10 min. The amplified products were analysed in 0.5% agarose gels, containing 1% of ethidium bromide and visualized with an ultraviolet transilluminator. All products were sequenced using same primers and the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), in a Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems, Foster City, California, USA).

Consensus sequences were generated based on the Phred 40 values using the Staden package [18] and

Table 1 Association between genetic polymorphisms in β -defensin-1 and with *Leishmania infantum* in dogs from Sobral, Brazil

SNP	Variation ID	Position ^a	Alleles	HWE	Possible genotype	Total frequency (n = 190)	Frequency in cases (n = 70)	Frequency in controls (n = 120)	Odds ratio (95% CI)	Logistic regression (P-value)
SNP1	rs852527703	58881447	C/T	0.14	T/T	0.23	0.19	0.25	0.51 (0.22–1.15)	0.17
					C/T	0.44	0.40	0.47	0.59 (0.30–1.15)	
					C/C	0.33	0.41	0.28	1.00	
SNP2	rs852380685	58881356	C/T	0.14	T/T	0.23	0.19	0.25	0.51 (0.22–1.15)	0.17
					C/T	0.44	0.40	0.47	0.59 (0.30–1.15)	
					C/C	0.33	0.41	0.28	1.00	
SNP3	rs850814192	58881297	A/G	0.59	G/G	0.51	0.49	0.52	1.00	0.73
					A/G	0.42	0.43	0.42	1.11 (0.60–2.06)	
					A/A	0.07	0.09	0.06	1.59 (0.49–5.10)	
SNP4	rs852670798	58881294	A/C	0.77	C/C	0.30	0.31	0.29	1.00	0.87
					A/C	0.51	0.49	0.52	0.86 (0.44–1.69)	
					A/A	0.19	0.20	0.18	1.01 (0.43–2.38)	
SNP5	rs852439766	58881277	C/T	0.082	T/T	0.25	0.26	0.25	1.00	0.89
					C/T	0.56	0.54	0.57	0.92 (0.45–1.86)	
					C/C	0.18	0.20	0.18	1.11 (0.45–2.72)	
SNP6	rs850643698	58881159	A/G	0.77	G/G	0.19	0.20	0.18	1.01 (0.43–2.38)	0.87
					A/G	0.51	0.49	0.52	0.86 (0.44–1.69)	
					A/A	0.30	0.31	0.29	1.00	
SNP7	rs853079810	58881122	A/G	0.19	G/G	0.25	0.26	0.25	1.00	0.91
					A/G	0.55	0.53	0.56	0.92 (0.45–1.87)	
					A/A	0.20	0.21	0.19	1.09 (0.45–2.61)	
SNP8	rs851268228	58881093	C/T	1	T/T	0.08	0.10	0.07	1.57 (0.53–4.71)	0.72
					C/T	0.41	0.40	0.41	1.03 (0.55–1.92)	
					C/C	0.52	0.50	0.52	1.00	
SNP9	rs850702571	58881081	A/G	0.24	G/G	0.48	0.50	0.48	1.00	0.88
					A/G	0.39	0.37	0.41	0.86 (0.46–1.63)	
					A/A	0.12	0.13	0.12	1.05 (0.41–2.67)	

^aPosition in the reference sequence of canine chromosome 16 (accession number: NC_006598.3)

Abbreviations: SNPs single nucleotide polymorphisms, HWE Hardy-Weinberg equilibrium

validated by BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). The sequences were aligned using the MEGA v.5.3 software [19], which was also used to visualize and quantify the polymorphisms.

Data analysis

The inter-population differentiation (F_{ST}) and the intra-population genetic variability (F_{IS}) were assessed using Arlequin version 3.11 [20] and GenePop version 4.0 [21]. The correlation between genetic and geographic distances was assessed with Mantel test using Arlequin version 3.11 [20]. Logistic regression was performed to evaluate SNPs and haplotype associations with the infection (case-control) were assessed using SNPStats software (http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats_web), assuming a 5% significance level

[22]. Statistical power was calculated using G*Power software [23]. This case-control study has > 80% power to identify a genotype association at the 5% significance level.

Results

The real-time PCR positivity values for *L. infantum* were 31.6% (30/95) in São Raimundo Nonato and 36.8% (70/190) in Sobral. The canine population of Putignano showed a positivity of 33.3% (34/102). Regarding the parasitic load among the 134 positive dogs, one was considered very highly positive, three were highly positive, nine were medium positive and 121 were low positive (Additional file 1: Table S1).

The PCR product for the *CBD1* gene showed a band size of approximately 600 bp. The specificity of the PCR

Table 2 Association between genetic polymorphisms in β -defensin-1 and with *Leishmania infantum* in dogs from São Raimundo Nonato, Brazil

SNP	Variation ID	Position ^a	Alleles	HWE	Possible genotype	Total frequency (n = 95)	Frequency in cases (n = 18)	Frequency in controls (n = 77)	Odds ratio (95% CI)	Logistic regression (P-value)
SNP1	rs852527703	58881447	C/T	0.22	T/T	0.32	0.43	0.26	1.00	0.10
					C/T	0.43	0.43	0.43	0.61 (0.23–1.61)	
					C/C	0.25	0.13	0.31	0.26 (0.07–0.95)	
SNP2	rs852380685	58881356	C/T	0.22	T/T	0.32	0.43	0.26	1.00	0.10
					C/T	0.43	0.43	0.43	0.61 (0.23–1.61)	
					C/C	0.25	0.13	0.31	0.26 (0.07–0.95)	
SNP3	rs850814192	58881297	A/G	1	G/G	0.51	0.60	0.46	1.00	0.44
					A/G	0.42	0.33	0.46	0.56 (0.22–1.40)	
					A/A	0.07	0.07	0.08	0.67 (0.12–3.80)	
SNP4	rs852670798	58881294	A/C	1	C/C	0.48	0.63	0.42	1.00	0.10
					A/C	0.43	0.33	0.48	0.46 (0.18–1.15)	
					A/A	0.08	0.03	0.11	0.20 (0.02–1.79)	
SNP5	rs852439766	58881277	C/T	0.41	T/T	0.20	0.17	0.22	0.50 (0.14–1.84)	0.47
					C/T	0.55	0.50	0.57	0.57 (0.21–1.56)	
					C/C	0.25	0.33	0.22	1.00	
SNP6	rs850643698	58881159	A/G	1	G/G	0.08	0.03	0.11	0.20 (0.02–1.79)	0.10
					A/G	0.43	0.33	0.48	0.46 (0.18–1.15)	
					A/A	0.48	0.63	0.42	1.00	
SNP7	rs853079810	58881122	A/G	0.41	G/G	0.16	0.13	0.17	0.60 (0.15–2.34)	0.67
					A/G	0.54	0.50	0.55	0.68 (0.26–1.78)	
					A/A	0.31	0.37	0.28	1.00	
SNP8	rs851268228	58881093	C/T	0.82	T/T	0.09	0.07	0.11	0.48 (0.09–2.61)	0.53
					C/T	0.45	0.40	0.48	0.65 (0.26–1.62)	
					C/C	0.45	0.53	0.42	1.00	
SNP9	rs850702571	58881081	A/G	0.53	G/G	0.64	0.73	0.60	1.00	0.43
					A/G	0.31	0.23	0.34	0.56 (0.21–1.53)	
					A/A	0.05	0.03	0.06	0.44 (0.05–4.22)	

^aPosition in the reference sequence of canine chromosome 16 (accession number: NC_006598.3)

Abbreviations: SNPs single nucleotide polymorphisms, HWE Hardy-Weinberg equilibrium

was confirmed by BLAST analysis, which presented high levels of similarity (99%) with a sequence of the *CBD1* gene (AC186962.12), which was used as a reference for designing the primers used in this study.

All dog samples were sequenced and DNA fragments of 582 bp were obtained. In the polymorphism analysis, 572 conserved sites and 10 variable sites were detected, and nine of them were parsimony informative. The informative sites were found in the 5' untranslated region (position in the chromosome 16: 58881447) and in intron (position in the chromosome 16: 58881356, 58881297, 58881294, 58881277, 58881159, 58881122, 58881093, 58881081) (see Tables 1, 2 and 3). No polymorphic sites were detected in the coding region (exons 1 and 2).

In the population genetics analyses, the F_{IS} for all SNPs in *CBD1* revealed a low inbreeding rate, with values near zero. The F_{ST} (0.016) indicated low genetic differentiation, demonstrating that the three populations studied are genetically very similar and can be evaluated as a single population. The analysis of allele, genotype and haplotype frequencies showed agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium.

When analysing the three populations together, we observed that none of SNPs in *CBD1* and haplotypes were associated with the *L. infantum* infection in dogs. With regard to the populations of Sobral and São Raimundo Nonato, data analysis demonstrated that none of the SNPs in *CBD1* found was associated with the presence of *L. infantum* (Tables 1 and 2).

Table 3 Association between genetic polymorphisms in β -defensin-1 and with *Leishmania infantum* in dogs from southern Italy

SNP	Variation ID	Position ^a	Alleles	HWE	Possible genotype	Total frequency (n = 102)	Frequency in cases (n = 33)	Frequency in controls (n = 69)	Odds ratio (95% CI)	Logistic regression (P-value)
SNP1	rs852527703	58881447	C/T	0.16	T/T	0.25	0.30	0.22	0.39 (0.12–1.23)	0.18
					C/T	0.42	0.48	0.39	0.44 (0.16–1.23)	
					C/C	0.33	0.21	0.39	1.00	
SNP2	rs852380685	58881356	C/T	0.16	T/T	0.25	0.30	0.22	0.39 (0.12–1.23)	0.18
					C/T	0.42	0.48	0.39	0.44 (0.16–1.23)	
					C/C	0.33	0.21	0.39	1.00	
SNP3	rs850814192	58881297	A/G	0.68	G/G	0.39	0.55	0.32	1.00	0.04
					A/G	0.45	0.39	0.48	2.08 (0.85–5.08)	
					A/A	0.16	0.06	0.20	5.73 (1.15–28.57)	
SNP4	rs852670798	58881294	A/C	0.24	C/C	0.47	0.30	0.55	1.00	0.05
					A/C	0.47	0.64	0.39	0.34 (0.14–0.83)	
					A/A	0.06	0.06	0.06	0.53 (0.08–3.30)	
SNP5	rs852439766	58881277	C/T	0.83	T/T	0.14	0.18	0.12	0.30 (0.08–1.15)	0.06
					C/T	0.49	0.61	0.43	0.34 (0.13–0.92)	
					C/C	0.37	0.21	0.45	1.00	
SNP6	rs850643698	58881159	A/G	0.33	G/G	0.06	0.06	0.06	0.58 (0.09–3.59)	0.11
					A/G	0.46	0.61	0.39	0.39 (0.16–0.95)	
					A/A	0.48	0.33	0.55	1.00	
SNP7	rs853079810	58881122	A/G	0.67	G/G	0.14	0.18	0.12	0.30 (0.08–1.13)	0.04
					A/G	0.44	0.58	0.38	0.31 (0.12–0.82)	
					A/A	0.42	0.24	0.51	1.00	
SNP8	rs851268228	58881093	C/T	0.68	T/T	0.18	0.06	0.23	6.80 (1.36–33.88)	0.02
					C/T	0.46	0.42	0.48	2.00 (0.82–4.92)	
					C/C	0.36	0.52	0.29	1.00	
SNP9	rs850702571	58881081	A/G	1	G/G	0.62	0.45	0.70	1.00	0.07
					A/G	0.34	0.48	0.28	0.37 (0.15–0.90)	
					A/A	0.04	0.06	0.03	0.31 (0.04–2.41)	

^aPosition in the reference sequence of canine chromosome 16 (accession number: NC_006598.3)

Abbreviations: SNPs single nucleotide polymorphisms, HWE Hardy-Weinberg equilibrium

The genotypes A/A and T/T within the SNPs 3 and 8, respectively, were associated with the risk of *L. infantum* infection in dogs from Italy. On the other hand, the genotypes A/C and A/G within the SNPs 4 and 7, respectively, were associated with protection against *L. infantum* infection (Table 3).

As far as haplotype association is concerned, no haplotypes were found to be associated with *L. infantum* infection in the studied dog populations.

Discussion

In this study, we evaluated the possible association between SNPs in the *CBD1* gene and *L. infantum* infection in dogs from north-eastern Brazil and southern Italy. We found an association between some genotypes within SNPs in the *CBD1* gene and *L. infantum* infection in dogs from Italy, indicating that these SNPs could be potential genetic markers for the study of *L. infantum* infection susceptibility/resistance in these animals. Yet, no association was found between SNPs in the *CBD1* gene and *L. infantum* infection in the dog populations from Brazil, which may suggest that further studies are needed to confirm the associations found in Italy. These differences could also be related to differences in parasite strains infecting dogs in each studied area. This hypothesis is unlikely because *L. infantum* zymodeme MON-1 is the predominant strain of infecting dogs in the Mediterranean basin and apparently also in South America [24–26]. Another issue that should be considered is population stratification. As all SNPs are potentially under selection pressure, they may not be reliable to assess population stratification. Therefore, the associations found herein could also be due to the underlying structure of the Italian population.

The association between the SNPs in the *CBD1* gene and *L. infantum* infection in dogs here described, along with previous studies demonstrating the association between other gene polymorphisms and leishmaniasis in humans [27] and dogs [7–9, 28], indicate that genetic factors may be involved in the susceptibility of *L. infantum* to infection and disease development. Studies conducted by Sanchez-Robert et al. [8, 28] reported an association between a haplotype (TAG-8-141) that includes a SNP in the promoter region and a microsatellite in intron 1, and two SNPs (A4549G in intron 6 and C4859T in exon 8) located in the *Slc11a1* gene and susceptibility to leishmaniasis in dogs. In another study, Quilez et al. [9] found associations between polymorphisms in several genes (e.g. *IL7R*, *Lifr*, *C6*, *C7* and *Csf1r* genes) and CanL.

The results of the SNPs association analysis herein presented indicates that *CBD1* gene may be involved in the immune response of dogs to *L. infantum*

infection. However, future analysis of the expression levels of the *CBD1* gene in dogs infected with *L. infantum* will provide more information about the function of this gene. A previous study evaluated the expression of beta-defensins (i.e. CBD1, CBD103 and CBD108) in the canine respiratory tract and their antimicrobial activity against the intracellular bacterium *Bordetella bronchiseptica* [11]. All three investigated beta-defensins were detected in respiratory cells and were also readily expressed in skin samples. The study demonstrated that cells infected with canine parainfluenza virus had lower levels of CBD1 and CBD108, as well as that CBD103 presents antimicrobial activity against *B. bronchiseptica*. Another study showed increased expression levels of the *CBD1* gene in the skin of dogs with atopic dermatitis compared with healthy individuals [12]. Hypothetically, differences in the expression of the *CBD1* gene in the skin of *L. infantum* infected dogs could be associated with the presence/absence/severity of skin lesions commonly seen in dogs with CanL. Again, further research is needed to evaluate the functional effects (if any) of the SNPs found herein and, from a broader perspective, to assess if CBD1 or other beta-defensins display any antimicrobial activity against *L. infantum*.

Conclusion

This study demonstrates for the first time a possible association between SNPs in the *CBD1* gene and *L. infantum* infection in dogs. A functional validation of this hypothesis, for example, to assess the level of expression of β -defensin-1 in the skin of dogs carrying these SNPs, would be required.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Frequency of *Leishmania infantum* parasite load categories in dogs from Sobral (SOB) and São Raimundo Nonato (SRN), Brazil, and Italy (ITA). (DOCX 17 kb)

Acknowledgements

This publication has been sponsored by Bayer Animal Health in the framework of the 12th CVBD World Forum Symposium.

Funding

This study was supported by the Ministry of Health of Brazil and by Bayer Animal Health (Germany).

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

LGS, SC, VQB and FDT designed the study; LGS performed the molecular analyses; LGS, CRLCJ, CASFJ and TCLB performed the bioinformatics and population genetics analyses; LGS and FDT wrote the manuscript; DO, VQB and FDT revised the manuscript; VQB and FDT supervised the study and revised the final version of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval

Sample collection in Brazil was approved (process number 23076.051904/2013-48) by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Biological Sciences Centre, Federal University of Pernambuco. Sample collection in Italy was approved by the Animal Ethics Committee of the University of Bari and by the Italian Ministry of Health (authorization number 72/2009C, no. 69062; 11/28/2008).

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

²Department of Microbiology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

³Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy.

⁴Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil.

Received: 9 January 2017 Accepted: 5 April 2017

Published online: 20 April 2017

References

- Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 2012;28:531–8.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. The LeishVet group. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2011;4:86–101.
- Reis AB, Giunchetti RC, Carrillo E, Martins-Filho OA, Moreno J. Immunity to *Leishmania* and the rational search for vaccines against canine leishmaniosis. *Trends Parasitol.* 2010;26:341–9.
- Panaro MA, Brandonisio O, Cianciulli A, Cavallo P, Lacasella V, Paradisi P, et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Parasitology.* 2009;136:823–31.
- Panaro MA, Brandonisio O, de Caprariis D, Cavallo P, Cianciulli A, Mitolo V, et al. Canine leishmaniasis in Southern Italy: a role for nitric oxide released from activated macrophages in asymptomatic infection? *Parasit Vectors.* 2008;9:10.
- Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 2008;24:324–30.
- Quinnell RJ, Kennedy LJ, Barnes A, Courtenay O, Dye C, Garcez LM, et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. *Immunogenetics.* 2003;55:23–8.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Utzet-Sadurni M, Giger U, Sanchez A, Francino O. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 2008;39:36–47.
- Quilez J, Martínez V, Woolliams JA, Sanchez A, Pong-Wong R, Kennedy LJ, et al. Genetic control of canine leishmaniasis: genome-wide association study and genomic selection analysis. *Plos One.* 2012;7:1–10.
- Blackwell JM, Fakiola M, Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. *Parasite Immunol.* 2009;31:254–66.
- Erles K, Brownlie J. Expression of beta-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *Bordetella bronchiseptica*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135:12–9.
- Van Damme CM, Willemse T, van Dijk A, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. Altered cutaneous expression of beta-defensins in dogs with atopic dermatitis. *Mol Immunol.* 2009;46:2449–55.
- Otranto D, de Caprariis D, Lia RP, Tarallo V, Lorusso V, Testini G, et al. Prevention of endemic canine vector-borne diseases using imidacloprid 10% and permethrin 50% in young dogs: a longitudinal field study. *Vet Parasitol.* 2010;20:323–32.
- Miller AS, Dykes DD, Olesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16:1255.
- Dantas-Torres F, da Silva Sales KG, Gomes da Silva L, Otranto D, Figueredo LA. *Leishmania*-FAST15: a rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *Mol Cell Probes.* 2017;31:65–9.
- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, Solano-Gallego L, Alberola J, et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2006;13:214–21.
- Untergasser A, Veen HN, Rao X, Bisseling T, Guerts R, Leunissen JAM. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 2007;35:71–4.
- Staden R, Beal KF, Bonfield JK. The Staden package 1998. *Methods Mol Biol.* 2000;132:115–30.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28:2731–9.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564–7.
- Rousset F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 2008;8:103–6.
- Solé X, Guino E, Valls J, Iñiesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics.* 2006;22:1928–9.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods.* 2007;39:175–91.
- Ait-Oudhia K, Harrat Z, Benikhef R, Dedet JP, Pratlong F. Canine *Leishmania infantum* enzymatic polymorphism: a review including 1023 strains of the Mediterranean area, with special reference to Algeria. *Acta Trop.* 2011;118:80–6.
- Zerpa O, Pratlong F, Ulrich M, Convit J. Isolation of *Leishmania infantum*, zymodeme MON-1 from canine and human visceral leishmaniasis on Margarita Island. *Venezuela Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:901–2.
- Coutinho CE, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, Madeira MF. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011;44:572–5.
- Mehrotra S, Fakiola M, Mishra A, Sudarshan M, Tiwary P, Rani DS, et al. Genetic and functional evaluation of the role of DLL1 in susceptibility to visceral leishmaniasis in India. *Infect Genet Evol.* 2012;12:1195–201.
- Sanchez-Robert E, Altet L, Sanchez A, Francino O. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. *J Hered.* 2005;96:755–58.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



6 DISCUSSÃO GERAL

No presente estudo, avaliaram-se a prevalência da infecção por *L. infantum* em cães e a relação entre polimorfismos presentes no gene *CBD1* e a positividade para *L. infantum*.

Detectou-se uma positividade de 36,84% em cães do município de Sobral (Ceará) e 18,95% em cães do município de São Raimundo Nonato (Piauí). Entre 2003 e 2013, 612 e 53 casos humanos de LV foram notificados, para Sobral e São Raimundo Nonato, respectivamente (BRASIL, 2016). Os dados de prevalência atrelados aos casos humanos presentes nos municípios estudados demonstram que as medidas de controle não têm sido suficientes para reduzir a incidência, seja na população canina, seja na população humana.

A LV geralmente está associada a condições de pobreza, ocorrendo principalmente em áreas rurais e suburbanas. Precárias condições de moradia, falta de saneamento básico e subnutrição podem aumentar o risco de infecção e de adoecimento (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

O uso da qPCR nos permitiu observar que a maioria dos cães apresentou uma baixa carga parasitária e não apresentou sinais clínicos. A análise da carga parasitária é um parâmetro para monitorar a quantidade dos parasitas circulantes, antes, durante e após o tratamento da LV (MARTÍNEZ et al., 2011).

A associação entre polimorfismos no gene da *CBD1* e a positividade para *L. infantum* em cães é descrita pela primeira vez em nosso estudo. Observamos que não houve associação significativa de nenhum dos nove SNPs encontrados no conjunto de sequências com a presença do parasita e à positividade para *L. infantum*, nas populações brasileiras, contudo foram encontradas associações significativas na população canina da Itália. A associação entre SNPs no gene *CBD1* e a infecção por *L. infantum* em cães aqui descrita, corrobora com estudos anteriores que demonstram a associação entre polimorfismos em outros genes e a leishmaniose em humanos (MEHROTRA et al., 2012) e cães (QUILEZ et al., 2012b; QUINNELL et al., 2003; SANCHEZ-ROBERT et al., 2005, 2008), indicando que fatores genéticos podem estar envolvidos na susceptibilidade à infecção por *L. infantum* e o desenvolvimento da doença.

Estes resultados coincidem com estudos de outros genes que apresentam associação com a LV e valores igualmente significativos, como é o caso do estudo de Sanchez-Robert et al. (2008), que identificaram um haplótipo (TAG-8-141) localizados no gene *Slc11a1* que inclui um SNP na região promotora e um microssatélite no íntron 1, e dois SNPs (A4549G no íntron 6 e C4859T no éxon 8), relacionados com a LV em cães. Em um estudo mais recente, Quilez et al. (2012) sugeriram que vários locos genéticos (e.g., *Il7R*, *Lifr*, *C6*, *C7* e *Csf1r* genes) do cromossomo 4 do cão podem estar associados com LVC.

Novos estudos serão necessários para determinar de forma definitiva a possível associação entre o gene *CBD1* e a infecção por *L. infantum* em cães. Em particular, seria interessante avaliar se os polimorfismos aqui encontrados no gene *CBD1* estão associados a uma maior ou menor probabilidade de desenvolver sinais clínicos de LV.

7 CONCLUSÕES GERAIS

- As populações estudadas se mostraram muito próximas geneticamente.
- A análise da carga parasitária permitiu concluir que não existe uma relação entre alta positividade e sinais clínicos.
- Não foi possível estabelecer associação entre o gene *CBD1* com a infecção por *L. infantum* nas populações brasileiras.
- Na população da Itália, os SNPs 3, 4, 7 e 8 no gene *CBD1* apresentaram associação significativa com a presença de *L. infantum*.
- Nenhum haplótipo formado pela interação dos nove SNPs do gene de *CBD1* apresentou associação com a presença de *L. infantum* nos cães infectados.

REFERÊNCIAS

AHMED, S. B. H. et al. DNA based vaccination with a cocktail of plasmids encoding immunodominant *Leishmania (Leishmania) major* antigens confers full protection in BALB/c mice. **Vaccine**, v. 27, n. 1, p. 99–106, 2009.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.

ALBEROLA, J. et al. Safety and Efficacy of Antimicrobial Peptides against Naturally Acquired Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 641–643, 2004.

ALTET, L. et al. Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in Leishmaniasis-susceptible dogs. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 6, p. 2763–2771, 2002.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 229–233, 2005.

BAGNICKA, E. et al. A/C polymorphism in the β -4 defensin gene and its association with phenotypic and breeding values of milk production traits in Polish-Friesian cows. **Animal Science Papers and Reports**, v. 26, n. 4, p. 239–250, 2008.

BARRA, G. B. et al. Diagnóstico molecular: passado, presente e futuro. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 43, n. 3, p. 254–260, 2011.

BELO, V. S. et al. A systematic review and meta-analysis of the factors associated with *Leishmania infantum* infection in dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, 2013.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em saúde. **Leishmaniose visceral : recomendações clínicas para redução da letalidade**. Ministério da Saúde: Brasília, DF. 2011.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde: Brasília, DF. 2014.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em saúde. **SINAN - Sistema de Informação de Agravos e Notificações**. Disponível em: <portalsinan.saude.gov.br>.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 2005.

CANDILLE, S. I. et al. A β -defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. **Science**, v. 318, n. 5855, p. 1418–1423, 2007.

CARRILLO, E. et al. Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 25, n. 8, p. 1534–1543, 2007.

CHAMIZO, C.; MORENO, J.; ALVAR, J. Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 67–75, 2005.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do Continente Americano**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C. Considerações sobre a taxonomia do gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Org.). **Leishmanioses do continente Americano**. 1a. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

DANTAS-TORRES, F. et al. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 12, p. 531–538, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco TT - Geographical expansion of visceral leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 39, n. 4, p. 352–356, 2006.

DE QUEIROZ, N. M. G. P. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos em associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, v. 19, n. 1, p. 32–38, 2010.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

ERLES, K.; BROWNLIE, J. Expression of beta-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *Bordetella bronchiseptica*. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 135, n. 1–2, p. 12–9, 2010.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology**, p. 1–13, 2016.

ETTINGER, N. A. et al. Genetic admixture in brazilians exposed to infection with *leishmania chagasi*. **Annals of Human Genetics**, v. 73, n. 3, p. 304–313, 2009.

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

FAZAKERLEY, D. J. et al. Kinetic evidence for unique regulation of GLUT4 trafficking by insulin and AMP-activated protein kinase activators in L6 myotubes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1653–1660, 2010.

FRANCINO, O. et al. Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 3–4, p. 214–221, 2006.

GANZ, T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 2003.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. NORMA. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338–349, 2004.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHONPRATT, D. A review of the geographic-distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new-world. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, 1989.

INIESTA, L. et al. Diagnostic techniques to detect cryptic leishmaniasis in dogs. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 9, n. 5, p. 1137–41, 2002.

KAGAN, B. L. et al. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. January, p. 210–214, 1990.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 9, p. 439–445, 2006.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W. E.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). . **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**. London: Academic Press, 1987. p. 120.

LAURENTI, M. D. Correlação entre o diagnóstico parasitológico e sorológico na leishmaniose visceral americana canina. **BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 67, p. 13–23, 2009.

LEONARD, B. C.; AFFOLTER, V. K.; BEVINS, C. L. Antimicrobial peptides: Agents of border protection for companion animals. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 3, 2012.

MAGNUSON, B.; EKIM, B.; FINGAR, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. **The Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 1–21, 2012.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary Parasitology**, 2008.

MANNA, L. et al. Leishmania DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 142, n. 3–4, p. 271–280, 2006.

MARTÍNEZ, V. et al. Canine leishmaniasis: The key points for qPCR result interpretation. **Parasites and Vectors**, v. 4, n. 1, 2011.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. **PLoS Pathogens**, 2013.

MEHROTRA, S. et al. Genetic and functional evaluation of the role of DLL1 in susceptibility to visceral leishmaniasis in India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1195–1201, 2012.

MICHALSKY, É. M. et al. Natural infection with *Leishmania infantum* chagasi in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sandflies captured in the municipality of Janaúba, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 58–62, 2011.

MONTEIRO, É. M. et al. Leishmaniose visceral: Estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p. 147–152, 2005.

PANARO, M. A. et al. Cytokine expression in dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Parasitology**, v. 136, n. 8, p. 823–831, 2009.

PATIL, A. A. et al. Cross-species analysis of the mammalian beta-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. **Physiological Genomics**, v. 23, n. 1, p. 5–17, 2005.

QUILEZ, J. et al. Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35349, 2012a.

QUILEZ, J. et al. Genetic Control of Canine Leishmaniasis: Genome-Wide Association Study and Genomic Selection Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35349, 2012b.

QUINNELL, R. J. et al. Susceptibility to visceral leishmaniasis in the domestic dog is associated with MHC class II polymorphism. **Immunogenetics**, v. 55, n. 1, p. 23–28, 2003.

REIS, A. B. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 128, n. 1–3, p. 87–95, 2009.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis: Promising treatments for this neglected disease. **Frontiers in Immunology**, 2014.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature Immunology**, 2002.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Polymorphism of Slc11a1 (Nramp1) gene and canine leishmaniasis in a case-control study. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 7, p. 755–758, 2005.

SANCHEZ-ROBERT, E. et al. Slc11a1 (formerly Nramp1) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 39, n. 3, 2008.

SANG, Y. et al. Canine cathelicidin (K9CATH): Gene cloning, expression, and biochemical activity of a novel pro-myeloid antimicrobial peptide. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 12, p. 1278–1296, 2007.

SANTORO, D. et al. Evaluation of canine antimicrobial peptides in infected and noninfected chronic atopic skin. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

SHAI, Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, 1999.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2004.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural Leishmania infection. **Veterinary Parasitology**, v. 90, n. 1–2, p. 37–45, 2000.

SOLANO-GALLEGO, L. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites Vectors**, p. 1–16, 2011.

TAFURI, W. L. et al. An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. **Journal of Immunological Methods**, v. 292, n. 1–2, p. 17–23, 2004.

VAN DAMME, C. M. M. et al. Altered cutaneous expression of β -defensins in dogs with atopic dermatitis. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 13, p. 2449–2455, 2009.

VERAS, P. S. T. et al. New Advances in the Diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. In: CLABORN, D. M. (Ed.). . **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] InTech, 2014. p. 239–273.

WHO. **Report of a meeting of the WHO Expert Committee on thePan American Health**. Geneva: [s.n.], 2010.

YANG, D. et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 525–528, 1999.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, 2002.

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 26 de março de 2014.

Ofício nº 02/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Valdir de Queiroz Balbino**
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.051904/2013-48

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Avaliação de Fatores Bióticos e Abióticos Determinantes do Processo de Urbanização da Leishmaniose Visceral no Município de Sobral, Ceará"**.

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério, fazenda, aviário, Cães domiciliados e errantes no município de Sobral Ceará; Animais: Cães; Linhagem: Cão; Número de animais previsto no protocolo: 1500 Cães.

Atenciosamente,

Prof. Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUACCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver

[illegible]

ANEXO D – ARTIGO COMPLEMENTAR (GENETIC STRUCTURING AND FIXED POLYMORPHISMS IN THE GENE *PERIOD* AMONG NATURAL POPULATIONS OF *Lutzomyia longipalpis* IN BRAZIL)

Lima Costa et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:193
DOI 10.1186/s13071-015-0785-6



RESEARCH

Open Access

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene *period* among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil

César Raimundo Lima Costa Jr¹, Moises Thiago de Souza Freitas¹, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr¹, Nádia Consuelo Aragão¹, Lidiane Gomes da Silva¹, Carlos Brisola Marcondes², Raimundo Vieira Dias³, Tereza Cristina Leal-Balbino⁴, Manuela Barbosa Rodrigues Souza¹, Marcelo Ramalho-Ortigão⁵ and Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

Abstract

Background: Even one hundred years after being originally identified, aspects of the taxonomy of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*, the principal vector of *Leishmania infantum* in the Americas, remain unresolved for Brazilian populations of this vector. The diversity of morphological, behavioral, biochemical, and ethological characters, as well as the genetic variability detected by molecular markers are indicative of the presence of a complex of species.

Methods: In this study, a 525 bp fragment of the *period* gene was used to evaluate sympatric populations of *L. longipalpis*. A combination of probabilistic methods such as maximum likelihood and genetic assignment approach to investigate sympatric species of *L. longipalpis* were applied in three populations of Northeast Brazil.

Results: Fixed polymorphisms in geographically isolated populations of *L. longipalpis* from two localities in the state of Ceará and one in the state of Pernambuco, Brazil, was identified in a 525 bp fragment of the gene *period* (*per*). Our results suggest a direct relationship between the number of spots found in males' tergites and the genetic variation in cryptic species of *L. longipalpis*. The fragment used in this study revealed the nature of the ancestral morphotype 1S.

Conclusion: New polymorphisms were identified in the gene *per* which can be used as a genetic barcode to sympatric taxonomy of *L. longipalpis*. The *per* gene fragment confirmed the presence of two sibling species of *L. longipalpis* in Sobral and showed that these same species are present in two other localities, representing an expansion within the *L. longipalpis* species complex with regards to the states of Ceará and Pernambuco.

Keywords: *Lutzomyia longipalpis* complex, *Period* gene, Fixed polymorphism

Background

A species complex is generally defined as a group of morphologically similar species that differ with regards to genetic and ethological aspects [1]. Low flight range and geographic isolation between populations are major drivers of allopatric speciation, contributing to constitution of cryptic species in Phlebotomine sand flies [2-4]. The occurrence of cryptic species is a fairly common

event in other disease vectors and have been described in *Anopheles gambiae*, *Culex pipiens*, *Triatoma dimidiata* and phlebotomines [5-8].

Lutzomyia longipalpis, the principal vector of *Leishmania infantum*, the etiologic agent of American visceral leishmaniasis, has a discontinued distribution throughout the Neotropical region with different populations displaying aspects compatible with those of a species complex [9,10]. The existence of cryptic species in the *Lutzomyia longipalpis* complex was supported by studies using morphological and molecular markers in populations from Central and South America leading to the identification of *L. pseudolongipalpis* [11], formally recognized

* Correspondence: vqbalbino@gmail.com

¹Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida da Engenharia S/N, Cidade Universitária, 50.740-600 Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Lima Costa et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO E – ARTIGO COMPLEMENTAR (ANALYSIS OF THE GENETIC STRUCTURE OF ALLOPATRIC POPULATIONS OF *Lutzomyia umbratilis* USING THE *PERIOD* CLOCK GENE)

Acta Tropica 154 (2016) 149–154



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the *period* clock gene



Moises Thiago de Souza Freitas^a, Claudia Maria Ríos-Velasquez^c, Lidiane Gomes da Silva^a, César Raimundo Lima Costa Jr.^a, Abigail Marcelino^a, Tereza Cristina Leal-Balbino^b, Valdir de Queiroz Balbino^{a,*}, Felipe Arley Costa Pessoa^{c,*}

^a Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

^b Department of Microbiology, Research Center Aggeu Magalhães, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, 50732-970 Recife, Pernambuco, Brazil

^c Laboratory of Infectious Disease Ecology in the Amazon, Instituto Leônidas e Maria Deane—Fiocruz Amazônia, Rua Terezina, 476, Adrianópolis, 69.057-070 Manaus, Amazonas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2015

Received in revised form

23 November 2015

Accepted 27 November 2015

Available online 2 December 2015

Keywords:

Lutzomyia umbratilis

Genetic structure

Species complex

Period gene

ABSTRACT

In South America, *Lutzomyia umbratilis* is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the species involved in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. In Brazil, *L. umbratilis* has been recorded in the Amazon region, and an isolated population has been identified in the state of Pernambuco, Northeastern region. This study assessed the phylogeographic structure of three allopatric Brazilian populations of *L. umbratilis*. Samples of *L. umbratilis* were collected from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas), from Manacapuru (south of the Amazon River), and from the isolated population in Recife, Pernambuco state. These samples were processed to obtain sequences of the *period* gene. Phylogenetic analysis revealed the presence of two distinct monophyletic clades: one clade comprised of the Recife and Rio Preto da Eva samples, and one clade comprised of the Manacapuru samples. Comparing the Manacapuru population with the Recife and Rio Preto da Eva populations revealed high indices of interpopulational divergence. Phylogenetic analysis indicated that geographical distance and environmental differences have not modified the ancestral relationship shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations. Genetic similarities suggest that, in evolutionary terms, these populations are more closely related to each other than to the Manacapuru population. These results confirm the existence of an *L. umbratilis* species complex composed of at least two incipient species.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Cryptic species are species with discrete morphological differences that remain undetected when assessed by classical taxonomy. Therefore, several insect species have been differentiated by assessing the following factors: genetic, ecological, and behavioral characteristics, susceptibility to infection, and eating habits (Mazzoni et al., 2008). Cryptic species are a common occurrence among insect vectors of disease; instances have been identified in the Anophelinae, Culicidae, Triatominae, and Phle-

botominae subfamilies (Anderson et al., 2000; Monteiro et al., 2013; Costa-Junior et al., 2015). In the Phlebotominae subfamily, low flight capacity and geographic isolation have significantly contributed to the emergence of cryptic species (Soto et al., 2001).

Lutzomyia umbratilis (Diptera: Psychodidae) is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the pathogenic agents of American tegumentary leishmaniasis (ATL) (Lainson et al., 1976, 1979, 1981). This species is found in Brazil, Bolivia, Colombia, French Guyana, Guyana, Peru, Suriname, and Venezuela (Young and Duncan, 1994; Burgos and Hudson, 1994). In Brazil, *L. umbratilis* is widely distributed in the Amazon basin and there is an isolated population in remnants of the Brazilian Atlantic rain forest, in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil (Young and Duncan, 1994; Balbino et al., 2001).

On the other side of Brazil, in the Amazon region, the presence of *L. umbratilis* naturally infected with *L. guyanensis* has been

* Corresponding authors.

E-mail addresses: vqbalbino@gmail.com (V.d.Q. Balbino), facpessoa@gmail.com, facpessoa@amazonia.fiocruz.br (F.A.C. Pessoa).

[†] These authors contributed equally.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.11.014>

0001-706X/© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

ANEXO F – ARTIGO COMPLEMENTAR (PHENOTYPIC AND GENOTYPIC VARIATIONS AMONG THREE ALLOPATRIC POPULATIONS OF *Lutzomyia umbratilis*, MAIN VECTOR OF *Leishmania guyanensis*)

de Souza Freitas et al. *Parasites & Vectors* (2015) 8:448
DOI 10.1186/s13071-015-1051-7



RESEARCH

Open Access

Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*



Moises Thiago de Souza Freitas¹, Claudia Maria Rios-Velasquez², César Raimundo Lima Costa Jr¹, Carlos Alberto Santiago Figueirêdo Jr¹, Nádia Consuelo Aragão¹, Lidiane Gomes da Silva¹, Marcus Vinicius de Aragão Batista⁴, Teresa Cristina Leal Balbino², Felipe Arley Costa Pessoa³ and Valdir de Queiroz Balbino^{1*}

Abstract

Background: In South America, *Lutzomyia umbratilis* is the main vector of *Leishmania guyanensis*, one of the species involved in the transmission of American tegumentary leishmaniasis. In Brazil, *L. umbratilis* has been recorded in the Amazon region, and in the state of Pernambuco, Northeastern region, where an isolated population has been identified. This study assessed the phylogeographic structure and size and shape differences of the wing of three Brazilian populations.

Methods: Samples of *L. umbratilis* were collected from Rio Preto da Eva (north of the Amazon River, Amazonas), from Manacapuru (south of the Amazon River), and from the isolated population in Recife, Pernambuco state. These samples were processed to obtain sequences of the Cytochrome Oxidase I mitochondrial gene. Geometric morphometry analysis of the right wing shape of the three populations was made using discriminate canonical analysis.

Results: Phylogenetic analysis revealed the presence of two distinct monophyletic clades: one clade comprised of the Recife and Rio Preto da Eva samples, and the other clade comprised of the Manacapuru samples. Comparing the Manacapuru population with the Recife and Rio Preto da Eva populations generated high indices of interpopulational divergence. Geometric morphometry analysis indicated two distinct groups between the studied populations. Canonical variate analysis of wing shape indicated that Rio Preto da Eva population is significantly closer to Recife population, and both populations were genetically distant from Manacapuru.

Conclusion: The polymorphic sites and geometric morphometry analysis indicate that the distance, lack of continuity and environmental differences have not modified the ancestral relationship between Recife and Rio Preto da Eva populations. The genetic and morphological similarities shared by the Recife and Rio Preto da Eva populations suggest that these populations are more closely related evolutionarily. These results confirm the existence of an *L. umbratilis* species complex in the North and Northeast regions.

Keywords: *Lutzomyia umbratilis*, Species complex, Phylogenetic analysis, Geometric morphometry

* Correspondence: vqbalbino@gmail.com

¹Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50732-970, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 de Souza Freitas et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

ANEXO G – ARTIGO COMPLEMENTAR (*Leishmania*-FAST15: A RAPID, SENSITIVE AND LOW-COST REAL-TIME PCR ASSAY FOR THE DETECTION OF *Leishmania infantum* AND *Leishmania braziliensis* KINETOPLAST DNA IN CANINE BLOOD SAMPLES

ARTICLE IN PRESS

Molecular and Cellular Probes xxx (2016) 1–5



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular and Cellular Probes

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymcpr

Leishmania-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples

Filipe Dantas-Torres^{a,*}, Kamila Gaudêncio da Silva Sales^a, Lidiane Gomes da Silva^b, Domenico Otranto^c, Luciana Aguiar Figueredo^a

^a Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Recife, Brazil

^b Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

^c Department of Veterinary Medicine, University of Bari, Valenzano, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 August 2016

Received in revised form

17 August 2016

Accepted 17 August 2016

Available online xxx

Keywords:

Leishmania spp.

Diagnosis

Real-time PCR

Blood

Dogs

ABSTRACT

We describe an improved real-time PCR assay (designated as “*Leishmania*-FAST15”) for the detection and quantification of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA minicircles in canine blood samples. The analytical sensitivity of this technique is 0.1 fg of DNA, which is equivalent to 0.002 parasite per reaction. This assay uses a small reaction volume (15 µl) and is rapid to perform, with the results being available in less than 34 min. This improved assay might also be suitable for detecting and quantifying *L. infantum* and *L. braziliensis* DNA in other tissues, such as bone marrow and lymph nodes.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis are a group of neglected diseases of major public health significance in all continents, except Antarctica and Oceania. The burden of these diseases is disproportionately greater amongst the poorest of the poor people, with 0.9–1.6 million cases estimated to occur each year in 98 countries and three territories around the globe [1]. Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease and recent estimates suggest that 20,000 to 40,000 people die from leishmaniasis each year [1]. These figures indicate that new tools for diagnosing, treating and controlling leishmaniasis are needed.

Leishmania infantum is the causative agent of zoonotic visceral leishmaniasis [2]. Dogs are frequently infected by this parasite and are considered as the primary reservoirs in the peri-domestic transmission cycle [3]. Hence, early diagnosis and proper management of *L. infantum* infection in dogs is important, not only from a veterinary perspective, but also from a One Health viewpoint

[3,4].

In their daily routine in endemic areas, veterinary practitioners use ordinary parasitological, serological and, to a lesser extent, molecular methods for the diagnosis of *L. infantum* infection in dogs. On the other hand, public health officials usually use serological tests (e.g., indirect fluorescence antibody assays, enzyme-linked immunosorbent assays and/or rapid immunochromatographic tests). The reasons for the unavailability of molecular tools in official leishmaniasis control programs in many endemic countries include a high cost of laboratory infrastructure, equipment and reagents, and a lack of personnel skilled in the application of molecular techniques.

Numerous polymerase chain reaction (PCR) assays have been published in the literature in the past decade (e.g., [5–15]). These assays have used different genetic markers (e.g., internal transcribed spacers, β -tubulin, locus *gp63*, *hsp70* and *cysteine proteinase* genes, and kinetoplast DNA minicircles), for application to different types of samples (e.g., bone marrow, lymph nodes, skin, blood, hair and nasal, oral, ear, and ocular swabs). For instance, Francino et al. [5] developed a highly sensitive real-time PCR assay to detect and quantify *L. infantum* DNA in canine blood samples. This assay has been used for different purposes [16–21], including the detection

* Corresponding author.

E-mail address: filipe.dantas@cpqam.fiocruz.br (F. Dantas-Torres).<http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>

0890-8508/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article in press as: F. Dantas-Torres, et al., *Leishmania*-FAST15: A rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples, Molecular and Cellular Probes (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.006>

ANEXO H – ARTIGO COMPLEMENTAR (IMPEDIMETRIC SENSOR FOR *Leishmania infantum* GENOME BASED ON GOLD NANOPARTICLES DISPERSED IN POLYANILINE MATRIX

Research Article



Received: 24 November 2015

Revised: 30 December 2015

Accepted article published: 11 January 2016

Published online in Wiley Online Library:

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jctb.4890

Impedimetric sensor for *Leishmania infantum* genome based on gold nanoparticles dispersed in polyaniline matrix

Maria FK dos S Garcia,^a Cesar AS Andrade,^b Celso P de Melo,^c
Daliane S Gomes,^b Lidiane G Silva,^d Raimundo V Dias,^e Valdir Q Balbino^d
and Maria DL Oliveira^{a,b*}



Abstract

BACKGROUND: In this work, an electrochemical sensor for specific detection of *Leishmania infantum* genome (LiG) was developed. The sensorial system is based on the immobilization of a DNA probe onto a gold electrode surface previously covered with a simple and effective layer of a SH-terminal group on polyaniline matrix containing gold nanoparticles (PANIAuNp). Scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CV), and electrochemical impedance (EI) techniques were applied to evaluate the immobilization of *L. infantum* primer (LiP) on PANIAuNp.

RESULTS: SEM images for AuNp/PANI-probe systems indicate that the film of the hybridized biomolecules was homogeneous, compact and dense. Experimental results indicate that even when immobilized the probe retained its bioactivity. The primer–genome interaction was evaluated by cyclic voltammetry (CV) and electrochemical impedance spectroscopy (EIS) using a $K_4[Fe(CN)_6]^{4-}/K_3[Fe(CN)_6]^{3-}$ redox pair. Both CV and EIS results have shown unequivocal evidence that the sensor presents specific detection of LiG based on primer–genome interactions. The LiG detection is translated as observable changes in the charge transfer resistance and the cathodic/anodic peak current. A stepwise modification on the bare gold electrode is accompanied not only by a decrease in its amperometric response, but also by an increase in the peak-to-peak separation between the cathodic and anodic waves of the redox probe. The sensor response to actual positive samples obtained from contaminated dogs was also evaluated.

CONCLUSION: Results indicate that it is feasible to use this biosensor to detect LiG even at low concentrations (0.01 pg mL^{-1}).

© 2016 Society of Chemical Industry

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: biosensor; *Leishmania infantum*; polyaniline; gold nanoparticles; impedance spectroscopy; cyclic voltammetry

INTRODUCTION

Leishmaniasis, a widespread zoonotic disease with various clinical manifestations represents a serious anthroponozoonosis.¹ When not properly treated, visceral leishmaniasis (VL), the most severe clinical manifestation of leishmaniasis, which is caused by the *Leishmania infantum* parasite, can lead to high rates of mortality.²

A prevalent disease in rural areas of Brazil, VL has recently been established in urban or peri-urban areas, where the environmental conditions are favorable for maintenance of its life cycle.³ Domestic dogs are the main host of *L. infantum*, and the clinical presentation in this host may range from asymptomatic to systemic manifestations characterized by fever, anemia, hepatomegaly, splenomegaly, renal alterations, skin disease, ocular lesions, disorders of the cardiovascular and respiratory system.³

In general, VL is confirmed by microscopic identification of the presence of amastigotes, the reproductive form of the parasite, in bone marrow or spleen aspirates. Although this method can be considered as a gold standard for the VL diagnosis,⁴ culture and

isolation of the parasites seem impractical in terms of the time involved and related costs.⁵

Diverse tests such as polymerase chain reaction (PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), direct agglutination

* Correspondence to: MDL Oliveira, Departamento de Bioquímica, UFPE, 50670-901, Recife, PE, Brazil. E-mail: m_danielly@yahoo.com.br

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^c Departamento de Física, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

^d Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^e Centro de Controle de Zoonoses, Rua Finlândia S/N, Parque Silvana II, Sobral, 62010-970, Ceará, Brazil

ANEXO I – ARTIGO COMPLEMENTAR (CYTOCHROME OXIDASE I AS TOOL TO EVALUATE THE *Lutzomyia longipalpis* COMPLEX: USEFUL MOLECULAR MARKER OR NOT?

Freitas et al., Vector Biol J 2016, 1:3
DOI: [10.4172/2473-4810.1000112](https://doi.org/10.4172/2473-4810.1000112)



Vector Biology Journal

Review Article

A SCITECHNOL JOURNAL

Cytochrome Oxidase I as Tool to Evaluate the *Lutzomyia longipalpis* Complex: Useful Molecular Marker or Not?

Moises Thiago de Souza Freitas^{1*}, César Raimundo Lima Costa Jr¹, Lidiane Gomes da Silva¹, Tereza Cristina Leal-Balbino² and Valdir de Queiroz Balbino¹

Abstract

In Latin America, *Lutzomyia longipalpis* is the principal vector of *Leishmania infantum*, and is associated with the majority of cases of visceral leishmaniasis. This species has distribution from southern Mexico to northern Argentina. Although widespread, its geographical distribution is discontinuous due to its low flight capacity associated with the large number of geographical barriers. Its geographic range includes climatic and environmental discontinuities that are associated with patterns of genetic divergence. In this study, a 487 bp fragment of the *Cytochrome Oxidase I (COI)* mitochondrial gene was used to evaluate two sympatric populations of *L. longipalpis* in the municipalities from Sobral (CE-1S and 2S) and Caririçu (CE-1S and 2S) from Northeast, Brazil. A combination of probabilistic methods such as maximum likelihood and Bayesian Inference were applied to populations studied. Phylogenetic analysis revealed the presence of a single monophyletic clades composed of *L. longipalpis* morph types 1S and 2S. These results suggest that mitochondrial gene *COI* is not able to evaluate the genetic structure of the complex *L. longipalpis*.

Keywords

Lutzomyia longipalpis; *Cytochrome Oxidase I*; Phylogenetic analysis

Introduction

Lutzomyia longipalpis sensu lato, the principal vector of *Leishmania infantum*, the etiologic agent of American visceral leishmaniasis, has a low flight capacity and discontinued distribution throughout the Neotropical region exhibiting bionomics and genetics features compatible with a species complex [1-3]. In Brazil, *L. longipalpis* complex was first proposed by Manga Beira [4] and was based on the number of abdominal male spots (1 spot and 2 spot) on tergites. Subsequently, analysis of sex pheromones and male "lovesongs" that are produced during copulation supported the existence of a species complex in *L. longipalpis* [5-9]. These two features can have an important role in the reproductive isolation among closely related species.

The presence of cryptic species in *Lutzomyia longipalpis* was supported initially by studies using morphological, isozyme and *Cytochrome oxidase I (COI)* molecular marker in populations from Central and South America leading to the identification of *L. pseudolongipalpis* [10], formally recognized as the first taxon of the *L. longipalpis* complex [11]. Genetic analyses were also realized using microsatellite markers and speciation genes (*period* gene), have provided further evidence of a species complex [3]. Thereafter, Vigoder [12] suggested that *L. cruzi* should be regarded as a cryptic species within the *L. longipalpis* complex based in copulation songs and *period* gene analysis.

Mitochondrial DNA (mt DNA) has proven useful in molecular phylogenetics of several subfamilies of vectors insects (Table 1) due to its maternal inheritance, rapid rate of divergence and lack of recombination [13-18]. Phylogenetics analysis realized on the gene *COI* of *L. longipalpis* revealed the existence of four clades in Latin America for this species [19]. However, little is known about the ability of this molecular marker evaluating the *L. longipalpis* complex. In light of this possibility, this study aimed to assess the phylogenetic structure of populations *L. longipalpis* from the state of Ceará using the *COI* mitochondrial gene. This mitochondrial gene (*COI*) has been implemented in many evolutionary studies of species of the subfamily Phlebotominae.

Field Collection

Field collections were done in Sobral (3°41'15"S; 40°21'5"W) and Caririçu (07°02'31"S; 39°17'02"W), both located in the Ceará State, Northeast Region of Brazil. Sand flies were trapped in the surrounding houses and domestic animal shelters using five CDC-type miniature light traps. Sand flies were identified according to Young and Duncan [20], and *L. longipalpis sensu lato* males were separated based on the number of abdominal spots into 1S and 2S. Genomic DNA extraction was carried out using Chelex®100 (BioRad, Berkeley, California, USA), according to Costa-Junior [21]. A fragment of 487 bp of the *Cytochrome Oxidase I (COI)* was amplified by PCR using the universal primers described by Simon [14]. Amplification reactions were done using the Mix Go Taq Colorless kit, according to manufacturer specifications (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). PCR products were visualized in 1% agarose gel through UV light and posteriorly purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA). Sequencing was carried out in ABI 3500 automatic sequencer (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA). Only sequences with a Phred score above 30 were used in the analysis. Contigs assembly was carried out using Codon Code Aligner (Codon Code Corporation). Local alignments were done using BLAST [22]. All new sequences produced in this study have been deposited in GenBank under accession numbers: KT806399 to KT806475.

Nucleotide sequences were aligned using Muscle [23] incorporated in MEGA v. 5.0 [24]. Phylogenetic analysis was carried out with the Maximum Likelihood criterion using PhyML [25]. The consistency of the branches was assessed using 1000 bootstrap replicates. We use also the Bayesian inference (BI) analysis, which was implemented with Mr Bayes [26]. BI analysis included two simultaneous independent

*Corresponding author: Moises Thiago de Souza Freitas, Department of Genetic, Federal University of Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego S/N, Recife, Pernambuco 50740-600, Brazil, E-mail: moisesfrts@gmail.com

Received: September 13, 2016 Accepted: September 30, 2016 Published: October 06, 2016

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Janeiro/2017

Lidiane Gomes da Silva

Curriculum Vitae

Dados pessoais

Nome: Lidiane Gomes da Silva

Nome em citações bibliográficas: SILVA, L. G.; DA SILVA, LIDIANE GOMES;
SILVA, LIDIANE G.; GOMES DA SILVA, LIDIANE

Sexo: Feminino

Cor ou Raça: Parda

Filiação: Josenildo Gomes da Silva e Audenir Gomes da Silva

Nascimento: 07/10/1987 - Gravatá/PE - Brasil

Carteira de Identidade: 7322743 SDS - PE - 23/10/2004

CPF: 071.405.724-02

Endereço residencial: Rua Siqueira Campos, Prado – Gravatá

CEP: 55642140, PE - Brasil

Telefone: 81 35333754

Celular: (81) 9 9654 6037

Endereço eletrônico

E-mail para contato: lidianegomesp@hotmail.com

E-mail alternativo: lidianegomes.3@gmail.com

Formação acadêmica/titulação:

2013- Doutorado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA LEISHMANIOSE VISCERAL AMERICANA NO MUNICÍPIO DE SOBRAL- CE

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Co-orientador: Filipe Dantas Torres

Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Áreas do conhecimento : Genética,Parasitologia

2011 – 2013- Mestrado em Genética.

Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: Avaliação da relação entre polimorfismos dos genes beta-defensina e mbl2 e a predisposição à infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em cães de Serra Talhada, Pernambuco, Ano de obtenção: 2013

Orientador: Valdir de Queiroz Balbino

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Áreas do conhecimento : Genética

Setores de atividade : Pesquisa e desenvolvimento científico

2009 – 2010- Especialização em Ensino de Biologia.

Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão, FAINTVISA, Vitoria De Santo Antao, Brasil

Título: Perfil Alimentar dos Alunos de Ensino Fundamental de um Colégio Particular do Município de Gravatá

Orientador: Sueli Lundgren

2005 – 2008- Graduação em Biologia.

Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão, FAINTVISA, Vitoria De Santo Antao, Brasil

Formação complementar

2016 - 2016 Curso de curta duração em Fundamentos da PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR). (Carga horária: 20h). ThermoFisher Scientific, THERMOFISHER, Brasil

2008 - 2008 Extensão universitária em Ciências Biológicas. (Carga horária: 800h). Centro de Integração Empresa Escola, CIEE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Associação de Funcionários da Santandré - AFS

2008 - 2010 Vínculo: Professor , Enquadramento funcional: Professor de ensino fundamental e médio, Regime: Parcial

2. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

2013 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Discente de Doutorado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2011 - 2013 Vínculo: Outro (especifique) , Enquadramento funcional: Discente de mestrado, Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

3. Escola Professor Antônio Farias - EPAF

2007 - 2010 Vínculo: Contrato temporário , Enquadramento funcional: Professora, Regime: Parcial

4. Faculdades Integradas da Vitória de Santo Antão - FAINTVISA

2007 - 2008 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa 2013 - Atual Análise dos fatores associados à urbanização da leishmaniose no Brasil

Situação: Em andamento

Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (8);

Integrantes: Lidiane Gomes da Silva; BALBINO, V. Q. (Responsável); Nádia Consuelo Aragão; Marcus Vinicius Cardoso; Moisés Thiago Souza Freitas; César Costa Junior; Carlos Brisola Marcondes; Carlos Alberto Santiago Figueiredo Júnior; Plínio Pereira Gomes Júnior; Maria Beatriz Araújo Silva; Sérgio de Sá Leitão Paiva Júnior; Tereza Cristina Leal Balbino; Raimundo Vieira Dias Neto

2011 - 2012 USO DE FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR NO ESTUDO DOS PADRÕES DE TRANSMISSÃO VETORIAL DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA NO SERTÃO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL

Situação: Concluído

Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Lidiane Gomes da Silva; Valdir de Queiroz Balbino (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE

Áreas de atuação

1. Genética
2. Biologia Molecular

Prêmios e títulos

2012 Menção honrosa pela melhor apresentação em pôster, Programa de Pós Graduação em Genética da UFPE

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO; RÍOS-VELASQUEZ, CLAUDIA MARIA; DA SILVA, LIDIANE GOMES; LIMA COSTA, CÉSAR RAIMUNDO; MARCELINO, ABIGAIL; LEAL-BALBINO, TEREZA CRISTINA; BALBINO, VALDIR DE QUEIROZ; PESSOA, FELIPE ARLEY COSTA

Analysis of the genetic structure of allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis* using the period clock gene. *Acta Tropica*. , v.154, p.149 - 154, 2016.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.actatropica.2015.11.014]

2. FREITAS, M. T. S.; COSTA JR, C. R. L.; SILVA, L. G.; Leal-Balbino, TC; BALBINO, Valdir de Queiroz

Cytochrome Oxidase I as Tool to Evaluate the *Lutzomyia longipalpis* Complex: Useful Molecular Marker or Not?. *Vector Biology Journal*. , v.1, p.3 - 10, 2016.

Palavras-chave: *Lutzomyia longipalpis*, Cytochrome Oxidase I, Phylogenetic analysis

Áreas do conhecimento : Genética Molecular e de Microorganismos

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Vários

3. DOS S. GARCIA, MARIA F. K.; ANDRADE, CESAR A.S.; DE MELO, CELSO P.; GOMES, DALIANE S.; SILVA, LIDIANE G.; DIAS, RAIMUNDO V.; BALBINO, VALDIR Q.; OLIVEIRA, MARIA D.L.

Impedimetric sensor for leishmania infantum genome based on gold nanoparticles dispersed in polyaniline matrix. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (1986). , v.x, p.n/a - n/a, 2016.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1002/jctb.4890]

4. DANTAS-TORRES, FILIPE; DA SILVA SALES, KAMILA GAUDÊNCIO; GOMES DA SILVA, LIDIANE; OTRANTO, DOMENICO; FIGUEREDO, LUCIANA AGUIAR

Rapid, sensitive and low-cost real-time PCR assay for the detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* kinetoplast DNA in canine blood samples. *MOLECULAR AND CELLULAR PROBES*. , v.1, p.1 - , 2016.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.mcp.2016.08.006]

5. LIMA COSTA, CÉSAR RAIMUNDO; FREITAS, MOISES THIAGO DE SOUZA; SANTIAGO FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO; ARAGÃO, NÁDIA CONSUELO; DA SILVA, LIDIANE GOMES; MARCONDES, CARLOS BRISOLA; DIAS, RAIMUNDO VIEIRA; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL; SOUZA, MANUELA BARBOSA RODRIGUES; ORTIGÃO, MARCELO RAMALHO; BALBINO, VALDIR DE QUEIROZ

Genetic structuring and fixed polymorphisms in the gene period among natural populations of *Lutzomyia longipalpis* in Brazil. *Parasites & Vectors*. , v.8, p.1 - 19, 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1186/s13071-015-0785-6]

6. DE SOUZA FREITAS, MOISES THIAGO; RÍOS-VELASQUEZ, CLAUDIA MARIA; COSTA, CÉSAR RAIMUNDO LIMA; FIGUEIRÊDO, CARLOS ALBERTO SANTIAGO; ARAGÃO, NÁDIA CONSUELO; DA SILVA, LIDIANE GOMES; DE ARAGÃO BATISTA, MARCUS VINICIUS; BALBINO, TERESA CRISTINA LEAL; PESSOA, FELIPE ARLEY COSTA; DE QUEIROZ BALBINO, VALDIR

Phenotypic and genotypic variations among three allopatric populations of *Lutzomyia umbratilis*, main vector of *Leishmania guyanensis*. *Parasites & Vectors*, v.8, p.1 - 10, 2015.

Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1186/s13071-015-1051-7]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, L. G.; COSTA-JUNIOS, C. R. L; DANTAS-TORRES, F. ; (Valdir de Queiroz Albino)

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES BETA-DEFENSINA (DEFB1) E A PREDISPOSIÇÃO À INFECÇÃO PELA LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI EM CÃES DO NORDESTE DO BRASIL In: Encontro de Genética do Nordeste, 2014, Campina Grande.

XX Encontro de Genética do Nordeste - Campina Grande/PB. , 2014.

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. ROCHA, P. K. L.; SANTOS, M. A. O.; SILVA, L. G.; ARAGAO, N. C.; FIGUEIREDO JUNIOR, C. A. S.; COSTA-JUNIOS, C. R. L; TAVARES, J. R.; MORAIS, M. A.; BALBINO, V. Q.

. Mitogenome of the Main Vector of American Visceral Leishmaniose. In: 58° Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu.

58° Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. SILVA, L. G.; BALBINO, V. Q.

Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE. In: II Jornada de Genética da UFPE, 2012, Recife.

II Jornada de Genética da UFPE. Lidiane, 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. FREITAS, M. T. S.; ARAGAO, N. C.; COSTA-JUNIOS, C. R. L; SILVA, L. G.; MARCONDES, C. B.; BALBINO, V. Q.

Population Genetics of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) from Caririaçu, Ceará In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Inglês.

5. ARAGAO, N. C.; ROCHA, P. K. L.; SANTOS, M. A. O.; SILVA, L. G.; MARCONDES, C. B.; BALBINO, V. Q.

Primeira Parte do Genoma Mitocondrial de *Psorophora ferox* (Diptera: Culicidae). In: XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia, 2012, Curitiba.

XXIV Congresso Brasileiro de Entomologia. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

6. SILVA, L. G.; ROCHA, P. K. L.; COSTA-JUNIOS, C. R. L; ARAGAO, N. C.; FREITAS, M. T. S.; SANTOS, M. A. O.; TAVARES, J. R.; MORAIS, M. A.; BALBINO, V. Q.

Sequencing Mitochondrial Genome of *Lutzomyia umbratilis*, vector of Cutaneous Leishmaniasis. In: 58° Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu.

58° Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

7. ARAUJO, A.L; GOMES, Jr P.P; ARAGAO, N. C.; SILVA, L. G.; CARDOSO, M. V.; BALBINO, V. Q.

The use of ovitraps in monitoring *Aedes aegypti* populations of Serra Talhada, Pernambuco, Brazil In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Inglês.

8. SILVA, L. G.; COSTA-JUNIOS, C. R. L; ARAGAO, N. C.; FREITAS, M. T. S.; Okuyama, F. Y. U; VELASQUEZ CMR,; PESSOA, F.A. C; BALBINO, V. Q.

Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of *Lutzomyia umbratilis*. In: I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012, Foz do Iguaçu.

I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português.

9. SILVA, L. G.; BALBINO, V. Q.

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO NATURAL DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE) PELA *Leishmania infantum chagasi* EM UMA ÁREA DE TRANSMISSÃO ATIVA DE LEISHMANIOSE VISCERAL NO SERTÃO DE PERNAMBUCO. In: I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011, Recife.

I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2011.

Palavras-chave: epidemiologia; leishmaniose visceral;

Áreas do conhecimento : Genética Animal

Referências adicionais : Brasil/Português.

10. SILVA, L. G.; BALBINO, V. Q.; MEDEIROS, S.; SILVA, G.G.Z; SANTOS, M. A. O.; BATISTA, M. V. A.

In 6Th International Conference of Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology In: In 6Th International Conference of Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2010, Ouro Preto.

In 6Th International Conference of Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology. , 2010.

Referências adicionais : Brasil/Português.

11. SILVA, L. G.; BALBINO, V. Q.; MEDEIROS, S.; SILVA, G.G.Z; SANTOS, M. A. O.; BATISTA, M. V. A.

Sandfly database:Development of an Integrated Plataform of Biological and Molecular Data of Sandflies of Medical and Veterinary Importance (Diptera:

Psychodidae). In: In: 5º International Conference Of The Brazilian Association For Bioinformatics And Computational Biology, 2009, Angra dos Reis.

In: 5º International Conference Of The Brazilian Association For Bioinformatics And Computational Biology. , 2009.

Referências adicionais : Brasil/Português.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. BALBINO, V. Q.; SILVA, L. G.

Sandfly Database: Development of an Integrated Platform of Biological and Molecular Data of Sandflies (Diptera: Psychodidae) of Medical and Veterinary Importance. In: Entomol 4 - WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS, 2010, Recife.

Entomol 4 - WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS. , 2010.

Áreas do conhecimento : Genética

Referências adicionais : Brasil/Português.

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, L. G.

Leishmaniose Visceral na região Nordeste - Diagnóstico molecular diferencial, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Pernambuco; Cidade: Recife; Evento: III Jornada Científica da FBV/DeVry; Inst.promotora/financiadora: FBV/DeVry

2. SILVA, L. G.

Manejo da Leishmaniose Visceral na Rede de Atenção Básica - Diagnóstico Laboratorial, 2016. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular, Leishmaniose

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Alagoas; Cidade: Maceió;

Evento: 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

3. SILVA, L. G.

Polimorfismos em genes de resposta imunológica e a predisposição à infecção por *Leishmania infantum* em cães, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Polimorfismos, Leishmaniose

Áreas do conhecimento : Genética

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Paraíba; Cidade: João Pessoa;

Evento: I Encontro de Genética e Biotecnologia da Paraíba;

Inst.promotora/financiadora: UEPB

4. DA SILVA, LIDIANE GOMES; DANTAS-TORRES, F. ; BALBINO, V. Q.

Beta-defensina 1(CBD1) e a predisposição à infecção pela *Leishmania infantum* chagasi em cães, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Centro de Ciências Biológicas; Cidade: Recife; Evento: V Jornada de Pós-Graduação em Genética; Inst.promotora/financiadora: Universidade Federal de Pernambuco

5. Oliveira.F.R.D; SILVA, L. G.; CAVALCANTI, E. M.; SILVA, S.P; LIMA, A. E. F.; AUSTRAGESILO, S. L.

AQUECIMENTO GLOBAL: VUNERABILIDADE QUE ATINGE A BIODIVERSIDADE., 2008. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: UFRPE; Cidade: Gravatá;

Evento: I Encontro sobre Aquecimento Global na UFRPE;

Inst.promotora/financiadora: UFRPE

6. Oliveira.F.R.D; SILVA, L. G.; CAVALCANTI, E. M.; SILVA, S.P; LIMA, A. E. F.; AUSTRAGESILO, S. L.

AQUECIMENTO GLOBAL: VUNERABILIDADE QUE ATINGE A BIODIVERSIDADE., 2007. (Comunicação, Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: UFRPE; Cidade: Recife; Evento: I Encontro sobre Aquecimento Global na UFRPE; Inst.promotora/financiadora: UFRPE

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. SILVA, L. G.

Manejo da Leishmaniose Visceral na Rede de Atenção Básica, 2016.
(Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 9 horas.

2. BALBINO, V. Q.; SILVA, L. G.; FREITAS, M. T. S.

XI CURSO DE BIOINFORMÁTICA: ANÁLISE DE DADOS MOLECULARES, 2016.
(Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Referências adicionais : Brasil/Português. 90 dias.

Educação e Popularização de C&T

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. ARAUJO, A.L; GOMES, Jr P.P; ARAGAO, N. C.; SILVA, L. G.; CARDOSO, M. V.; BALBINO, V. Q.

The use of ovitraps in monitoring *Aedes aegypti* populations of Serra Talhada, Pernambuco, Brazil In: XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine, 2012, Rio de Janeiro.

XVIII Internacional Congress of the Society of Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Society of Tropical Medicine. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Inglês.

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, L. G.

Leishmaniose Visceral na região Nordeste - Diagnóstico molecular diferencial, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Pernambuco; Cidade: Recife; Evento: III Jornada Científica da FBV/DeVry; Inst.promotora/financiadora: FBV/DeVry

2. SILVA, L. G.

Manejo da Leishmaniose Visceral na Rede de Atenção Básica - Diagnóstico Laboratorial, 2016. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Diagnóstico Molecular, Leishmaniose

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Alagoas; Cidade: Maceió; Evento: 52º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

3. SILVA, L. G.

Polimorfismos em genes de resposta imunológica e a predisposição à infecção por Leishmania infantum em cães, 2016. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Polimorfismos, Leishmaniose

Áreas do conhecimento : Genética

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Paraíba; Cidade: João Pessoa; Evento: I Encontro de Genética e Biotecnologia da Paraíba; Inst.promotora/financiadora: UEPB

Participação em eventos, congressos, exposições, feiras e olimpíadas

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2011. (Outra)

Avaliação da Infecção Natural de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) pela *Leishmania infantum chagasi* em uma área de transmissão ativa de Leishmaniose Visceral no Sertão de Pernambuco.

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Jackeline Estefany Barros Santiago. AVALIAÇÃO DE INFECÇÃO POR *L. infantum* EM CÃES DE UMA ÁREA ENDÊMICA DO NORDESTE, ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES E SOROLÓGICAS. 2014. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

2. FERNANDA YUKIE UCHOA OKUYAMA. Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE.. 2012. Iniciação científica - Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. 52º CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2016. (Congresso)

Manejo da Leishmaniose Visceral na Rede de Atenção Básica - Diagnóstico Laboratorial.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) Encontro de Genética do Nordeste, 2014. (Outra)

AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DOS GENES BETA-DEFENSINA (DEFB1) E A PREDISPOSIÇÃO À INFECÇÃO PELA LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI EM CÃES DO NORDESTE DO BRASIL.

3. XX Encontro de Genética do Nordeste, 2014. (Encontro)

.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) 58º Congresso Brasileiro de Genética, 2012. (Congresso)

Mitochondrial Genome of Lutzomyia umbratilis, vector of Cutaneous Leishmaniasis..

5. Entomol 5 - WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS, 2012. (Congresso)

.

6. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Simpósio Brasileiro de Identificação Molecular de Espécies, 2012. (Simpósio)

Using Molecular Marker for the Determination of Taxonomic Status of Lutzomyia umbratilis..

7. Apresentação de Poster / Painel no(a) II Jornada de Pós Graduação em Genética, 2012. (Congresso)

Avaliação da Relação entre Polimorfismos nos Genes Beta-Defensina e MBL e a Predisposição da Infecção pela *Leishmania infantum chagasi* em Cães de Serra Talhada-PE.

8. IV Curso de Bioinformática: Análise de Dados Moleculares, 2012. (Outra)

.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2011. (Outra)

Avaliação da Infecção Natural de Flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) pela *Leishmania infantum chagasi* em uma área de transmissão ativa de Leishmaniose Visceral no Sertão de Pernambuco.

10. Apresentação Oral no(a) Entomol 4 - WORKSHOP DE GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR DE INSETOS VETORES DE DOENÇAS TROPICAIS, 2010. (Outra)

Sandfly Database: Development of an Integrated Platform of Biological and Molecular Data of Sandflies (Diptera: Psychodidae) of Medical and Veterinary Importance..

11. Apresentação (Outras Formas) no(a)X - MEETING 6Th International Conference of Brazilian Association for Bioinformatics and Computational Biology, 2010. (Outra)

Sandfly Database: Development of an Integrated Platform of Biological and Molecular Data of Sandflies (Diptera: Psychodidae) of Medical and Veterinary Importance..

12. I Workshop Pernambucano de Bioinformática, 2009. (Outra)

13. Apresentação Oral no(a) VIII Jornada de Ciências das Faintvisa, 2009. (Oficina) Microestruturas de Cogumelos Basidiomycetos.

14. Apresentação (Outras Formas) no(a)X-MEETING 5º International Conference Of The Brazilian Association For Bioinformatics And Computational Biology, 2009. (Outra)

Sandfly database:Development of an Integrated Plataform of Biological and Molecular Data of Sandflies of Medical and Veterinary Importance (Diptera: Psychodidae).

15. Entomol 3, 2008. (Outra)

16. III Erebio NE - I Erebes, 2008. (Oficina)

17. VI Congresso Internacional de Educação - "Educação e Qualidade: Um grande desafio", 2008. (Congresso)

18. VI Jornada de Ciências das FAINTVISA, 2008. (Outra)

19. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Encontro sobre Aquecimento Global na UFRPE, 2007. (Encontro)
O Aquecimento Global: Vulnerabilidade que atinge a biodiversidade.

20. Apresentação de Poster / Painel no(a) I Encontro sobre Aquecimento Global na UFRPE, 2007. (Congresso)
Aquecimento Global: Vulnerabilidade que atinge a Biodiversidade.

21. VII Jornada de Ciências, 2007. (Encontro)

22. I Encontro Biológico de estudos Independentes, 2005. (Oficina)

23. III Congresso e VI Encontro Norte e Nordeste da Sociedade de Zoólogos do Brasil, 2005. (Congresso)

Organização de evento

1. SILVA, L. G.

I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011. (Outro, Organização de evento)

Referências adicionais : Brasil/Português.

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. DANTAS-TORRES, F.; Figueredo LA; SILVA, L. G.

Participação em banca de Adelmo Vieira Rêgo Júnior. UTILIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA CARACTERIZAÇÃO DE FONTES ALIMENTARES DE FLEBOTOMÍNEOS (DIPTERA: PSYCHODIDAE), 2015 (Ciências Biológicas)

Universidade Federal de Pernambuco

Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	6
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	12
Apresentações de trabalhos (Comunicação).....	2
Apresentações de trabalhos (Conferência ou palestra).....	1
Apresentações de trabalhos (Outra).....	3

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (aperfeiçoamento).....	2
--	---

Orientações

Orientação concluída (iniciação científica).....	2
--	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	7
Participações em eventos (simpósio).....	1
Participações em eventos (oficina).....	3
Participações em eventos (encontro).....	3
Participações em eventos (outra).....	9
Organização de evento (outro).....	1
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1