

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIEL GRAZIANI

ANÁLISE MOLECULAR DE ISOLADOS DO GÊNERO *LEISHMANIA* E CLÍNICA DE
PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
ATENDIDOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Dr^a Raimunda Nonato R. Sampaio
Coorientadora: Prof^a Dr^a Beatriz Dolabela de Lima

BRASÍLIA
2013

*Dedico este trabalho aos portadores de leishmaniose,
motivo maior do trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades que colocou em minha vida, pelos obstáculos que me ajudou a superar, pelas pessoas que me permitiu conhecer e pelas vitórias que me fez alcançar. Sou grato por tudo e por todos que estão em minha vida.

Agradeço às minhas mães Maria e Elisa que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins, me apoiando, incentivando e ensinando. Sem vocês eu jamais teria chegado até aqui.

Agradeço à minha namorada, Lanusse, pela paciência, amor, ajuda e incentivo. Obrigado por sempre estar ao meu lado e por construir sua história junto a minha multiplicando minhas alegrias.

Agradeço à Prof^a Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio pela oportunidade dada a mim, pois sem ao menos me conhecer, confiou um projeto tão promissor. Sou grato por todas as experiências compartilhadas, por todos os ensinamentos, orientações e principalmente pela atenção que sempre dispensou a mim.

Agradeço à Prof^a Beatriz Dolabela de Lima pela paciência, pelo entusiasmo, pela confiança, pela amizade e principalmente por ter me ajudado no momento que mais precisei. A senhora é o exemplo de Bióloga e de ser humano que almejo ser.

Agradeço aos colegas do Laboratório da Biologia do Gene que me receberam tão bem e pacientemente compartilharam comigo seus conhecimentos. Agradeço em especial ao Ricardo Camargo, Agenor de Castro, Stenia Magalhães, Aurilene Monteiro e Marinez Viana que contribuíram com a realização deste trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Dermatômicoologia por me ajudarem sempre que precisei em especial o Dr. Ciro Gomes, Dr. Killarney Athaide, aos técnicos Tércio Rodrigues e Viviane Medeiros, que com seus conhecimentos sobre Leishmaniose, me ensinaram e me aconselharam da melhor maneira possível.

Agradeço ao acadêmico de medicina e aluno de iniciação científica Nathan Drummond pela amizade e por ter contribuído ativamente na execução deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos do HBDF que me apoiaram desde minha chegada em Brasília, em especial ao meu amigo Rui Pires que me acolheu e me ajudou.

Aos meus amigos da UPA do Núcleo Bandeirante que, sempre de bom humor, tornaram meus dias mais alegres.

“Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso.”
(Albert Einstein)

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana é um grave problema de saúde pública no Brasil e em vários países do mundo. As diferentes manifestações clínicas podem variar desde uma lesão localizada até múltiplas lesões distribuídas por todo o corpo. Fatores inerentes às diferentes espécies do parasita contribuem para a diversidade clínica e para a patogênese da doença. O objetivo deste trabalho foi estudar através de metodologias moleculares isolados de *Leishmania* e relacionar com os aspectos clínicos dos pacientes fontes. A identificação foi realizada através da PCR do gene miniexon, PCR-RFLP e sequenciamento da região ITS1 do rDNA. Foram analisados 38 isolados provenientes de 36 pacientes e foram identificados: 22 *L. (V.) braziliensis*, 3 *L. (V.) panamensis*, 1 *L. (V.) guyanensis*, 1 *L. (V.) utingensis*, 2 *L. (V.) spp.*, 8 *L. (L.) amazonensis* e 1 *L. (L.) infantum*. Os pacientes que predominaram eram do sexo masculino em idade reprodutiva com lesões nos membros superiores e inferiores. Os pacientes infectados pelo subgênero *Viannia* desenvolveram em 81% dos casos leishmaniose cutânea. Apenas pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* desenvolveram leishmaniose mucosa. Um paciente infectado por *L. (V.) braziliensis* e co-infectado por HIV desenvolveu a Síndrome de Reconstituição Imune. Entre os oito pacientes infectados pela espécie *L. (L.) amazonensis*, seis apresentaram leishmaniose cutânea, um apresentou a forma cutânea disseminada e um apresentou leishmaniose cutânea difusa. O único paciente infectado por *L. (L.) infantum* apresentou três lesões cutâneas ulceradas. A técnica RAPD permitiu comparar *fingerprints* de isolados de um mesmo paciente a fim de analisar as modificações ao longo de sucessivas recidivas. Através desta técnica foi possível caracterizar duas cepas de *L. (L.) amazonensis* como idênticas, isoladas de dois pacientes com formas clínicas graves e raras (LCD e LD). Neste estudo relata-se pela primeira vez como agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar no Brasil as espécies: *L. (V.) utingensis* e *L. (L.) infantum*. A *L. (V.) utingensis* é descrita pela primeira vez infectando humanos e a *L. (L.) infantum* desencadeando leishmaniose cutânea. Devido ao amplo espectro clínico causado pelas espécies de *Leishmania*, o diagnóstico molecular pode ser útil para o prognóstico clínico rotineiro da leishmaniose bem como para compreensão da ocorrência e comportamento de cada espécie.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana; Formas clínicas; Diagnóstico Molecular.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious public health problem in Brazil and in several countries worldwide. The different clinical manifestations may vary since a localized lesion until multiple lesions distributed throughout the body. Factors inherent to the different species of the parasite contribute to the clinical diversity and pathogenesis of the disease. The aim of this work was to study through molecular methodologies of *Leishmania*'s isolates and relate them with clinical aspects of the patient's sources. The identification was performed by PCR miniexon gene, PCR-RFLP and sequencing of ITS1 from rDNA gene. In this study 38 isolates from 36 patients were analyzed and were identified: 22 *L. (V.) braziliensis*, 3 *L. (V.) panamensis*, 1 *L. (V.) guyanensis*, 1 *L. (V.) utingensis*, 2 *L. (V.) spp*, 8 *L. (L.) amazonensis* and 1 *L. (L.) infantum*. Patients were males in reproductive age with lesions in upper and lower limbs. The patients infected by the *Viannia* subgenus have developed cutaneous leishmaniasis, in 81% cases. Only patients infected by *L. (V.) braziliensis* developed mucosal leishmaniasis. One patient infected by *L. (V.) braziliensis* and co-infected with HIV developed immune reconstitution syndrome. Among the eight patients infected by the *L. (L.) amazonensis*, six have developed cutaneous leishmaniasis, one presented disseminated cutaneous form and the other had diffuse cutaneous leishmaniasis. The single patient infected by *L. (L.) infantum* has showed an atypical form of cutaneous leishmaniasis. The RAPD technique allowed us to compare *fingerprints* of isolates from the same patient, in order to analyze changes over successive recurrences. By using this technique, it was possible to characterize two strains of *L. (L.) amazonensis* as identical, these was isolated from two patients with severe clinical and rare forms (LCD and LD). The present study reports, for the first time as etiologic agents of cutaneous leishmaniasis in Brazil, the following species: *L. (V.) utingensis* and *L. (L.) infantum*. *L. (V.) utingensis* is first described infecting humans and *L. (L.) infantum* unleashing cutaneous leishmaniasis. Due to the wide clinical spectrum caused by *Leishmania* species, the molecular diagnosis can be useful for routine clinical prognosis of leishmaniasis as well as for understanding the occurrence and behavior of each species.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; Clinical forms; Molecular Diagnostics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana notificados no Brasil - 1990 a 2011 (Adaptado de 4)
- Figura 2 O ciclo biológico da leishmaniose no vetor e no hospedeiro humano (Adaptado de 15)
- Figura 3 Mapa genômico da *Leishmania (V.) braziliensis* (32)
- Figura 4 Organização do DNA ribossomal de tripanossomatídeos. Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor); LSU (subunidade maior); Subunidade 5,8; NTS = Região espaçadora não transcrita; ETS: Região espaçadora transcrita externa; ITS: Região espaçadora transcrita interna (44)
- Figura 5 Desenho esquemático do estudo
- Figura 6 Simulação no software *NEBcutter 2.0* de padrões de bandas esperados entre diferentes espécies de *Leishmania* em gel de agarose a 2% (62)
- Figura 7 Comparação entre as regiões discriminatórias das sequências nucleotídicas da região ITS1 das espécies do gênero *Leishmania*: *L. peruviana* (FN398340), *L. guyanensis* (FJ753390), *L. panamensis* (FJ948446), *L. utingensis* (FN398153), *L. amazonensis* (FJ753372), *L. infantum* (FM164420) e *L. braziliensis* (JQ061322)
- Figura 8 Os três diferentes padrões encontrados nas amostras analisadas no estudo. Produtos amplificados por PCR da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (A) antes e (B) após a digestão pela enzima Hae III. Gel de agarose a 2%
- Figura 9 Gel utilizado para identificação das amostras por PCR do gene Miniexon. LA= *L. (L.) amazonensis*; LB= *L. (V.) braziliensis*; CN= controle negativo; Amostras: 01, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 15, 37, 28. Gel de agarose a 2%
- Figura 10 Gel utilizado para identificação das amostras por RFLP da região ITS1. Produtos amplificados por PCR da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (A) antes e (B) após a digestão pela enzima Hae III. LA= *L. (L.) amazonensis*; LB= *L. (V.) braziliensis*; LI= *L. (L.) infantum*; Amostras: 35, 40, 22 e 27; CN= controle negativo. Gel de agarose a 2%

- Figura 11 Comparação entre as sequências nucleotídicas da região ITS1 das amostras com sequências cadastradas no *NCBI*. *L. guyanensis* (FN398330) com isolado 05; *L. panamensis* (FN398329) com isolados 10, 37 e 38; *L. utingensis* (FN398153) com o isolado 32; *L. infantum* (KC347301) com o isolado 40; *L. braziliensis* (FN398335) com todos os isolados identificados como *L. braziliensis*; *L. amazonensis* (FJ753373) com todos os isolados identificados como *L. amazonensis*; Os isolados 31 e 42 não se alinharam com nenhuma sequência cadastrada no *NCBI*
- Figura 12 Comparação entre as manifestações clínicas de LTA causadas por diferentes espécies de *Leishmania*
- Figura 13 Frequência de casos de acordo com o aspecto das lesões causadas em pacientes infectados por espécies do gênero *Leishmania*. Número = Frequência dos casos
- Figura 14 Distribuição dos prováveis locais de infecção por *Leishmania* de acordo com Identificação do respectivo isolado
- Figura 15 Cladograma com isolados do subgênero *Viannia* relacionando espécies com a manifestação clínica das lesões
- Figura 16 *Fingerprints* comparativos obtidos através da técnica RAPD com três diferentes *primers* (PR497, PR498 e PR499). A) Comparação entre padrões de bandas gerados pelas amostras 12 (Leishmaniose Mucosa) e 21 (Síndrome de Reconstituição Imune). B) Comparação entre padrões de bandas gerados pelas amostras 37 (Recidiva Cútis) e 38 (Nova lesão)
- Figura 17 Cladograma com isolados do subgênero *Leishmania* contendo espécies e seus respectivos dados clínico-epidemiológicos

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Comparação entre os aspectos clínicos e imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por diferentes espécies de *Leishmania*
- Tabela 2 Reagentes utilizados para amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal
- Tabela 3 Ciclos utilizados para amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal
- Tabela 4 Reagentes utilizados para digestão enzimática do fragmento amplificado ITS1.
- Tabela 5 Demonstrativo de espécies de *Leishmania* cadastradas no Genbank com a sequência *ITS1* - Fragmentos inteiros e posterior a digestão pela enzima *Hae III*
- Tabela 6 Reagentes utilizados para amplificação do gene miniexon
- Tabela 7 Ciclos utilizados para amplificação do gene miniexon
- Tabela 8 Reagentes utilizados para RAPD
- Tabela 9 Ciclos utilizados para RAPD
- Tabela 10 Tabela 10 – Identificação da espécie de 38 isolados oriundos de pacientes portadores de LTA e relação com forma clínica e procedência
- Tabela 11 Distribuição de 36 casos de LTA atendidos no HUB de acordo com a espécie infectante e faixa etária
- Tabela 12 Distribuição dos locais do corpo dos pacientes portadores de LTA acometidos por diferentes espécies de *Leishmania*
- Tabela 13 Comparação entre as drogas utilizadas para o tratamento dos pacientes portadores de LTA acometidos por diferentes espécies de *Leishmania*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DF	Distrito Federal
HUB	Hospital Universitário de Brasília
ID	Identificação
IDRM	Intradermorreção de Montenegro
kDNA	DNA do cinetoplasto
ITS1	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>Lu.</i>	<i>Lutzomyia</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutâneo-Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
Multialin	Multiple sequence alignment with hierarchical clustering
NNN	McNeal, Novy e Nicolle
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RAPD	<i>Random amplified polymorphic DNA</i>
RNA	Ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNIP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UnB	Universidade de Brasília
<i>V.</i>	<i>Viannia</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	13
1.2	ASPECTOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	14
1.3	ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	16
1.4	ASPECTOS MOLECULARES E GENÉTICOS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	18
1.5	ESPAÇADORES INTERNOS TRANSCRITOS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	20
1.6	O GENE MINIEXON DOS PARASITOS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	21
1.7	ANÁLISE DO POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	21
2.	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	LOCAL DO ESTUDO	24
3.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO	24
3.3	COLETA E CULTURA DAS AMOSTRAS	25
3.4	CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	25
3.5	DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS	26
3.6	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS	26
3.7	ANÁLISE POR PCR DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL	26
3.8	ANÁLISE DO POLIMORFISMO EM FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)	27
3.9	ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL	29

3.10	CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO POR PCR DO GENE MINIEXON	30
3.11	AMPLIFICAÇÕES ALEATÓRIAS DE DNA (RAPD)	31
3.12	ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES PORTADORES DE LTA	32
3.13	QUESTÕES ÉTICAS	33
4.	RESULTADOS	34
4.1	AMOSTRAS ANALISADAS	34
4.2	IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE <i>Leishmania</i> PROVENIENTES DE PACIENTES ATENDIDOS NO HUB	34
4.3	ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS DE PACIENTES PORTADORES DE LTA ATENDIDOS NO HUB	38
4.4	ANÁLISE DO POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO	43
5.	DISCUSSÃO	48
6.	CONCLUSÃO	53
7.	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma antropozoonose considerada um grave problema de saúde pública no Brasil e em vários países tropicais. É transmitida por vetores flebótomos e têm como agente etiológico o protozoário do gênero *Leishmania* que pode parasitar diferentes espécies de animais silvestres e domésticos. No homem pode causar lesões na pele e/ou em mucosas (1).

Essa doença foi listada entre as seis doenças infecto-parasitárias mais prevalentes no mundo. As leishmanioses ameaçam cerca de 350 milhões de homens, mulheres e crianças que habitam áreas de risco em 88 países ao redor do mundo e atualmente estima-se que 12 milhões de pessoas em todo o planeta estejam infectadas (2).

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com casos autóctones em todas as regiões brasileiras (1). Estudos realizados desde a década de 70 demonstraram que esta antropozoonose encontra-se em processo de expansão geográfica em todo o Brasil (3). A média de casos notificados entre os anos de 1990 a 2011 no Brasil é de 27.500 novos casos por ano tendo como o ano recordista 1995 com 35.748 casos (4). A Figura 1 mostra o número de casos notificados por ano no Brasil.

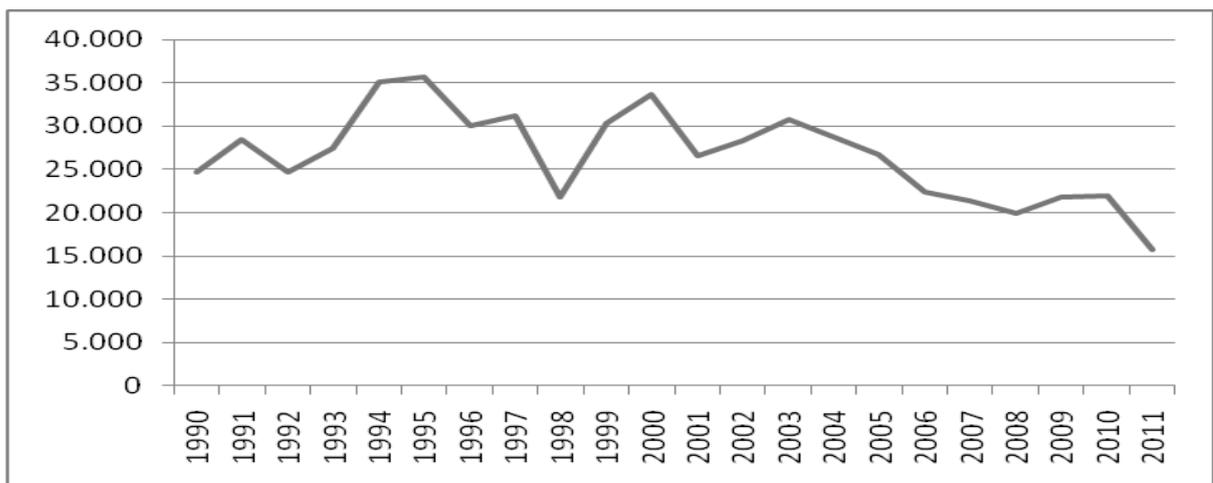


Figura 1 – Casos de leishmaniose tegumentar americana notificados no Brasil - 1990 a 2011 (Adaptado - 4)

A LTA é representada por um grupo de doenças com características clínicas e imunopatológicas distintas. Mesmo não sendo completamente elucidados, são

apontados vários fatores como possíveis interferentes nas diferenças clínicas, entretanto destaca-se a resposta imune do hospedeiro e características inerentes ao parasito, que podem aumentar ou atenuar o seu potencial patogênico (5).

Essa parasitose, que inicialmente se restringia às regiões florestais e acometiam populações que eventualmente penetravam nas matas, passa cada vez mais por modificações em seu caráter epidemiológico. Em áreas de colonização com florestas remanescentes e poucos animais silvestres, constata-se cada vez mais uma adaptação do vetor ao ambiente domiciliar onde os animais domésticos como o cão, roedores domésticos e sinantrópicos passam a atuar como reservatórios da doença (6). A expansão progressiva das leishmanioses seja pela maior ação antrópica ou pelas mudanças em seus perfis epidemiológicos, com a adaptação de seus agentes etiológicos a novos hospedeiros e consequente introdução no ambiente domiciliar, torna a leishmaniose um modelo de doença emergente (7).

1.2 ASPECTOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Leishmania*

A LTA é causada por protozoários parasitos digenéticos (heteroxênicos) pertencentes a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* que agrupa um grande número de espécies. No Brasil, as três espécies principais de leishmania reponsáveis pela LTA são: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; e mais recentemente, *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* foram identificadas como novos agentes da doença (1). No Distrito Federal foram identificados como agentes etiológicos da LTA a *Leishmania (L.) amazonensis* e a *Leishmania (V.) brazilienses*, sendo que a última é a espécie de maior ocorrência (8, 9).

A principal via de infecção é por meio da inoculação dos parasitos no hospedeiro através da picada da fêmea do inseto pertencente a ordem Diptera, família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, do gênero *Lutzomyia* no momento da hematofagia (10, 11). No Brasil existem mais de 200 espécies de flebotomíneos envolvidos na transmissão das leishmanioses (12, 13). Atualmente, no Distrito Federal, atribui-se preponderantemente o papel vetorial da LTA às seguintes espécies de flebótomos: *Lu. intermedia*; *Lu. whitmani* e *Lu. flaviscutellata* (8).

O ciclo se inicia quando a fêmea do flebótomo suga o sangue de um animal infectado e ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas, tipicamente

ovóides ou esféricas. No intestino do inseto essas células se rompem liberando as formas amastigotas que se diferenciam em promastigotas e multiplicam por divisão binária e em seguida diferenciam-se em formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas. Em seguida, formas infectantes migram para a proventrículo do inseto vetor após aproximadamente quatro a cinco dias. A esta altura, bloqueiam o proventrículo, podendo então, durante um novo repasto sanguíneo, serem inoculadas em novo hospedeiro. Posteriormente as formas promastigotas no hospedeiro são internalizadas especialmente pelos macrófagos. Nestas células, o parasito se diferencia na forma amastigota que se multiplica continuamente até que o macrófago se rompa e libere parasitos aptos a infectar novas células (14) (Figura 2).

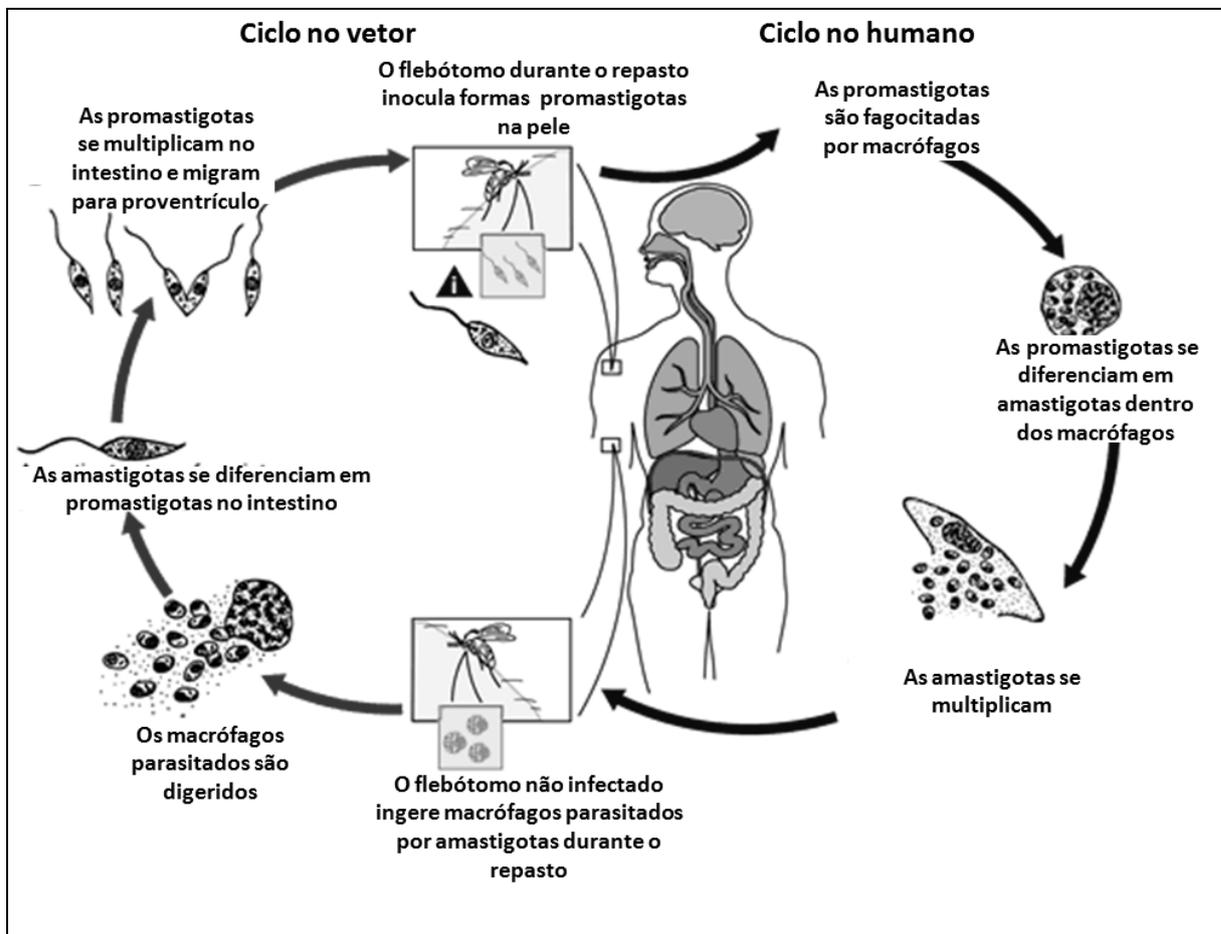


Figura 2 – O ciclo biológico da leishmaniose no vetor e no hospedeiro humano (Adaptado de 15)

É importante destacar que cada espécie de *Leishmania* apresenta características próprias que permitem sua evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Durante a fase de metaciclogênese, ocorre a expressão de moléculas de superfície com características modificadas, que quando há interação com a célula

do hospedeiro, impedem a deposição de complexos do sistema complemento (promotores da lise celular) além de interferirem na ativação de componentes terminais do complemento, protegendo o parasito (1). Os eventos que ocorrerão quando as promastigotas se transformarem em amastigotas no interior dos macrófagos dependerão da resposta do organismo e da espécie do parasito. Quando acontece a recuperação espontânea da infecção ocorre o desenvolvimento da imunidade celular, quando não há uma resposta imune celular adequada, os parasitos atingem as células do sistema retículo endotelial possibilitando a manifestação da doença. O período habitual de incubação é de três a dezoito meses, podendo o parasito permanecer latente por um tempo superior até que aconteça um comprometimento da imunidade celular e desenvolva a doença (16).

Geralmente quando inoculados, os parasitos da espécie *L. (V). braziliensis*, permanecem no local desencadeando um infiltrado na pele, principalmente por macrófagos que ficam repletos de amastigotas, e nessa fase, com poucos linfócitos. Com o desenvolvimento da lesão aparecem mais linfócitos e um infiltrado superficial na pele. Nos meses seguintes, há um aumento gradual no número de amastigotas e macrófagos, deixando um infiltrado granulomatoso constituído de linfócitos, plasmócitos, células epiteliais e células gigantes multinucleadas. Depois que estes elementos aparecem, os macrófagos deixam de proliferar e diminui simultaneamente o número de parasitos. Normalmente a reação inflamatória diminui (17).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As diferentes manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, da relação do parasito com o seu hospedeiro e, portanto da resposta imune do hospedeiro (18). Sendo assim, as diferentes espécies de *Leishmania* podem causar Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Disseminada (LD), Leishmaniose Mucosa (LM) e Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) (Tabela 1).

Tabela 1 – Comparação entre os aspectos clínicos e imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana causada por diferentes espécies de *Leishmania*

Formas Clínicas	Principais espécies envolvidas	Achados clínicos	Cura espontânea	IDRM	Citocinas	Linfo-proliferação	Esfregaço	Resposta terapêutica
LCL	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i>	Úlcera limitada.	Possível	POS	↑ IFN-γ ↑ TNF-α	POS	Escassez parasitária	Adequada
LM	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) panamensis</i>	Lesão destrutiva septo/palato.	Não	POS	↑ IFN-γ ↑↑ TNF-α	POS	Escassez/ ausência parasitária	Adequada
LD	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (V.) braziliensis</i>	Múltiplas lesões papulares, e de aparência acneiforme. Número de lesões >10 a centenas.	Não	POS	↑ IFN-γ ↑↑ TNF-α	POS	Escassez parasitária	Inadequada
LCD	<i>L. (L.) amazonensis</i> <i>L. (L.) aetiopica</i> <i>L. (L.) mexicana</i>	Placas infiltradas e nódulos não ulcerados disseminados.	Não	NEG	0 IFN-γ ↓ TNF-α	NEG	Abundância parasitária	Inadequada

LC =Leishmaniose cutânea; LM=Leishmaniose Mucosa; LCD = Leishmaniose Cutânea Difusa; LD=Leishmaniose Disseminada (1,17,19, 20, 21, 22).

A forma cutânea representa o acometimento primário da pele, podendo se apresentar sob a forma cutânea (LC) e cutânea disseminada (LD).

A LC ocorre geralmente no local da picada do flebótomo após um período de incubação médio de 30 dias, podendo ocorrer até em anos. Inicialmente, surge uma lesão eritemato-papulosa, única ou múltipla, evoluindo para pápulo-pustulosa, posteriormente úlcero-crostosa, e finalmente assumindo o aspecto característico de úlcera de contornos circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolores e fundas com granulações grosseiras (22).

Uma expressão clínica grave de leishmaniose é a forma Cutânea Disseminada caracterizada por aparecimento de múltiplas lesões papulares (>10 a centenas), e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais. Nessa manifestação clínica os pacientes apresentam títulos elevados de anticorpos séricos anti-*Leishmania*, resposta variável a intradermoreação de Montenegro (IDRM) e baixo número de parasitos através da pesquisa direta. A forma de LD pode ser observada em cerca de 1% dos casos e alguns pacientes apresentam mais de 700 lesões. Esta forma pode ser causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (23, 24).

A Leishmaniose Mucosa (LM) é uma forma de leishmaniose cutânea com elevada morbidade que acomete comumente a mucosa nasal, e menos frequentemente, os lábios, boca, faringe e laringe. Geralmente está associada com

as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis* e raramente com a *L. (L.) amazonensis*. Estima-se que concomitantemente ou após a resolução da leishmaniose cutânea (LC) causada por *L. (V.) braziliensis*, cerca de 3% dos pacientes desenvolvem a forma mucosa da doença. Acredita-se que a propagação dos parasitos, desde a lesão cutânea até a mucosa possa ocorrer por via linfática (20). Neste caso, os pacientes apresentam uma forte reação de hipersensibilidade do tipo tardia ao antígeno de *Leishmania* (IDRM), intensa imunidade mediada por células e produção de níveis elevados de IFN- γ e TNF- α . Por outro lado a imunidade humoral específica é menos exacerbada, com baixa produção de anticorpos (25,26).

A Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) é uma forma rara de leishmaniose causada por *L. (L.) aetiopica*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* (19). Nesta forma clínica as lesões são geralmente em grande número e com aspecto eritematoso ou nodular, porém sem ulceração (24). Na LCD não há resposta imune do tipo tardia ao antígeno do parasito *in vivo* (DTH ou reação de Montenegro negativa) nem *in vitro* (resposta linfoproliferativa) (26, 27).

1.4. ASPECTOS MOLECULARES E GENÉTICOS DO GÊNERO *Leishmania*

Os parasitos pertencentes da ordem Kinetoplastida, como os do gênero *Leishmania*, são caracterizados pela presença de uma estrutura subcelular conhecida como cinetoplasto, uma região distinta da mitocôndria. Geralmente este é encontrado próximo ao corpúsculo basal que está localizado na base do flagelo, porém não relacionado à motilidade. O cinetoplasto consiste em uma estrutura condensada em forma de disco composto de uma rede de milhares de DNAs circulares topologicamente interligados formando o DNA mitocondrial (kDNA). A rede contém dois tipos de moléculas de DNA: os maxicírculos presentes em algumas cópias (20 a 50) e os minicírculos representados por milhares de cópias (5.000-10.000) (28).

O genoma nuclear dos parasitos do gênero *Leishmania* tem aproximadamente 35Mb, organizado em 34-36 cromossomos que não se encontram condensados em nenhum momento do ciclo celular (Figura 3) (29). Seus cromossomos são lineares com tamanho variado, entre 200 a 4000kb, apresentam telômeros, entretanto, centrômeros não foram descritos (30). Existe ainda muita divergência sobre a ploidia desse gênero (31).

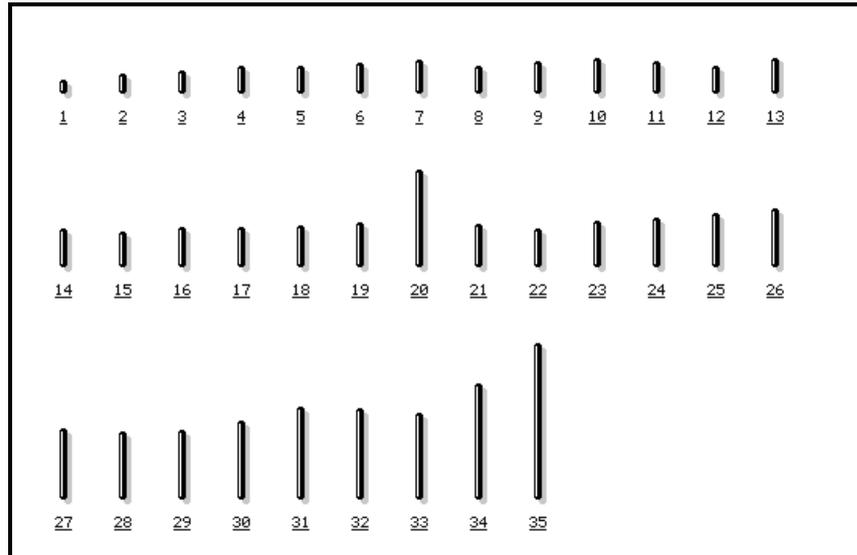


Figura 3 – Mapa genômico da *Leishmania (V.) braziliensis* (32)

Os genes dos tripanossomatídeos são na maior parte organizados em *tandem* e são caracterizados pela ausência de introns (29, 31, 33). Os tripanossomatídeos apresentam as três RNAs polimerases clássicas (RNA polimerases I, II e III) (34). A maioria dos genes é transcrito policistronicamente e constitutivamente e o nível de mRNA maduro é regulado pós-transcricionalmente por estabilização do mRNA e modulação da estabilidade dos mRNAs e sua tradução (35). A estabilização do mRNA pode ocorrer no núcleo, antes do processamento, ou após a geração do mRNA maduro (36). A fim de gerar mRNAs maduros estáveis, as unidades policistrônicas são submetidas ao trans-splicing pela inserção de uma sequência líder (SL) a partir do RNA minixon de cerca de quarenta nucleotídeos na extremidade 5' de todos os mRNAs e de uma cauda de poli-A na extremidade 3' (31, 37).

A *Leishmania* se reproduz assexuadamente por fissão binária. Todavia, é descrito na literatura a existência de troca de material genético no interior do flebótomo (38, 39).

É possível que a variabilidade genética desempenhe um papel em parte no amplo espectro da doença (18). Além disso, o parasito exibe extenso polimorfismo genético em diversas regiões do seu genoma bem como plasticidade na expressão de epítomos de superfície celular (40). Entretanto, o papel do parasito no desenvolvimento das distintas formas clínicas é até o presente pouco elucidado.

Por isso, estudos com o objetivo de associar o polimorfismo genotípico dos parasitos do gênero *Leishmania* com as diferentes formas clínicas se tornam cada

vez mais necessários a fim de elucidar aspectos da relação parasito/hospedeiro que ainda não foram esclarecidos (18, 41, 42).

1.5 ESPAÇADORES INTERNOS TRANSCRITOS DO CLUSTER GÊNICO DOS RNAS RIBOSSOMAIS DO GÊNERO *Leishmania*

As moléculas de rRNA que compõe o ribossomo são transcritas na forma de um precursor, o pré-rRNA. Em seguida, este é processado para formar os seguintes rRNAs maduros: *SSU* (*small subunit*), *5.8S* e *LSU* (*large subunit*) (43). Além das sequências que formarão as moléculas maduras, encontram-se presentes no pré-rRNA os denominados espaçadores transcritos, sendo que aqueles que se posicionam mais a 5' é o espaçador externo transcrito e os demais são os espaçadores internos transcritos (*ITS - Internal transcribed spacer*). Assim, o locus do *rDNA* se organiza de forma similar (Figura 4). Desta forma, existem sequências altamente conservadas mantidas por forte pressão seletiva. Em contrapartida, as sequências espaçadoras se encontram sob pressão de seleção neutra, o que pode originar uma variabilidade nessas regiões (43). Sendo assim, essas sequências podem ser úteis para reconstruções filogenéticas e estudos de evolução molecular.

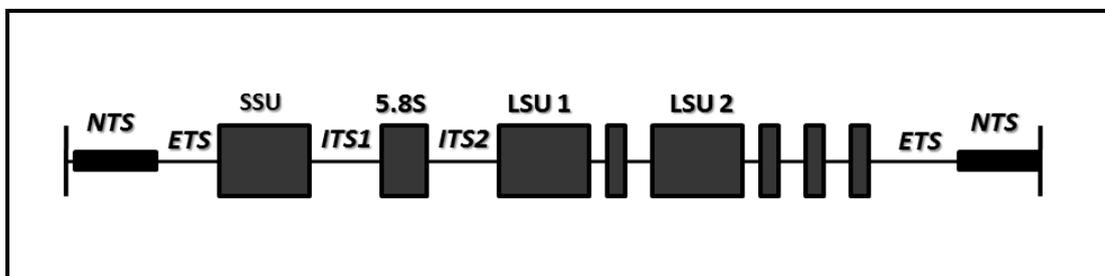


Figura 4 – Organização do *DNA* ribossomal de tripanossomatídeos. Subunidades conservadas: SSU (subunidade menor); LSU (subunidade maior); Subunidade 5,8; NTS = Região espaçadora não transcrita; ETS: Região espaçadora transcrita externa; ITS: Região espaçadora transcrita interno (Adaptado de 44)

Existem vários exemplos de trabalhos que utilizaram a região ITS do *rDNA* como região de estudo para distinguir espécies e estimar diversidade do gênero *Leishmania* no Brasil e em todo mundo. No nordeste brasileiro, ao pesquisar a diversidade genética da *Leishmania (L.) amazonensis*, foi possível detectar polimorfismo entre os isolados estudados através do sequenciamento da região ITS (45). Através da técnica PCR-RFLP da região ITS1 foi possível estimar a diversidade de parasitos do gênero *Leishmania* em 50 achados clínicos no estado do Acre (46). Em Israel, foi testada a técnica PCR-RFLP da região ITS1 como ferramenta para o

diagnóstico da leishmaniose tegumentar e foi observado 70% de positividade em relação aos outros métodos de diagnóstico. Neste estudo foi possível identificar as principais espécies de interesse médico (47).

1.6 O GENE MINIEXON DOS PARASITOS DO GÊNERO *Leishmania*

O RNA miniexon tem um papel fundamental no processamento de pré-mRNA policistrônico de cinetoplastídeos. Durante o processamento, a sequência líder presente no RNA miniexon é adicionada na extremidade 5' de cada mRNA fornecendo a estrutura 5'-cap para a molécula (48). Essa estrutura protege a extremidade 5' da ação de exonucleases e parece estar envolvida no reconhecimento pelo ribossomo do local de início da síntese de proteínas (49).

Os genes do miniexon se apresentam em *tandem* com sequências repetidas de 100 a 200 cópias (50). A região transcrita é altamente conservada, diferente da região espaçadora não transcrita, que se apresenta em sequências diferentes entre as espécies de *Leishmania* (51). Essas sequências encontram-se presentes em todos os cinetoplastídeos e ausentes no genoma dos mamíferos hospedeiros e dos insetos vetores, por isso é considerado um alvo altamente específico e sensível para o diagnóstico de LTA (52, 53). Foi demonstrando que a PCR do gene miniexon é eficaz para identificar o gênero *Leishmania* testado em 46 isolados (50). Outro estudo permitiu constatar a alta sensibilidade da PCR do gene miniexon como diagnóstico em comparação com cultura e sorologia (52). Em um estudo realizado no sudeste do Irã almejando identificar o agente causador da LC, foi possível concluir que essa região é um alvo eficaz para diagnóstico de leishmaniose (53).

1.7 ANÁLISE DO POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO DO GÊNERO *Leishmania*

A técnica de amplificação aleatória de DNA, *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*), é utilizada para caracterizar e avaliar a heterogeneidade genética em amostras de diferentes indivíduos permitindo fazer comparações diretas sobre diversidade genética e estrutura de populações sem necessidade do conhecimento prévio da sequência alvo (54, 55).

Essa técnica é uma variação do protocolo da PCR na qual se utiliza como *primer* um único oligonucleotídeo contendo de 9 a 10 bases, ao invés de um par de

primers. A sequência é construída com pouca especificidade, o que resulta na amplificação de sequências alvo desconhecidas (54, 55).

Para que haja a amplificação de um fragmento RAPD no genoma analisado é necessário que duas sequências de DNA complementares ao *primer* estejam suficientemente adjacentes e em orientação oposta, propiciando a polimerização exponencial deste segmento que pode ser visualizado na forma de uma banda no gel de eletroforese (54, 55, 56).

A técnica RAPD pode ser utilizada na obtenção de *fingerprints* genômicos de indivíduos, variedade e populações. A comparação entre os diferentes *fingerprints* tem permitido a análise da diversidade genética de *Leishmania* em vários estudos (57). Em um estudo realizado no Brasil em 1995, utilizando a técnica RAPD, foi possível identificar subgrupos de *L. (V.) braziliensis* de acordo com a sua origem geográfica (58). Outro estudo aplica a técnica RAPD para análise intraespecífica de espécies neotropicais de *Leishmania* (59). A técnica RAPD permitiu constatar a homogeneidade de isolados de *L. (L.) infantum* provenientes de cinco áreas endêmicas do Brasil (60).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar através de metodologias moleculares isolados do gênero *Leishmania* e relacionar com os aspectos clínicos de pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as espécies de *Leishmania* criopreservadas e isoladas de pacientes atendidos no HUB;
- Confirmar a identificação das espécies de *Leishmania* através de sequenciamento;
- Analisar o polimorfismo genético das mesmas por RAPD;
- Relacionar as espécies e sua variabilidade genética com a manifestação clínica e tratamento dos pacientes fontes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB) no Laboratório de Dermatologicologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia do Gene do Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Neste estudo, foram selecionadas culturas criopreservadas entre o período de Janeiro de 2008 a Janeiro de 2012. As amostras foram descongeladas e os respectivos DNAs foram extraídos e purificados (tópico 3.6). Em seguida foi realizada a PCR da região do miniexon (tópico 3.8) e a PCR da região ITS1 do rDNA (3.7). Após a organização das amostras por subgênero foi realizada a RAPD (tópico 3.9). Os produtos da PCR da região ITS1 do rDNA foram sequenciadas (Figura 5). Os respectivos prontuários foram analisados e os dados foram relacionados com os achados genéticos.

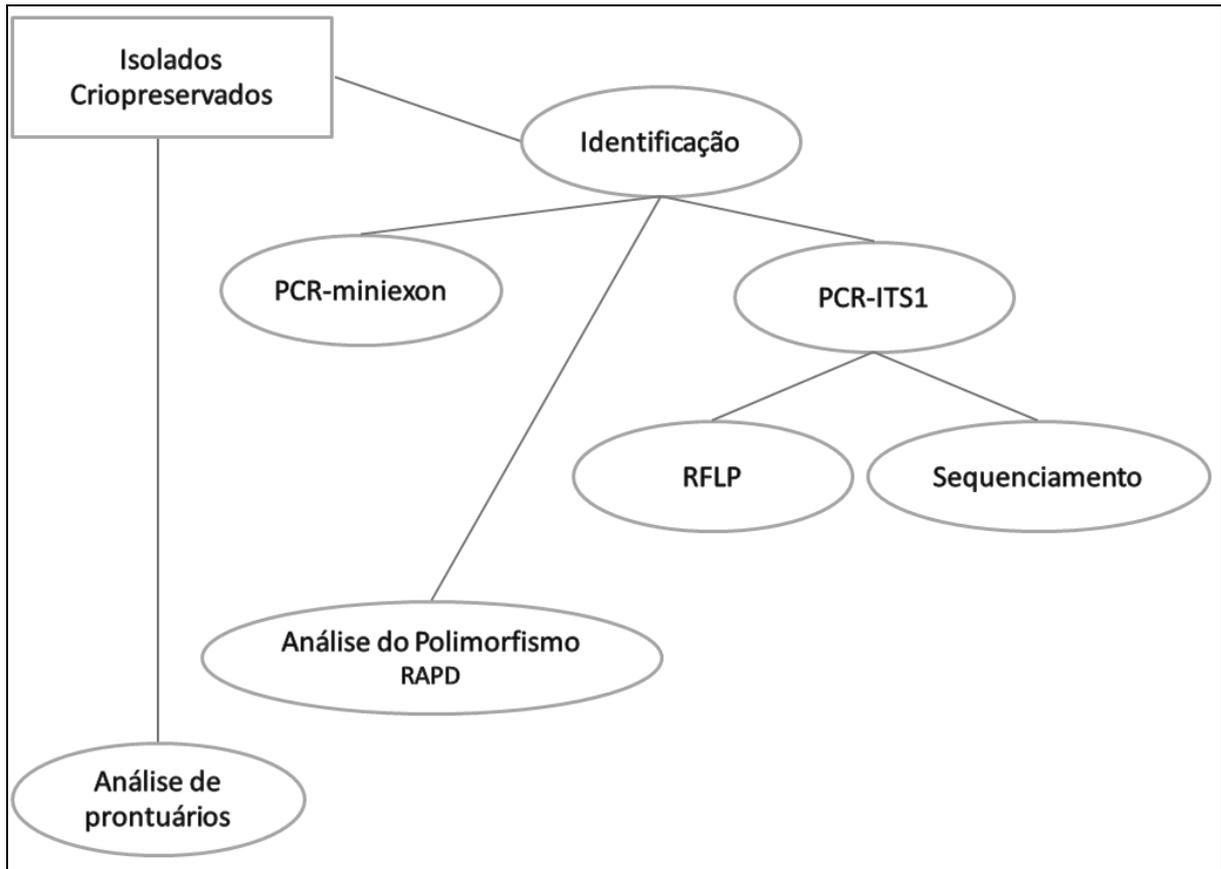


Figura 5 – Desenho esquemático do estudo

3.3 COLETA E CULTURA DAS AMOSTRAS

As amostras foram colhidas por médico dermatologista através da aspiração realizada na borda da lesão com seringa contendo 300 μL de solução fisiológica estéril e antibiótico (gentamicina a 0,2%). O aspirado foi dividido em 2 tubos (150 μL em cada) com meio NNN (McNeal, Novy e Nicolle). As tampas dos frascos de cultura foram previamente limpas com gaze e álcool 70%. Os tubos foram conservados em estufa 24-26°C e o material observado ao microscópio invertido (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) diariamente, até 30 dias. A visualização de formas promastigotas no meio confirmou a positividade.

3.4 CRIOPRESERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após o crescimento abundante de formas promastigotas, foi realizada a criopreservação do isolado de *Leishmania*. Neste caso os isolados foram armazenados em botijões de nitrogênio líquido para estudos futuros. Em um tubo vial, previamente identificado, contendo 200 μL de solução tampão fosfato-salino e glicerina acrescentou-se 200 μL da solução meio de cultura contendo os parasitos.

Em seguida, o tubo vial foi inicialmente colocado na parte superior do botijão de nitrogênio e após vinte e quatro horas o tubo foi devidamente alocado. Esse procedimento teve como finalidade evitar choques térmicos.

3.5 DESCONGELAMENTO DAS AMOSTRAS

Os tubos vial com os parasitos criopreservados foram retirados do botijão de nitrogênio. Após alguns minutos, ao menor sinal de descongelamento, foram retirados aproximadamente 100 µL da amostra com seringa de 1 mL. O material retirado foi inoculado dentro do tubo de cultura contendo NNN. Os tubos de cultura foram incubados em estufa a 26°C e observados em microscópio invertido a partir do dia seguinte.

3.6 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DAS AMOSTRAS

O DNA genômico oriundo das células das culturas criopreservadas foi purificado utilizando-se o Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen). Para sua quantificação, usou-se o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis.

3.7 ANÁLISE POR PCR DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL

Para amplificação da região espaçadora interna transcrita 1 (ITS1- *Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal foram utilizados os *primers* PR280 (5'-AGCTGGATCATTTTCCGATG-3') e PR281 (5'-TATGTGAGCCGTTATCCACGC-3') que se anelam nas sequências conservadas *SSU* e *5.8S* gerando um produto esperado de 250-300 pb.

Os reagentes utilizados para amplificação da região *ITS1* estão descritos na Tabela 2 e na Tabela 3 encontram-se os ciclos utilizados na PCR.

Tabela 2 – Reagentes utilizados para amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal

Reagente	Volume
Tampão Taq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	0,9 µL
dNTPs 10 mM	0,6 µL
BSA 100X	0,3 µL
Taq Polimerase (5 U/µL)	0,4 µL
PRIMER 280 10 µM	1,0 µL
PRIMER 281 10 µM	1,0 µL
DNA purificado amostral	10 ng
Volume final	30 µL

Tabela 3 – Ciclos utilizados para amplificação da região ITS1 do DNA ribossomal

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	1 min	1X
Desnaturação	94°C	30 seg	
Anelamento	56°C	30 seg	35X
Extensão	72°C	40 seg	
Extensão final	72°C	1 min	1X

Uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi analisada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os géis foram analisados em Fotodocumentador (Bio Rad).

3.8 ANÁLISE DO POLIMORFISMO EM FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO (RFLP)

A técnica de PCR-RFLP (*Polymerase chain reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) baseia-se na amplificação de uma determinada região do genoma e digestão desse fragmento com enzimas de restrição capazes de reconhecer e clivar a molécula de DNA em regiões específicas, no presente estudo a enzima Hae III que cliva regiões GG⁺CC. O sistema para digestão está descrito na Tabela 4. O sistema foi deixado em banho maria por 2 horas a 37°C.

Tabela 4 – Reagentes utilizados para digestão enzimática do fragmento amplificado ITS1.

Reagente	Volume
Produto amplificado (DNA)	20,0 µL
Tampão NEB2 10X	2,5 µL
Enzima <i>HaeIII</i> (10 U/µL)	0,5 µL
H ₂ O	2,0 µL
Volume final	25 µL

Os sistemas de digestão foram analisados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os géis foram analisados no fotodocumentador (Bio Rad).

Foi realizada uma pesquisa por espécies de *Leishmania* que apresentavam sequências nucleotídicas da região *ITS1* cadastradas no *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (61). As sequências das espécies encontradas foram analisadas no software *NEBcutter 2.0* (62). Assim obteve-se a Tabela 5:

Tabela 5 – Demonstrativo de espécies de *Leishmania* cadastradas no Genbank com a sequência *ITS1* - Fragmentos inteiros e posterior a digestão pela enzima *Hae III*

	Espécie	GenBank	Produto amplificado	Digestão com enzima <i>Hae III</i>
Subgênero <i>Leishmania</i>	<i>L. chagasi</i>	GU045591.1	244 pb	117+72+55 pb
	<i>L. infantum</i>	FM164420.1	245 pb	118+72+55 pb
	<i>L. donovani</i>	GQ367489.1	251 pb	117+79+55 pb
	<i>L. tropica</i>	FJ460457.1	252 pb	116+61+55+20 pb
	<i>L. major</i>	FJ460456.1	270 pb	136+134 pb
	<i>L. aethiopica</i>	GQ920673.1	251 pb	116+58+57+20 pb
	<i>L. amazonensis</i>	FJ753372.1	263 pb	144+119 pb
	<i>L. mexicana</i>	HM163470.1	273 pb	138+135 pb
Subgênero <i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	JQ061322.1	228 pb	139+89 pb
	<i>L. guyanensis</i>	FJ753390.1	226 pb	137+89 pb
	<i>L. turanica</i>	GQ466355.1	267 pb	137+54+52+24 pb
	<i>L. panamensis</i>	FJ948446.1	230 pb	139+91 pb
	<i>L. venezuelensis</i>	AF339752.1	270 pb	136+134 pb

Desta forma, após a amplificação e digestão pela enzima *Hae III*, esperou-se observar os seguintes padrões de bandas em gel de agarose a 2% (Figura 6):

Foi realizada uma pesquisa por espécies neotropicais do subgênero *Viannia* que apresentavam sequências nucleotídicas da região *ITS1* cadastradas no *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) através da ferramenta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (61). Estas sequências nucleotídicas foram alinhadas no software Bioedit (63) com a finalidade de identificar possíveis *SNIPs* (*Single nucleotide polymorphism*) capazes de distinguir estas espécies (Figura 7).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>L. peruviana</i>	TTTCTAGCAAGCCTTCCACAGATACGCAATCAATCTATATATATAT	ATATATATATATAGACACCAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGT								
<i>L. guyanensis</i>	TTTCTAGCAAGCCTTCCACAGATACGCAATCAATCTATATATATAT	ATGTATATAGACACCAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGT								
<i>L. panamensis</i>	TTTCTAGCAAGCCTTCCACAGATACGCAATCAATCTATATATATAT	ATATGTATATAGACACCAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGT								
<i>L. utingensis</i>	TTTCTAGCAAGCCTTCCACAGATACGCAATCAATCTATATATATAT	ATATGTATATAGACACCAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGT								
<i>L. amazonensis</i>	TTTCGATAGGCGCCTTCCACACATACACAGCAAAAGTTTGTACTCAA	AAACAACATTTGCAGTAAACAAAAATGGCCGATCGACGT								
<i>L. infantum</i>		TTTGTACTCAA					AA	TTTGCAGTAAA	AAAAAGGCCGATCGACGT	
<i>L. braziliensis</i>	TTTCTAGCAAGCCTTCCACAGATACGCAATCAATCTATATATATAT	ATATATAGACACCAACATACAGTAGAAAAAGGCCGATCGACGT								

Figura 7 – Comparação entre as regiões discriminatórias das sequências nucleotídicas da região *ITS1* das espécies do gênero *Leishmania*: *L. peruviana* (FN398340), *L. guyanensis* (FJ753390), *L. panamensis* (FJ948446), *L. utingensis* (FN398153), *L. amazonensis* (FJ753372), *L. infantum* (FM164420) e *L. braziliensis* (JQ061322)

3.10 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO POR PCR DO GENE MINIEXON

Para amplificação do gene miniexon foram utilizados os *primers* PR278 (5'-TATTGGTATGCGAAACTTCCG-3') e PR279 (5'-ACAGAACTGATACTTATATAGCG-3').

Os reagentes utilizados para amplificação do gene miniexon estão descritos na Tabela 6 e na Tabela 7 encontram-se os ciclos utilizados na PCR.

Tabela 6 – Reagentes utilizados para amplificação do gene Miniexon.

Reagente	Volume
Tampão Taq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	0,9 µL
dNTPS 10 mM	0,6 µL
DMSO	3,6 µL
Platinum Taq Polimerase (5U/ µL)	0,4 µL
PRIMER PR279 10 µM	1,0 µL
PRIMER PR278 10 µM	1,0 µL
DNA purificado amostral	10 ng
Volume final	30 µL

Tabela 7 – Ciclos utilizados para amplificação do gene miniexon

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	2 min	1X
Desnaturação	94°C	30 seg	
Anelamento	54°C	30 seg	35X
Extensão	72°C	45 seg	
Extensão final	72°C	1 min	1X

Uma alíquota de 10 µl de cada amostra foi analisada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. Os géis foram analisados no Fotodocumentador (Bio Rad).

3.11 AMPLIFICAÇÕES ALEATÓRIAS DE DNA (RAPD)

Para amplificação dos fragmentos RAPD foram realizados três experimentos, um com cada *primer*. Para cada experimento/primer, as amostras foram processadas, amplificadas e analisadas em conjunto e em um único dia. Todas as amostras foram processadas em capela de fluxo com a finalidade de evitar qualquer tipo de contaminação. As amostras amplificadas de *L. (V.) braziliensis* foram agrupadas e analisadas em um único gel, da mesma forma se procedeu para análise dos produtos da *L. (L.) amazonensis*.

Os *primers* utilizados foram: 497 (CTGATGCTAC), 498 (TCACGATGCA) e 499 (GCACTGTCA). Os reagentes utilizados para a RAPD estão descritos na Tabela 8, e na Tabela 9, encontram-se os ciclos utilizados.

Tabela 8 – Reagentes utilizados para RAPD (PR497, PR 498 e PR499).

Reagente	Volume
Tampão Taq polimerase 10X	3,0 µL
MgCl ₂ 50 mM	1,5 µL
dNTPS 10mM	0,6 µL
BSA 100X	0,6 µL
Platinum Taq Polimerase (5U/µL)	0,4 µL
PRIMER 10µM	3,75 µL
DNA purificado amostral	10 ng
Volume final	30 µL

Tabela 9 – Ciclos utilizados para RAPD

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação	94°C	5 min	1X
Desnaturação	94°C	1 min	
Anelamento	36°C	1 min	45X
Extensão	72°C	2 min	
Extensão final	72°C	5 min	1X

Dez microlitros das amostras foram analisados em gel de agarose a 2% marcado com brometo de etídio. Os géis foram analisados no Fotodocumentador (Bio Rad).

A partir dos padrões de bandas obtidos pela RAPD foram construídos cladogramas com pacote *Phylip 3.69* baseando-se no método *Neighbor-Joining* (64). Este método consiste em pesquisar sucessivamente na matriz de distâncias os vizinhos mais próximos e utilizar as relações no espaço métrico aditivo para obter um novo segmento. As matrizes de distância foram construídas baseando-se na presença e ausência das bandas geradas pelo RAPD.

3.12 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS DOS PACIENTES PORTADORES DE LTA

As informações dos pacientes foram coletadas dos prontuários arquivados no HUB e inseridas em uma planilha do programa Microsoft Excel. Para a avaliação descritiva dos dados foram construídos gráficos e tabelas.

Neste trabalho foram consideradas como falha terapêutica a não re-epitelização das lesões, presença de infiltração, eritema ou exsudato aos 90 dias após a conclusão do tratamento, cicatrização inicial com reaparecimento de lesão em qualquer momento após a conclusão do tratamento. Foram classificados como cura, re-epitelização das lesões, ausência de infiltração, eritema ou exsudato aos 90 dias após a conclusão do tratamento.

As drogas e as respectivas doses utilizadas para o tratamento foram: N-metil glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para a forma cutânea e 30 dias para a forma mucosa; anfotericina B lipossomal 50mg/dia até 1g/dia para a forma cutânea e 2g/dia para a forma mucosa; anfotericina B desoxicolato 1mg/kg/dia até 1g para a forma cutânea e 2g para a forma mucosa; pentamidina 4mg/kg dia em dias alternados, 3 doses para a forma cutânea e até 2g para a forma mucosa.

3.13 QUESTÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB e aprovada sob o registro nº 033/2012.

4. RESULTADOS

As coletas foram realizadas entre o período de janeiro de 2008 e janeiro de 2012 no Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB-UnB). Por se tratar de um centro de referência para atendimento dos casos de LTA designado pelo MS (4), o Serviço de Dermatologia do HUB atendeu pacientes com vasta diversidade clínica procedentes de vários estados brasileiros.

4.1 AMOSTRAS ANALISADAS

Entre o período de janeiro de 2008 a janeiro de 2012 foram criopreservados 37 isolados de *Leishmania* obtidas das lesões de 35 pacientes. Os isolados, número 12 e 21 foram oriundos de um mesmo paciente co-infectado com HIV. A amostra 12 é derivada de uma lesão que recidivou após o tratamento e a amostra 21 de uma pápula decorrente da manifestação clínica da Síndrome de Reconstituição Imune (SIRI), coletada um ano após a coleta inicial. Os isolados 37 e 38 também são oriundos de um mesmo paciente procedente da Guiana Francesa. Neste caso, o isolado 37 é derivado de uma lesão de recidiva após o tratamento, localizada no membro superior direito e o isolado 38 de uma lesão cutânea nova localizada na região glútea que surgiu concomitante à lesão de recidiva.

A amostra 15 trata-se de uma coleta realizada na década de noventa, ou seja, fora do período amostral. Esta amostra foi incluída neste estudo por se tratar de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) com a finalidade de comparar seu perfil genético com outros isolados. Desta forma foram analisados 38 isolados provenientes de 36 pacientes.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Leishmania* PROVENIENTES DE PACIENTES ATENDIDOS NO HUB

A amplificação da região *ITS1* do DNA ribossomal gerou três padrões de fragmentos que variaram de 200 pb a 300 pb. Após a digestão dos fragmentos pela enzima Hae III foi possível distinguir três padrões compatíveis com os de *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) spp* e *Leishmania (L.) infantum* (Figura 8). Os padrões de banda estavam de acordo com as análises realizadas previamente a partir de sequências cadastradas no *NCBI* (Tabela 5; Figura 6).

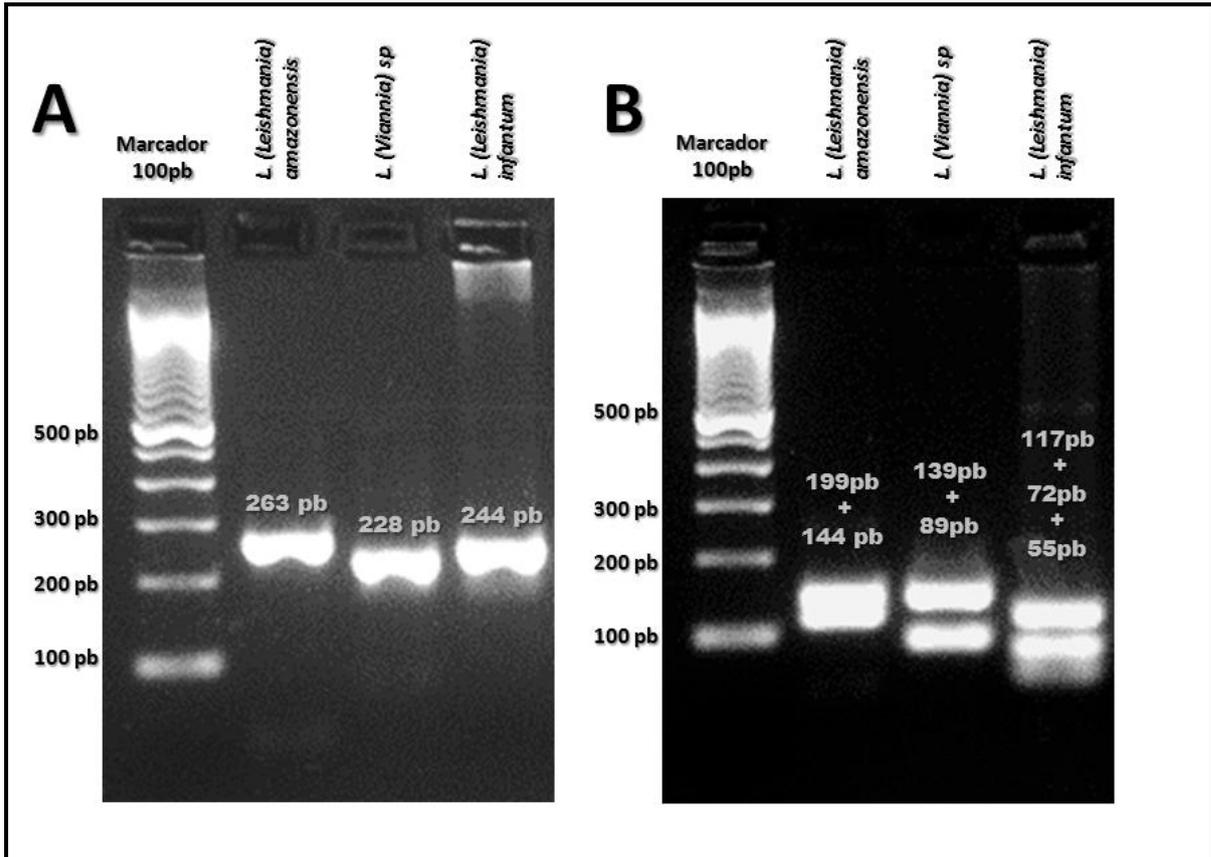


Figura 8 – Os três diferentes padrões encontrados nas amostras analisadas no estudo. Produtos amplificados por PCR da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (A) antes e (B) após a digestão pela enzima Hae III. Gel de agarose a 2%

As identificações através do método de PCR-RFLP da região ITS1 e da amplificação da região minixon foram concordantes. Desta forma, 76% (29/38) dos isolados foram identificados como *Leishmania* (*V.*) *spp*, 21% (8/38) como *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* e 3% (1/38) como *Leishmania* (*L.*) *infantum*. Exemplo dos géis para identificações nas Figuras 9 e 10.

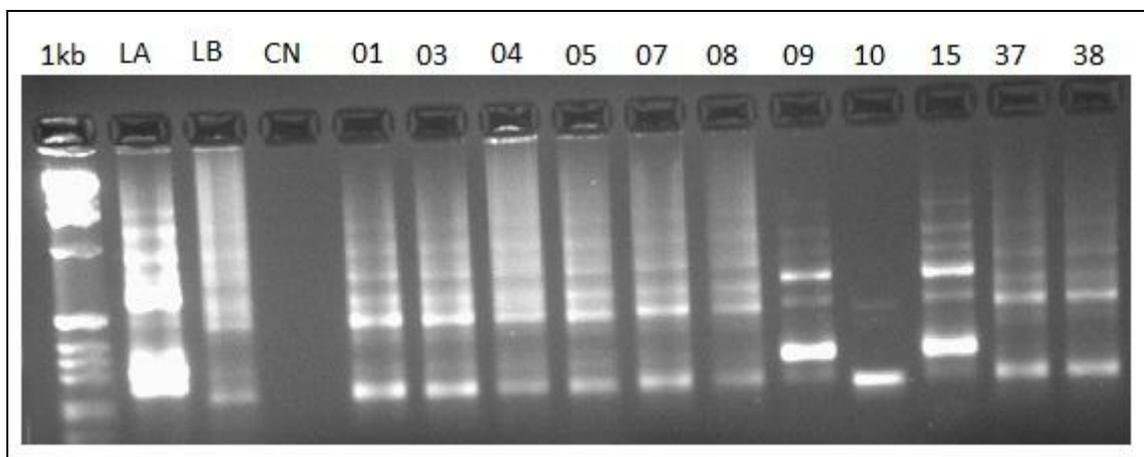


Figura 9 – Gel utilizado para identificação das amostras por PCR do gene Miniexon. LA= *L. (L.) amazonensis*; LB= *L. (V.) braziliensis*; CN= controle negativo; Amostras: 01, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 10, 15, 37, 28. Gel de agarose a 2%

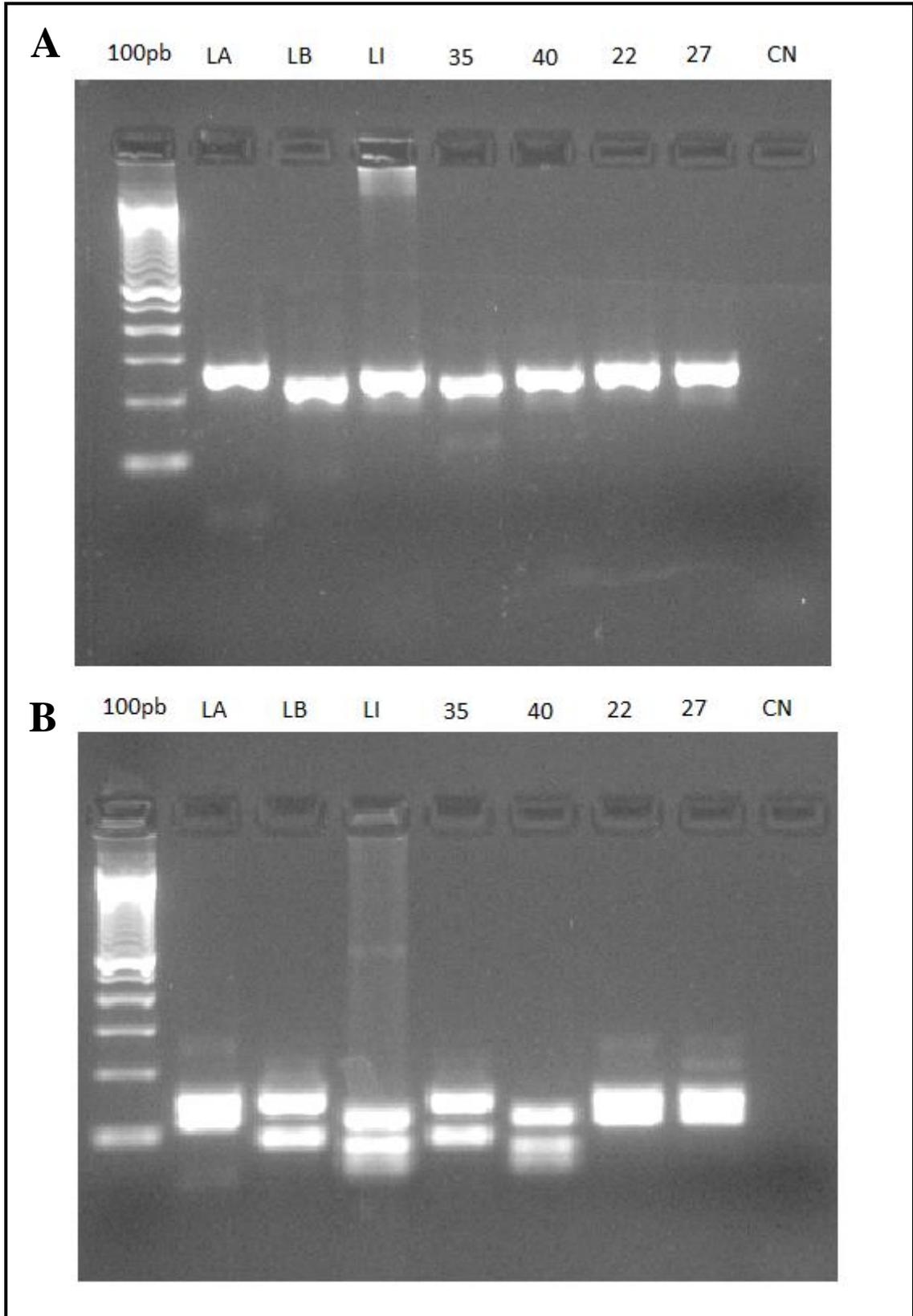


Figura 10 – Gel utilizado para identificação das amostras por RFLP da região ITS1. Produtos amplificados por PCR da região ITS1 do rDNA de *Leishmania* (A) antes e (B) após a digestão pela enzima Hae III. LA= *L. (L.) amazonensis*; LB= *L. (V.) braziliensis*; LI= *L. (L.) infantum*; Amostras: 35, 40, 22 e 27; CN= controle negativo. Gel de agarose a 2%

A confirmação da identificação das amostras do subgênero *Leishmania* e a distinção entre as amostras do subgênero *Viannia* foram realizadas através da comparação entre o produto de amplificação da região ITS1 sequenciado com sequências previamente cadastradas no NCBI (Figura 11).

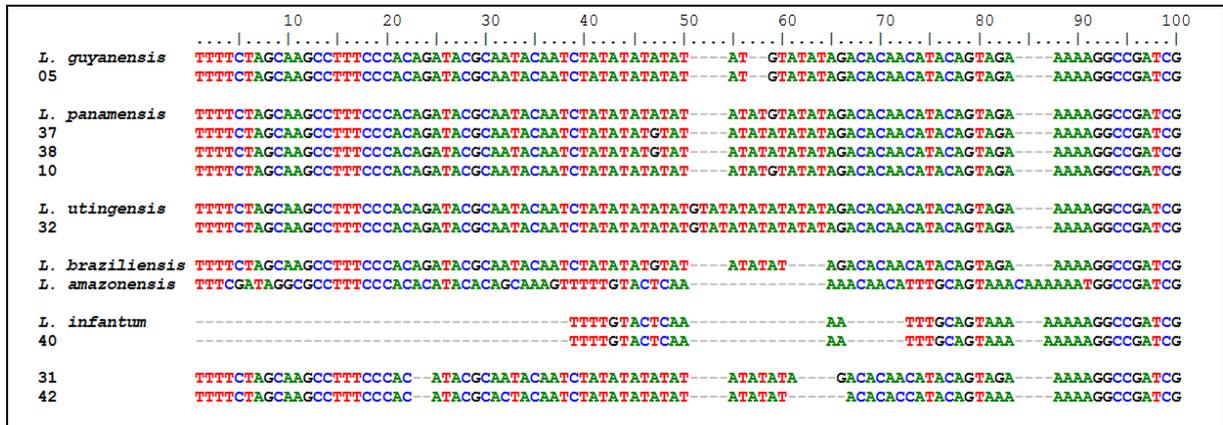


Figura 11 – Comparação entre as sequências nucleotídicas da região ITS1 das amostras com sequências cadastradas no NCBI. *L. guyanensis* (FN398330) com isolado 05; *L. panamensis* (FN398329) com isolados 10, 37 e 38; *L. utingensis* (FN398153) com o isolado 32; *L. infantum* (KC347301) com o isolado 40; *L. braziliensis* (FN398335) com todos os isolados identificados como *L. braziliensis*; *L. amazonensis* (FJ753373) com todos os isolados identificados como *L. amazonensis*; Os isolados 31 e 42 não se alinham com nenhuma sequência cadastrada no NCBI.

Desta forma, 36 isolados foram identificados ao nível de espécie: 22 como *L. (V.) braziliensis*, 3 como *L. (V.) panamensis*, 1 como *L. (V.) guyanensis*, 1 como *L. (V.) utingensis*, 8 como *L. (L.) amazonensis* e 1 como *L. (L.) infantum*. Dois isolados, 31 e 42, não foram identificados no nível de espécie, pois apresentaram sequências nucleotídicas diferentes de todas as espécies comparadas (Tabela 10).

Tabela 10 – Identificação da espécie de 38 isolados oriundos de pacientes portadores de LTA e relação com a forma clínica e procedência

ID	Espécie	Forma Clínica	UF*	ID	Espécie	Forma Clínica	UF*
01	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LM	MG	22	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LD	DF
03	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LM	TO	23	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	GO
04	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MT	24	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MT
05	<i>L. (V.) guyanensis</i>	LC	AM	27	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	DF
07	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MT	28	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	DF
08	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MA	29	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	DF
09	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	GO	30	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	GO
10	<i>L. (V.) panamensis</i>	LC	AM	31	<i>L. (V.) sp</i>	LC	MA
11	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LM	BA	32	<i>L. (V.) utingensis</i>	LC	BA
12	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	GO	33	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	TO
13	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	GO	34	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MG
14	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	NI	35	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	DF
15	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LCD	MG	36	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	NI
16	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MT	37	<i>L. (V.) panamensis</i>	LC	GF
17	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	MT	38	<i>L. (V.) panamensis</i>	LC	GF
18	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	GO	39	<i>L. (L.) amazonensis</i>	LC	MA
19	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	RO	40	<i>L. (L.) infantum</i>	LC	MG
20	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LC	TO	41	<i>L. (V.) braziliensis</i>	LM	NI
21	<i>L. (V.) braziliensis</i>	SIRI	GO	42	<i>L. (V.) sp</i>	LC	CE

ID= Identificação do isolado; LM= Leishmaniose Mucosa; LC= Leishmaniose Cutânea; LD= Leishmaniose Disseminada; LCD= Leishmaniose Cutânea Difusa; SIRI = Síndrome de Reconstituição Imune; NI= Não informado. *Provável região que ocorreu a infecção.

4.3 ANÁLISE DOS PRONTUÁRIOS DE PACIENTES PORTADORES DE LTA ATENDIDOS NO HUB

Os pacientes acometidos pelas espécies do subgênero *Viannia* eram em sua maioria do sexo masculino, 77% (21/27), um resultado similar pode ser observado nos infectados pelo subgênero *Leishmania*, na qual 78% (7/9) dos casos foram também em indivíduos do sexo masculino. No que se refere à faixa etária, a infecção acometeu todas as idades, porém com predominância em indivíduos entre 21 a 50 anos (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição de 36 casos de LTA atendidos no HUB de acordo com a espécie infectante e faixa etária

Faixa etária	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. utingensis</i>	<i>L. (Viannia) spp</i>
00-10 anos	1	-	1	1	-	-	-
11-20 anos	1	-	1	-	-	-	-
21-30 anos	1	-	3	-	-	1	-
31-40 anos	-	-	4	1	1	-	-
41-50 anos	3	1	7	-	-	-	1
51-60 anos	2	-	2	-	-	-	-
61-70 anos	-	-	2	-	-	-	1
> 71 anos	-	-	1	-	-	-	-

Os pacientes infectados pelo subgênero *Viannia* desenvolveram em 81% (22/27) dos casos LC. Apenas pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis*, em 15% (4/27) dos casos, desenvolveram a forma mucosa. Todos os pacientes deste estudo com lesão de mucosa (4/27) apresentaram previamente a LC. Apenas um paciente infectado por *L. (V.) braziliensis* (1/22) e co-infectado por HIV desenvolveu a Síndrome de Reconstituição Imune (SIRI) (Isolado 21). O mesmo apresentou previamente lesão cutânea (Isolado 12). A LC também foi a forma mais frequente em pacientes infectados por espécies do subgênero *Leishmania*, representando 78% (7/9). Um isolado era de um paciente com quadro clínico de LD (Isolado 22) e o isolado extra neste estudo, isolado 15, pertencia a um paciente com o quadro clínico de LCD (Figura 12).

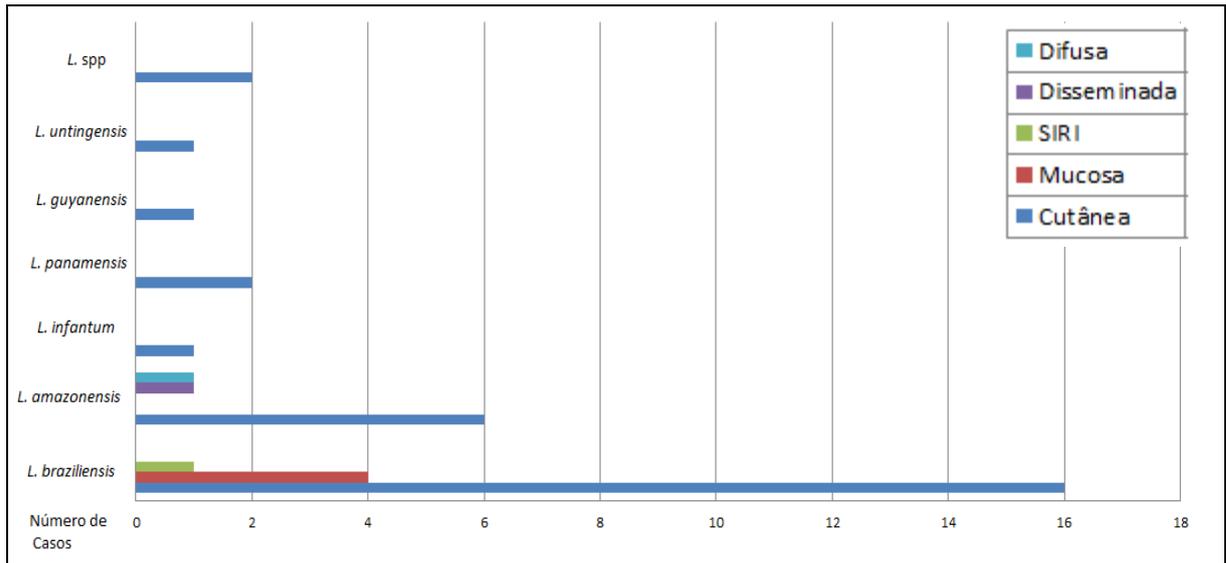


Figura 12 – Comparação entre as manifestações clínicas de LTA causadas por diferentes espécies de *Leishmania*. Número = frequência dos casos

As lesões causadas por ambos os subgêneros se distribuíram em todas as regiões do corpo. Porém, em geral, os membros inferiores e superiores apresentaram maior comprometimento (77%) em relação ao resto do corpo (23%). Apenas em dois casos envolvendo *L. (L.) amazonensis* (Isolado 15 e 22) apresentaram lesões disseminadas por todo o corpo (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição dos locais do corpo dos pacientes portadores de LTA acometidos por diferentes espécies de *Leishmania*

Local das lesões	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. panamensis</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. untingensis</i>	<i>L. (Viannia) spp</i>
Membros superiores	3	1	7	1	1	-	1
Membros inferiores	3	-	5	1	-	1	1
Membros superiores e inferiores	-	-	3	-	-	-	-
Cabeça	-	-	6	-	-	-	-
Tronco	-	-	-	-	-	-	-
Todo o corpo	2	-	-	-	-	-	-
Total	8	1	21	2	1	1	2

As lesões se apresentaram em forma de úlceras, placas e pápulas. A úlcera foi a forma mais frequente. Um caso de *L. (V.) braziliensis* (Isolado 21), SIRI, e um

caso de *L. (L.) amazonensis* (Isolado 15), LCD, apresentaram lesões combinadas com pápulas, úlceras e placas (Figura 13).

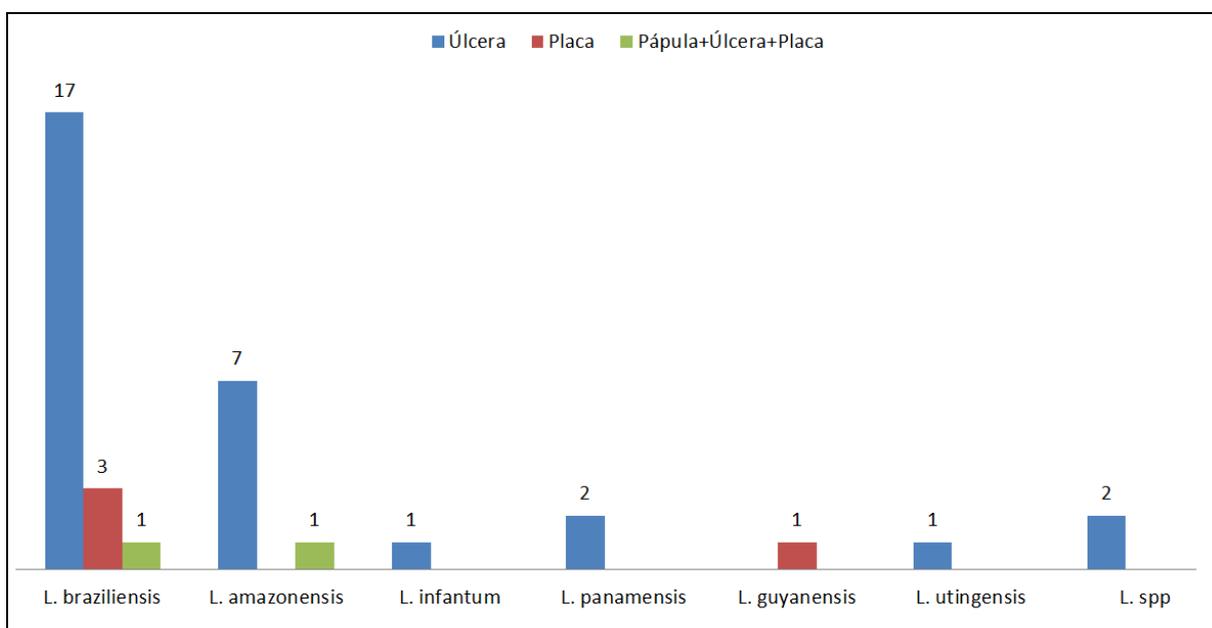


Figura 13 – Frequência de casos de acordo com o aspecto das lesões causadas em pacientes infectados por espécies do gênero *Leishmania*. Número = frequência dos casos

As lesões únicas representaram 69% (25/36) dos casos enquanto que as múltiplas lesões ocorreram em 31% (11/36) dos casos. Os pacientes que apresentaram múltiplas lesões causadas pela espécie *L. (V.) braziliensis* representaram 22% (8/36) do total de casos. Dois casos cuja a causa foi a *L. (L.) amazonensis* apresentaram múltiplas lesões: um paciente com o quadro clínico de LCD (Isolado: 15) e outro com LD (Isolado: 22). O único caso com infecção por *L. (L.) infantum* (Isolado: 40) apresentou três úlceras.

As drogas utilizadas para o tratamento foram: N-metil glucamina, anfotericina B lipossomal, anfotericina B desoxicolato, pentamidina. O N-metil glucamina foi administrado em 88% (32/37) dos tratamentos, dentre estes, apresentou falha terapêutica em 22% (7/32) destes tratamentos. A Pentamidina administrada em 11% (4/37) dos tratamentos com falha terapêutica em 50% (2/4) dos tratamentos em que foi indicada. A Anfotericina B lipossomal foi indicada apenas para um tratamento (Isolado 14) que evoluiu para cura clínica. A anfotericina B desoxicolato foi administrada em um tratamento (isolado 12) que resultou em falha terapêutica. Neste estudo foram incluídos dois pacientes com formas clínicas de difícil tratamento, o paciente com LCD (Isolado 15) e o paciente co-infectado por HIV (Isolados 12 e 21). Ambos apresentaram sucessivas falhas terapêuticas (Tabela 13).

Tabela 13 – Comparação entre as drogas utilizadas para o tratamento dos pacientes portadores de LTA acometidos por diferentes espécies de *Leishmania*

Droga	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. infantum</i>		<i>L. braziliensis</i>		<i>L. panamensis</i>		<i>L. guyanensis</i>		<i>L. utingensis</i>		<i>L. (Viannia) spp</i>	
	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica	Falha Terapêutica
N-metil glucamina	7	1	1	0	17	4	3	1	1	0	1	1	2	0
Anfotericina B Lipossomal	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anfotericina B desoxicolato	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentamidina	1	1	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	8	2	1	0	22	6	3	1	1	0	1	1	2	0

A informação do provável local de infecção foi baseada no fluxo migratório descrito pelo próprio paciente pelos últimos três anos. Assim, os pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* foram procedentes das seguintes unidades federativas brasileiras: Bahia (isolado: 11), Goiás (isolados: 12, 13, 18, 21 e 23), Maranhão (isolado: 08), Minas Gerais (isolados: 01 e 34), Mato Grosso (isolados: 04, 07), Roraima (isolado: 19), Tocantins (isolados: 03, 20 e 33) e Distrito Federal (isolado: 35). Três prontuários de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* não indicavam o provável local de infecção (Isolados: 14, 36 e 41).

Os isolados 37 e 38 ambos identificados como *L. (V.) panamensis* foram amostras de um mesmo paciente procedente da Guiana Francesa. O isolado 10, também identificado como *L. (V.) panamensis*, foi originado de um paciente procedente do Amazonas. O único isolado identificado como *L. (V.) guyanensis* (isolado 05), parasitava um paciente também procedente do Amazonas. O isolado identificado como *L. (V.) utingensis* (isolado 32) foi coletado de um paciente oriundo da Bahia.

Os dois isolados identificados apenas ao nível de subgênero foram provenientes dos estados do Maranhão (isolado 31) e Ceará (isolado 42).

Dentre os sete pacientes acometidos pela *L. (L.) amazonensis*, quatro casos (isolados 22, 27, 28 e 29) foram considerados autóctones do Distrito Federal. Os

outros três casos foram procedentes dos Estados do Maranhão (isolado 39) e Goiás (isolados 09 e 30).

A partir das informações contidas nos prontuários foi possível construir um mapa indicando a distribuição dos prováveis locais de infecção (Figura 14).

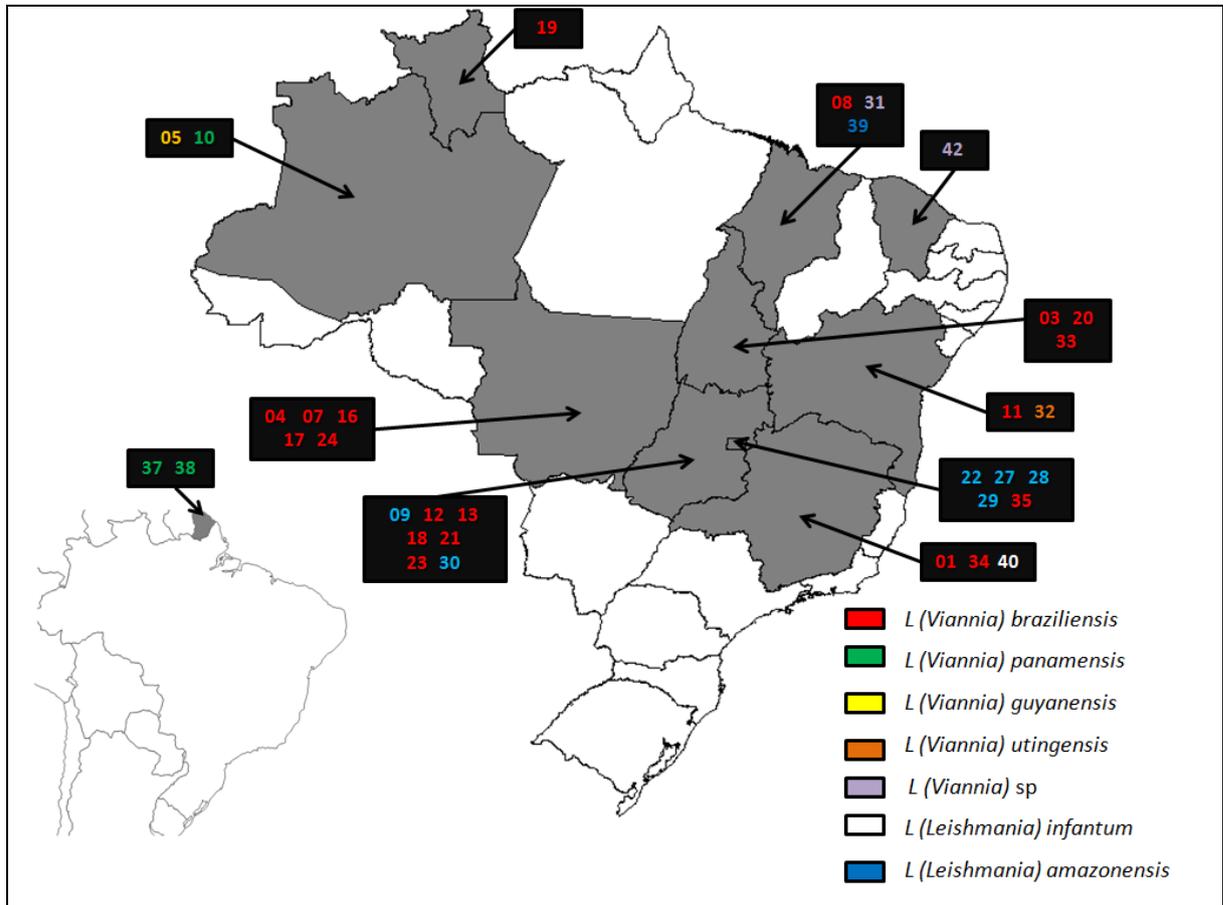


Figura 14 – Distribuição dos prováveis locais de infecção por *Leishmania* de acordo com identificação do respectivo isolado

4.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO INTRAESPECÍFICO

A técnica RAPD gerou produtos de amplificação com diferentes padrões de bandas entre os isolados. Assim, essa técnica permitiu analisar a diferença intraespecífica entre isolados previamente agrupados pela técnica PCR-RFLP.

Através da análise em conjunto dos padrões das bandas produzidas pelos três diferentes *primers*, foi possível construir duas matrizes de distância, uma compreendendo os isolados do subgênero *Viannia* e outra contendo os isolados do subgênero *Leishmania*. A partir das matrizes de distância foram construídos dois cladogramas, um para cada *taxon*. Com os cladogramas buscou-se relacionar os

padrões de bandas com espécie, provável unidade federativa de infecção, forma clínica, forma da lesão, número de lesões e resposta ao tratamento.

No cladograma com as espécies do subgênero *Viannia* não foi observada relações entre os grupos formados de acordo com a forma clínica e procedência geográfica. Porém, no que tange o tratamento, foi possível distinguir três grupos: A, B e C. No Grupo A, agrupou-se 12 isolados provenientes de 12 casos na qual observou-se cura terapêutica em 11 casos. O único caso que apresentou falha terapêutica foi o paciente co-infectado por HIV isolado 21. No grupo B, em nove casos observou-se falha terapêutica em quatro casos. O isolado 12 também derivado do paciente co-infectado por HIV, obtido em outra etapa da doença pertence a este grupo. No grupo C, observou-se resposta terapêutica em quatro casos do total de seis casos tratados. Fazem parte deste grupo os isolados 38 e 37, derivados de um mesmo paciente (Figura 15).

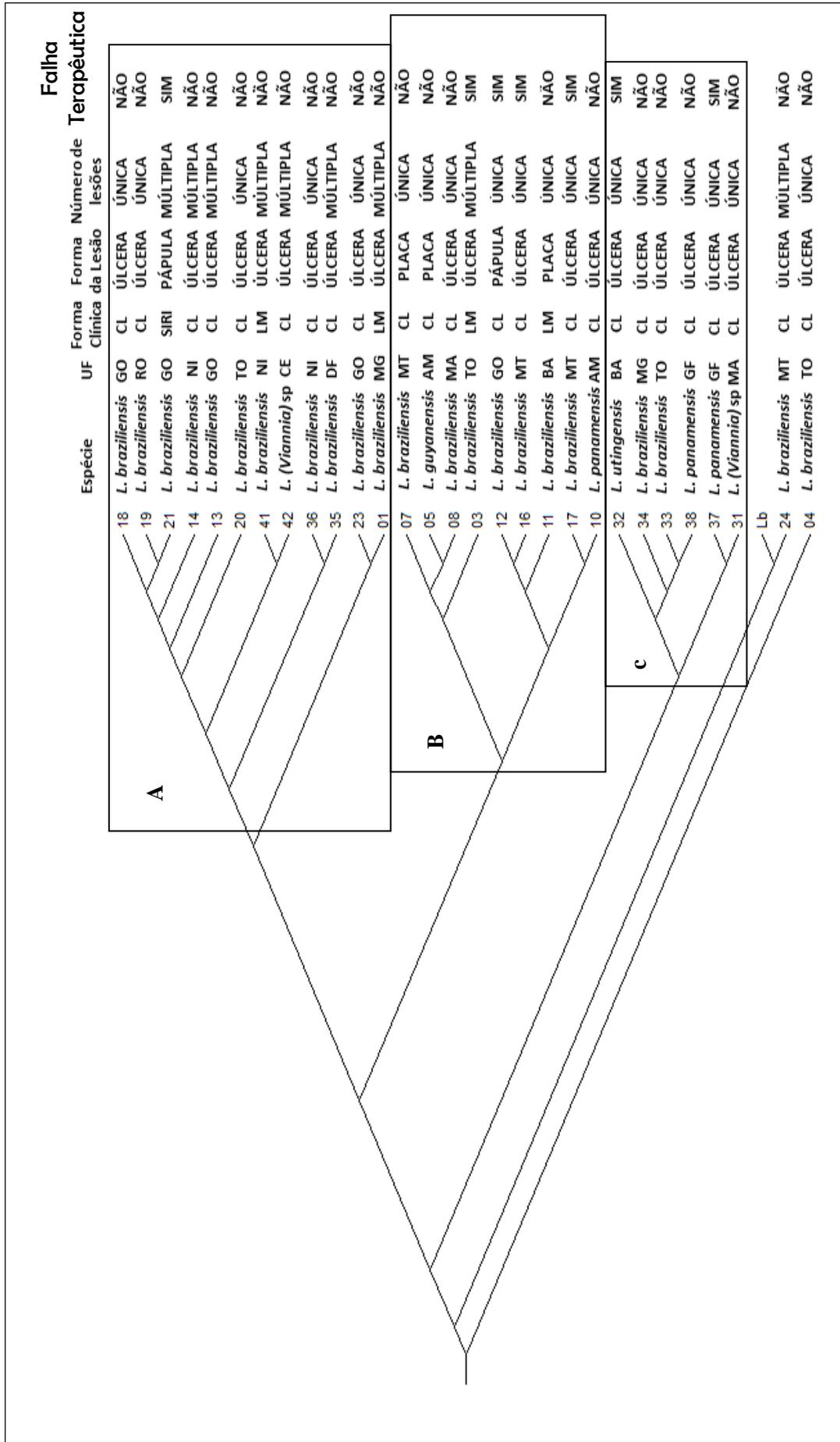


Figura 15 – Cladograma com isolados do subgênero *Viannia* relacionando espécies com a manifestação clínica das lesões. NI= Não informado

Os *fingerprints* gerados através do RAPD das amostras 12 e 21 provenientes de um mesmo paciente com lesão de recidiva após o tratamento apresentaram diferentes padrões de bandas. Os *fingerprints* das amostras 37 e 38 também procedentes de um único paciente apresentaram maior similaridade entre si (Figura 16).

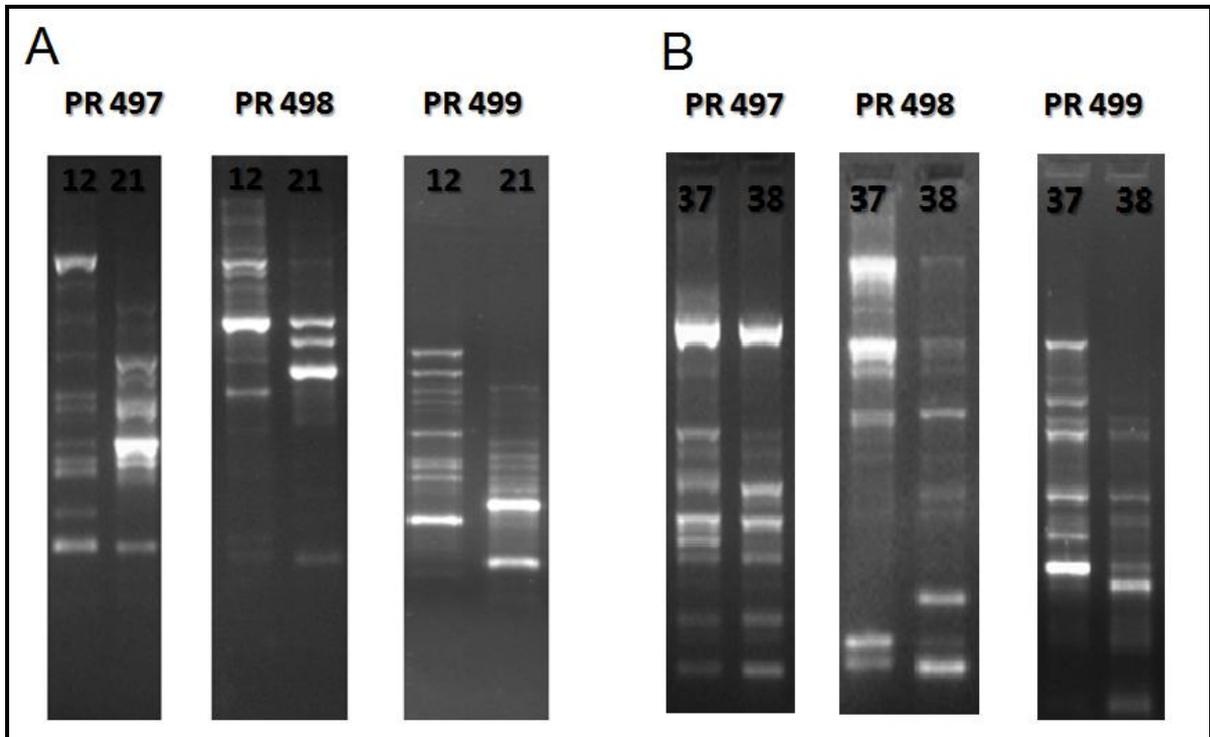


Figura 16 - *Fingerprints* comparativos obtidos através da técnica RAPD com três diferentes *primers* (PR497, PR498 e PR499). A) Comparação entre padrões de bandas gerados pelas amostras 12 (Leishmaniose Mucosa) e 21 (Síndrome de Reconstituição Imune). B) Comparação entre padrões de bandas gerados pelas amostras 37 (Recidiva Cútis) e 38 (Nova lesão)

No cladograma contendo as espécies do subgênero *Leishmania* foi possível agrupar dois isolados pertencentes a pacientes diferentes que causaram quadros clínicos distintos, porém extremamente graves e raros: LCD (isolado 15) e LD (Isolado 22). Os dois casos apresentaram múltiplas lesões em forma de placas e pápulas (Figura 17).

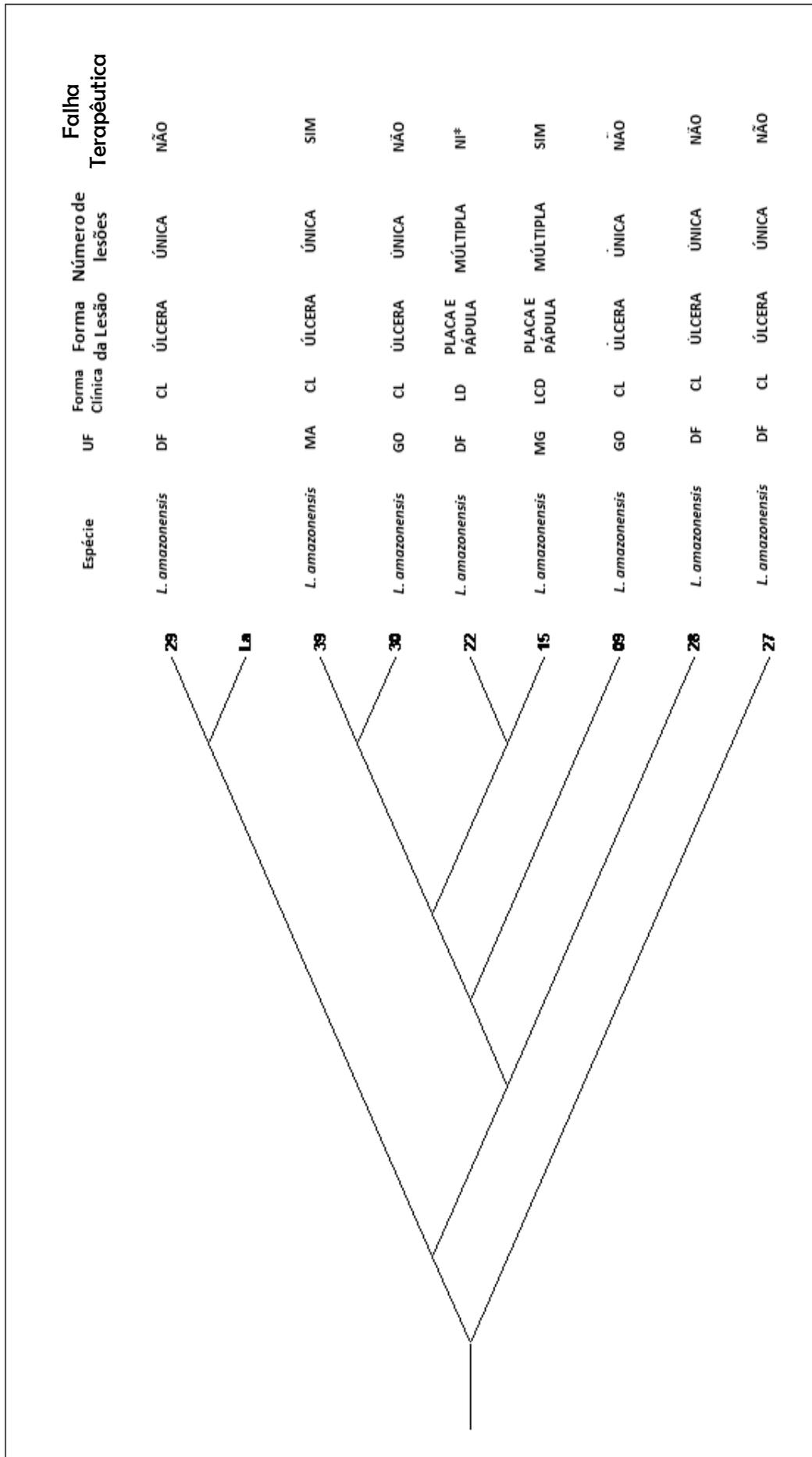


Figura 17 – Cladograma com isolados do subgênero *Leishmania* contendo espécies e seus respectivos dados clínico-epidemiológicos

5. DISCUSSÃO

A técnica RFLP da região ITS1 do DNA ribossomal se mostrou como uma eficiente alternativa para o diagnóstico e identificação de espécies do gênero *Leishmania* necessitando de sequenciamento apenas para a distinção entre indivíduos do subgênero *Viannia*. A técnica PCR do gene miniexon confirmou a identificação no nível de gênero, porém em comparação com a técnica RFLP a amplificação do gene miniexon gerou bandas de difícil interpretação.

Não foi possível identificar no nível de espécie as amostras 31 e 42 pertencentes ao subgênero *Viannia* que apresentaram sequências da região ITS1 diferentes de todas as cadastradas no *NCBI*. Esse dado exige novos estudos visando outras regiões gênicas com a finalidade de identificá-las ou classificá-las como novas espécies.

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (1, 14). Os pacientes infectados pela *L. (V.) braziliensis* procederam de diversos Estados (BA, DF, GO, MA, MG, MT, RO e TO). Esse dado está de acordo com os dados do Ministério da Saúde que descreve a ampla distribuição desta espécie com incidência em todos os estados brasileiros (1, 4). A segunda espécie com maior distribuição e frequência no Brasil é a *L. (L.) amazonensis*, representando neste estudo a segunda maior em incidência e em origem geográfica (GO, DF, MG e MA) (1, 3, 4).

O único paciente infectado por *L. (V.) guyanensis*, isolado 05, tem como provável local de infecção o estado do Amazonas, onde esta espécie é endêmica (1, 3, 4). A origem geográfica dos isolados 37 e 38 identificados como *L. (V.) panamensis* oriundos da Guiana Francesa também estão de acordo com a literatura (1, 3, 4). Em contrapartida, o paciente infectado pelo isolado 10 identificado também como *L. (V.) panamensis* aponta como provável local de infecção o estado do Amazonas. Porém os dados descritos na literatura descrevem, além da Guiana Francesa, o Canal do Panamá, Panamá, Colômbia, Costa Rica, Equador, Honduras Nicarágua e Venezuela como países endêmicos para esta espécie, ou seja, até o momento não existe registro do ciclo de infecção desta espécie no Brasil (3).

Existe um único registro da ocorrência da espécie *Leishmania (Viannia.) utingensis* (68) que foi identificada a partir de um isolado parasitando o flebótomo *Lutzomyia tuberculata* extraído do tronco de uma árvore na floresta de Utinga no estado do Pará em 1973 (68). Até o momento não houve registros desta espécie

parasitando humanos (3). Neste trabalho relata-se pela primeira vez a infecção de *L. (Viannia) utingensis* (isolado: 32) em um paciente do sexo feminino procedente do estado da Bahia apresentando uma úlcera delimitada na perna esquerda que recidivou após o primeiro tratamento. O tratamento em discussão foi decorrente de uma recidiva de outro tratamento terminado em 2011. Após 20mg/kg/dia de N-metil glucamina durante 20 dias a paciente evoluiu para a cura. A escassez de dados sobre esta cepa sugere novos estudos para avaliar seu comportamento patológico e tratá-la como um novo agente etiológico da LTA no Brasil.

A *Leishmania (L.) infantum* é o agente etiológico da Leishmaniose Visceral em todo o território brasileiro (13). As espécies *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) donovani*, no que concerne a região ITS1 do DNA ribossomal, são geneticamente idênticas. A *L. (L.) infantum* se distingue em 4 nucleotídeos, porém vários estudos afirmam que a *L. (L.) infantum* e a *L. (L.) chagasi* são na verdade uma mesma espécie (65, 66). Por isso, neste trabalho, os isolados que apresentaram após a digestão pela enzima Hae III os fragmentos 117 pb +72 pb +55 pb foram considerados como *L. (L.) infantum*. A única amostra identificada como *L. (L.) infantum* (Isolado 40) foi confirmada por sequenciamento da região ITS1 do DNA ribossomal.

O paciente infectado pelo isolado 40, identificado como *L. (L.) infantum*, apresentou a forma clássica de LC com presença de três lesões cutâneas. Este paciente faz uso de adalimumabe, um inibidor do TNF- α indicado para o controle da espondilite anquilosante. Esse tipo de terapia está associada a infecções oportunistas especialmente aquelas em que a formação de granulomas desempenha importante papel na defesa do hospedeiro (67). A infecção por *L. (L.) infantum* associada ao quadro clínico de imunossupressão do paciente pode ter influenciado na evolução atípica desta infecção.

Todavia, já foram descritas infecções envolvendo a espécie *L. (L.) infantum* associada ao quadro clínico de leishmaniose tegumentar (69, 70). Um estudo realizado na Nicarágua descreve que a *L. (L.) infantum* pode provocar além da doença visceral uma forma atípica de leishmaniose cutânea (70). Esse comportamento clínico parece estar relacionado principalmente com a resposta imune do hospedeiro. Novos estudos moleculares e experimentais devem ser realizados para elucidar o comportamento desta cepa.

Do total de pacientes atendidos foram observados três casos envolvendo *L. (V.) braziliensis* para cada caso de *L. (L.) amazonensis*. Em outro trabalho realizado

no Distrito Federal estudando-se apenas casos autóctones, foram observados nove casos de *L. (V.) braziliensis* para cada caso de *L. (L.) amazonensis* (9).

No presente estudo, a alta incidência dos casos autóctones envolvendo *L. (L.) amazonensis* pode ser atribuída ao critério de inclusão em que apenas pacientes com cultura positiva fizeram parte deste estudo. É conhecido que a espécie *L. (L.) amazonensis*, apresenta durante a infecção, maior riqueza parasitária em relação à espécie *L. (V.) braziliensis* o que torna seu cultivo mais viável (17). Mesmo com a possibilidade deste viés, foi possível identificar a *L. (V.) braziliensis* como a principal espécie causadora de LTA nos pacientes atendidos no HUB.

A maioria dos portadores de LTA atendidos no HUB é procedente de outros estados, predominando Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia e estados do Norte e Nordeste (71, 72). O presente estudo corrobora esse dado no que tange os pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis*. Porém, foi observada alta incidência de casos autóctones do Distrito Federal envolvendo a espécie *L. (L.) amazonensis*. O principal vetor da *L. (L.) amazonensis* é o *Lutzomyia flaviscutellata*, esta espécie foi previamente relatada com pouca frequência no DF, sendo encontrada em veredas e ambientes úmidos no qual realiza o repasto sanguíneo em pequenos roedores dos gêneros *Oryzomys* e *Proechimys* (73, 74). Desta forma é possível que o ciclo de transmissão da *L. (L.) amazonensis* esteja acontecendo em região rural do DF.

A LTA acomete indivíduos de todas as faixas etárias, raças e de ambos sexos. Neste estudo foi encontrada predominância de casos em indivíduos do sexo masculino em idade produtiva. Trabalhos anteriores realizados no Distrito Federal apresentaram os mesmos resultados (9, 72, 73, 76).

No que se refere à localização das lesões, houve predomínio destas em membros superiores e inferiores. Provavelmente, isso pode ser atribuído à exposição frequente destas regiões do corpo ou às peculiaridades da altura do vôo dos vetores (75, 77).

Aproximadamente 3% dos pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* apresentam a clínica de LM (78, 79). Provavelmente, o envolvimento da mucosa se desenvolve a partir da lesão primária seguida pela disseminação hematogênica ou linfática, do parasito para a mucosa. No presente estudo, todos os pacientes que apresentaram LM foram infectados por *L. (V.) braziliensis* e apresentaram lesão cutânea prévia.

Neste estudo a técnica RAPD foi aplicada com a finalidade de identificar diferenças genéticas entre isolados pertencentes ao mesmo subgênero. Os grupos identificados no cladograma das espécies do subgênero *Viannia* não se relacionam com o provável local de infecção e nem com os aspectos clínicos, ou seja, as similaridades encontradas foram predominantemente genéticas. O isolado 04, mesmo apresentando manifestações clínicas clássicas, se apresentou como a amostra geneticamente mais distinta, pois não se agrupou com nenhuma outra amostra. Os isolados 37 e 38, ambos *L. (V.) panamensis*, foram oriundos de um mesmo paciente infectado na Guiana Francesa. Neste caso, o isolado 37 foi derivado de uma lesão que recidivou após tratamento com localização no braço e o isolado 38 de uma lesão cutânea primária na nádega esquerda. A similaridade clínica e genética permite suspeitar que ambos os isolados infectaram o paciente no mesmo local de procedência oriundos de uma mesma população clonal de *Leishmania*. Porém, também é possível que parasitos resistentes ao primeiro tratamento tenham se multiplicado e disseminado pela corrente sanguínea causando uma nova lesão localizada na nádega esquerda.

Os isolados 12 e 21, ambos *L. (V.) braziliensis*, são oriundos de um único paciente co-infectado por HIV. A amostra 12 é derivada de uma lesão cutânea que recidivou após o tratamento e a amostra 21 proveniente de uma pápula decorrente do quadro clínico de Síndrome de Reconstituição Imune (SIRI), obtida um ano após a primeira coleta. SIRI é o conjunto de manifestações clínicas e laboratoriais resultantes da resposta inflamatória exacerbada em pacientes portadores de HIV após o início da terapia antirretroviral. Nesses indivíduos, a restauração do sistema imune é acompanhada de intensa resposta inflamatória contra agentes infecciosos co-infectantes, resultando no aparecimento de manifestações clínicas atípicas (18).

As duas amostras, 12 e 21, apresentaram padrões de bandas (nos três *primers*) e aspectos clínicos completamente distintos entre si. Neste caso é possível que o paciente tenha sido alvo de uma nova infecção por uma população de *L. (V.) braziliensis* diferente da que causou a primeira infecção. Outra possibilidade é o processo de seleção artificial induzido no primeiro tratamento, no qual pode não ter ocorrido a total eliminação dos parasitos selecionando apenas as formas mais resistentes e/ou virulentas.

Uma expressão clínica especial de leishmaniose é a forma Cutânea Disseminada (LD), na qual muitas lesões são observadas (>10). Esta forma pode ser

causada por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (24, 25). Neste estudo foi identificado um caso de LD em um paciente infectado por *L. (L.) amazonensis* (isolado 22). Não foi possível descrever a evolução clínica do paciente com LD, portador do isolado 22, pois este deu continuidade ao tratamento em outro Hospital.

A amostra 15 foi incluída neste estudo por se tratar de Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) com a finalidade de comparar seu perfil genético com outros isolados. Trata-se de um isolado oriundo de um indivíduo do sexo masculino, 76 anos, procedente de Tocantins, tratado no HUB na década de 90. O mesmo apresentou lesões do tipo pápulas, placas, tubérculos e nódulos, com acometimento dos membros, face e demais partes corpo. Esta cepa foi identificada como *L. (L.) amazonensis* e através da técnica RAPD foi possível agrupá-la com o isolado 22 (LD), autóctone do Distrito Federal. É possível que o paciente infectado com a *Leishmania* do isolado 22 possa ter sido infectado pela mesma cepa que infectou o paciente portador do isolado 15 desencadeando formas clínicas graves e raras, porém com características imunológicas distintas.

Em geral foram observados que 27% dos tratamentos apresentaram falência terapêutica, predominantemente nos casos com envolvimento das espécies de maior ocorrência no Brasil: *L. (L.) amazonensis* (25%) e *L. (V.) braziliensis* (27%). Outros estudos, anteriores a estes, inclusive alguns realizados no mesmo local, HUB, relatam resultados similares (22, 72, 76). Neste estudo foi detectada uma subpopulação de isolados do subgênero *Viannia* com maior ocorrência de falência terapêutica em relação aos outros grupos analisados (Figura 15). Os mecanismos envolvidos na falência terapêutica são vários e ainda não são totalmente compreendidos (22, 81). Acredita-se que geração endógena de novos polimorfismos influencie na estrutura original da população e conseqüentemente esteja relacionada aos mecanismos de resistência e/ou reativação das lesões (81).

Devido ao amplo espectro clínico causado pelas diferentes espécies de *Leishmania*, a identificação da espécie pode ser extremamente útil para direcionar o prognóstico clínico (79, 80). Neste trabalho através de técnicas moleculares foi possível relacionar as espécies com as respectivas clínicas previamente descritas. Essas técnicas poderiam ser úteis para o diagnóstico e para o prognóstico clínico rotineiro da Leishmaniose.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo as identificações foram realizadas através das técnicas RFLP e sequenciamento da região ITS1 do DNA ribossomal. Através deste trabalho confirma-se que o uso da técnica RFLP na região ITS1 é eficiente para identificar e discriminar as espécies do gênero *Leishmania*, sendo que para diferenciar as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* é necessário o sequenciamento desta região.

A técnica RAPD permitiu caracterizar duas cepas de *L. (L.) amazonensis* como idênticas. Estas cepas foram isoladas de dois pacientes com formas clínicas graves e raras (LCD e LD), todavia com características imunológicas distintas.

Através da RAPD foi possível comparar *fingerprints* de isolados de um mesmo paciente a fim de analisar as modificações ao longo de sucessivas recidivas. Através da comparação dos *fingerprints* gerados foi possível concluir que as recidivas do paciente eram causadas por diferentes isolados.

Este trabalho sugere modificações na ocorrência geográfica de algumas espécies neotropicais de *Leishmania*. É ressaltada a incidência de casos autóctones de LTA no Distrito Federal envolvendo a espécie *L. (L.) amazonensis*. Um paciente infectado por *L. (V.) panamensis* procedente do estado do Amazonas nos faz suspeitar da ocorrência do ciclo desta espécie na Amazônia brasileira.

Este trabalho descreve pela primeira vez a infecção em humano por *L. (V.) utingensis*. Existe apenas um relato na literatura da ocorrência desta espécie parasitando o vetor *Lutzomyia tuberculata* em uma floresta no estado do Pará.

Pela primeira vez, no Brasil, relata-se um caso de leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (L.) infantum*.

Neste estudo foi possível identificar como agente etiológico da LTA, além das espécies endêmicas da região, as espécies: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) utingensis*. Essa diversidade justifica a instalação do diagnóstico molecular rotineiro em auxílio à clínica.

7. REFERÊNCIAS

1. Brasil Ministério da Saúde 2006. Secretaria de vigilância em saúde. Leishmaniose tegumentar americana diagnóstico clínico e diferencial. 1ª Edição, Brasília, 182pp.
2. WHO.int [homepage on the internet] World Health Organization. Leishmaniasis. [update 2010 may 22; cited 2013 jun 10] Available from <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>.
3. Lainson R 2010. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Ver Pan-Amaz Saude* 1:13-32.
4. Brasil [homepage on the internet] Portal da Saúde SUS. Leishmaniose Tegumentar Americana. [update 2013 jan 10; cited 2013 jun 10] Available from http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1560.
5. Costa JML 2011. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas, Salvador*, p.113-126.
6. Castro EA, Soccol VT, Membrive N, Luz E 2002. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do estado do Paraná de 1993 a 1998. *Rev Soc Bras Med Trop*, 35:5-9.
7. Dorval ME, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro AC, Alves TP. 2006. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Rev Soc Bras Med Trop* 39:43-46.
8. Brasil 2007. Secretaria de vigilância em saúde. *Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana*. 2ª Edição, Brasília.
9. Santos GM, Kuckelhaus SA, Roselino AM, Chaer WK, Sampaio RNR 2012. Leishmania (Viannia) braziliensis is the main species causing cutaneous leishmaniasis in the Federal District of Brazil. *Journal of venomous Animals and toxins including Tropical Diseases* 18:340-343.
10. Neves DP 2004. *Parasitologia Humana*, 10ª edição Atheneu, São Paulo, 36-53.
11. Forattini OP 1973. *Entomologia Médica*. 4ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher, São Paulo, 658 pp.
12. Basano SA, Camargo LMA 2004. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7: 328-337.
13. Gontijo CMF, Melo NM 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7:338-349.

14. Gontijo B, Carvalho MLR 2003. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista Brasileira de Medicina Tropical* 36:71-80.
15. CDC [homepage on the internet] Centers for Disease Control and Prevention. Leishmaniasis. [update 2011 jun 30; cited 2013 jun 10] Available from <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>
16. Silva LJ, Camargo VLFN. As Leishmanioses – Uma visão para o clínico. *Prática Hospitalar* [serial on the internet]. 2004 jun [cited 2012 Aug 12] Available from <http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2036/paginas/materia%2010-36.html>.
17. Hepburn NC 2000. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental Dermatology* 25:363-370.
18. Bacellar O, Machado P, Carvalho E 2011. Resposta imune da leishmaniose tegumentar humana In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*, Salvador, p. 113-126.
19. Guenoun FZ, Doukan S, Bouree P, Vieillefond A 1990. A diffuse and persistent skin eruption in an immunosuppressed patient. *Ann Pathol* 10:365-366.
20. Lessa MM, Lessa HA, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM 2007. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras Otorrinolaringol* 73:843-7.
21. Boaventura V, Barral A, Barral-Netto M 2011. Imunopatologia da leishmaniose cutânea humana In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*, Salvador, p. 127-136.
22. Costa JML 2011. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*, Salvador, p. 138-145.
23. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV, Barreto AC 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89:319-323.
24. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56:315-325.
25. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, Rocha H 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 135:4144-48.
26. Castes M, Agnelli A, Verde O, Rondón AJ 1983. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol* 27:176-186.

27. Castes M, Agnelli A, Rondón AJ 1984. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 57:279-286.
28. Degraeve W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a minireview. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89:463-469.
29. Iborra S, Abánades DR, Bonay P, Soto M 2011. Biología molecular de leishmania: regulación de la expresión génica. In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*, Salvador, p. 13-23.
30. Lighthall GK, Giannini SH 1992. The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitology Today* 8:192–199.
31. Banuls AL, Hide M, Prugnolle F 2007. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Advances in parasitology* 64:1-70.
32. NCBI.gov [homepage on the internet] National Center for Biotechnology Information. *Leishmania braziliensis* genome view. [update 2007 sep 21; cited 2013 jun 10] Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=5660.
33. Bard E 1989. Molecular Biology of *Leishmania*. *Biochem Cell Biol* 67:516-24.
34. Cornelissen AW, Backes S, Evers R, Grondal EJ, Jess W, Kock J 1990. Transcription analysis in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Society Transactions* 18, 710–714.
35. Furger A, Schürch N, Kurath U, Roditi I 1997. Elements in the 3' untranslated region of procyclin mRNA regulate expression in insect forms of *Trypanosoma brucei* by modulating RNA stability and translation. *Mol Cell Bio* 17:4372-80.
36. Hotz HR, Hartmann C, Huober K, Hug M, Clayton C 1997. Mechanisms of developmental regulation in *Trypanosoma brucei*: a polypyrimidine tract in the 3'-untranslated region of a surface protein mRNA affects RNA abundance and translation. *Nucleic Acids Res* 25:3017-3026.
37. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes Dev* 8:491-501.
38. Rougeron V, De-Meeus T, Hide M, Waleckx E, Bermedez H, Arevalo J 2009. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. *Proceedings of the national academy of sciences* 106: 10224-9

39. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of leishmania in the sand fly vector. *Science*, 324:265- 277
40. Requena JM, Alonso C, Soto M 2000. Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during leishmania infections. *Parasitology Today* 16:246-250.
41. Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, Castillo A, Valladares B 2003. Cloning and characterization of the Leishmania (Viannia) braziliensis HSP70 gene. Diagnostic of the C-terminal fragment rLb70. *J. Parasitol* 89:372-378.
42. Schriefer A, Schriefer ALF, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HÁ, Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM 2004. Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for american tegumentary leishmaniasis. *Infection and immunity* 72:508-514.
43. Floeter-Winter LM, Cruz AK 2011 Biología molecular de leishmania: Genoma da Leishmania. In: A Barral; J Costa, *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*, Salvador, 13-23.
44. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, Oliveira-Neto MP, Brito MEF, Falqueto A, Naiff MF, Grimaldi-Jr, G 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different host and geographic áreas in Brazil. *Journal of clinical microbiology* 41:3126-3132.
45. Oliveira JPC, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo A, Barral A, Oliveira CI 2007. Genetic diversity of Leishmania amazonensis strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid biology and disease* 6:33-45.
46. Silva ACT, Cupolillo E, Volpino AC, Almeida R, Romero AR 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Tropical Medicine and International Health* 2:1388-1398.
47. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schalling HDFH, Presber W, Jaffe CL 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 47:349-358.
48. Toledo JS, Santos AFJ, Moura TR, Antoniazi SA, Brodskyn C, Oliveira CI, Barral A, Cruz AK 2009. Leishmania (Viannia) Braziliensis transfectants overexpressing the miniexon gene lose virulence in vivo. *Parasitology International* 58:45-50.
49. Rodrigues JJS. Processamento de RNA. In: Zaha A. *Biologia Molecular Básica*. 3ª Edição. Porto Alegre: Mercado Aberto;2003. p. 251-76
50. Serin MS, Waki K, Chang K, Aslan G, Direkel S, Otag F, Kayar B, Koksall F, Emekdas G 2007. Consistence of miniexon polymerase chain reaction-restriction

fragment length polymorphism and single-copy gene sequence analyses in discriminating *Leishmania* genotypes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57:295-99.

51. Katakura K, Kawazu S, Sanjoba C, Naya T, Matsumoto Y, Ito M, Nagakura K, Aikawa M, Hashiguchi Y 1999. *Leishmania* mini-exon genes for molecular epidemiology of leishmaniasis in China and Ecuador. *Tokai J Exp Clin Med* 23:393-9.

52. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck P, Felger I 2003. Identification and differentiation of *Leishmania* species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 41:3147-53.

53. Saki J, Mearmar AR, Oormazdi H, Akhlaghi L, Maraghi S, Mohebbali M, Khademvatan S, Razmjou E 2010. Mini-exon genotyping of *Leishmania* species in Khuzestan province, southwest Iran. *Iranian J Parasitol* 5:25-34.

54. Williams JGK, Kubelik AR, Livak KL 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary *primers* are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18:6531-6535.

55. Welsh J, McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary *primers*. *Nucleic Acids Res* 18:7213-7218.

56. Ferreira ME, Grattapaglia D 1998. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3 Edição. Brasília: Embrapa Cenargen, 220pp.

57. Martinez E, Alonso V, Quipe A, Thomas MC, Alonso R, Piñero JE, González AC, Ortega A, Valladares B 2003. RAPD method useful for distinguishing *Leishmania* species: design of specific *primers* for *L. braziliensis*. *Parasitology* 127: 513-517.

58. Gomes RF, Macedo MR, Pena SDJ, Melo MN 1995. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp. Parasitol* 80:681-687.

59. Noyes HÁ, Belli AA, Maingon R 1996. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction *primers* for *Leishmania* identification. *Am J Trop Med Hyg* 55:98-105.

60. Segatto M, Ribeiro SL, Costa DL, Costa CHNC, Oliveira MR, Carvalho SFG, Macedo AM, Valadares MS, Detze R, Brito CFA, Lemos EM 2012. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:39-47.

61. NCBI.gov [homepage on the internet] National Center for Biotechnology Information. BLAST Assembled Reseq genomes. [update 2013 jun 20; cited 2013 jun 26] Available from <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

62. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ. [homepage on the internet] New England Biolabs. NEBcutter V2.0. [update 2003 jun 20; cited 2013 jun 26] Available from <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>
63. Hall TA 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp* 41:95-98.
64. Felsenstein J [homepage on the internet] Phylip (Phylogeny inference Package) version 3.5 [update 2009 sep 20; cited 2013 jun 26] Available from <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
65. Schuonian G, mauricio E, Cupolillo E 2010. Is it time to revise the nomenclature of Leishmania. *Trends in parasitology* 26:466-9.
66. Cupolillo E, Momen H 2000 Speculations on the origin and evolution of the genus Leishmania. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:2983-588.
67. Campos-Ponce M, Ponce C, Ponce E, Maingon RDC 2005. Leishmania chagasi/infantum: further investigations on Leishmania tropisms in atypical cutaneous and visceral leishmaniasis foci in Central America. *Experimental Parasitology* 109:209–219.
68. Braga RR, Lainson R, Ishikawa EA, Shaw JJ 2003. *Leishmania (Viannia) utingensis* n. sp., a parasite from the sandfly *Lutzomyia (Viannamyia) tuberculata* in Amazonian Brazil. *Parasite* 10:111-8
69. Giudice P, Marty P, Lacour JP, Perrin C, Prtlong F, Haas H, Dellamonica P, Fichoux YL 1998. Cutaneous leishmaniasis due to Leishmania infantum. *Arch dermatol* 134:193-198.
70. Belli A, García D, Palacios X, Rodriguez B, Valle S, Videa E, Tinoco E, Marín F, Harris E 1999. Widespread atypical cutaneous leishmaniasis cause by Leishmania (L.) chagasi in Nicaragua. *American Society of tropical medicine and hygiene*, 61:380-385.
71. Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC 1980. Leishmaniose tegumentar americana. Casuística do Hospital Escola da UnB. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 55: 69-76.
72. Sampaio RNR, Sampaio JHD, Tauil PL, Nogueira LSC, Borges KT, Name RQ 2005. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes, com leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 3:249-254.
73. Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL 2009. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical* 42:686-690.
74. Carvalho MSL, Bredt A, Meneghin ERS, Oliveira C 2010. Flebotomíneos (Diptera:Psychodidae) em áreas de ocorrência de leishmaniose tegumentar

americana no Distrito Federal, Brasil, 2006 a 2008. *Epidemiol.Serv.Saúde* 19: 227-237.

75. Sampaio RNR, Ribeiro CDR 1999. Leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 523-528.

76. Nogueira LSC, Sampaio RNR 2001. Estudo hospitalar da leishmaniose tegumentar americana (LTA): epidemiologia e tratamento. *Anais brasileiros de Dermatologia* 76: 51-62.

77. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM 1995. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol* 34:474-479.

78. Marsden PD 1986. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:859-876.

79. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brasil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg* 65:456–465.

80. Blum J, Hatz C, Junghanss T 1994. The therapy of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dtsch Med Wochenschr* 119:1169–1172.

81. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Miranda LFC, Pinto AGS, Pimentel MIF, Pacheco RS 2012. Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. *Journal of Tropical Medicine* 2012.