

LASARO TEIXEIRA FERREIRA

**Caracterização genotípica de isolados de *Leishmania*  
obtidos de hospedeiros portadores de leishmaniose  
tegumentar americana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Área de Concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientadora:** Profa. Dra. Vera Lucia Pereira-Chioccia.

**São Paulo**

**2014**

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Ferreira, Lasaro Teixeira

Caracterização genotípica de isolados de *Leishmania* obtidos de hospedeiros portadores de leishmaniose tegumentar americana/ Lasaro Teixeira Ferreira – São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública  
Orientadora: Vera Lucia Pereira-Chioccola

1. Leishmaniose cutânea
2. Polimorfismo
3. Técnicas de genotipagem
4. *Leishmania (Viannia) brasiliensis*
5. Polimorfismo de fragmento de restrição

SES/CCD/CD- 289/14

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Anisia Teixeira** e **Manuel Ferreira** (*in memoriam*), pelo contínuo incentivo aos estudos e que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Á minha professora e orientadora **Vera Lucia Pereira-Chioccola** pela excelente orientação desde o meu ingresso inicial no programa de estágio probatório até a finalização desta dissertação. Agradeço por acreditar na minha capacidade, pelos inúmeros ensinamentos, pelo profissionalismo, paciência e amizade.

Á minha esposa **Renata Cristina**, pelas palavras de otimismo e superação, pelo apoio aos estudos e compreensão diante de minhas ausências.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle e Doenças, pelos ensinamentos e orientações que recebi durante todas as disciplinas cursadas.

Á **Dra. Maria de Fátima Costa Pires**, ao **Dr. André Tempone** à **Caroline Coppo** e à **Tirces Francine** pelo profissionalismo e dedicação ao departamento de pós-graduação.

Aos Professores Doutores que participaram de minha Banca de Qualificação, **Rita Maria da Silva**, **Samanta Etel Treiger Borborema**, **Regina Célia Moreira**, **Aparecida Helena de Souza Gomes** e **Fabio Colombo** pela contribuição ao enriquecimento deste trabalho.

Ao Biologista **Ricardo Gava**, por ensinar-me as técnicas moleculares utilizadas no diagnóstico das Leishmanioses, Toxoplasmose e Doença de Chagas, bem como ter atuado nas metodologias laboratoriais utilizadas neste trabalho.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular, **Thais Alves, Cristina Meira, Gabriela Motoie, Alexandre Pires e Ricardo Dalla Zanna** pela acolhida, solicitude e colaboração diante minhas dificuldades.

A todos do laboratório de Biologia Molecular de parasitas, **Isabelle Ferreira, Maria Aparecida Perez, Margarete Pereira, Marilena dos Anjos, Inara Bastos, Kate Brighente, Lilian Camilo e Luiz Fernando Gonçalves**, pela amizade e disposição em trocar experiências.

A todos os pesquisadores científicos, assistentes de pesquisa, biólogos, técnicos e auxiliares de laboratório e aos alunos dos programas de Mestrado e Doutorado do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz, que contribuíram direta ou indiretamente em minha formação acadêmica.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo- (FAPESP- 2011/13939-8).

Lasaro Teixeira Ferreira teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

“O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço: quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido”.

Blaise Pascal

## RESUMO

As leishmanioses constituem um grupo de zoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Causam variadas manifestações clínicas e são de grande importância epidemiológica. Constituem um sério problema de saúde pública mundial e estão entre as sete prioridades da Organização Mundial de Saúde.

Nas Américas, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente na forma tegumentar da doença, com diferentes formas clínicas. No Brasil, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença com diversidade de agentes, reservatórios e vetores, apresentando diferentes padrões de transmissão. Considerável variabilidade genética encontrada nestes parasitas explicaria as adaptações nos diferentes ambientes geográficos.

A relevância do quadro sintomatológico e a possível influência genotípica são fatores que devem ser estudados, pois podem contribuir para a melhoria no diagnóstico, tratamento, prognóstico e no desenvolvimento de ações epidemiológicas.

O objetivo deste estudo foi de analisar a variabilidade genética de isolados de *L. (V.) braziliensis* isoladas de amostras clínicas de diferentes regiões do Estado de São Paulo. Foram analisadas 132 amostras de origem humana e canina de casos confirmados por diagnóstico molecular de LTA por *L.(V.) braziliensis* distribuídas em 36 municípios.

As amostras foram ensaiadas por duas metodologias de genotipagem: a PCR-LSSP e a PCR-RFLP. DNA de dezenove amostras foram amplificadas e genotipados pela PCR-LSSP. Os resultados mostraram que os isolados apresentaram características genéticas distintas. A seguir, amostras de DNA de cinquenta e duas amostras foram amplificadas e genotipadas pela PCR-RFLP, onde se revelaram nove padrões genéticos distintos. Esses resultados sugerem que no Estado de São Paulo circulam

isolados de *L. (V.) braziliensis* polimórficos. Estes dados corroboram com estudos em outras regiões do Brasil, que mostram uma grande variabilidade destas populações naturais de focos endêmicos.

**Palavras chave:** Leishmaniose cutânea, polimorfismo, técnicas de genotipagem, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Polimorfismo de Fragmento de Restrição.

## ABSTRACT

The leishmaniasis are a group of zoonoses caused by protozoa of the genus *Leishmania*, presenting with various clinical manifestations and having a wide epidemiological diversity. They are a serious public health problem worldwide and are among the seven priorities of the World Health Organization.

In the Americas, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most prevalent species of the cutaneous form of the disease, causing different clinical forms. In Brazil, American cutaneous leishmaniasis (ACL) has a wide variety of agents, reservoirs and vectors, with different transmission patterns. Considerable genetic variability found in these parasites could explain the adaptations to different geographical environments.

The significance of symptomatology and possible genotypic influence are factors that must be studied as they can contribute to improving diagnosis, treatment, prognosis and development of epidemiological surveillance measures.

The objective of this study was to analyze the genetic variability of isolated of *L. (V.) braziliensis* isolated from clinical samples from different regions of São Paulo. We analyzed 132 samples of human and canine cases of confirmed ACL by molecular diagnosis by *L. (V.) braziliensis* distributed in 36 municipalities.

The samples were tested by two genotyping methods: LSSP-PCR and PCR-RFLP. DNA of nineteen samples was amplified and genotyped by PCR-LSSP. The results showed high levels of polymorphism. Next, the fifty-two DNA samples were amplified and genotyped by PCR-RFLP and produced 9 distinct genetic patterns. These results suggest that polymorphic *L. (V.) braziliensis* isolates have been circulating in the state of São Paulo. These data corroborate studies in other regions of Brazil that show a great variability of these natural populations in endemic areas.

**Keywords:** cutaneous leishmaniasis, polymorphism, genotyping techniques, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Restriction Fragment Length Polymorphism.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**°C** - Graus centígrados

**CCD** - Centro de Controle de Doenças

**CDC**- “Centers for Disease Control and Prevention” - Centros de Controle e Prevenção de Doenças

**cDNA** - DNA complementar

**CVE** - Centro de Vigilância Epidemiológica

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**dNTP**-“\_deoxyribonucleotide triphosphate “- Deoxinucleotídeos tri fosfatados

**EDTA** - “Ethylenediaminetetraacetic acid” - Ácido etilenodiaminotetraacético

**ELISA** - “Enzyme-linked Immunosorbent Assay”- Ensaio Imunoenzimático

**g** - grama(s)

**g** - Aceleração da gravidade terrestre (9,8m/s)

**Gapdh** - “glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase”- Gliceraldeído 3 - fosfato desidrogenase.

**Hsp** - “heat shock proteins”- Proteínas de choque térmico

**IDRM** - Intradermorreação de Montenegro

**IFI** - Imunofluorescência indireta

**IR** – “Intergenic Region”- Região Intergenica

**ITS** - “Internal Transcribed Spacers” - Espaçadores Internos Transcritos

**kDNA** - DNA do cinetoplasto

**Kb** - 1.000 bp (pares de base)

**LC** - Leishmaniose cutânea

**LCD** - Leishmaniose cutânea difusa

**LMC** - Leishmaniose muco cutânea

**LSSP** - “Low Stringency Single Specific Primer”- marcador específico único  
baixa estringência.

**LSU** - “Large Subunit” – subunidade grande

**LT** - Leishmaniose tegumentar

**LTA** - Leishmaniose tegumentar americana

**LV** - Leishmaniose visceral

**LVA** - Leishmaniose visceral americana

**MLEE** - “Multi-Locus Enzyme Electrophoresis”- Eletroforese de enzimas  
multilocus

**mM** - Milimolar

**MS** - Ministério da Saúde

**Ng** - nanograma

**NNN** - Neal, Novy, Nicolle

**NTS** - “Non Transcribed Spacer”- Espaçadores Não Transcritos

**Pb** - pares de bases

**PBS** - “Phosphate Buffered Saline”- Solução Salina Tamponada com Fosfato

**PCR** - “Polymerase Chain Reaction”- Reação em cadeia da polimerase

**pH** - potencial hidrogeniônico

**PAHO** - Pan American Health Organization- “Organização Pan-Americana de Saúde”

**PKDL** - post-kala-azar dermal leishmaniasis- “leishmaniose dérmica pos calazar”

**PM** - Peso Molecular

**PV-LT** - Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar

**RAPD** - “Random Amplified Polymorphic DNA” - Amplificação aleatória de DNA polimórfico.

**rDNA** - DNA ribossômico

**RFLP** - “Restriction Fragment Length Polymorphism” - Polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição

**RNA** - Ácido ribonucleico

**rRNA** - ribosomal Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico ribossomal)

**RNAse** - Ribonuclease

**SFM** - sistema fagocítico mononuclear

**SVS** - Sistema de vigilância sanitária

**SES** - Secretaria de Estado da Saúde

**SINAN** - Sistema de Informação de Agravos de Notificação

**SSR** - “Simple Sequence Repeats”-Sequências simples repetidas

**SSU** - “small-subunit”- pequena subunidade

**TBE** - Tris/ Borato/ EDTA

**Tris-HCl** - tris/ ácido clorídrico

**µl** - microlitros

**$\mu\text{M}$**  - Micromolar

**WHO** - "World Health Organization" - Organização Mundial de Saúde (OMS)

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses nas Américas.....	20
<b>Tabela 2</b> - Número de casos de LTA notificados no Estado de São Paulo no período de 2007 a 2012.....	41
<b>Tabela 3</b> - Distribuição das amostras nos 36 municípios do Estado de São Paulo.....	67
<b>Tabela 4</b> - Marcadores moleculares utilizados no diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar.....	72
<b>Tabela 5</b> - Marcadores moleculares utilizados na genotipagem de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	76
<b>Tabela 6</b> - Relação das amostras clínicas genotipadas por PCR-LSSP.....	82
<b>Tabela 7</b> - Relação das amostras clínicas genotipadas por PCR-RFLP.....	85
<b>Tabela 8</b> - Distribuição das amostras clínicas entre os 9 perfis encontrados nos 17 municípios do Estado de São Paulo.....	86

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Taxonomia de <i>Leishmania</i> .....	19
<b>Figura 2</b> - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> : amastigota (A) e promastigota (B).....	21
<b>Figura 3</b> - Ciclo biológico das leishmanioses.....	24
<b>Figura 4</b> - Mapa demonstrativo do perfil endêmico da leishmaniose visceral (A) e da leishmaniose cutânea(B).....	26
<b>Figura 5</b> - Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> nas Américas.....	27
<b>Figura 6</b> - Casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas.....	28
<b>Figura 7</b> - Teoria Amazônica da expansão da LTA causada por <i>L.(V.) braziliensis</i> .....	30
<b>Figura 8</b> - Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão LTA no Brasil.....	33
<b>Figura 9</b> - Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetores da LTA no Brasil.....	33
<b>Figura 10</b> - Casos de leishmaniose cutânea e mucosa no Brasil (2001-2011).....	34
<b>Figura 11</b> - Exemplos de padrões epidemiológicos de transmissão.....	36
<b>Figura 12</b> - Histórico da cobertura vegetal do Estado de São Paulo.....	37
<b>Figura 13</b> - Mapa dos Municípios do Estado de São Paulo com registro de incidência da média de casos de LTA por município (1998 – 2011)....	38

<b>Figura 14</b> - Número de casos autóctones e municípios afetados pela LTA no Estado de São Paulo.....	40
<b>Figura 15</b> - Algoritmo da LTA.....	44
<b>Figura 16</b> - Formas clínicas da LTA.....	45
<b>Figura 17</b> - Distribuição geográfica das espécies de <i>leishmania</i> causadora da LTA em <i>Canis familiaris</i> .....	46
<b>Figura 18</b> - LTA canina provocada por <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> .....	47
<b>Figura 19</b> - Cinetoplasto em formas promastigotas.....	61
<b>Figura 20</b> - Diagrama esquemático Gene RNA mini-exon.....	62
<b>Figura 21</b> - Organização do locus de rRNA de Tripanossomatídeos.....	63
<b>Figura 22</b> - Localização da HSP70 no genoma de <i>L. (V.) braziliensis</i> .....	64
<b>Figura 23</b> - Mapa do Brasil e do Estado de São Paulo indicando a localização dos municípios onde as amostras clínicas foram coletadas.....	66
<b>Figura 24</b> - Delineamento experimental.....	68
<b>Figura 25</b> - Eletroforese em géis de agarose: marcador molecular 150/152(A), marcador molecular LB-3C/LU-5A(B), marcador molecular $\beta 1/\beta 2$ (C), marcador molecular Gapdh-4(D).....	79
<b>Figura 26</b> - Análise dos produtos amplificados utilizando os marcadores B1-B2.....	81
<b>Figura 27</b> - Análise dos perfis de PCR- LSSP.....	81
<b>Figura 28</b> - Análise dos produtos amplificados de <i>L. (V.) braziliensis</i> identificados com o marcador que amplifica a região ITS.....	84

**Figura 29** - Análise dos perfis de PCR-RFLP por eletroforese em géis de poliacrilamida 8%..... 84

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. Classificação e nomenclatura.....	16
1.2. Morfologia.....	21
1.3. Transmissão e ciclo biológico.....	22
1.4. Dados epidemiológicos.....	24
1.4.1. Epidemiologia mundial das leishmanioses.....	24
1.4.2. Epidemiologia da LTA nas Américas.....	27
1.4.3. Epidemiologia da LTA no Brasil.....	29
1.4.3.1. Subgênero <i>Viannia</i> .....	30
1.4.3.2. Subgênero <i>Leishmania</i> .....	32
1.4.4. Epidemiologia da LTA no Estado de São Paulo.....	37
1.5. Modalidades clínicas da LTA.....	41
1.6. Leishmaniose Tegumentar Americana Canina.....	45
1.7. Tratamento.....	48
1.8. Genoma de <i>Leishmania</i> .....	50
1.9. Diagnóstico laboratorial.....	52
1.9.1. Métodos parasitológicos.....	52
1.9.2. Métodos imunológicos.....	53
1.9.3. Métodos moleculares.....	55
1.10. Métodos de genotipagem.....	56
1.10.1. Eletroforese de enzimas (isoenzimas).....	57
1.10.1.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	57
1.10.1.2 PCR-SSR (PCR-Simple Sequence Repeats) .....	58
1.10.1.3 PCR-LSSP (PCR- Low Stringency Single Specific Primer).....	58
1.10.1.4 PCR-RFLP.....	59
1.10.2. Regiões gênicas utilizadas como alvos para genotipagem.....	60
1.10.2.1 kDNA.....	60
1.10.2.2 RNA mini-exon.....	61
1.10.2.3 Internal Transcribed Spacers.....	62

1.10.2.4 Heat shock proteins.....	63
<b>2. OBJETIVO.....</b>	<b>65</b>
2.1. Objetivos específicos.....	65
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>66</b>
3.1. Amostras clínicas.....	66
3.2. Delineamento experimental.....	68
3.3. Diagnóstico molecular.....	69
3.3.1. Extração de DNA.....	69
3.3.2. Quantificação do DNA .....	69
3.3.3. PCR.....	70
3.3.4. Eletroforese e gel de agarose.....	71
3.4. Padronizações.....	73
3.5. Genotipagens.....	73
3.5.1. Genotipagem por PCR-LSSP.....	73
3.5.1.1.Primeira PCR.....	73
3.5.1.2.PCR-LSSP .....	74
3.5.2. Genotipagem por PCR-RFLP – ITS.....	74
3.5.2.1.PCR.....	74
3.5.2.2.Isolamento dos produtos amplificados a partir do gel de agarose.....	77
3.5.2.3.RFLP.....	77
3.5.3. Eletroforese e gel de poliacrilamida.....	78
3.6. Análise de dados.....	78
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>79</b>
4.1. Diagnóstico molecular.....	79
4.2. Genotipagens.....	80
4.2.1. Genotipagem por PCR-LSSP.....	80

4.2.2.	Genotipagem por PCR-RFLP.....	83
5.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
6.	<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	95

## **ANEXOS**

**Anexo 1** - Cadastro no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.

**Anexo 2** - Parecer do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz.

**Anexo 3** - Ferreira LT, Gomes AHS, Pereira-Chioccola VL. Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with american cutaneous leishmaniasis. 2014. Acta Tropica. Submit.

## 1. INTRODUÇÃO

As Leishmanias são protozoários que pertencem ao gênero *Leishmania* e à família dos Tripanosomatídeos. Estes organismos são unicelulares, possuem um flagelo e uma estrutura rica em DNA denominada cinetoplasto. As diversas espécies do gênero *Leishmania* demonstram ampla distribuição geográfica mundial, causando um amplo conjunto de enfermidades denominadas Leishmanioses. Esses parasitos infectam grande variedade de hospedeiros, sejam eles silvestres ou domésticos e são transmitidos por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (Lainson & Shaw, 1987; Grimaldi et al., 1993; Lainson & Shaw, 1998; Secundino et al., 2011). As leishmanioses são consideradas doenças tropicais negligenciadas, afetando principalmente a populações inseridas no ciclo da pobreza e da desigualdade social. Estima-se que 14 milhões de pessoas estejam infectadas e que a cada ano 500 mil desenvolvam a forma visceral e 1,5 milhões a forma tegumentar. As leishmanioses são notificadas somente em 37.5% dos 88 países nos quais elas ocorrem (Secundino et al., 2011).

O curso da doença pode variar de uma úlcera com cura espontânea, uma destruição muco cutânea a um grave comprometimento visceral, que pode ser letal se não for tratado (Ashford, et al., 1992; Grimaldi & Tesh, 1993). De acordo com a diversidade clínica, as leishmanioses são agrupadas em duas principais categorias: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT).

A LT compreende a forma cutânea, caracterizada pela produção de lesões cutâneas limitadas ulcerosas, e a forma muco cutânea, quando aparecem lesões destrutivas e desfigurantes nas mucosas do nariz, boca e faringe. Ambas as formas clínicas geram impactos nas áreas social, psicológica e econômica dos indivíduos afetados (Rey, 2001b; Coura, 2005b).

A LV é considerada a forma mais grave. É uma doença crônica e potencialmente fatal em indivíduos não tratados e subnutridos, é causada por parasitas que possuem tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do

baço, fígado e medula óssea. (Gontijo, 2003). A sintomatologia típica inclui febre prolongada e irregular, hepatoesplenomegalia e anemia. O período de incubação varia entre dias, meses e anos, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro (Colombo, 2012). Após a administração do esquema terapêutico e a consequente cura da LV causada principalmente pela espécie *Leishmania (Leishmania) donovani*, os pacientes ainda podem desenvolver a forma cutânea da doença, denominada de PKDL (Secundino et al., 2011).

Em relação ao padrão de transmissão da LV, há o ciclo zoonótico, em que a transmissão do parasito ocorre do animal para o vetor e posteriormente para o hospedeiro humano e outros animais, especialmente os canídeos são os reservatórios naturais. A segunda forma de transmissão denominada ciclo antroponótico ocorre quando a LV é transmitida entre humanos pelo inseto vetor (Secundino et al., 2011).

### **1.1. Classificação e nomenclatura**

Os parasitas que causam as leishmanioses pertencem ao reino Protista, sub-Reino Protozoa, que compreende organismos unicelulares nucleados. São pertencentes ao filo Sarcomastigophora e ao subfilo Mastigophora consistindo de organismos que se locomovem por meio de flagelos ou cílios. Possuem um ou mais filamentos, respectivamente. Incluem-se na classe Zoomastigophora, que compreende os seres heterotróficos, ordem Kinetoplastida, apresentando o cinetoplasto, que corresponde a uma organela que contém DNA. Todas as espécies pertencem à família Trypanosomatidae, sendo essencialmente parasitas (Degraeve et al., 1994; Lainson & Shaw, 1998; Rey, 2001a; Rey, 2001b).

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Figura 1) (Lainson & Shaw, 1987). Esta divisão baseia-se na posição ocupada pelo parasita no tubo digestivo do vetor, que pode ser na região peripilária ou suprapilária. As espécies do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se no intestino anterior e médio, na região suprapilária. Já as

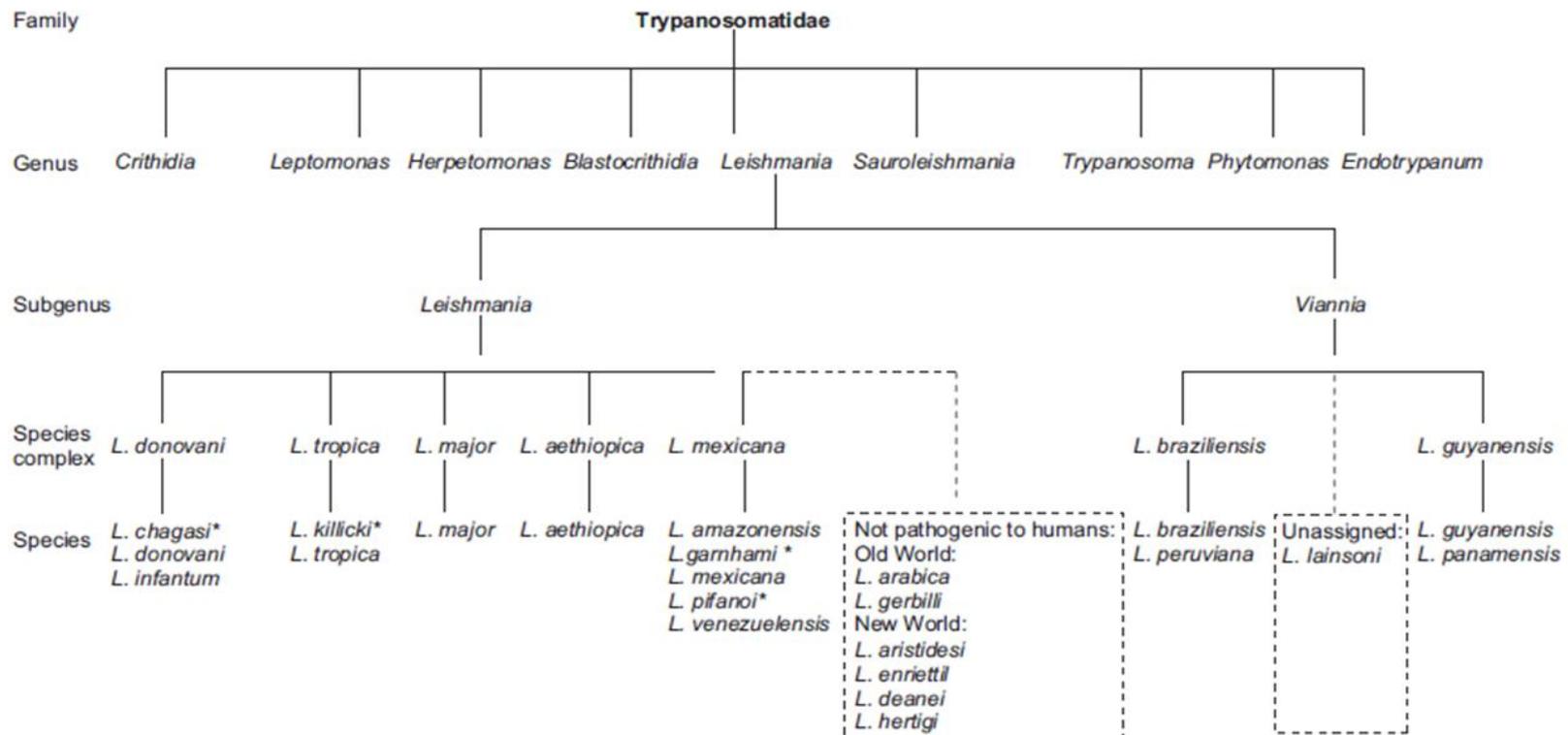
pertencentes ao subgênero *Viannia* desenvolvem-se tanto no intestino anterior, médio e posterior, na região peripilária. Esta classificação proposta em 1987 foi confirmada com estudo de isoenzimas.

Com exceção de pequenas diferenças no tamanho, todas as espécies de *Leishmania* são morfologicamente muito semelhantes, porém com diferentes classificações, manifestações clínicas e ampla distribuição geográfica (Cupolillo et al., 1994; Fernandes et al., 1994). Os critérios iniciais para a identificação e classificação destes parasitas baseavam-se nas manifestações clínicas, na localidade, nas características epidemiológicas, dentre outros. No entanto, a grande diversidade destes fatores impossibilitou uma classificação precisa e eficaz. Com o desenvolvimento de métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares surgiram marcadores taxonômicos mais precisos, com base em características intrínsecas dos próprios parasitas. Entre as metodologias atualmente em uso podemos citar o uso das isoenzimas, sondas de DNA e análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), utilizando seqüências de DNA diferentes como alvos. Portanto, os métodos moleculares associados aos bioquímicos são capazes de oferecer um melhor entendimento da epidemiologia molecular, estrutura da população e filogenia de diferentes espécies de *Leishmania* (Cupolillo et al., 1998).

A Tabela 1 mostra a classificação e a nomenclatura das espécies de *Leishmania* distribuídas nas Américas (Novo Mundo) que foram baseadas na distribuição geográfica e no tipo de lesões que causam ao homem. Outras espécies da América do Sul como *L. (V.) equatoriensis*, *L. (L.) hertigi*, *L. (L.) deanei*, *L. (L.) aristedesii* e *L. (L.) forattinii* foram descritas até agora apenas em animais silvestres (Cupolillo et al., 1994; Cupolillo et al., 1998). No início desta década foi descrita uma nova espécie, a *L. (V.) lindenbergi* isolada de soldados por ocasião de um surto de leishmaniose no Estado do Pará, Brasil (Silveira et al., 2002).

A leishmaniose visceral é causada por parasitas do subgênero *Leishmania*, que engloba as espécies *L. donovani*; *L. infantum*; *L. chagasi* e *L. archibaldi* (Lainson e Shaw, 1987). *L. donovani* causa a infecção em

hospedeiros de países asiáticos, principalmente na Índia, Paquistão e Bangladesh e, na África Oriental. *L. infantum* esta distribuída no Mediterrâneo, África Oriental, Próximo Oriente, norte da Ásia e da China. *L. archibaldi* está distribuída no Sudão. Nas Américas, o agente etiológico da LV é *L. chagasi* ou *L. infantum*. (Lainson & Shaw, 1987; Rey, 2001a).



\*Species status is under discussion. *L. chagasi* in the New World is the same species than *L. infantum*

Figura 1 – Taxonomia de *Leishmania*.

Fonte: Brasil, 2006.

Tabela 1: Principais agentes etiológicos, manifestações clínicas e distribuição geográfica das leishmanioses nas Américas<sup>1</sup>.

<b>Espécie</b>	<b>Lesões causadas no homem</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Cutâneas e mucosas	América Central e do Sul até o norte da Argentina
<i>(V.) peruviana</i>	Predominantemente cutâneas	Altos vales andinos e encosta ocidental dos Andes
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Predominantemente cutâneas	Noroeste e Norte da América do Sul até o rio Amazonas
<i>L. (V.) panamensis</i>	Predominantemente cutâneas	América Central e costa pacífica da América do Sul
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Norte do Estado do Pará
<i>L. (V.) shawi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) naiffi</i>	Casos raros com lesões cutâneas	Região Amazônica
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Cutâneas e mucosas	Colômbia Panamá e Venezuela
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Cutâneas eventualmente mucosas difusas	México e América Central
<i>L. (L.) amazonenses</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	América Central, Norte, Nordeste, Centro Oeste <sup>2</sup> ; Sudeste <sup>3</sup> e Sul do Brasil.
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Cutâneas eventualmente cutâneas difusas	Venezuela
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutâneas	Venezuela
<i>L. (L.) garnhami</i>	Predominantemente cutâneas	Andes Venezuelanos
<i>L. (L.) infantum = L. (L.) chagasi</i>	Lesões viscerais (calazar)	Sul do México ao Norte da Argentina, Brasil.

<sup>1</sup>Segundo Marzochi et al., 1999; <sup>2</sup>Dorval et al, 2006; <sup>3</sup>Taniguchi et al., 2005.

## 1.2. Morfologia

Os parasitas flagelados da família Trypanosomatidae possuem aspectos diferentes de acordo com a sua interação com o hospedeiro parasitado. A forma amastigota é uma estrutura pequena (2 a 6µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura) achatado, imóvel, com núcleo relativamente grande e redondo ocupando de metade a dois terços do corpo celular. Apresenta o cinetoplasto visível e flagelo reduzido. Esta forma é intracelular, sendo encontrada no hospedeiro vertebrado. (Fig. 2A)

A forma promastigota é comprida e achatada. O cinetoplasto se encontra na posição anterior do parasita, próximo ao flagelo. Apresenta dimensões de 14 a 20 µm de comprimento, por 1,5 a 4 µm de largura. (fig. 2B).

O cinetoplasto é uma organela composta de DNA específico (kDNA) e está presente somente em organismos pertencentes à Classe Kinetoplastida. O flagelo é composto por nove microtúbulos, dispostos em círculo e aos pares e mais dois centrais (Grimaldi & Tesh, 1993; Rey, 2001a; Coura, 2005a).

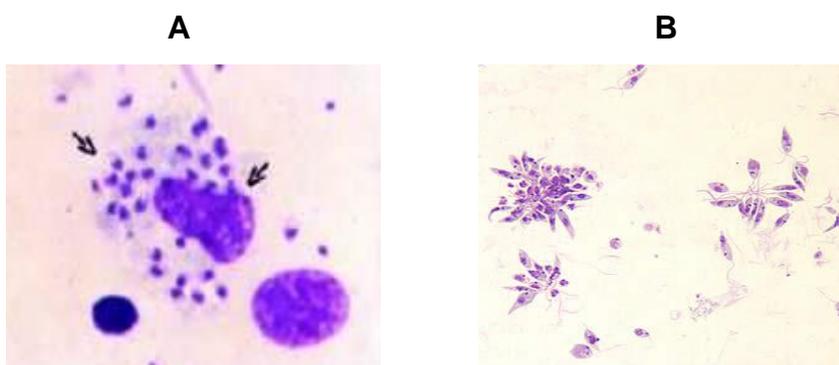


Figura 2. Formas evolutivas de *Leishmania*: amastigota (A) e promastigota (B).

Fonte: A: Gontijo, 2003; B: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>

### 1.3. Transmissão e ciclo biológico

Os vetores das leishmanioses são insetos denominados flebotomíneos. Pertencem à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília *Phlebotominae*. Apenas dois gêneros de flebotomíneos possuem importância médica: *Phlebotomus*, na Ásia, Europa e África, e *Lutzomyia*, nas Américas. No Brasil, dependendo da localização geográfica, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Miranda et al., 2011; Grimaldi & Tesh, 1993; Rey, 2001a; Coura, 2005a).

Os flebotomíneos são insetos pequenos, pilosos, corcundas e possuem a característica de manter as asas abertas, quando em pouso. São holometábolos, cujas formas jovens (ovos, larvas e pupas) vivem na natureza em ambiente úmido, rico em matéria orgânica de onde obtém abrigo e alimento. Estes insetos têm hábito crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos e protegidos. São encontrados em diferentes regiões geográficas, condições climáticas e ambientes. A maioria dos flebotomíneos habita o ambiente silvestre, porém podem atacar os homens e animais, cujas habitações estão próximas a regiões de mata. Algumas espécies apresentam acentuada antropofilia e domiciliação, o que as tornam epidemiologicamente importantes na transmissão de doenças. Somente as fêmeas são hematófagas. O repasto sanguíneo realizado no hospedeiro pode durar de três a cinco minutos e estará finalizado quando ocorrer à saída de uma gota de plasma sanguíneo da extremidade posterior do abdome. Os flebotomíneos necessitam de carboidratos a fim de promover o seu metabolismo e oferecer condições favoráveis para que as formas promastigotas de *Leishmanias* desenvolvem-se e se multipliquem em seu trato digestivo. Os ovos possuem forma elíptica, são alongados e pouco encurvados. A alimentação por meio de sangue se faz necessária para promover o desenvolvimento do folículo ovariano. Cada fêmea pode produzir entre 40 e 70 ovos, que permanecerão

aderidos ao substrato graças à substância produzida pelas glândulas acessórias. O período de incubação dos ovos é de aproximadamente uma semana, em condições ótimas de temperatura, entre 25°C e 27°C, e elevada umidade relativa do ar. Na ausência de umidade os ovos não resistem por mais de 48 horas (Miranda et al., 2011; Grimaldi & Tesh, 1993; Lainson & Shaw, 1998; Rey, 2001a; Coura, 2005a).

O ciclo da leishmaniose alterna entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado e pode ser visto esquematicamente na figura 3. Juntamente com a picada do vetor, as formas promastigotas são introduzidas no hospedeiro vertebrado e são fagocitadas pelos macrófagos da pele. Entre 1 a 4 horas as formas promastigotas se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando os macrófagos estão quase repletos com amastigotas, eles se rompem e liberam os parasitas que vão infectar outros macrófagos, determinando a leishmaniose cutânea. Caso a infecção seja por uma espécie causadora da leishmaniose visceral, as amastigotas são transportadas até os órgãos internos, propagando-se em direção a vários tipos de células e se reproduzindo por divisão binária.

Em decorrência de um novo repasto sanguíneo no hospedeiro infectado, os flebotomíneos ingerem as células parasitadas com as formas amastigotas. No intestino do vetor as formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas procíclicas flageladas que se replicam intensamente. A seguir passam por um processo de metaciclogênese, originando as formas promastigotas metacíclicas (infectantes). As formas promastigotas metacíclicas das espécies do subgênero *Leishmania* exibem desenvolvimento suprapilárico (porção do trato digestivo anterior ao piloro, sobretudo nas regiões abdominais e torácicas do intestino médio). As formas promastigotas das espécies do subgênero *Viannia* exibem desenvolvimento peripilárico, na região posterior do trato digestivo, na região pilórica e no intestino médio abdominal, migrando para as porções mais anteriores durante o seu desenvolvimento (Pimenta et al., 2012). Rapidamente essas

formas se direcionam para a cavidade bucal, onde são introduzidas no novo hospedeiro durante o repasto (Rey, 2001a; Coura, 2005a).

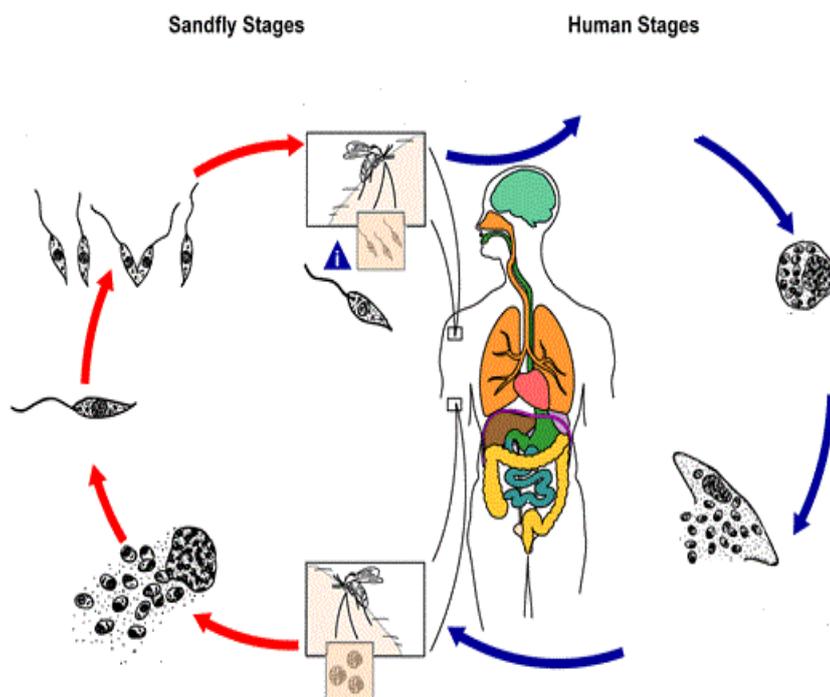


Figura 3. Ciclo biológico das leishmanioses.

Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

## 1.4. Dados epidemiológicos

### 1.4.1 Epidemiologia mundial das leishmanioses

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública mundial, pois são causadas por 21 espécies do gênero *leishmania* patogênicas ao homem. Estão presentes em todos os continentes, e são endêmicas em 98 países (PAHO, 2013) (Figuras 4A e 4B). A prevalência é de 12 milhões de pessoas infectadas. Estima-se que anualmente ocorra dois

milhões de novos casos -1,5 milhões de casos de leishmaniose cutânea e 500 000 casos de leishmaniose visceral- (WHO, 2002).

A leishmaniose tegumentar é prevalente em 82 países. Estima-se que 1,5 milhões de casos por ano. Os casos são relatados na África, principalmente em Marrocos, Etiópia e Tunísia. No Oriente Médio, principalmente no Afeganistão, Paquistão, Irã, Iraque, Síria e Arábia Saudita. Na América Latina, principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela. Mais de 90% das leishmanioses cutâneas ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria, e 90% do muco-cutâneas ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (Goto & Lauletta Lindoso, 2010; Goto & Lauletta Lindoso, 2012).

A leishmaniose visceral é endêmica em 65 países, com um total de 200 milhões de pessoas com o risco de adquirir a doença, e mais de 90% dos casos concentram-se em cinco países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (Zijlstra et al., 2001; Secundino et al., 2011).

O aumento da incidência dos casos de leishmaniose principalmente nas duas últimas décadas, nas regiões afetadas deve-se à migração de pessoas de áreas rurais para áreas urbanas em busca de oportunidades de trabalho, migração em consequência de guerras, distúrbios em microambientes devido a mudanças de clima e intervenção humana, a deterioração das condições socioeconômicas e a presença de co-infecção entre AIDS e *Leishmania* (Goto & Lauletta Lindoso, 2012; WHO, 2002).

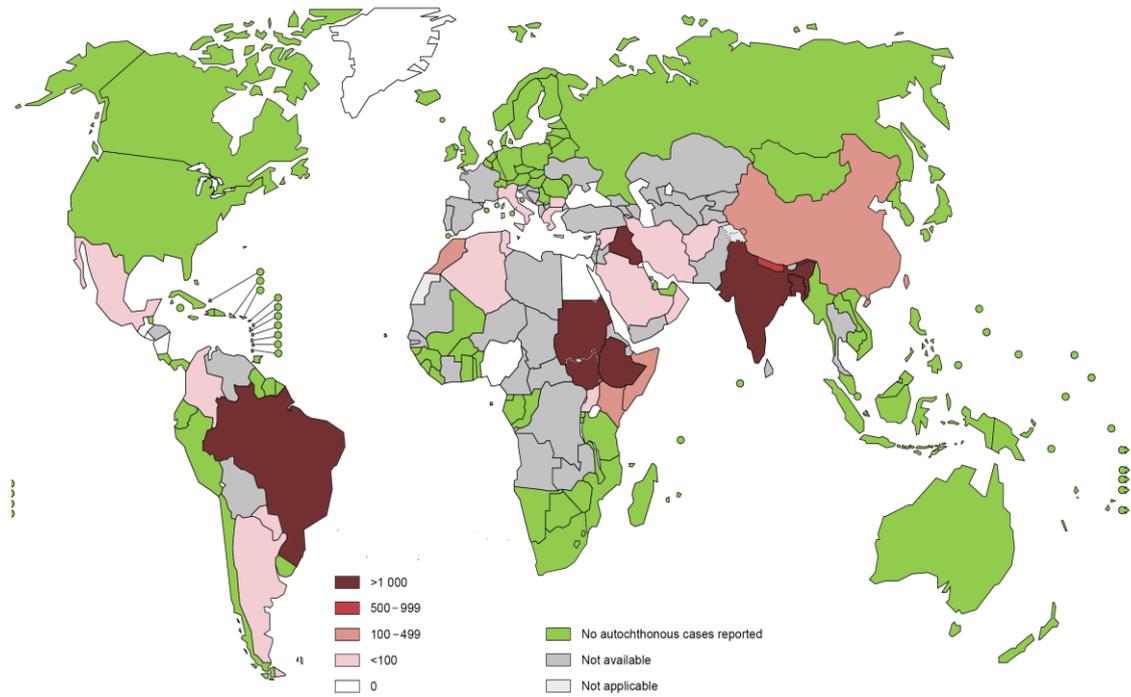


Figura 4A. Mapa demonstrativo do perfil endêmico da leishmaniose visceral com notificações referente ao ano de 2012.

Fonte: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_VL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png)

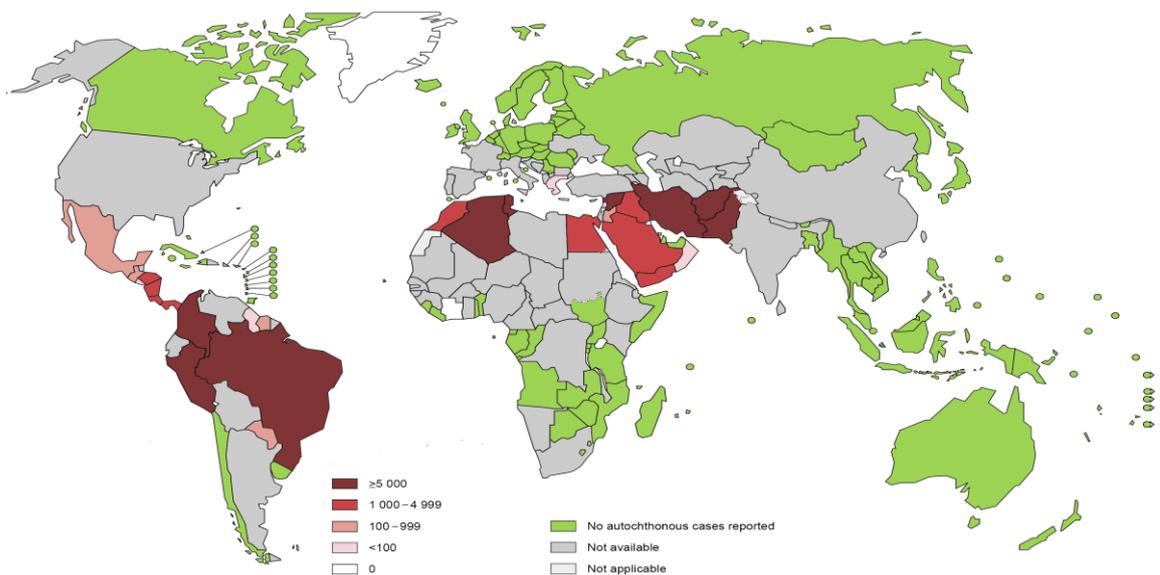


Figura 4B. Mapa demonstrativo do perfil endêmico da leishmaniose cutânea com notificações referente ao ano de 2012.

Fonte: [http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis\\_CL\\_2013.png](http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png)

### 1.4.2. Epidemiologia da LTA nas Américas

Nas Américas a LT é considerada endêmica e autóctone. O ciclo de transmissão é zoonótico, dotado de grande complexidade devido a uma grande variedade de espécies de vetores (cerca de 50 espécies de flebotomíneos potencialmente transmissoras). Os vetores são adaptados aos diversos tipos de clima e padrões geográficos, reservatórios (domésticos e selvagens) e parasitas. A espécie *L. (V.) braziliensis* exibe ampla distribuição e está presente em todos os países (com exceção dos EUA) evidenciando, desta forma, sua propagação do ambiente silvestre para o peri e intra domicílio (PAHO, 2013). A figura 5 exibe as diversas espécies de *Leishmania* distribuídas nas Américas.



Figura 5. Distribuição das espécies de *leishmania* nas Américas (2009).

Fonte: PAHO, 2013.

Nas Américas, entre 2001 e 2011 foram registrados 638,702 casos de leishmaniose cutânea e mucosa. A América do Sul concentra o maior número de casos, 279.856 (43,81%), seguido pelos países que compõe a Comunidade Andina das nações, 257.812 (40,36%). Os países pertencentes à América Central somam 100.475 (15,73%). O México, somente com dados de 2011 registrou 468 casos. A figura 6 exhibe o número de casos de LTA nas Américas compreendendo um período de dez anos (PHO, 2013).

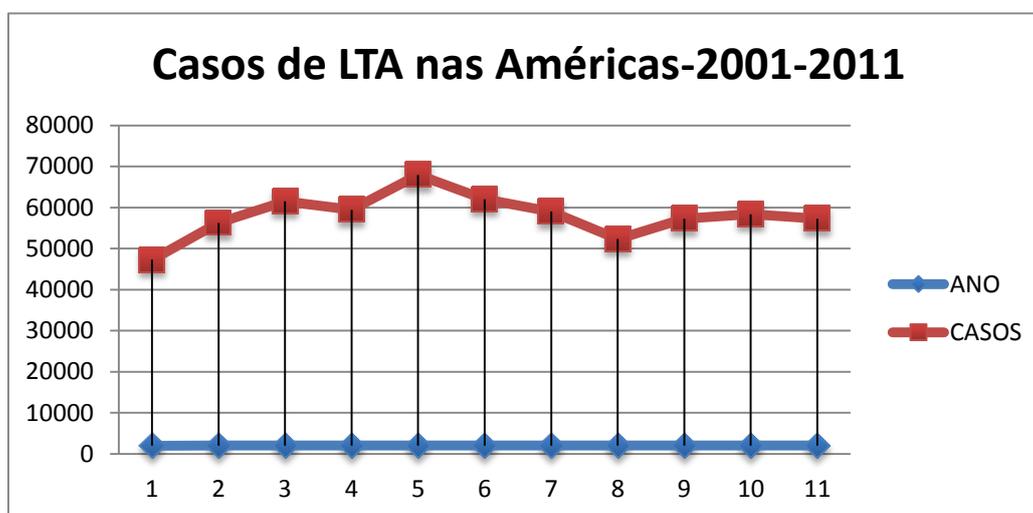


Figura 6. Casos de leishmaniose cutânea e mucosa nas Américas 2001-2011

Fonte: PAHO, 2013.

De acordo com relatório elaborado pela World Health Organization (2002), nas Américas o fenômeno da urbanização é considerado o principal fator de risco para a disseminação das leishmanioses. Há casos notificados em regiões anteriormente não endêmicas para a doença. A urbanização da LTA viabiliza o processo de colonização de seus vetores em ambientes onde ocorre a presença da fauna sinantropica na periferia das cidades e em áreas com vegetação densa. O mecanismo de translocação de *L.(V.) braziliensis* no ambiente peridoméstico oferece maior risco para a geração de zoonoses emergentes e pandemias (PHO, 2013; Salomón et al., 2011). Estimativas sugerem que dentro de 50 anos cerca de cinco bilhões de pessoas viverão

nos centros urbanos, constituindo uma adaptação dos vetores com a evolução do ambiente urbano. Dentro desse contexto, há necessidade dos países em aprimorar o serviço de vigilância epidemiológica das leishmanioses a fim de desenvolver ações relevantes de prevenção e controle da doença para que os indivíduos infectados com LTA tenham diagnóstico, acompanhamento médico e tratamento adequados (PHO, 2013).

### **1.4.3. Epidemiologia da LTA no Brasil**

A teoria amazônica sobre a expansão da LTA no Brasil foi proposta por Marzochi & Marzochi (1994). Segundo essa teoria a LTA surgiu na região amazônica ocidental e o processo de sua dispersão para outras áreas do Brasil ocorreu entre 1880 e 1912 durante o ciclo econômico da borracha (Vale et al., 2005). Por volta de 1930 a expansão seguiu em direção ao Sudeste em decorrência da expansão do cultivo de café. Posteriormente outros ciclos extrativistas com suas mobilidades sociais, ocorrido nas décadas de 60, 70, 80 e 90 teriam contribuído para a expansão da LTA, com reaparecimento em vários estados das regiões Centro-Oeste e Sudeste e Sul (Marzochi et al., 1999; Coura, 2005b). Essa hipótese de origem amazônica da LT é alicerçada através de estudos moleculares no parasita, onde foi constatada a heterogeneidade genética de *L. (V.) braziliensis* na região amazônica em comparação de sua homogeneidade genética fora desta região, sugerindo sua posterior introdução, longe de sua origem e propagação clonal (Altamirano et al., 2003). A figura 7 ilustra o processo da dispersão da LTA no Brasil com base na teoria amazônica.



Figura 7. Teoria Amazônica da expansão da LTA causada por *L.(V.) braziliensis*.  
Fonte: Bedoya-Pacheco et al., 2011.

No Brasil, a LTA apresenta ampla disseminação em todo o território nacional, devido a uma ampla diversidade de agentes, reservatórios e vetores, gerando diferentes padrões de transmissão, tornando-a uma enfermidade de difícil controle (Brasil, 2010).

#### 1.4.3.1. Subgênero *Viannia*

As espécies mais frequentes que causam a leishmaniose tegumentar no Brasil pertencentes ao subgênero *Viannia* são *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*. São responsáveis pela forma cutânea localizada, causando uma lesão na pele que pode curar espontaneamente após algumas semanas ou meses.

*L. (V.) braziliensis* é considerada espécie predominante em áreas endêmicas. Possui ampla distribuição desde a Amazônia até o sul do país. A

espécie causa uma forma muco cutânea que se inicia com úlcera primária de pele que pode desenvolver metástases na região oronasal. Pode ocorrer grande destruição de tecidos e, em alguns casos, são extremamente mutilantes. (Gontijo & Carvalho, 2003; Basano & Camargo, 2004; Pinheiro, 2004; Secundino et al., 2011). Em relação aos reservatórios, o parasito infecta mamíferos silvestres e sinantrópicos, dentre os quais podemos citar roedores de diversos gêneros, como o *Necromys lasiurus* (rato-do-mato), *Ratus rattus*, *Nectomys squamipes* (rato d' água), *Akodon arviculoides*, *Dasyprocta azarae* (cutia), *Kannabateomys amblyonyx* (rato-da-taquara), *Agouti paca* (paca), *Oryzomys capito* (rato-do-arroz), *Oryzomys nigripes* (rato catingueiro), *Proechimys spp.* Dentre os marsupiais exemplares do gênero *Didelphis*, temos as espécies *Didelphis marsupialis* (gambá-comum), *Didelphis aurita* (gambá-de-orelha-preta). Dentre os mamíferos placentários podemos citar a espécie *Choloepus didactylus* (preguiça-real). Dentre os reservatórios animais domésticos para *L. (V.) braziliensis* incluem-se as espécies *Canis familiaris* (cão doméstico), *Felis catus* (gato doméstico), diversas espécies de equinos, *Equus caballus* (cavalo), *Equus asinus* (jumento) e mulas (Brandão-Filho et al., 2011).

A espécie *L. (V.) guyanensis* causa lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, é mais frequente no norte da bacia amazônica, nos estados do Amapá, Roraima, Amazonas e Pará e Mato Grosso (Lainson & Shaw, 1987; Delgado et al., 1997; Romero et al., 2002). Vários mamíferos selvagens são considerados hospedeiros naturais, principalmente a preguiça-de-dois-dedos (*Choloepus didactylus*) e o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), além dos marsupiais e algumas espécies de roedores. Em consequência do desmatamento e invasão das florestas, esses animais passam a conviver próximo ao homem. O principal vetor é o *Lutzomyia umbratilis* (Brandão-Filho et al., 2011).

Diversas espécies do subgênero *Viannia* como *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) colombiensis*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) equatoriensis* foram isoladas de animais silvestres nas Regiões Amazônicas

e Nordeste, mas raramente infectam o homem (Delgado et al., 1997; Romero et al., 2002).

#### **1.4.3.2. Subgênero *Leishmania***

No Brasil a única espécie do subgênero *Leishmania* responsável por lesões cutâneas e mucosas é *L. (L.) amazonensis*. Produz lesões cutâneas únicas ou em pequeno número. Não produz metástases mucosas, mas pode causar a leishmaniose cutâneo-difusa ou a forma disseminada da doença em indivíduos imunossuprimidos. As lesões causadas por *L. (L.) amazonensis* apresentam grande número de parasitos. Estes parasitos estão presentes nas florestas dos estados da Amazônia, Pará e Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Goiás. Seus hospedeiros naturais são os marsupiais e roedores, além da espécie *Cerdocyon thous* (raposa caranguejeira). Em relação aos animais domésticos, as espécies *Canis familiaris* e *Felis catus* tem sido encontradas naturalmente infectadas por *L. (L.) amazonensis*. Os vetores são espécies do complexo *Lutzomyia flaviscutellata*, de hábitos noturnos e voo baixo, sendo pouco antropofílicos, razão de uma menor frequência de infecção humana por esta espécie (Gomes et al., 1992; Lainson & Shaw, 1998; Marzochi et al., 1999; Brandão-Filho et al., 2011).

As figuras 8 e 9 apresentam a distribuição das espécies de *leishmania* e seus vetores responsáveis pela transmissão da LTA no Brasil.

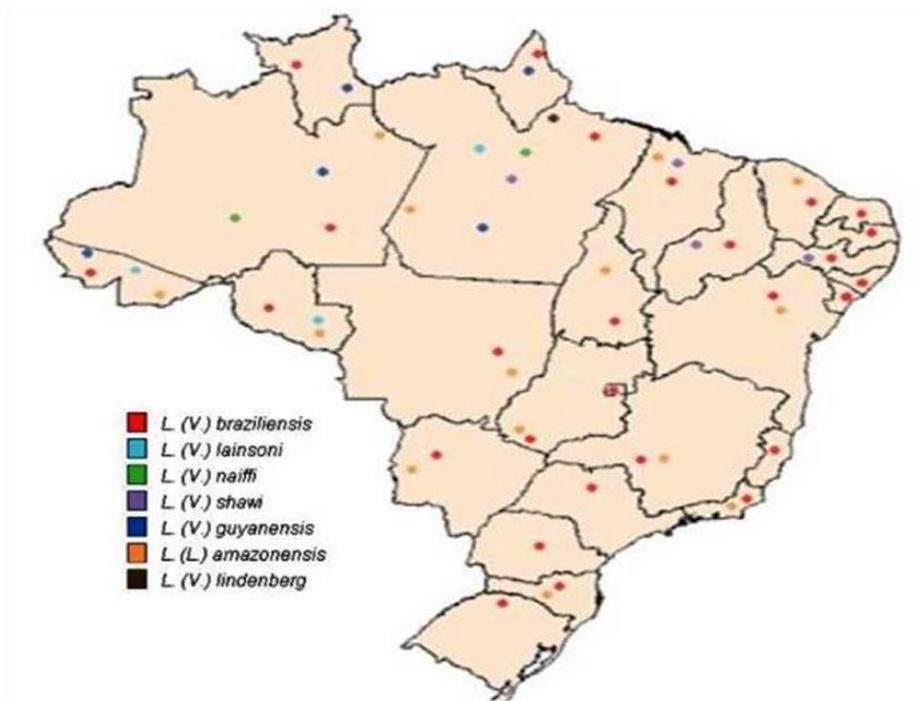


Figura 8. Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão LTA no Brasil (2005).

Fonte: Brasil, 2010

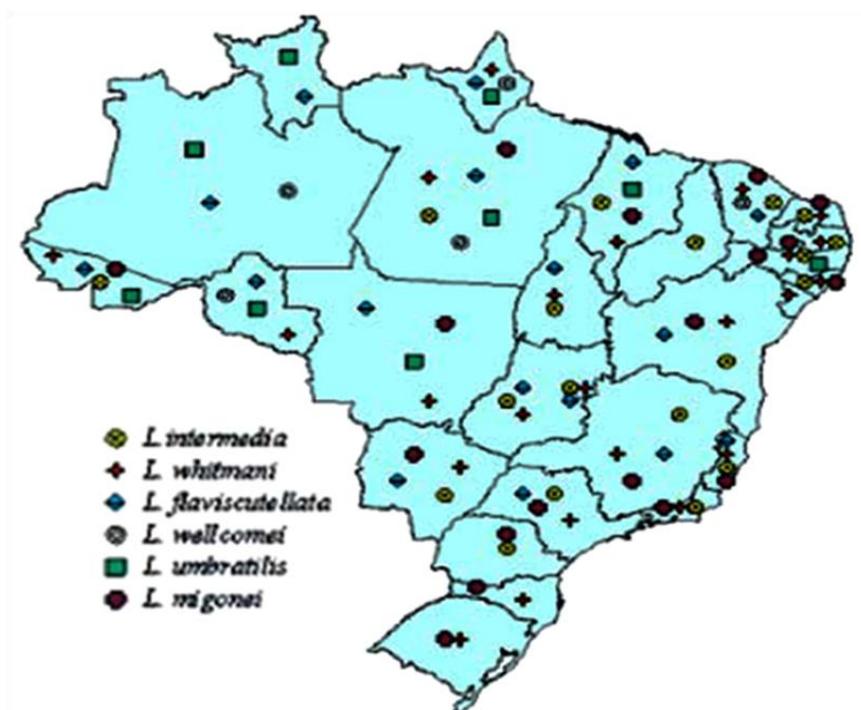


Figura 9. Distribuição das principais espécies de flebotomíneos vetoras da LTA no Brasil (2005).

Fonte: Brasil, 2010

No período de 2001-2011 o Brasil registrou 270.572 casos de LTA, com média de 27.572 casos/ano (figura 10). Em 2006 foram notificados 22.394 casos, e em 2007 foram 21.530 casos, representando um número bem menor do que aqueles registrados nos anos anteriores indicando uma possível redução na intensidade do processo de produção da doença, porém existem muitas barreiras que dificultam a eficácia de ação do programa, dentre elas menciona-se o despreparo das unidades de saúde para com as técnicas básicas de diagnóstico (evidenciação do parasita através de microscopia e o teste de Montenegro) e a escassez de técnicas moleculares e imunológicas (PCR, ELISA, Histopatológico); a distribuição irregular em localidades de difícil acesso e falta do monitoramento do tratamento com os antimoniais representam um importante fator ao tratamento adequado. No ambiente periurbano a transmissão da LTA está relacionada com o nível socioeconômico da população, constituindo mais um fator negativo para o controle da transmissão da LTA (Basano et al., 2004).

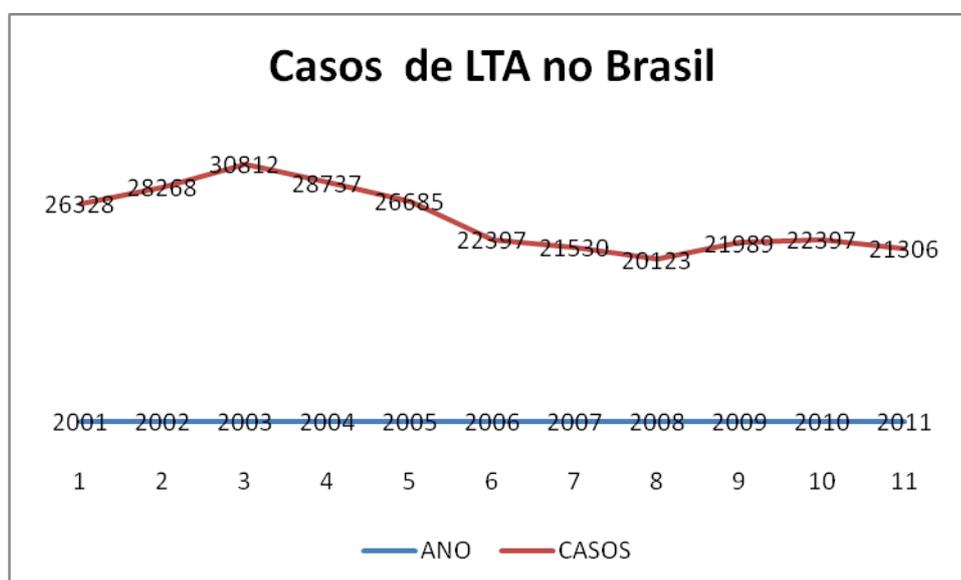


Figura 10. Casos de leishmaniose cutânea e mucosa no Brasil (2001-2011).  
Fonte: PAHO, 2013.

Devido à importância da LTA no Brasil, no qual responde por 42.36% da totalidade de casos reportados nas Américas (PAHO, 2013), o governo federal implantou o Programa de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar

(PV-LT). Esse programa possui objetivo de realizar o diagnóstico e oferecer tratamento adequado a fim de evitar ou diminuir as deformidades provocadas pela doença. As ações desenvolvidas no PV-LT incluem o monitoramento das unidades territoriais a fim de definir as áreas de transmissão, promover a identificação de surtos, acompanhar os casos em que ocorre o desenvolvimento da forma mucosa da doença, caracterizar a os casos autóctones em regiões que não apresentam padrões endêmicos para a doença, adotar medidas para diminuir a transmissão da LTA em áreas urbanas e detectar os efeitos prejudiciais em decorrência do uso de medicamentos anti leishmania (Costa et al., 2011). A estrutura do programa permite que os profissionais da saúde planejem ações, definam prioridades e racionalizem os recursos para as áreas de risco para onde as medidas de controle são direcionadas. (Brasil, 2010).

O SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) foi introduzido no ano de 1993, porém, somente a partir de 1998 este sistema foi regulamentado no Brasil, tornando obrigatória a notificação compulsória de várias de doenças, dentre as quais a LTA está inserida. O SINAN, através de um sistema informatizado, coleta os dados gerados pelos SVE no âmbito federal, estadual e municipal. A partir dos resultados obtidos oferece suporte para as ações epidemiológicas de combate as doenças/agravos (Brasil, 2007).

No Brasil, a LTA apresenta diferentes padrões epidemiológicos caracterizando-se conforme o modelo de transmissão. São eles: padrão silvestre, onde a transmissão ocorre em regiões de vegetação primária, envolvendo animais silvestres, a infecção humana nesses ambientes pode ocorrer devido à exploração de florestas primárias (figura 11A). Padrão silvestre modificado ou ocupacional, onde a transmissão está relacionada à exploração de florestas com a derrubada da vegetação primária (figura 11B). Padrão rural- ocorre em áreas de colonização antiga. Caracteriza-se por ser uma zoonose de matas residuais (figura 11C). Padrão periurbano (figura 11D), a transmissão ocorre em áreas de colonização antiga, onde houve adaptação do vetor ao peridomicílio e envolvimento de animais

domesticados como reservatórios, caracterizando-se por uma zoonose e antroponose (Marzochi & Marzochi, 1994; Brasil, 2010; Basano et al., 2004).

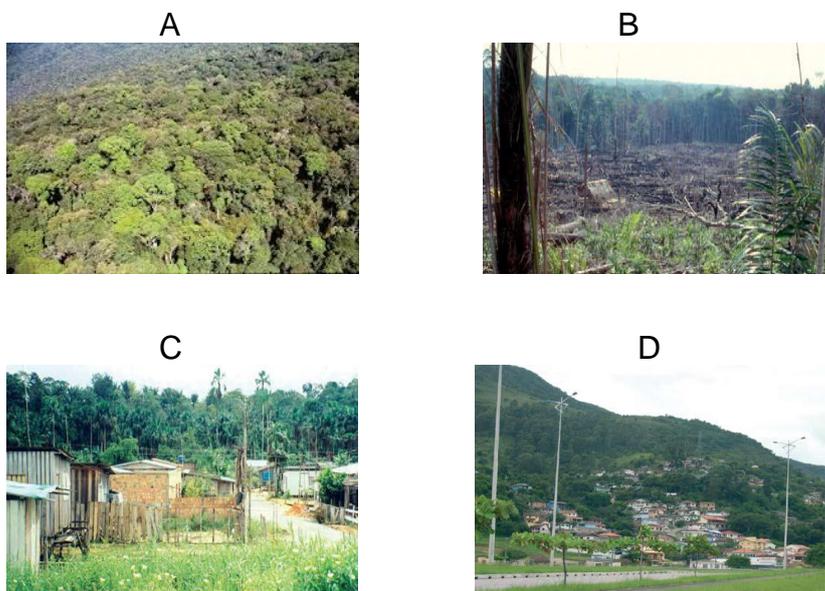


Figura 11. Exemplos de padrões epidemiológicos de transmissão: A: Mata Atlântica; B: Área em desmatamento na região Amazônica; C: Assentamento no Rio Piorini, na região Norte do Brasil; D: Ocupação de encosta da Serra do Mar.

Fonte: Brasil, 2010.

#### 1.4.4. Epidemiologia da LTA no Estado de São Paulo

A intensa prática do desflorestamento, as alterações ambientais, a modificação na composição dos vetores flebotomíneos no decorrer do século XX, determinaram diferentes padrões epidemiológicos no Estado de São Paulo (Tolezano, 2001). Atualmente a composição vegetal é caracterizada pela ausência de florestas, sendo composta principalmente por matas residuais ou ciliares. A figura 12 ilustra a redução progressiva da cobertura de vegetação primitiva até a atualidade.

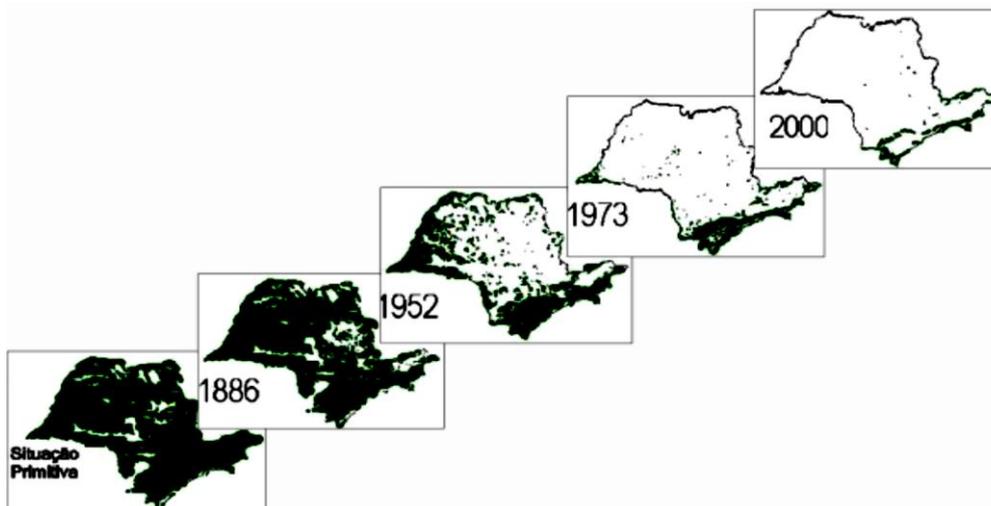


Figura 12. Histórico da cobertura vegetal do Estado de São Paulo.

Fonte: Martinelli, 2010.

A LTA tem ocorrido no Estado de São Paulo desde 1884 (Tolezano, 1994). Inicialmente a transmissão aumentou devido ao desmatamento durante a expansão das plantações de café no século XIX, continuando nas primeiras décadas do século XX, e se espalhou em direção ao noroeste do Estado em consequência das construções de ferrovias e estradas estaduais em direção à costa litorânea. Depois de um declínio na incidência até o final da década de 1950, a LTA tornou-se endêmica em áreas do sul do Estado na década de 1970 (Shimabukuro, 2010).

Na década de 80 a doença tornou-se reemergente e sua transmissão foi relacionada com fatores antrópicos, sem ligação com ambientes florestados. Esse novo modelo epidemiológico acarretou em um aumento

espacial dos casos autóctones (Camargo-Neves et al., 2002). A figura 13 ilustra um panorama dos municípios afetados e revela a incidência acumulada dos casos de LTA nos do Estado de São Paulo.

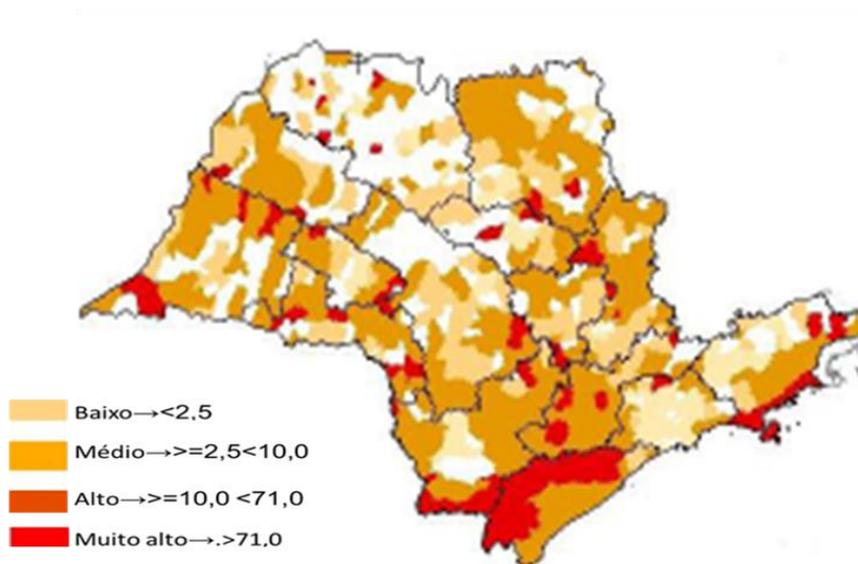


Figura 13. Mapa dos Municípios do Estado de São Paulo com registro de incidência da média de casos de LTA por município (1998 – 2011).

Fonte: Fonseca, 2013

No Estado de São Paulo a LTA apresenta dois perfis epidemiológicos de transmissão: o primeiro é caracterizado no ambiente silvestre, no qual o homem entra em contato com o ciclo enzootico e o segundo de caráter domiciliar, no qual a transmissão envolve espécies de flebotomíneos adaptadas aos ambientes peri-urbanos, os animais sinantrópicos e o homem. Foram identificadas 17 espécies de flebotomíneos em localidades envolvidas com transmissão da LTA. Esse fato pode ser justificado pela diversidade de clima, relevo, vegetação e pela diversidade de ambientes modificados pelo homem. (Silva, et al., 2012). Cinco espécies são comprovadamente vetores da *L. (V.) braziliensis* no Estado de São Paulo: *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia neivai*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia migonei* e *Lutzomyia pessoai*. *Lutzomyia fischeri* está sob forte suspeita de possuir capacidade vetorial (Shimabukuro et al., 2010).

Atualmente, *Lu. intermedia* é o principal vetor de *Leishmania (Viannia) braziliensis* no ambiente domiciliar e no ambiente rural ou extradomiciliar. *Lu. whitmani* e *Lu. migonei* são os principais vetores. (Camargo-Neves et al., 2002). *Lu. intermedia* é a espécie mais importante na transmissão da LTA, sua presença maciça ocorre em ambientes com redução total ou parcialmente de cobertura vegetal original e demonstram afinidade nas áreas que compreendem o intra e peridomicílio. (Silva et al., 2012). A adaptação dessa espécie nos ambientes modificados ocorreu devido à ação antrópica do homem. Os ambientes florestados são habitados por grande diversidade de flebotomíneos, principalmente pelas espécies *Lu. fischeri*, *Lu. ayrozai* e *Lu. migonei*. (Tolezano et al., 2001). Portanto, a concentração de moradias próximas a regiões florestadas formam áreas residuais de mata entre as moradias, tornando os moradores mais vulneráveis a adquirir a LTA (Pereira et al., 2011).

Diante da complexidade da transmissão da LTA, o Estado de São Paulo elaborou um programa de controle da LTA. O objetivo principal do programa é oferecer o diagnóstico e tratamento precoce dos casos detectados visando reduzir as deformidades causadas pela doença (CVE, 2012). As condutas ocorreram em dois períodos distintos: o primeiro relacionado com a devastação primária da cobertura vegetal e o segundo contemplando o ambiente modificado periurbano. O programa contempla o controle de vetores, a investigação epidemiológica, o diagnóstico e o tratamento das pessoas afetadas. (Gomes et al., 1998). No Estado de São Paulo, a partir de 1978, a LTA entrou na lista de doenças com notificação compulsória (Condino e Azevedo, 2004).

De acordo com Silva et al., (2012) o programa de vigilância e controle da LTA deve ser direcionado de modo específico para cada região a fim de que se possa caracterizar a(s) espécie(s) de *Leishmania*, possibilitando identificar o agente etiológico, promover a vigilância entomológica a fim de que se conheça o vetor predominante, além de investir na disseminação de informações sobre a prevenção da doença e adotar medidas para garantir um diagnóstico precoce e um tratamento

adequado. Os diferentes padrões epidemiológicos que apresentam em função das espécies vetoras, reservatórios, agentes etiológicos e interação do homem nesta biocenose, são os principais fatores que dificultam a elaboração de um programa de controle eficaz. (CVE, 2012; Costa et al., 2011).

De 1975 a 2008 a LTA no Estado de São Paulo apresentou notável aumento de disseminação na transmissão nos municípios acompanhado de um número crescente de casos autóctones (Silva et al., 2012). A figura 14 demonstra os números de casos relacionados com a amplitude da transmissibilidade nos municípios paulistas.

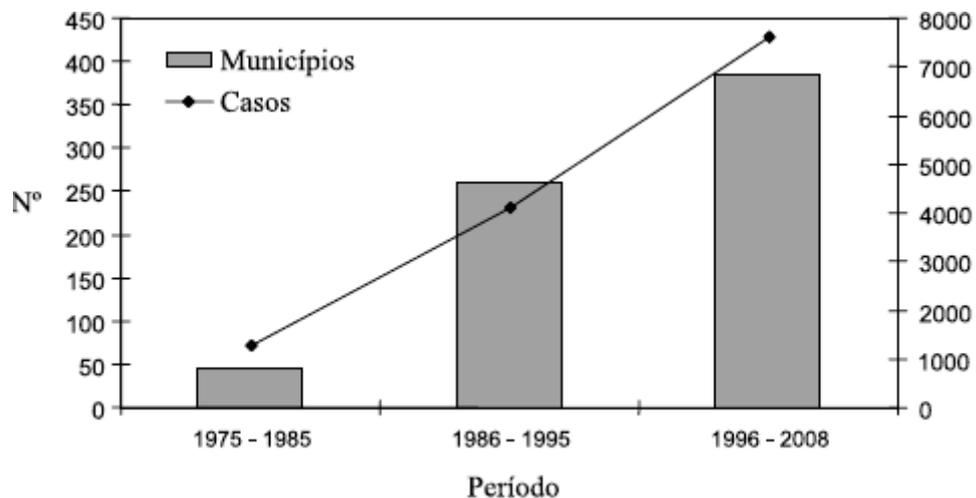


Figura 14. Número de casos autóctones e municípios afetados pela LTA no Estado de São Paulo, período de 1975 a 2008.

Fonte: Silva et al., 2012.

De acordo com dados apresentados pelo Grupo de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde no Estado de São Paulo, no período de 2007 a 2012 foram registrados 2162 casos confirmados da LTA. Como ilustração, a Tabela 2 mostra o número de casos de LTA notificados no estado de São Paulo no período de 2007 a 2012 (CVE, 2012).

Tabela 2: Número de casos de LTA notificados no Estado de São Paulo, período de 2007 a 2012.

<b>ANO</b>	<b>NºCASOS</b>
2007	402
2008	421
2009	427
2010	383
2011	263
2012	309
<b>Total: 2205</b>	

Fonte: SINAN - Divisão de Zoonoses - CVE - SES-SP.

Em outro estudo epidemiológico realizado pelo CVE contemplando o período de 1998 a 2011 a doença atingiu um pico de frequência entre homens e mulheres na faixa etária de 35-49 anos de idade. Dentre as modalidades clínicas da LTA, a forma cutânea foi a mais prevalente representando 83%, dos casos, seguida de 15% da forma mucosa. A reincidência é relativamente baixa (5%), os casos novos representam 91% das notificações. O diagnóstico laboratorial detectou 73% dos casos, os dados clínicos e epidemiológicos confirmaram 22%. A média anual da porcentagem de cura no período estudado foi de 77% (CVE, 2012).

### **1.5. Modalidades clínicas da LTA**

A complexa interação entre uma diversidade de espécies de *Leishmania*, dos vetores, dos reservatórios silvestres e urbanos em diferentes ambientes geográficos e as formas de resposta do hospedeiro originam as distintas formas clínicas da LTA. (Marzochi et al., 1999, Goto & Lauletta Lindoso, 2010). A variabilidade genética encontrada em isolados e cepas *L. (V). braziliensis* é responsabilizada pelo considerável espectro da enfermidade (Bacellar et al., 2011). A figura 15 descreve o algoritmo para as diferentes formas clínicas da LTA, proposto por Marzochi & Marzochi (1994).

A leishmaniose cutânea localizada representa cerca de 95% dos casos. Caracteriza-se por lesões ulceradas com fundo granuloso e borda elevada, geralmente acompanhada por linfadenopatia regional (figura 16A). O início das lesões ocorre após o ponto de inoculação das formas promastigotas da espécie causadora da doença, O período de incubação dura, em média, 30 dias, podendo variar de 10 a 90 dias, (Gontijo et al., 2003; Costa, 2011). As lesões podem ocorrer de forma única ou múltipla, geralmente de 1 a 10 lesões, dependendo da quantidade de picadas. Ocorre somente na pele, afetando a face, tórax, membros superiores e inferiores. (Guimarães et al., 2008). Apresenta boa resposta ao tratamento, podendo curar-se espontaneamente ou, dependendo do equilíbrio hospedeiro-parasita evoluir para outros tipos de lesões cutâneas (Goto & Lauletta Lindoso, 2012).

A leishmaniose cutânea disseminada foi descrita em 1986. As lesões primárias são difundidas para várias partes do corpo via hemática ou linfática. As multiplas lesões (100-300) exibem aspecto paular acneiforme e ulceroso (figura 16B). A forma mucosa pode estar associada a 30% dos casos de portadores de leishmania cutanea. A sintomatologia inclui pirexia, indisposição, mialgias, emaciação, etc (Brasil, 2010; Goto & Lauletta Lindoso, 2012; Costa, 2011).

Na leishmaniose cutânea difusa ocorre uma lesão inicial com posterior difusão para outras regiões do corpo. Acomete indivíduos anérgicos, portadores resposta imunológica deficiente contra os antígenos de *Leishmania* (figura 16C). As lesões apresentam alta carga parasitária, na forma de nódulos não ulcerados, pápulas ou tubérculos e com ausência de manifestações viscerais. Geralmente a resposta ao tratamento é ausente ou muito deficiente. (Brasil, 2010; Goto & Lauletta Lindoso, 2012; Costa et al., 1992; Costa et al., 2011).

A forma recidiva cútis (figura 16D) caracteriza-se pela presença de lesões em forma de nódulos ao redor ou dentro da cicatriz de uma infecção anterior por *Leishmania* spp. Pode ocorrer cicatrização de maneira espontânea ou através do tratamento, após determinado período de tempo.

Geralmente a reativação ocorre na borda da lesão (Brasil, 2010; Costa, 2011).

A leishmaniose mucosa (LM) ou mucocutânea é considerada a forma mais grave da LTA, pois há grande risco de desenvolvimento de deformidades permanentes no septo cartilaginoso nasal e mucosa oral podendo afetar, menor frequência, a laringe, faringe e cordas vocais. Nos estágios mais avançados da leishmaniose mucosa pode haver comprometimento do ouvido médio. (Gontijo et al, 2003; Guimarães et al., 2008; Lessa et al., 2007). As *Leishmanias* atingem a mucosa por meio da disseminação hematogênica ou linfática das formas cutâneas. A manifestação clínica da LM está ligada a resistência natural e a magnitude da resposta imunológica do hospedeiro (Lessa et al., 2007). A LM pode ocorrer simultaneamente com a LC, manifestar-se após a cura clínica ou tratamento inadequado da forma cutânea. Entre os portadores de LC que evoluem para a LM, 90% ocorrem dentro de 10 anos. Destes, 50% ocorrem nos primeiros dois anos após a cicatrização das lesões cutâneas (Brasil, 2010) Os principais sintomas incluem otite média crônica, tosse, obstrução e sangramento e prurido nasal, dificuldade de deglutição e dificuldade respiratória (Lessa et al., 2007; Brasil, 2010). A leishmaniose mucosa pode apresentar-se sob a forma tardia (a mais comum), caracterizada pela morosidade na cicatrização da lesão primária e tratamento inadequado (figura 16E). O aparecimento das lesões pode ocorrer até vários anos após a cicatrização da forma cutânea (Gontijo et al, 2003; Brasil, 2010), as formas menos frequentes são do tipo concomitante, indeterminada, contígua e primária (figuras 16 F, G, H e I).

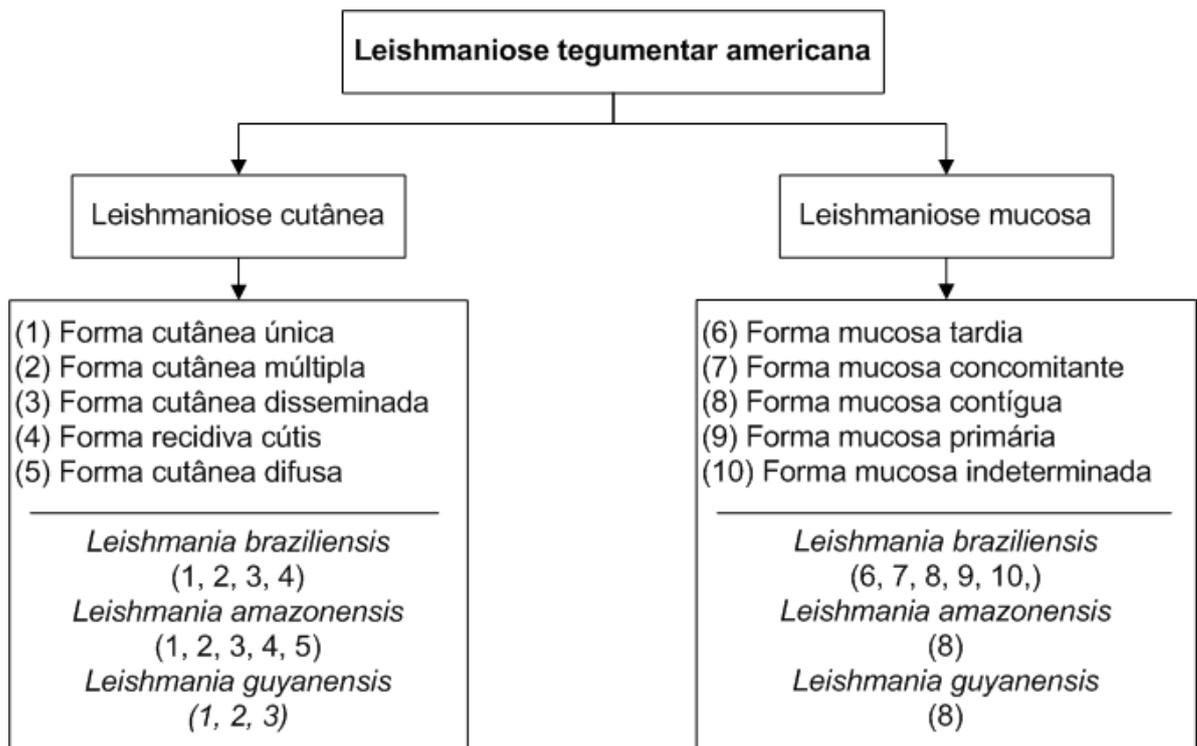


Figura 15: Algoritmo da LTA

Fonte: Brasil, 2010



Figura 16. Formas clínicas da LTA. Forma cutânea localizada (A); Forma cuânea disseminada (B); Forma cutânea difusa (C); Forma recidiva cútis (D); Forma mucosa tardia (E); Forma mucosa concomitante (F); Forma mucosa indeterminada (G); Forma mucosa contígua (H); Forma mucosa primária (I).

Fonte: Brasil, 2010

### 1.6. Leishmaniose Tegumentar Americana Canina

Em 1913 foi constatada a participação do cão doméstico (*Canis familiaris*) no ciclo de transmissão da LTA no Brasil, porém somente a partir da década de 80 que o fato tornou-se mais explorado e difundido (Barbosa et al., 1999). O fato ocorre em virtude da adaptação do ciclo de transmissão da LTA para áreas urbanas. Na região sudeste e a LTA tem ocorrido devido ao processo migratório e ocupação das regiões de encostas, formando aglomerados urbanos. Neste contexto o cão está inserido como fonte de infecção no ciclo de transmissão da LTA causado pelas espécies *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) panamensis* e *L.(V.) peruviana* (Serra et al., 2003;

Reithinger et al., 1999). A figura 17 mostra a distribuição das espécies de leishmanias nas Américas causadoras da LTA canina.



Figura 17. Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* causadora da LTA em *Canis familiaris*.

Fonte: Reithinger et al., 1999

O diagnóstico é baseado em exames clínicos (detecção de lesões características ou cicatrizes) e laboratoriais. O método parasitológico consiste na evidência do parasita através de biópsias de lesões. Os testes sorológicos são ferramentas padrão para a identificação de cães infectados e contemplam a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e ELISA. A soro positividade da RIFI para a pesquisa de IgG representa um confiável indicativo de LTA, independente da inexistência de lesões. Porém, a sorologia apresenta algumas limitações como reações cruzadas, ocorrência de um atraso entre infecção e a soro conversão ou mesmo considerar casos em que os cães portadores da LTA nunca soro convertem. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) juntamente com a sorologia pode determinar a presença da doença e a espécie envolvida, além de oferecer informações mais precisas a fim de contribuir para o programa de controle de

leishmaniose canina. Estudos apontam maiores índices de sensibilidade na PCR utilizando DNA a partir de biopsias de lesões quando comparada com técnicas sorológicas e parasitológicas (Reithinger et al, 1999).

Em relação ao vetor, estudos sugerem que a espécie *Lu. migonei* apresenta afinidade por alimentar-se do sangue de cães domésticos (Barbosa et al., 1999). Em adição, estudos recentes apontam a presença de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* em ectoparasitas de cães portadores e não portadores da LTA, porém sem comprovação da competência vetorial (Morais et al., 2013). Em relação à competência de cães como fonte de infecção por *L. (V.) braziliensis*, estudos apontaram que fêmeas de *Lu. whitmani* forma infectadas ao se alimentarem a partir das lesões ulceradas em cães portadores da *L. (V.) braziliensis*, porém quando essas fêmeas foram alimentadas em outras regiões do corpo no mesmo cão infectado nenhuma delas se infectou (Brandão-Filho et al., 2011).

As manifestações clínicas da LTA canina ocorrem na fase crônica da doença, caracterizam-se pelo aparecimento de lesões ulcerosas, podendo progredir para cura clínica e as subseqüentes reativações, ou a cometer a mucosa nasal, porém não oferecem risco de morte ao animal. A figura 18 ilustra as diferentes localizações das lesões de cães infectados pela LTA.



Figura 18. LTA canina provocada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

A-lesão em bolsa escrotal, B-lesão de mucosa nasal C- lesão ulcerosa na orelha.

Fonte: Figueiredo et al., 2009; Madeira et al., 2003.

Em decorrência dos animais domésticos serem considerados como hospedeiros acidentais, o Programa de Vigilância da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil não adota medidas de controle e

planejamento epidemiológico. Nesta abordagem, a fim de que se obtenha maior conhecimento sobre a infectividade da LTA em cães e o estabelecimento de um programa de vigilância mais eficaz se faz necessário estudos de xenodiagnóstico nos vetores flebotomíneos a fim de avaliar o grau de infecciosidade dos vetores flebotomíneos a partir de cães e outros hospedeiros. Em adição, se faz necessário realizar estudos sobre a evolução da infecção em cães, estudos epidemiológicos, como correlacionar o numero de cães e outros, promover maior investimento em técnicas de diagnostico com maior sensibilidade (Brandão-Filho et al., 2011).

### **1.7. Tratamento**

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. O antimoniato de N-metilglucamina é o principal antimonial utilizado no Brasil. Sua ação leishmanicida ocorre pela inibição nos processos da glicólise, oxidação dos ácidos graxos, reduzindo a produção de ATP e GTP e CO<sub>2</sub>, determinado eliminação das formas amastigotas do parasito (Brasil, 2010; Amato, 2006). Esses fármacos apresentam baixa toxicidade devido a sua pouca retenção com os tecidos e por não apresentarem ligações com as hemácias, atingem rápido pico de concentração no plasma e são rapidamente excretados pelos rins e eliminados com a urina. Sua utilização estende-se até as mulheres em períodos de amamentação, uma vez que a concentração do antimônio pentavalentes no leite materno é insignificante, não provocando efeitos indesejáveis ao recém-nascido (Brasil, 2010).

Os principais efeitos colaterais do medicamento são astralgia e mialgia, vertigens, hipertermia, e regurgitação estomacal. Cardiopatias, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e insuficiência hepática constituem as principais limitações do uso dos antimoniais (Gontijo et al., 2003). Outro fator a ser considerado é a proibição de seu uso em gestantes (Goto & Lauletta Lindoso, 2010) em decorrência de sua retenção no sistema nervoso do feto, ocasionado retardamento mental (Brasil, 2010).

A posologia e a duração do tratamento variam de acordo com a forma clínica da doença. A eficácia do antimonial pentavalente é variável de acordo com a espécie de *Leishmania*, a apresentação clínica da doença e a região geográfica (Goto & Lauletta Lindoso, 2010). A fim de diminuir a resistência medicamentosa e melhorar a eficácia terapêutica aos antimoniais a orientação é a sua utilização combinada com outras drogas (Lima et al., 2007).

No caso de falhas no tratamento com os antimoniais, o antibiótico Anfotericina B constitui-se a droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses, a qual demonstra menor frequência de recidivas e eficácia superior principalmente nas formas mucosas (Gontijo, 2003). Deve-se considerar que esses fármacos empregados na segunda linha da terapia também apresentam efeitos colaterais, toxicidade e pode apresentar falhas na atividade leishmanicida, além de induzir resistência do parasito a essas drogas (Lima et al., 2007). Em decorrência de sua ligação específica com o ergosterol a Anfotericina B causa aumento na permeabilidade de membrana, causando a eliminação dos componentes citoplasmáticos e a consequente morte do parasito (Amato, 2006; Martinez, 2006). A droga deve ser solubilizada em soro glicosado e administrado gota a gota (Gontijo, 2003). Os efeitos colaterais incluem febre, aumento da frequência cardíaca e arritmias, hipertensão arterial, náuseas, neuro e nefrotoxicidade, dentre outros. Visando diminuição dos efeitos colaterais e aumentar a eficácia, o fármaco é produzido em outras versões diferentes: complexo Anfotericina B lipossomal, Anfotericina dispersão colesterol e lipídios Anfotericina. Todos com eficácia semelhante, mas diferem em efeitos secundários (Murray, 2012).

Dentre outras drogas de segunda escolha podemos citar as Pentamidinas, sua ação leishmanicida ocorre por ação específica no cinetoplasto do parasito, o Alopurinol, eficaz quando administrado com os antimoniais, Miltefosine, age inibindo a síntese de RNA, de proteínas e do DNA e a Paromicina, que afeta as atividades mitocondriais de *Leishmania*.

A cura clínica da forma tegumentar é definida pelo retrocesso das lesões, da infiltração e eritema após 90 dias do término do esquema terapêutico. Na forma mucosa a cura é caracterizada pela regressão de todos os sinais e comprovado por diagnóstico otorrinolaringológico, até 180 dias após o término da terapia. Para todos os casos, é aconselhável um acompanhamento clínico até um ano após o fim do esquema terapêutico (Brasil, 2010, Gontijo, 2003).

### **1.8. Genoma de *Leishmania***

O genoma de *Leishmania spp.* está organizado em dois compartimentos distintos: o núcleo, que contém o DNA cromossômico e o cinetoplasto, que contém o DNA mitocondrial (Kazemi B, 2011).

O conhecimento do genoma de *Leishmania* nos permite uma maior compreensão da dinâmica de seu processo evolutivo, no conhecimento de características incomuns de relevância que determinam a virulência e patogênese desses parasitas no hospedeiro (Smith et al., 2007). Além disso, é possível também relacionar a genética com os fenótipos. A análise molecular no cariótipo de *Leishmania spp.* apontou polimorfismos ao longo dos cromossomos e um alto grau de plasticidade em seu genoma (Grimaldi et al., 1993). As regiões teloméricas e sub teloméricas dos cromossomos de *Leishmania* são dotadas de sequências repetitivas e são apontadas como responsáveis pela plasticidade cromossômica (Winter et al., 2011). Três espécies de *leishmania* possuem o sequenciamento completo de seus genomas: *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L.(V.) braziliensis*. A comparação entre esses genomas indicam que são semelhantes em conteúdo e organização, porém em *L. (V.) braziliensis* a presença de retrotransposons e componentes de RNAi promovem maior diversidade nesta espécie (Smith et al., 2007). *L. (V.) braziliensis* possui em genoma de 32 Mb, com 35 cromossomos (união entre os cromossomos 20 e 34), com 60,4% de Guanina-Citocina. Possui 8314 genes, sendo 49 espécie-específicos, 33 genes compartilhados com *L. (L.) infantum* e 5 com *L. (L.) major* (Dujardin,

2009). Apresenta, ainda, 161 pseudogenes. A formação do pseudogene e a perda de genes são os principais fatores que determinam a diferenciação entre os genomas dessas três espécies de *Leishmania*. Os genes que são diferencialmente distribuídos entre essas espécies, codificam proteínas envolvidas na interação patógeno-hospedeiro e na sobrevivência do parasita no interior do macrófago. (Peacock, 2007). O polimorfismo cromossômico de *Leishmania spp.* não relaciona-se com os mecanismos de translocação ou remoção e sim com ocorrência de aneuploidias. Apesar de *Leishmania* ser considerada um organismo diplóide, estudos apontaram a ocorrência de formas triplóides, em consequência da troca genéticas entre formas promastigotas e o inseto vetor, além do aumento do número de cópias de determinados genes, como por exemplo, de alguns genes envolvidos na resistência drogas. (Kazemi B, 2011; Winter et al., 2011).

As mutações são os indutores da variabilidade genética em *Leishmania*, porém há evidências de formação de híbridos. Os genes de amplificação-supressão, e possível troca genética entre organismos distintos, sugere que a recombinação genética também pode estar envolvida na evolução destes parasitas (Grimald, 1993). Em adição, estudos apontam que *Leishmania* podem demonstrar drásticas alterações em sua expressão gênica ocasionadas por diferentes estímulos externos, a fim de que se adapte a novas situações, como, por exemplo, as mudanças ocorridas nas diversas fases de seu ciclo biológico ou a migração para diversos compartimentos em diferentes hospedeiros. Apesar da ausência de fatores de transcrição específicos, estudos sugerem que mudanças na expressão gênica podem ser originárias devido a fatores como trans-splicing alternativo, alterações no transcriptoma, eventos diferenciais de fosforilação, mudanças estruturais na cromatina, dentre outros (Kramer, 2012).

## 1.9. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial baseia-se em exames parasitológicos, imunológicos e moleculares.

### 1.9.1. Métodos parasitológicos

Os exames parasitológicos para a LT contemplam as técnicas de esfregaço, no qual permite a observação direta do parasita, cultivo o material proveniente de lesões e a inoculação em animais. (RíosYuil et al., 2012). No caso de suspeita de leishmaniose cutânea, as amostras são obtidas por raspagem da borda da lesão, aspiração da borda inflamada ou biopsia. No caso de leishmaniose visceral, as amostras são coletadas por punções aspirativas de baço, linfonodos, medula óssea ou crista ilíaca. (Rey, 2001a; Ferreira & Ávila, 2001).

As formas amastigotas provenientes de biopsia, raspagem ou punção das lesões são submetidas à coloração Giemsa ou Leishman podem ser evidenciadas através do microscópio óptico. Essa técnica apresenta baixa sensibilidade, variando de 50% a 70% (Goto & Lauletta Lindoso, 2010). Alguns fatores como a modalidade clínica da LT, a evolução da infecção e o local da lesão utilizado para os exames podem influenciar na taxa de sensibilidade do teste. Nos sessenta dias iniciais da evolução a sensibilidade do teste pode alcançar 100%, diminuindo para 75% aos 180 dias e 20 % acima de 360 dias (Gontijo et al., 2003). As lesões difusas possuem elevada carga parasitária, no entanto as formas disseminada e mucosa apresentam pouca quantidade de parasitas nas lesões (Goto & Lauletta Lindoso, 2012).

Quando a amostra é obtida por meio da extremidade da ulcera a sensibilidade do teste eleva-se para 78,3% enquanto que a amostra retirada da porção inferior da ulcera a sensibilidade eleva-se para 90,4% (RíosYuil et al., 2012).

As formas promastigotas cultivadas *in vitro*, a partir dos diferentes materiais biológicos e semeados em meios de cultura específicos para

*Leishmania* como NNN ou Ducrey permitem a posterior distinção da espécie na lesão quando analisadas utilizando anticorpos monoclonais específicos para a espécie de *Leishmania* estudada (Marzochi et al., 1999, Goto & Lauletta Lindoso, 2010). Porém esse método necessita de dez dias para a obtenção do número de promastigotas para a investigação da cepa. O método apresenta baixa sensibilidade (50%) para identificação de *L.(V.) braziliensis*, especialmente em casos crônicos, onde se encontra baixa parasitemia. Outro método de diagnóstico consiste na inoculação do material da biopsia cutânea em hamsters (*Mesocricetus auratus*), porém a técnica necessita de 60 a 270 dias para obter-se a evolução da lesão, além do requerimento de uma gama de recursos laboratoriais (Andrade et al., 2008).

### **1.9.1 Métodos imunológicos**

Diversos testes sorológicos são empregados em inquéritos epidemiológicos e para definir o diagnóstico das leishmanioses. Apresentam sensibilidade e especificidade variáveis e ainda não existe um teste diagnóstico padrão ouro (Schallig & Oskam, 2002; Souza et al., 2005). Outro fator a ser considerado é a co-infecção por *Leishmania* / HIV, pois limita a aplicação dos testes sorológicos, em decorrência de seus portadores apresentarem de baixa ou falta de anticorpos circulantes (Schallig et al., 2002).

A técnica de imunohistoquímica baseia-se na utilização de anticorpo específico para ligar-se com os antígenos de formas amastigotas de tecidos provenientes de biopsias. A metodologia apresenta sensibilidade de 85% (Goto & Lauletta Lindoso, 2010; RíosYuil et al., 2012). O Teste intradérmico (Intradermoreação de Montenegro) detecta resposta de hipersensibilidade celular retardada ao antígeno de leishmania (Brasil, 2010; Andrade et al., 2008). O aparecimento de um nódulo endurecido maior que 5mm no local da aplicação dos antígenos de *Leishmania* determina um valor positivo ao teste. (Goto & Lauletta Lindoso, 2012). O exame detecta positividade em indivíduos com prévia exposição ao parasito; em casos anteriormente

tratados, quando há cura espontânea das lesões ou mesmo após a cura clínica da doença, além de apresentar reação cruzada com outras doenças, como doença de Chagas, tuberculose, hanseníase wirchowiana, dentre outras. A IDRМ apresenta resultados negativos entre 30 e 45 dias após o surgimento da lesão, não é capaz de diferenciar doença de infecção e também não há detecção nas formas cutâneas difusas e em pacientes imunodeprimidos (Andrade, et al., 2008). A IDRМ apesar de ser um método simples e útil no diagnóstico da leishmaniose tegumentar, o seu uso é mais indicado em inquéritos epidemiológicos a fim de determinar a prevalência da doença, diagnosticar viajantes que residem em áreas endêmicas ou diagnosticar casos em que os parasitas são escassos ou ausentes (Brasil, 2010; Andrade et al. 2008; Ferreira & Ávila, 2001).

Na IFI são utilizadas formas promastigotas de *Leishmania* fixadas em lâminas e conjugado anti-IgG humano ligado com Isotiocianato de fluoresceína e testadas com soros de pacientes. (Arraes et al., 2008). A sensibilidade do teste varia de acordo com a diversidade clínica da doença. Na forma cutânea a sensibilidade é estimada de 71%, na forma mucosa 100%, porém na forma cutânea difusa o teste apresenta resultado negativo. Repetidamente o teste demonstra resultados negativos em indivíduos imunodeprimidos e em portadores de novas lesões até 180 dias do desenvolvimento da LT (Andrade et al., 2008). Apresenta reações cruzadas com soros de pacientes chagásicos, com hanseníase, tuberculose e outras patologias (Ferreira & Ávila, 2001).

O teste imunoenzimático (ELISA) é outra técnica sorológica utilizada na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* presentes no soro de pacientes portadores da LT. A sensibilidade do teste é variável de acordo com a forma clínica da LTA e da preparação do antígeno utilizado no teste (Andrade et al., 2008). Em relação à sensibilidade do teste foi realizado um estudo comparativo entre as técnicas de RIFI e ELISA nas regiões Norte e Nordeste do Brasil utilizando amostras de pacientes portadores de LTA. Os resultados apontaram sensibilidade de 27,7% para IFI e 66,9% para ELISA para a forma cutânea. Na forma mucosa da doença o nível de sensibilidade dos

dois testes aumentou significativamente: 93,3% ELISA e 56,7% IFI (RíosYuil et al., 2012). Em outro estudo realizado para detecção de IgG anti-*Leishmania* no soro de 53 pacientes, utilizando antígeno bruto de *L. (V.) braziliensis*, ELISA revelou sensibilidade de 85%, seguida pela IDRM = 64,4% e RIFI =58,1% (Ferreira et al., 2007).

### **1.9.2 Métodos Moleculares**

O principal método utilizado no diagnóstico molecular é a reação em cadeia da polimerase (PCR), técnica que amplifica um segmento específica de DNA do parasito, resultando em uma produção de milhões de cópias daquele segmento específico. A PCR permite uma rápida detecção de *Leishmania* nos insetos vetores e reservatórios. A técnica pode ser aplicada a uma diversidade de amostras biológicas como sangue periférico, aspirado de medula óssea, linfonodos e baço, biopsia de lesões, amostras fixadas em formol em blocos de parafina (Costa et al., 2009). Substitui o teste de cultura dos parasitas, além de requerer metodologias menos invasivas para a obtenção do material biológico a ser analisado (Degrave et al., 1994; Miyamoto, 2006). A PCR apresenta muitas vantagens quando comparado a outros testes parasitológicos: a sensibilidade é muito superior devido à capacidade de detecção do DNA de formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* mesmo com a utilização de amostras biológicas com baixa parasitemia. A PCR possui capacidade de detecção de 1 fentograma de DNA por parasito. O teste demonstra sensibilidade de 98,41% e especificidade de 95,59% (Gontijo et al., 2003), enquanto que outros estudos apontaram uma positividade de 100% em biopsias provenientes de indivíduos portadores da LT (Andrade et al., 2008). Um estudo realizado por Gomes et al., (2008) avaliou a eficácia da PCR frente a métodos parasitológicos e a IDRM em detectar *L. (V.) braziliensis* em amostras de 109 pacientes portadores de lesões cutâneas em uma região de considerável endemicidade do Estado de São Paulo. A PCR apresentou sensibilidade de 96% e 100% de especificidade. Os testes parasitológicos e

a IDRM apresentaram sensibilidade de 69% e 100%, respectivamente e especificidade de 100% e 64%, respectivamente. Deste modo concluiu-se que a PCR aplicada à biopsia demonstrou ser um bom método de diagnóstico, principalmente em amostras clínicas com número limitado de parasitas e foi útil para diferenciar leishmaniose de outras patologias em pacientes que residem em áreas endêmicas.

Várias regiões gênicas têm sido estudadas, tais como o gene do RNA ribossomal, de genes de minixon, de DNA do cinetoplasto e de sequências de DNA repetitivo tubulina, o gene da enzima Glicose-6-fosfato-desidrogenase, genes do rDNA, microssatélites, kDNA, genes das proteínas de choque térmico. (Goto & Lauletta Lindoso, 2010). Desta forma, a PCR apresenta especificidade modulada, podendo indicar não somente o gênero e sim identificar até a espécie de *Leishmania* em questão, fato que coopera para a implantação das para as devidas ações epidemiológicas de controle e uma adequação ao tratamento ofertado aos pacientes (Andrade et al., 2008).

### **1.10 Métodos de genotipagem**

Diversos estudos sobre a evolução e a variabilidade genética em *Leishmania* são realizados. Diferentes metodologias podem ser empregadas em sua caracterização.

Variadas metodologias pertinentes a Biologia Molecular estão sendo inseridas em estudos epidemiológicos investigativos sobre as leishmanioses (Schönian et al., 2011). Diversos marcadores moleculares possuem a capacidade de demonstrar diferenças genéticas entre espécies de *Leishmania* (Schönian et al., 2008). As técnicas de genotipagem possibilitam realizar a diferenciação de espécies que ocupam a mesma área geográfica daquelas oriundas de diferentes regiões, permitem a detecção de espécies vinculadas com a falha terapêutica, delatar novos reservatórios e vetores, evidenciar combinações genéticas entre parasita e o vetor e pode identificar espécies de *Leishmania* híbridas. Desta forma, os métodos moleculares

contribuem para a compreensão de várias abordagens no âmbito epidemiológico das leishmanioses (Marlow, 2013).

### **1.10.1 Eletroforese de enzimas (isoenzimas)**

A utilização da técnica de eletroforese de enzimas determina as similaridades e diferenças entre os organismos possibilitando o conhecimento das relações genéticas empregadas na identificação e classificação taxonômica de diversos parasitos. As variabilidades podem ser diretamente atribuídas às diferenças genéticas e os perfis eletroforéticos encontrados podem ser considerados como expressão fenotípica do organismo. Cada banda enzimática representa um caráter separado e cada eletromorfo é considerado um marcador molecular, que representa os alelos de um determinado loco. As cepas são divididas em grupos com padrões enzimáticos idênticos ou homogêneos e são chamados zimodemas. Os zimodemas podem representar diferenças enzimáticas simples ou conjunto de diferenças ocorrendo entre grupos populacionais de organismos. No Brasil, a tipagem de isoenzimas é considerada como o método de referência para a caracterização de espécies de *Leishmania*, onde facilmente identifica-se perfis heterozigóticos desses parasitos (Cupolillo et al., 2003; Schonian et al., 2003; Botilde et al., 2006).

#### **1.10.1.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)**

Esta metodologia emprega iniciadores moleculares curtos, que se ligam arbitrariamente ao DNA molde em condições de baixa estringência. Assim, o conhecimento prévio da sequência alvo não é necessário (Williams et al., 1990). Esta técnica foi muito empregada para a discriminação de parasitas de gêneros da Ordem Kinetoplastida, identificação de espécies do gênero *Leishmania* e estudo de variabilidade intraespecífica (Williams et al., 1990; Tibayrenc et al., 1993; Noyes et al., 1996; Ferreira et al., 2004; Schriefer et al., 2004).

### **1.10.1.2 PCR-SSR (PCR- Simple Sequence Repeats)**

Esta metodologia emprega iniciadores moleculares que amplificam regiões de repetições de sequências simples (microssatélites) (Wu et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994). Os padrões obtidos por PCR-SSR são altamente polimórficos e discriminativos entre as cepas estudadas e mais discriminativos que os padrões gerados pelo RAPD. Esta metodologia utiliza alta estringência, é mais reprodutível e requer uma quantidade de DNA dez vezes menor para sua execução. A SSR-PCR oferece uma alternativa metodológica para o estudo de variabilidade genética de *Leishmania* (Pena et al., 1994; Oliveira et al., 1997; Volpini et al., 2001; Ferreira et al., 2004; Volpini et al., 2004).

### **1.10.1.3 PCR-LSSP (PCR- Low Stringency Single Specific Primer)**

Esta técnica surgiu em 1994 e vem sendo considerada como uma eficiente ferramenta para analisar variabilidade genética entre diferentes microrganismos. É capaz de detectar uma ou várias mutações gênicas em um segmento de DNA. Baseada na PCR a técnica é utilizada sob condições de baixa estringência, ou seja, com a utilização de concentrações elevadas de um único oligonucleotídeo, grandes quantidades de Taq polimerase e baixa temperatura de anelamento (Pena et al., 1994). Primeiramente, amplifica-se o DNA alvo que se deseja avaliar a mutação. Este fragmento amplificado é purificado e submetido à nova PCR usando-se isoladamente um dos iniciadores que o gerou, em condições de baixa estringência. Os fragmentos produzidos na segunda PCR geram um complexo e único perfil de bandas, onde as modificações em um único par de bases pode ser detectado, constituindo uma única assinatura genética. Portanto PCR-LSSP é uma técnica útil em que se faz necessário à rápida detecção de mudanças de variáveis e imprevisíveis nas sequências definidas. (Carvalho et al., 2007; Pena et al., 1994).

#### **1.10.1.4 PCR-RFLP ( PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism)**

A PCR-RFLP permite a análise de mutações genóticas inseridas em sequencias de reconhecimento de enzimas de restrição (Felley et al., 1991). É uma metodologia extremamente valiosa, para a genotipagem das variações específicas entre espécies e interespecies. É considerado um método simples e acessível, sem a necessidade de utilização equipamentos muito sofisticados (Xiao et al., 2004). A primeira etapa do processo ocorre pela amplificação da região alvo de interesse, ou seja, do fragmento de DNA de suspeita que ha variabilidade genética. Em seguida o amplicon é tratado com endonucleases de restrição: enzimas purificadas de diferentes espécies de bactérias, que as utilizam para defender-se contra ação de DNA exógeno. Estas enzimas cortam a dupla fita em sítios específicos, gerando fragmentos de DNA de quatro a oito nucleotídeos. Os fragmentos de diferentes dimensões de restrição podem ser detectados como bandas diferenciadas por análise eletroforética em géis de poliacrilamida ou de agarose. (Alberts, B et al., 2010). Essa metodologia apresenta muitas vantagens: não necessita de instrumentos laboratoriais muito avançados, fácil de projetar, sua aplicabilidade estende-se a polimorfismos de base única (SNPs), até deleções, duplicações e suas combinações envolvendo o ganho ou perda de 1 a 50 nucleotídeos. A utilização de uma única enzima de restrição que pode ser suficiente para diferenciação de espécies. As desvantagens incluem o longo tempo utilizado para a complementação das etapas, o alto preço de algumas enzimas de restrição e impossibilidade de obtenção de uma genotipagem exata no caso em que há mais do que uma variação de nucleotídeos no sitio de reconhecimento de uma mesma enzima de restrição (Rasmussen, 2012).

## 1.10.2 Regiões gênicas utilizadas como alvos para genotipagem

### 1.10.2.1. kDNA

Os protozoários incluídos na ordem Kinetoplastida, como os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, além do DNA nuclear contam com mais uma organela, o cinetoplasto, que é ricamente composta de DNA. O DNA do cinetoplasto representa cerca de 30 por cento do DNA celular total (Figuras 19A e 19B). As proteínas envolvidas na condensação do kDNA dentro da matriz mitocondrial são conhecidas como histonas, que auxiliam na compactação e organização do DNA nuclear (Rogers & Wirth, 1987).

O kDNA é constituído por uma rede de moléculas de DNA circulares (Figura 19C) e pode ser dividido em dois grupos: O primeiro grupo é composto de moléculas grandes, com cerca de 20-35kb, denominadas de maxicírculos. São extremamente homogêneas entre os diferentes grupos que compõe a ordem Kinetoplastida, e estão presentes em cerca de 20-50 cópias/kinetoplasto. Estas moléculas circulares grandes estão envolvidas no transporte de genes que codificam enzimas e coenzimas no Ciclo de Krebs (Kazemi B, 2011). O outro grupo é composto de moléculas menores (de 0,5-1,5Kb) denominadas de minicírculos (que são desigualmente distribuídos entre cerca de 10 classes). Apresentam-se em grande quantidade (10.000 unidades/kinetoplasto) e com sequências heterogêneas entre os grupos. Dessa maneira são amplamente utilizados como alvos em estudos que visam identificar classes, gêneros ou espécies. (Rogers & Wirth, 1987; Fernandes et al., 1996; Noyes et al., 1998; Simpson et al., 2002)

Cada minicírculo de *Leishmania* apresenta uma região conservada de aproximadamente 200 pb contendo três blocos de sequências conservadas em todas as espécies de *Leishmania*. O restante da molécula, aproximadamente 550-700pb, apresenta sequências altamente variáveis, contendo um grande número de nucleotídeos A e T. Portanto, nessa região, podem-se encontrar sequências específicas para os diferentes grupos de

*Leishmania* (Fernandes et al., 1996; Noyes et al., 1998; Brenière et al., 1999; Oliveira et al., 2010).

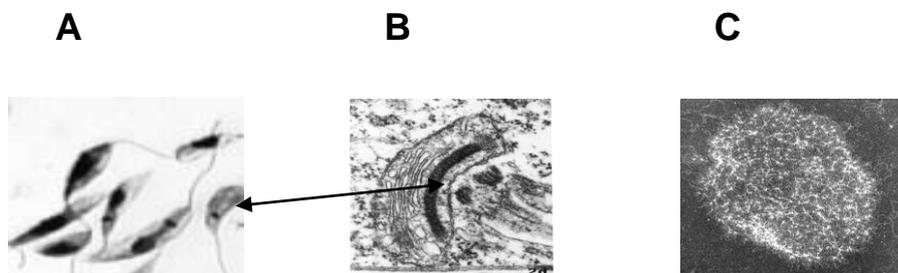


Figura 19. A seta sinaliza o kinetoplasto em promastigotas (A e B). A estrutura e rede de maxicírculos e minicírculos de DNA são vistas em maiores detalhes, por microscopia eletrônica em (B e C).

Fonte: [www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html](http://www.ebi.ac.uk/parasites/kDNA/Source.html); Pereira-Chioccola, 2009.

#### 1.10.2.2 RNA mini-exon

O gene RNA mini-exon (ou spliced leader – SL) é uma região gênica localizada no núcleo de todos os grupos da ordem Kinetoplastida e que nas *Leishmanias* tem sido utilizada como alvo para genotipar espécies (Fernandes et al., 1994; Harris et al., 1998; Marfurt et al., 2003). Cada genoma apresenta cerca de 100 a 200 cópias e cada SL é composta de uma região de transcrição conservada (exon) contendo uma sequência de 39pb, e outra região (intron), também conservada, mas de tamanho variável (55 a 101pb, dependendo da espécie). Entre cada SL existem regiões variáveis que não são transcritas e diferem na sequência de nucleotídeos e no tamanho (140 a 350 pb), dependendo do complexo de *Leishmania* (Figura 20).

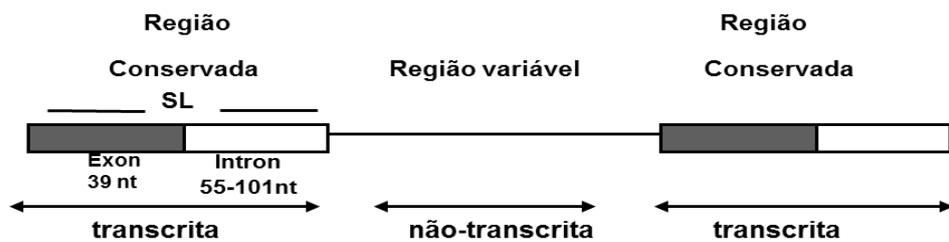


Figura 20. Diagrama esquemático Gene RNA mini-exon (ou spliced leader-SL) de *Leishmania*.

Fonte: Harris et al., 1998; Pereira-Chioccola, 2009.

### 1.10.2.3 Internal Transcribed Spacers

O DNA ribossômico (rDNA) localiza-se na região nucleolar das células eucarióticas, apresentando-se em unidades repetidas. Há cerca de 100 a 500 cópias do gene rDNA no genoma do núcleo. A sua função é codificar o RNA ribossômico. Estas unidades possuem segmentos transcritos e não transcritos. No interior da unidade de repetição as sequências transcritas são alternadas com regiões espaçadoras (IGS), sendo constituídas pelo espaçador transcrito externo (do inglês *external transcribed spacer*), uma região codificadora do RNA ribossômico (SSU 18S) seguida por um espaçador transcrito interno-(ITS-1) -do inglês *internal transcribed spacer*- uma segunda região codificadora de RNA ribossômico (5.8S), um segundo espaçador transcrito interno (ITS-2), uma terceira região codificadora de RNA ribossômico (LSU 28S) seguida por outro espaçador não transcrito (Silva et al., 2011). O mecanismo de transcrição dos genes que codificam o RNA ribossômico é realizado através da enzima RNA polimerase I (Winter et al., 2011).

Os genes que codificam o RNA ribossômico (rRNA) são altamente conservados e muito utilizados em estudos filogenéticos de Tripanosomatídeos (Sogin et al., 1986). A região NTS tem sido usada para estudos de comparação de espécies (Suzuki et al., 1986; Briones et al., 1992; Cupolillo et al., 1995; Orlando et al., 2002; Mayer & Floeter-Winter, 2012). Por outro lado, as regiões de transcrição não codificadoras dos genes rRNA, (regiões internas de transcrição, “internal transcribed sequences” ou

ITS) apresentam grande variabilidade. Ao contrário dos NTS, os ITS são relativamente pequenos, com cerca de 1 kb em *Leishmania* e são flanqueados por segmentos altamente conservados (Cupolillo et al., 1995).

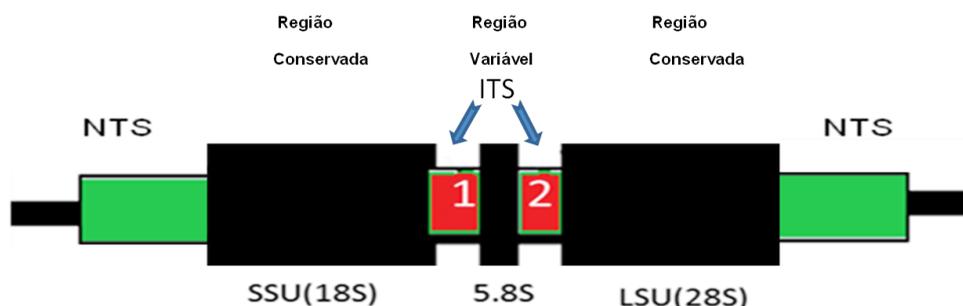


Figura 21. Organização do locus do gene rRNA de Tripanossomatídeos contendo as subunidades conservadas: SSU (subunidade menor), LSU (subunidade maior) e as regiões codificadoras ITS (Internal Transcribed Spacer) e NTS (Non Transcribed Spacer).

Fonte: Cupolillo et al., 1995.

#### 1.10.2.4 Heat shock proteins

A resposta ao choque térmico é um mecanismo genético conservado ao longo da evolução e encontra-se em todos os organismos, desde arqueobactérias até eucariotas superiores.

A atividade das proteínas de choque térmico, “heat shock proteins” (HSP) é desencadeada quando os organismos estão expostos a temperaturas superiores as normais para o seu crescimento. Protegem as células dos efeitos do calor e de outras formas de stress. São proteínas de expressão constitutiva (Hartl, 1996).

Entre HSPs, HSP70 é a mais conservada em sequência e função. São componentes centrais de muitos processos celulares fundamentais, como dobragem e montagem de proteínas recentemente sintetizadas, de enrolamento de proteínas deformadas e agregados, translocação de proteínas de membrana e de organelas secretórias, a degradação

proteolítica de proteínas instáveis, e controle da atividade de proteínas reguladoras (Ramírez et al., 2011).

Em *Leishmania*, o aumento de temperatura e a diminuição do pH são os principais agentes desencadeantes do processo de diferenciação promastigota para amastigota. Assim, os parasitos são capazes de adquirir mecanismos de tolerância às mudanças de temperatura, sendo que a HSP70 esta envolvida neste processo. Dentre as diferentes funções, desempenham um papel importante no processo de adaptação, influenciando a mudança do desenvolvimento de formas promastigotas em flebótomos para amastigotas em hospedeiros mamíferos (Zurita et al., 2003).

Genes HSP70 representam um alvo adequado para tipagem de espécies de *Leishmania* (Garcia et al., 2004, Garcia et al., 2005, Garcia et al., 2007; Silva et al., 2010). A Figura 22 indica a localização de genes HSP70 no genoma *L. braziliensis*.

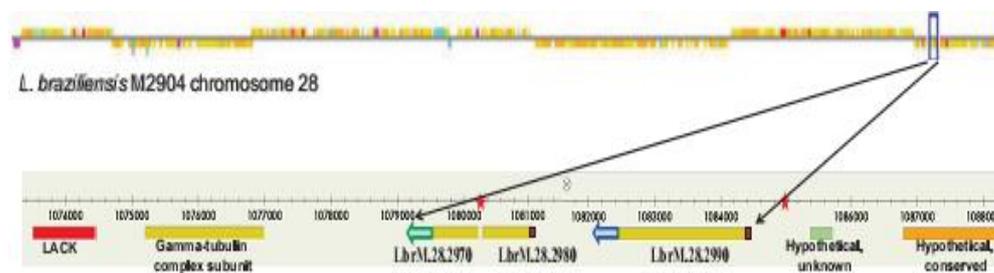


Figura 22. Localização da HSP70 no genoma de *L. braziliensis*. As setas superiores pretas demarcam o local HSP70. Caixas vermelhas indicam o 5'UTR, seta azul a 3'UTR-I, a seta verde da 3'UTR-II e vermelho estrelas as lacunas na sequencia. Fonte: Ramírez et al., 2011.

## 2 OBJETIVO

Estudar a variabilidade genética em amostras de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas em diferentes regiões do Estado de São Paulo.

### 2.1. Objetivos específicos

1. Avaliar a eficácia do marcador molecular IR-ITS, frente ao marcador molecular LB-3C/LU-5A, utilizado no diagnóstico molecular de *L. (V.) braziliensis* do Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Instituto Adolfo Lutz-SP.
2. Avaliar a PCR-RFLP e a PCR-LSSP para uso no estudo de variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* utilizando DNA extraído de amostras clínicas.
3. Determinar os padrões genotípicos de *L. (V.) braziliensis* empregando marcadores moleculares diretamente no DNA extraído de amostras clínicas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Amostras clínicas

As amostras clínicas utilizadas nesse estudo foram provenientes de casos suspeitos de LTA de origem humana e canina enviados ao laboratório de Biologia Molecular de Parasitas do Instituto Adolfo Lutz (IAL-SP) por médicos ou veterinários dos serviços de saúde e de zoonoses de vários municípios do Estado de São Paulo. Para a realização do diagnóstico molecular da LTA o material genético (DNA) foi extraído a partir do tecido de biopsia de lesões e posteriormente acondicionado em freezer desprovido do sistema *frost-free*, sob temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  (Mello et al., 2010).

Para o presente estudo foram utilizadas 132 amostras de DNA provenientes de 36 municípios, pois apresentaram resultado positivo no diagnóstico molecular. A Tabela 3 mostra em detalhes o número de amostras analisadas por região no Estado de São Paulo e a Figura 23 mostra a localização das regiões.

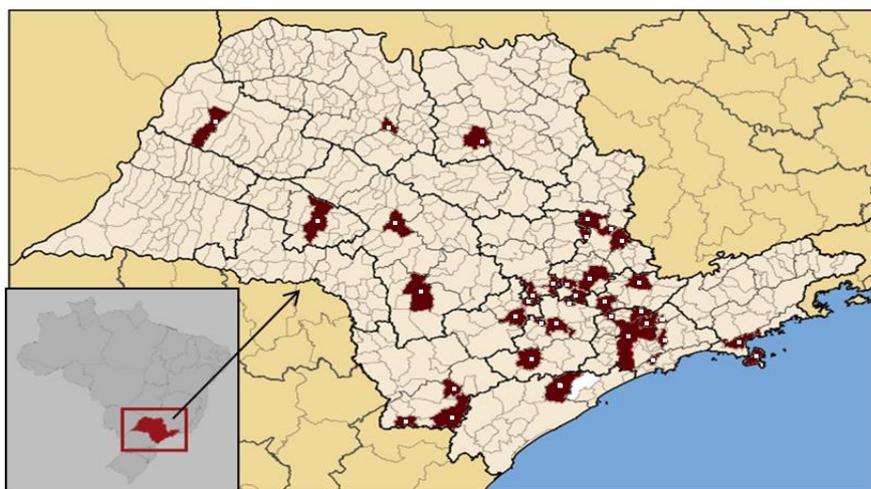


Figura 23. Mapa do Brasil e do estado de São Paulo indicando a localização dos municípios onde as amostras clínicas foram coletadas.

Tabela 3: Distribuição das amostras nos 36 municípios do Estado de São Paulo

<b>Municípios</b>	<b>Número de amostras de DNA</b>	<b>Municípios</b>	<b>Número de amostras de DNA</b>
Alumínio	2	Itapira	1
Arujá	1	Itupeva	2
Avaré	1	Jaboticabal	1
Bauru	4	Jundiaí	6
Bragança Paulista	1	Mairiporã	1
Cajamar	1	Marília	1
Campinas	5	Miracatu	1
Caraguatatuba	2	Mirandópolis	3
Cerquilha	1	Mogi Guaçu	1
Conhal	1	Monte Mor	6
Cubatão	1	Pilar do Sul	2
Guapiara	1	Ribeira	5
Guarulhos	12	Salto	2
Ibirá	1	São Paulo	11
Ilha Bela	4	Sorocaba	42
Indaiatuba	1	Suzano	1
Iperó	2	Tatui	1
Iporanga	3	Tietê	1
<b>Total de amostras</b>		<b>132</b>	

### 3.2. Delineamento experimental

As amostras biológicas com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar americana encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz-SP foram diagnosticadas pelas técnicas de biologia molecular. Posteriormente, as amostras positivas para *L. (V.) braziliensis* foram selecionadas e genotipadas por PCR-LSSP (kDNA) e PCR-RFLP (ITS). A organização das etapas empregadas na metodologia encontra-se ilustrada na figura 24.

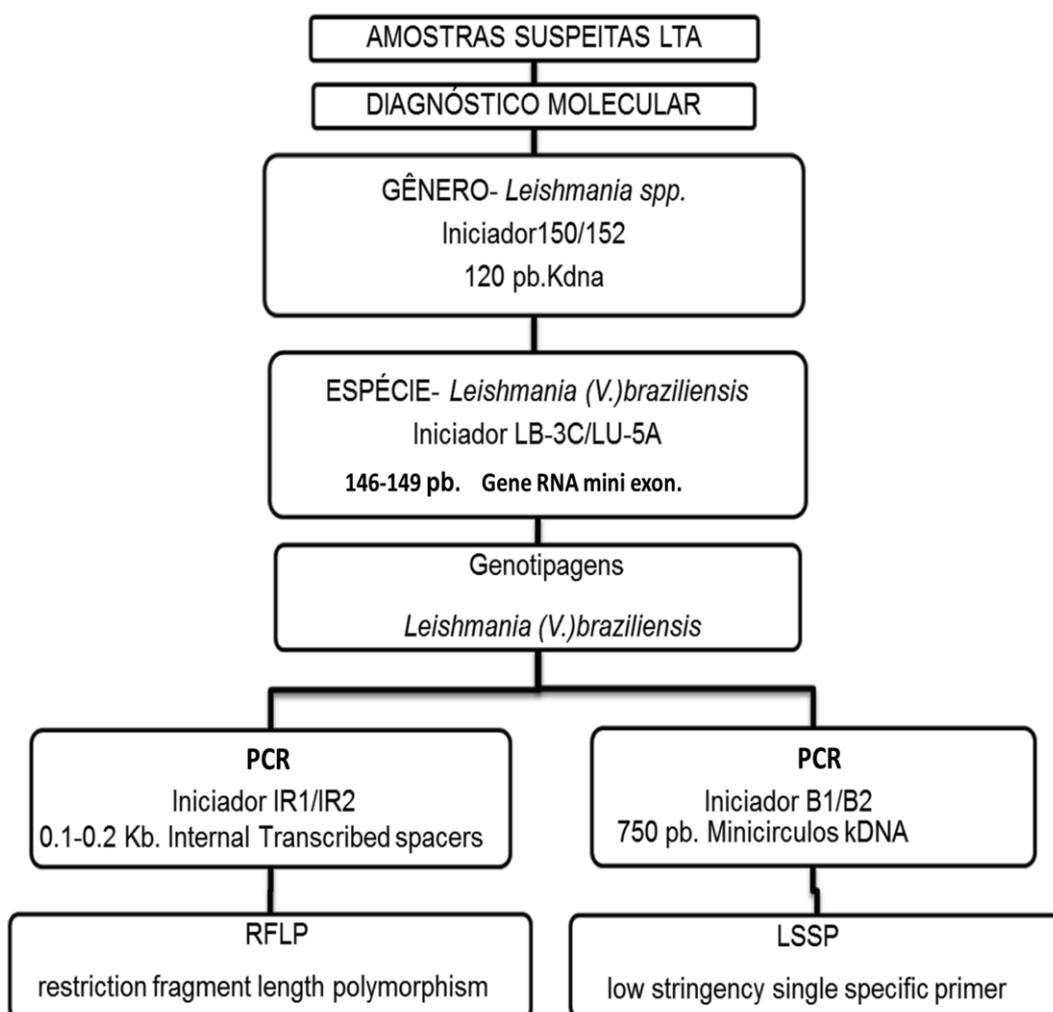


Figura 24. Delineamento experimental

### **3.3. Diagnóstico molecular**

#### **3.3.1. Extração de DNA**

As extrações foram realizadas de acordo com kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®). A quantidade de DNA é proporcional à quantidade e ao tipo de tecido, onde 1mg de tecido contém cerca de 0,2-1,2 µg de DNA. Fragmentos de tecido com peso superior a 10 mg disponibilizam mais de 10µg de DNA, quantidade adequada para uma eficiente análise molecular (Melo et al., 2010).

As biópsias contendo, em média, 25 mg de tecido foram maceradas, e a seguir, adicionaram-se 20µl de proteinase K dissolvida em 180 µl do tampão Qiagen–ATL. Procedeu-se a homogeneização das amostras em um agitador tipo Vortex seguida de incubação a 56°C (em banho-maria) até a completa lise das células. Após a adição de 200µl de etanol absoluto, as misturas foram transferidas para colunas de afinidade. Após a lavagem das colunas com os tampões Qiagen-AW1 e AW2, as moléculas de DNA foram eluídas com 200 µl Buffer AE.

#### **3.3.2. Quantificação de DNA**

As amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotometria. Para realizar o procedimento utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.). As concentrações de DNA foram determinadas pelas leituras realizadas a 260 nm. A absorbância igual a 1 equivale à concentração de 50µg/ml de DNA dupla fita (Sambrook et al., 1989). Todas as amostras foram diluídas para que a concentração fosse  $\geq 100$  ng/µl. A pureza das moléculas de DNA foi avaliada utilizando-se a razão de absorbância da amostra entre 260 e 280 nm. A proporção de  $\sim 1.8$  é interpretada como DNA livre de impurezas.

### 3.3.3 PCR

As amplificações foram realizadas utilizando um kit comercial (Gotaq®green Master Mix - Promega) contendo dois corantes (azul e amarelo) que permitem monitorar o progresso das amostras durante a eletroforese. Cada 12,5 µl do “mix” continha uma unidade de Taq DNA polimerase em 10mM Tris-HCl, pH 8.5; 50mM KCl; 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de cada um dos desoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Cada reação foi realizada adicionando-se 5 µl do DNA alvo e 50 pmol de cada marcador molecular em um volume final de 25 µl. As reações de amplificação foram realizadas no equipamento Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems®). A cada conjunto de reações foram adicionados dois controles negativos, um contendo apenas água livre de nuclease (Nuclease-Free Water- QIAGEN®) e outro com DNA extraído de amostra sabidamente negativa para *Leishmania spp.* e um controle positivo extraído de cultura de promastigotas de cepa padrão *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), proveniente da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz.

*Leishmania spp.* foi determinada utilizando-se o marcador molecular 150/152, que identifica o gênero *Leishmania spp.* Amplifica um fragmento de 120 pb da região conservada dos minicírculos do kDNA (Passos et al., 1999). A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (55°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos) repetida por 30 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

*L. (V.) braziliensis* foi determinada utilizando-se o marcador que LB-3C/LU-5A, que amplifica um fragmento de 146-149 pb. A sequência alvo do iniciador LU-5A é da região conservada SL, comum em todas as espécies de *Leishmania*. O iniciador LB-3C provém da região não transcrita, variável e específica para o complexo *L. (V.) braziliensis* (Harris et al. 1998). A reação foi realizada como descrita previamente (Gomes et al., 2007; Gomes et al., 2008) e foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5

minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 45 segundos), anelamento (57.8°C por 45 segundos) e extensão (72°C por 45 segundos) repetida por 35 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para verificar a integridade do DNA extraído das amostras humanas foram realizadas PCR utilizando o marcador molecular  $\beta 1$ - $\beta 2$  que amplifica um fragmento de 140 pb do gene da  $\beta$ -globulina humana (Lee et al., 2001). Para as amostras caninas foi utilizado o marcador molecular Gapdh-4, que amplifica um fragmento de 911pb da gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase canina (Kullberg et al., 2006). Ambos marcadores (humano e canino) foram utilizados para verificar a integridade do DNA extraído, e se caso houvesse algum agente inibidor de reação, o resultado da PCR seria negativa. Neste caso, onde a reação de amplificação de uma amostra não ocorreu, procedeu-se à re-extração da mesma. Estas reações foram realizadas simultaneamente e com as mesmas condições do protocolo do marcador molecular LB-3C/LU-5A. A Tabela 4 mostra a descrição dos marcadores moleculares utilizados no diagnóstico molecular.

#### **3.3.4. Eletroforese e gel de agarose**

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% em TBE (Tris-Borato, 0,045M; EDTA, 0,001M) com 0,5  $\mu$ l/ml de brometo de etídio e separados por um sistema de eletroforese horizontal numa cuba contendo o mesmo tampão. As imagens dos géis foram visualizadas sob iluminação UV em transluminador Mini Bis Pro Gene Genius (Programa Gel Capture, Mini Bis Pro, versão 4.5.3). Os tamanhos dos fragmentos foram comparados com o padrão de peso molecular de 100 bp utilizado no gel juntamente com as amostras.

Tabela 4: Marcadores moleculares utilizados no diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar

Marcador molecular	Sequencia 5'- 3' (antisense-sense)	Produto amplificado de (em pb):	Referência
150/152	GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC	<i>Leishmania</i> spp. (120)	Passos et al. 1999
LB-3C/ LU-5A	CGTCGCCGAACCCCGTGTC TTTATTGGTATGCGAACTTC	<i>L. (V.) braziliensis</i> (146-149)	Harris et al. 1998
$\beta$ 1/ $\beta$ 2	ACCACCAACTTCATCCACGTTCCACC CTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGC	$\beta$ -globulina humana (140)	Lee et al., 2001
Gapdh-4	AGG CTG AGA ACG GGA AAC TT ATT AAG TTG GGG CAG GGA CT	gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase canina (911)	Kullberg et al., 2006

### **3.4. Padronizações**

Os primeiros experimentos envolvendo as técnicas de genotipagem admitidas neste estudo foram realizados com a finalidade de padronizar as condições da PCR. Primeiramente as reações foram realizadas (para cada marcador molecular) para verificar a viabilidade e determinar o tamanho aproximado do fragmento amplificado. Testaram-se também as concentrações dos marcadores moleculares e as temperaturas de desnaturação, pareamento e extensão, através de um gradiente de temperatura realizado nos termocicladores utilizados nesta pesquisa.

### **3.5. Genotipagens**

#### **3.5.1. Genotipagem por PCR-LSSP**

##### **3.5.1.1. Primeira PCR**

As amplificações foram realizadas como descrito no item 3.3.3. (PCR) com o kit comercial (Gotaq®green Master Mix - Promega). A cada conjunto de reações foi adicionado um controle negativo, contendo apenas água pura e um controle positivo, como já descrito no item 3.3.3. "PCR". O marcador molecular B1/B2 amplifica uma região variável dos minicírculos do kDNA de *Leishmania*, específica para o complexo *L. (V.) braziliensis* (Bruijn & Barker, 1992) (Tabela 5). As amplificações foram realizadas com 1 ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 45 segundos, 59°C por 45 segundos, 72° C por 45 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR de 750 pb foram analisados conforme descrito no item 3.3.4. "eletroforese e gel de agarose". Os produtos amplificados foram purificados com o kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen™) de acordo com as instruções fornecidas. Brevemente, foram adicionados 4

volumes de PureLink® Binding Buffer para cada volume do produto de PCR (50–100 µL) seguida de uma breve homogeneização e transferência da mistura para a PureLink® Spin Column. A seguir, as colunas foram centrifugadas em temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 × g. As colunas foram transferidas para um novo tubo, foram adicionados 650 µL de Wash Buffer e duas centrifugações por 10,000 × g durante 1 minuto. As moléculas de DNA foram eluídas com 50 µL de Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) ou água destilada estéril (pH 7.0), após centrifugação a 10000 × g por 2 minutos.

### **3.5.1.2. PCR-LSSP**

As reações de PCR-LSSP foram realizadas conforme descrito anteriormente (Rodrigues et al., 2002; Baptista et al., 2009). Os produtos de 750 pb foram reamplificados utilizando-se 50 pmoles do marcador molecular por reação e 60 ng de cada produto purificado (2 µl). As concentrações dos reagentes para as PCR foram semelhantes ao item 3.3.3. “PCR”. As amplificações foram realizadas com um ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguidos de 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, 36°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram separados e analisados por eletroforese em géis de poliacrilamida 8% conforme descrito no item 3.5.3. “Eletroforese e gel de poliacrilamida”.

## **3.5.2. Genotipagem por PCR-RFLP – ITS**

### **3.5.2.1. PCR**

As amplificações foram realizadas utilizando como descrito no item 3.3.3. (PCR) com o kit comercial (Gotaq®green Master Mix - Promega). A cada conjunto de reações foi adicionado um controle negativo, um contendo apenas água pura e um controle positivo, como descrito no item 3.3.3. “PCR”.

As ampliações das unidades de ITS foram realizadas utilizando-se o marcador molecular IR1/IR2, que amplifica um fragmento de 1 a 1,2 kb (Cupolillo et al., 1995). A descrição e localização no genoma do marcador molecular encontram-se descritos na Tabela 5. A PCR foi composta de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de uma segunda etapa composta de desnaturação (95°C por 30 segundos), anelamento (56°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 30 segundos) repetida por 30 ciclos. A terceira etapa constituiu em um ciclo de extensão final a 72°C por 4 minutos. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% e analisados como descrito no item 3.3.4. “Eletroforese e gel de agarose”.

Tabela 5: Marcadores moleculares utilizados na genotipagem de *L. (V.) braziliensis*.

Marcador molecular	Sequencia 5'- 3' (antisense-sense)	Método	Produto (kb)	Referência
B1/B2	GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG CTAATTGTGCACGGGGAGG	PCR-LSSP	0.75	Rodrigues et al., 2002
IR1/IR2	GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT GCGGGTAGTCCTGCCAAACTCAGGTCTG	PCR-RFLP – ITS/IR	1-1.2	Cupolillo et al., 1995

### **3.5.2.2. Isolamento dos produtos amplificados a partir do gel de agarose**

Mesmo após as padronizações da PCR, algumas amostras apresentaram bandas inespecíficas no gel de agarose 2%. Procedeu-se a purificação da banda de 1.0-1.2 kb no gel de agarose antes do tratamento com a enzima de restrição. O procedimento foi realizado com o uso do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Inicialmente, os géis contendo as corridas eletroforéticas foram visualizados no transluminador e no local das bandas de 1.0-1.2 kb os géis foram cortados com auxílio de um bisturi e acondicionados em tubos de 1,5 ml. Os fragmentos foram dissolvidos em uma solução de ligação da membrana a razão de 10 µl de solução por 10 mg da fatia do gel. As misturas foram homogeneizadas e incubadas a 50-65°C durante 10 minutos ou até que as amostras dos géis fossem completamente dissolvidas e, em seguida, centrifugadas por 1 min a 3000 g. A purificação das moléculas de DNA foi realizada conforme instruções do fabricante. O DNA eluído foi quantificado em NanoDrop como descrito no item 3.3.2. “Quantificação de DNA” e acondicionado à -20°C.

### **3.5.2.3. RFLP**

O polimorfismo dos produtos de PCR que amplificam as duas unidades de ITS foi analisado por RFLP. Os fragmentos amplificados da PCR foram digeridos com a enzima de restrição HhaI (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, 10µl do produto amplificado foram incubados com 1µl da enzima de restrição, 7µl de água livre de nuclease e 2µl de “buffer Tango”, totalizando um volume final de 20µl. A solução foi incubada a 37°C por 3 horas e os produtos digeridos foram analisados em gel de poliacrilamida a 8%.

### **3.5.3. Eletroforese e gel de poliacrilamida**

Os produtos amplificados conforme descrito no item 3.3.4. e digeridos como descrito no item 3.5.2.3. foram submetidos à eletroforese vertical em géis de poliacrilamida 8% (Bio-Rad). As corridas eletroforéticas foram realizadas por 90 minutos 400 mA e 100 Volts à temperatura ambiente, com o gel submerso em tampão TBE (Tris-Borato, 0,045M; EDTA, 0,001M). Após a corrida eletroforética, os fragmentos amplificados foram visualizados após a coloração com 0,5 µl/ml de brometo de etídio por 30 minutos. As imagens foram captadas com iluminação UV em transluminador Mini Bis Pro Gene Genius. Os perfis eletroforéticos detectados foram analisados e comparados com o padrão de peso molecular de 50 pb utilizado no gel juntamente com as amostras.

### **3.6 Análise de dados**

Todos os resultados foram avaliados analisando-se os perfis de bandas obtidas pelas das diferentes mobilidades eletroforéticas.

Os resultados da PCR utilizada no diagnóstico molecular das leishmanioses no Laboratório de Biologia molecular de Parasitas e Fungos foram considerados padrão ouro.

Os perfis de restrição de ITS e kDNA foram analisados visualmente. As fotografias dos géis de poliacrilamida foram analisadas e os padrões de bandas inseridos manualmente no computador.

Nas técnicas de genotipagem, as diferenças de tamanho dos fragmentos de restrição de DNA foram referenciadas ao marcador molecular utilizado, estabelecendo-se a classificação das bandas de acordo com as similaridades obtidas. Após a identificação e classificação dessas bandas foi construída uma tabela com os grupos de perfis eletroforéticos encontrados.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Diagnóstico molecular

As 132 amostras clínicas utilizadas neste estudo apresentaram resultados positivos tanto no diagnóstico molecular para o gênero *Leishmania*, utilizando-se o marcador molecular 150/152 (figura 25 A), quanto para a determinação da espécie *L. (V.) braziliensis*, realizando-se a PCR com o marcador molecular LB-3C/LU-5A (Figura 25B).

O controle da qualidade das extrações de DNA foi realizado utilizando-se uma PCR para amplificar uma região gênica humana (Figura 25 C) ou canina (Figura 25 D).

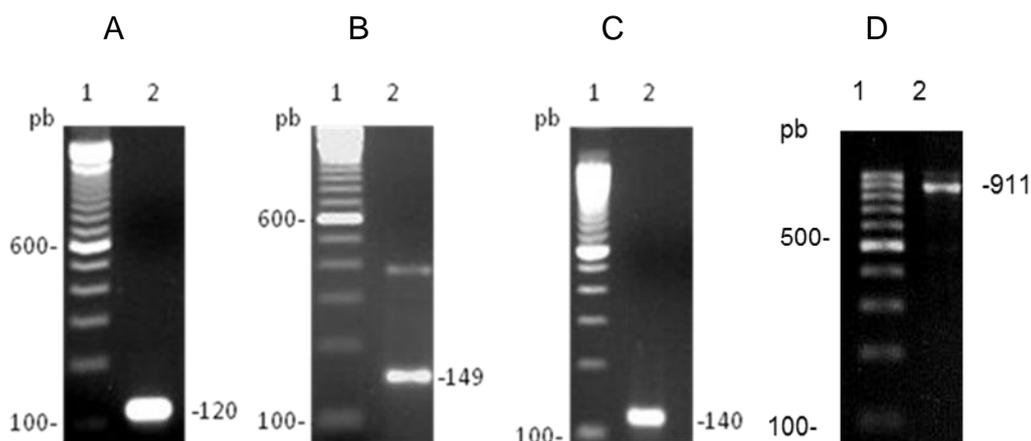


Figura 25. Eletroforese em géis de agarose a 2% com um marcador molecular de 100pb (1) e produtos de PCR de amostras clínicas (2). (A) produto de 120 pb de *Leishmania* spp. de uma região conservada dos minicírculos do kDNA (marcador molecular 150/152); (B) produto de 146-149 pb de *L. (V.) braziliensis* (marcador molecular LB-3C/LU-5A); (C) produto de 140 pb do gene da  $\beta$ -globulina humana (marcador molecular  $\beta 1/\beta 2$ ); e (D) produto de 911 pb do gene gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase canina (marcador molecular Gapdh-4).

## 4.2. Genotipagens

### 4.2.1. Genotipagem por PCR-LSSP

Os primeiros ensaios foram feitos utilizando-se o marcador molecular B1/B2. Os produtos PCR gerados de 750 pb podem ser vistos na Figura 26. Das 132 amostras positivas para a espécie *L. (V.) braziliensis*, somente 19 amostras apresentaram resultados positivos com a utilização desses marcadores. Essas amostras são provenientes de 5 regiões do Estado de São Paulo conforme descritas na Tabela 6. As procedências foram Sorocaba (11 amostras); Jundiaí (3 amostras); Caraguatatuba (2 amostras); Bauru (1 amostra); e Campinas (2 amostras).

A seguir as amostras foram genotipadas pela PCR-LSSP. Para cada amostra foram realizadas duas reações de amplificação com baixa estrincência. A primeira reação foi realizada utilizando-se o iniciador B1. Como pode ser visto na Figura 27 verificou-se um alto grau de polimorfismo entre os isolados estudados tanto entre amostras das diferentes regiões ou não (11 amostras de Sorocaba). Os resultados foram semelhantes em ambas às amplificações (com o marcador molecular B1 ou o B2).

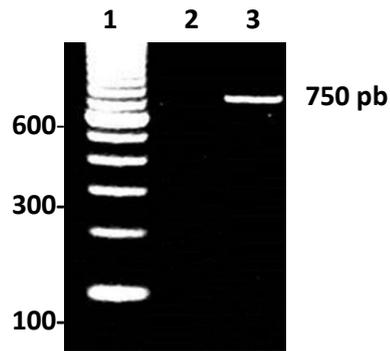


Figura 26. Análise dos produtos amplificados de *L. (V.) braziliensis* identificados com o marcador que amplifica uma região variável dos minicírculos do kDNA. Os produtos amplificados de 750 pb foram analisados por eletroforese em géis de agarose 2%. Linha 1, marcador de massa molecular (100 pb); linha 2, controle negativo; linha 3, amostra clínica.

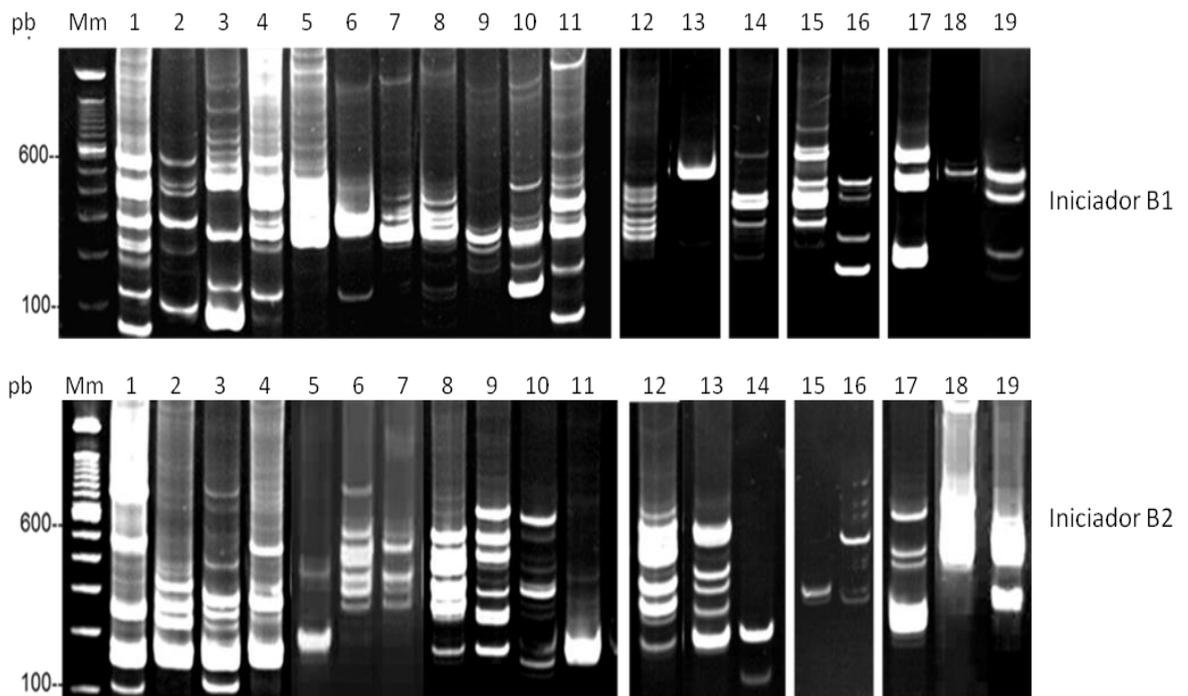


Figura 27. Análise dos perfis de PCR-LSSP por eletroforese em géis de poliacrilamida 8% das 19 amostras utilizando-se o marcador molecular B1 (figura acima) e o marcador molecular B2 (figura abaixo). Mm: marcador de massa molecular (100 pb); linhas 1 a 11, amostras de pacientes provenientes de Sorocaba; linhas 12 e 13, de Caraguatatuba; linha 14, Bauru; linhas 15 e 16, Campinas; e linhas 17 a 19 Jundiaí.

Tabela 6: Relação das 19 amostras clínicas genotipadas por PCR-LSSP incluindo os códigos, data de coleta, hospedeiros e procedências

<b>Nº da amostra/data de coleta (mês/ano)</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Município</b>
190-08/2005	Humano	Sorocaba
276-05/2006	Humano	Sorocaba
277-05/2006	Humano	Sorocaba
278-05/2006	Humano	Sorocaba
281-05/2006	Humano	Sorocaba
282-05/2006	Humano	Sorocaba
301-08/2006	Humano	Sorocaba
678-03/2008	Canino	Caraguatatuba
683-03/2008	Humano	Sorocaba
684-03/2008	Humano	Sorocaba
832-05/2008	Canino	Caraguatatuba
908-06/2008	Humano	Sorocaba
1142-10/2008	Humano	Campinas
1153-11/2008	Humano	Campinas
1156-11/2008	Humano	Sorocaba
1264-12/2008	Humano	Bauru
1608-08/2009	Humano	Jundiaí
1945-10/2010	Humano	Jundiai
1946-10/2010	Humano	Jundiaí

#### 4.2.2. Genotipagem por PCR-RFLP

Das 132 amostras admitidas no estudo, 52 (40%) apresentaram resultado positivo utilizando-se o marcador molecular IR1/IR2, que amplifica fragmentos de 1 a 1,2 kb da região ITS de *L. (V.) braziliensis* (figura 28).

A Tabela 7 mostra, em detalhes, cada amostra como o seu respectivo código e data de coleta, hospedeiro e procedência. Destas, 44 foram provenientes de humanos e 8 de cães. A cidade de Sorocaba foi a localidade que concentrou o maior número de amostras clínicas (21), enquanto que as outras amostras (31) foram distribuídas em 17 municípios participantes do estudo.

As análises por PCR-RFLP revelaram 9 padrões distintos, como pode ser visto na Figura 29. A distribuição das amostras clínicas pode ser vista na Tabela 8. O padrão 1 foi o mais comum e foi presente em 29 amostras, distribuídas em 13 municípios. O segundo perfil esteve presente em 9 amostras distribuídas em 4 municípios. Os demais padrões (3 a 9) foram determinados em poucas amostras: 3 (3 municípios), 4 (2 municípios), 5 (1 município), 6 (1 município), 7 (2 municípios), 8 (2 municípios), 9 (2 municípios), respectivamente.

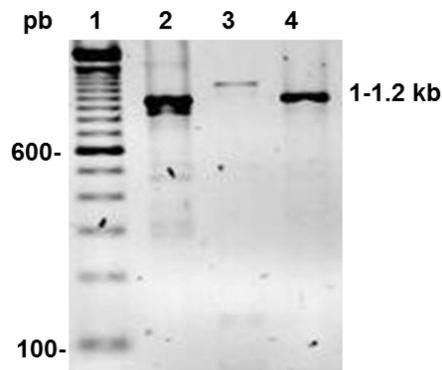


Figura 28. Análise dos produtos amplificados de *L. (V.) braziliensis* identificados com o marcador que amplifica a região ITS. Os produtos amplificados de 1-1.2 kb foram analisados por eletroforese em géis de agarose 2%. Linha 1, marcador de massa molecular (100 pb); linhas 2 a 4: amostras clínicas.

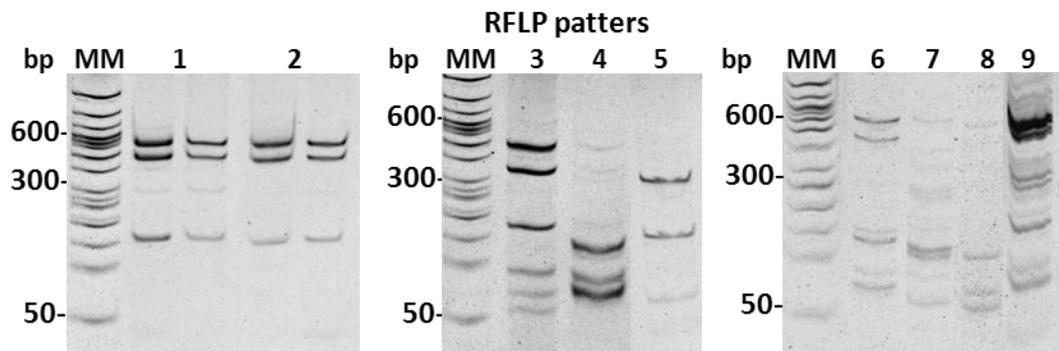


Figura 29. Análise dos perfis de PCR-RFLP por eletroforese em géis de poliacrilamida 8% dos produtos amplificados 1-1,2 kb de ITS digeridos com HhaI. Mm: marcador de massa molecular (50 pb); 1 a 9, perfis de *L. (V.) braziliensis* isolados diretamente de 52 amostras clínicas.

Tabela 7. Relação das 52 amostras clínicas genotipadas por PCR-RFLP incluindo os códigos, datas das coletas, hospedeiros e procedências.

Nº da amostra–data de coleta (mês/ano)	Hospedeiro	Município	Nº da amostra–data de coleta (mês/ano)	Hospedeiro	Município
07-09/2003	Humano	Sorocaba	1063-07/2008	Humano	Guarulhos
18-09/2003	Humano	Sorocaba	1153-11/2008	Humano	Campinas
20-09/2003	Canino	Sorocaba	1324-02/2009	Humano	Sorocaba
26-10/2003	Canino	Marília	1622-08/2009	Humano	Guarulhos*
64-09/2004	Humano	Sorocaba	1758-02/2010	Humano	Jundiai
65-09/2004	Humano	Sorocaba	1945-06/2010	Humano	Jundiai
84-11/2004	Canino	Ilha Bela	1946-10/2010	Humano	Jundiai
115-03/2005	Humano	Sorocaba	1985-11/2010	Humano	Bauru
125-03/2005	Humano	Sorocaba	2001-12/2010	Humano	Sorocaba
157-06/2005	Humano	Itupeva	2036-02/2011	Canino	Iporanga
194-08/2005	Humano	Sao Paulo*	2037-02/2011	Canino	Iporanga
253-11/2005	Humano	Sorocaba	2038-02/2011	Canino	Iporanga
274-05/2006	Humano	Mairiporã	2072-04/2011	Humano	Iperó
275-05/2006	Humano	Cajamar	2098-06/2011	Humano	Guarulhos*
279-05/2006	Humano	Itapera	2135-09/2011	Humano	Sorocaba
281-05/2006	Humano	Sorocaba	2136-09/2011	Humano	Sorocaba
282-05/2006	Humano	Sorocaba	2150-09/2011	Humano	Sorocaba
288-06/2006	Humano	Itupeva	2151-09/2011	Humano	Sorocaba
304-08/2006	Humano	Sorocaba	2152-09/2011	Humano	Sorocaba
327-08/2006	Canino	Avaré	2163-10/2011	Humano	Guarulhos*
354-10/2006	Humano	Sao Paulo*	2302-01/2012	Humano	Guarulhos*
504-09/2007	Humano	Sorocaba	2538-05/2012	Humano	Sorocaba
560-12/2007	Humano	Sorocaba	2656-07/2012	Humano	Ribeira
684-03/2008	Humano	Sorocaba	2657-07/2012	Humano	Ribeira
829-05/2008	Humano	Sao Paulo*	2658-07/2012	Humano	Ribeira
832-05/2008	Canino	Caraguatatuba	2883-12/2012	Humano	Iperó

\* amostras clínicas foram coletadas de pacientes que foram atendidos em Centros médicos de São Paulo e Guarulhos e não se conhece a procedência.

Tabela 8. Distribuição das amostras clínicas entre os 9 perfis encontrados nos 17 municípios do Estado de São Paulo

<i>L. (V.) braziliensis</i> genotipagem (n)	Municípios (n=17)	Humano	Canino
Pattern 1 (29 samples)	Bauru	1	-
	Cajamar	1	-
	Caraguatatuba	-	1
	Guarulhos	1	-
	Iperó	2	-
	Iporanga	-	2
	Itapera	1	-
	Itupeva	2	-
	Jundiai	2	-
	Mairipora	1	-
	Ribeira	2	-
	Sao Paulo	2	-
	Sorocaba	10	1
Pattern 2 (9 samples)	Guarulhos	3	-
	Jundiai	1	-
	Ribeira	1	-
	Sorocaba	4	-
Pattern 3 (3 samples)	Avaré	-	1
	Marilia	-	1
	Sorocaba	1	-
Pattern 4 (2 samples)	Campinas	1	-
	Sorocaba	1	-
Pattern 5 (1 sample)	São Paulo	1	-
Pattern 6 (2 samples)	Sorocaba	2	-
Pattern 7 (2 samples)	Guarulhos	1	-
	Sorocaba	1	-
Pattern 8 (2 samples)	Iporanga	-	1
	Sorocaba	1	-
Pattern 9 (2 samples)	Ilha Bela	-	1
	Sorocaba	1	-
Total of samples		44	8

## 5. DISCUSSÃO

Das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, *L. (V.) braziliensis* é o exemplar mais prevalente nos casos de LTA no homem nas Américas e constitui um sério problema de saúde pública no Brasil. Diferentes estudos têm revelado um acentuado polimorfismo genético, o que explicaria a adaptação destes parasitos às mudanças observadas nas condições ambientais (Cupolillo et al., 1998; Cupolillo et al., 2003).

A importância de estudos da variabilidade genética de *Leishmania* se deve principalmente à correlação com os outros aspectos da doença como a localização geográfica, biomas, formas clínicas, virulência, patogenicidade, resistência a drogas e variação antigênica, dentre outros.

Patógenos que produzem diferentes variantes genéticas são mais propensos a infectar múltiplos hospedeiros. Assim, a pesquisa de polimorfismos genéticos de *L. (V.) braziliensis* pode potencialmente levar a um melhor entendimento da epidemiologia molecular da doença. Apesar de já existirem estudos genéticos utilizando amostras de *L. (V.) braziliensis* em diversos estados brasileiros (Cupolillo et al., 1995; Cupolillo et al., 2003; Schriefer et al., 2004; Oliveira et al. 2010; Silva et al., 2010), nenhum deles foi realizado no Estado de São Paulo. O conhecimento biológico, imunológico, genético e eco-epidemiológico podem contribuir para o aumento no controle e medidas futuras para o tratamento desta enfermidade.

No Estado de São Paulo, *L. (V.) braziliensis* é a espécie que apresenta maior diversidade genética, grande importância epidemiológica, predominante nas infecções humanas, com diferentes manifestações de formas clínicas. É transmitida por uma diversidade de espécies de flebotomíneos adaptados ao peridomicílio que infectam também animais domésticos e selvagens nos diferentes ambientes de transmissão. Devido à urbanização de diversas regiões do Estado de São Paulo bem como a

contínua exploração do meio ambiente, os vetores da LTA encontram-se em franca expansão, ocasionando sequelas físicas no homem.

A ideia de conduzir este estudo surgiu devido à incidência da LTA nos últimos 20 anos no Estado de São Paulo, apesar de já estar instalada há mais de cem anos, a transmissão ainda ocorre durante as atividades realizadas no campo ou em regiões periurbanas. Esses fatores aliam-se ao grau de degradação ambiental imposto pelo crescimento das cidades (Rey, 2001b). Estas razões foram suficientes para buscarmos a caracterização genotípica para emprego em estudos epidemiológicos e que possam ser de rápida e fácil execução. Especialmente, no Estado de São Paulo, que de 1998 a 2011 foram relatados 6642 casos, com média de 147 municípios em transmissão (CVE, 2012), não existem trabalhos que abordam a variabilidade genética da *L. (V.) braziliensis*. Em paralelo, estudos taxonômicos de isolados de *Leishmania spp.* indicam grande diversidade e heterogeneidade populacional entre os parasitos e o subgênero *Viannia* (Cupollilo et al., 1994; Cupollilo et al., 1998).

Deve-se ressaltar que a PCR é uma técnica rápida e eficiente para determinar a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção. Os iniciadores LB-3C/LU-5A demonstraram alta sensibilidade e especificidade para compor o diagnóstico da LTA causada por *L. (V.) braziliensis*.

A proposta de caracterizar genotipicamente os isolados de *L. (V.) braziliensis* em amostras clínicas surgiu da dificuldade em se cultivar estes parasitas, o que demandaria demasiado tempo de incubação, requerimento de excessiva quantidade de meio de cultivo e maior volume de amostra para que possa ser realizada repetidamente, além do potencial risco de contaminação (Gutierrez et al., 2010). Assim, a identificação por genotipagem diretamente da amostra clínica torna-se uma importante ferramenta para os diferentes estudos (Gomes et al., 2008). No presente trabalho, ainda que somente 40% das amostras foram genotipadas pela PCR-RFLP e 14% pela PCR-LSSP, os resultados demonstraram a possibilidade de realizar a genotipagem nas regiões ITS e kDNA, utilizando

pequenas quantidades de DNA de *L. (V.) braziliensis* extraído diretamente de amostras clínicas.

Em relação à integridade dos ácidos nucleicos, um estudo realizado por Melo et al., (2010) relata que o DNA pode ser armazenado a uma temperatura de -20 °C por, no máximo, sete anos. No presente trabalho selecionamos aleatoriamente amostras positivas para *L. (V.) braziliensis* de biópsias recebidas por nosso laboratório durante nove anos (2003-2012). Todas as amostras demonstraram resultados viáveis nas metodologias moleculares utilizadas. Portanto, foi possível manter integridade de ácidos nucleicos estocados em freezer a uma temperatura de -20 °C por um período superior a sete anos, demonstrando a possibilidade de sua determinação genotípica.

A escolha da região alvo para o desenho de iniciadores é de crucial importância, pois é um dos principais fatores para se estabelecer a alta sensibilidade e especificidade da reação. Diante disso optou-se por realizar as primeiras análises com o marcador molecular B1/B2 na PCR-LSSP (Bruijn & Barker, 1992). A técnica de PCR-LSSP revelou que as amostras analisadas apresentaram características genéticas distintas nas moléculas de kDNA. Este procedimento apresentou um potencial para discriminar variantes de *L. (V.) braziliensis* circulantes no Estado de São Paulo. Devido ao alto grau de polimorfismos encontrados, não verificamos amostras com perfis semelhantes, impossibilitando a formação de genótipos. Ao contrário como realizado em um estudo conduzido por Baptista, et al., (2009), no Estado do Rio de Janeiro, onde as variantes de *L. (V.) braziliensis* foram agrupadas em nove genótipos. Estudos anteriores demonstraram que PCR-LSSP foi uma valiosa ferramenta para discriminar variações genotípicas em isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de humanos. Baptista et al., (2012) demonstraram a existência de polimorfismo genético entre amostras isoladas de pacientes antes do tratamento e após reativação da doença ou fracasso do tratamento com antimonial, sugerindo uma possível diferenciação da estrutura da população original de parasitas frente a mecanismos de resistência a um tratamento ou a reativação de lesões de

LTA. Em concordância com os nossos resultados obtidos por PCR-LSSP, Oliveira et al., (2013) analisando a variabilidade genética no kDNA de *L. (V.) braziliensis* em diferentes pacientes com a mesma lesão e de diferentes lesões de um mesmo paciente obtiveram diferentes perfis genéticos dos parasitas. Os estudos revelaram a variabilidade genética ao nível intrapacientes foi menos pronunciada do que aquela entre pacientes diferentes. No presente estudo a tipagem genética do kDNA de *L. (V.) braziliensis* foi obtida a partir da biópsia de lesões dos casos suspeitos. Essa metodologia está em concordância com um estudo prévio realizado por Oliveira et al., (2010), onde encontraram perfis geneticamente divergentes detectados em lesões de pacientes submetidos à biópsia em momentos diferentes dentro de um período de 1 ano. Com a presente técnica também foi possível à confirmação visualização de variantes genéticas no kDNA de *L. (V.) braziliensis* de cães infectados, sugerindo que o parasita sofre modificações no repertório de seus minicirculos para que se adapte aos diversos reservatórios que compõe o ciclo de transmissão. A presença de variantes de *L. (V.) braziliensis* em amostras caninas foi relatada em um estudo conduzido por Oliveira et al., (2013) no qual investigaram polimorfismos genéticos em populações de *L. (V.) braziliensis* em diferentes locais anatômicos de cães naturalmente infectados. Os resultados apontaram que populações de parasitas restritas ao local da lesão eram geneticamente semelhantes e as populações que se disseminaram para órgãos internos exibiram um perfil genético mais polimórfico.

O próximo passo foi realizar as genotipagens pela análise das regiões de ITS. O uso da PCR-RFLP direcionada para a região dos espaçadores transcritos internos foi possível detectar variabilidade genética em população de *L. (V.) braziliensis* circulante em 36 municípios do Estado de São Paulo. Os nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores que tem demonstrado a utilidade deste marcador na detecção de diversidade genética, bem como a sua associação com os aspectos epidemiológicos (El Tai et al., 2001; Berzunza-Cruz et al., 2002; Cupolillo et al., 2003; Garcia et al., 2005). A PCR-RFLP direcionada para a região ITS foi utilizada em

diferentes estudos e mostrou ser eficiente. Cupolillo et al., (1995) utilizando a técnica de tipagem da região intergênica demonstrou diferentes padrões genotípicos em espécies do subgênero *Viannia*. Concluíram que este método foi capaz de identificar considerável diversidade molecular, destacando considerável polimorfismo encontrado em *L. (V.) braziliensis*. Considerando a variabilidade dos ITS, Cupolillo et al., (2003) apontou diversidade genética de *L. (V.) braziliensis*, associando os genótipos encontrados com ciclos de transmissão específicos de diversas regiões do Brasil. De modo semelhante, Butriago et al., (2011) conduziu um estudo na Bolívia utilizando a PCR-RFLP voltada para a região ITS, onde discriminou várias espécies e revelou variabilidade genética em *L. (V.) braziliensis*. Ao comparar 152 amostras de pacientes portadores de LTA através da PCR-RFLP (com a enzima Hae III) e sequenciamento, Garcia et al.,(2005) constataram 61% de concordância entre os resultados, mostrando significância da PCR-RFLP para *L. (V.) braziliensis*, apresentando menores custos e tempo de execução, comparado ao sequenciamento de DNA.

As amostras de DNA analisadas neste estudo apresentaram distintos perfis eletroforéticos sob análise da região ITS quando submetidas à ação da enzima de restrição HhaI na qual foram detectados nove padrões distintos. Nosso estudo confirma a presença de variabilidade genética em *L. (V.) braziliensis* pelos diferentes métodos de caracterização molecular empregado.

Um estudo realizado em Corte de Pedra, no estado da Bahia, relacionou a presença de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* genotipicamente distintas com as diferentes formas clínicas da doença. Outra pesquisa demonstrou que *L. (V.) braziliensis* obtida de diferentes formas de doença humana, ou proveniente de áreas geográficas diversas exibem comportamentos biológicos distintos em animais de laboratório. Nesse segmento, um estudo prévio concluiu que cepas distintas podem influenciar diferentes formas de expressão de quimiocinas nos sítios de inoculação em animais de laboratório (Schriefer et al., 2008). As variações

interespecíficas demonstradas por *L. (V.) braziliensis* podem influenciar a eficácia do tratamento.

A hibridização que ocorre em *Leishmania* pode ter origem em seu modo de reprodução. Além da propagação clonal, estudos relatam reprodução sexuada de formas promastigotas, com ocasionais recombinações gênicas, anteriormente a fase de metaciclogênese, no trato gastrointestinal do inseto vetor (Rougeron et al., 2010). Portanto, a reprodução sexuada em *Leishmania* pode contribuir para a diversidade fenotípica em populações naturais, promovendo, desta forma, a adaptação do parasita a diversas localizações geográficas, vetores e hospedeiros, incluindo humanos e animais domésticos (Miles et al., 2009; Akopyants, et al., 2009).

Diante do quadro epidemiológico da transmissão da LTA no Estado de São Paulo, as variações genotípicas exibidas por *L. (V.) braziliensis* podem ser justificadas pela necessidade do parasito em adaptar-se as mudanças no quadro de transmissão que originalmente pertencia aos ambientes florestados e partir da progressiva retirada da cobertura vegetal esses parasitas ampliaram sua capacidade de infectar maior diversidade de flebotomíneos, e reservatórios. A estreita ligação entre áreas selvagens com áreas povoadas e urbanas mantém um ciclo heterogênico de circulação de *Leishmanias* (Gomes et al., 1998).

Os resultados sugerem que no Estado de São Paulo circulem isolados de *L. (V.) braziliensis* polimórficos. Estes dados corroboram com estudos anteriores que mostram uma grande variabilidade destas populações naturais de focos endêmicos (Cupolillo et al., 2003; Garcia et al., 2005).

Considerando que os polimorfismos presentes em *Leishmania* podem modular características como a especificidade de interação com os hospedeiros e vetores, virulência e adaptação as diferentes regiões geográficas (Cupolillo et al, 1998), os resultados obtidos com presente estudo relacionados com pesquisas de variações intraespecíficas encontradas em de *L. (V.) braziliensis* sugerem que o estudo da heterogenicidade molecular genética desses parasitos podem aperfeiçoar

ações epidemiológicas de controle da doença, fornecer subsídios científicos para a fabricação de fármacos com maior grau de especificidade, e colaborar com o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que das 132 amostras positivas para LTA, determinadas pelos marcadores moleculares 150/152 e LU5A/LB3C, o marcador molecular IR amplificou produtos de PCR em 52 amostras (40%) apresentando baixa sensibilidade.

A genotipagem *L. (V.) braziliensis* por LSSP-PCR mostrou alto grau de polimorfismo entre os isolados, mas não foi possível determinar padrões genotípicos pelo alto grau de variação intraespecífica.

Embora a PCR realizada com marcador molecular IR tenha apresentado baixa sensibilidade foi possível identificar nove perfis genéticos nas 52 amostras analisadas pela RFLP-PCR.

Foi possível analisar polimorfismos de *L. (V.) braziliensis* empregando marcadores moleculares diretamente no DNA extraído de amostras clínicas.

## 7. Referências Bibliográficas

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter. Biologia molecular da célula. 5ªed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. Science. 2009; 324: 265-8.

Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre and post colombian historical source. Hist Cienc Saude Manginhos. 2003; 10: 852-82.

Amato VS. Treatment of american tegumentary leishmaniasis. Boletim Epidemiológico Paulista. Coordenadoria de Controle de Doenças, 2006: 26.

Andrade BB, Boaventura V, Barral Neto M, Barral A. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. Gazeta Médica da Bahia, 2008:74.

Ashford RW, Desjeux P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitology Today. 1992; 8: 104-5.

Arraes SM, Marini MT, Martello D, Silveira TG, Lonardoni MV, Nanni MR. Serological investigation of subclinical cutaneous leishmaniasis cases

following an outbreak in an endemic area. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008; 41: 205-8.

Bacellar O, Machado P, Carvalho E. Resposta imune na leishmaniose tegumentar humana. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 2011. p.113-126

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol*. 2009; 121: 317-22.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, de Freitas C M L, Guimarães S P A, Helena S B J, et al. Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. *J Trop Med*. 2012.

Barbosa GM, Marzochi MC, Massard CL, Lima GP, Confort EM. Epidemiological aspects of canine american tegumentary leishmaniasis in the municipality of Paraty, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, 1999; 15: 641-46.

Basano AS, Camargo, L M A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev. bras. Epidemiol*. 2004; 7: 328-37.

Berzunza-Cruz M, Cabrera N, Crippa-Rossi M, Sosa Cabrera T, Pérez-Montfort R, Becker I. Polymorphism analysis of the internal transcribed spacer and small subunit of ribosomal RNA genes of *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res*. 2002; 88: 918-25.

Bedoya-Pacheco SJ, Araujo-Melo MH, Valete-Rosalino CM, Pimentel MI, Conceição-Silva F, Schubach AO, Marzochi MC. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84: 901-5.

Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G, Dujardin JC. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infect Genet Evol.* 2006; 6: 440-46.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Editora do Ministério da Saúde, 2006. [Acesso em Abril de 2014]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas\\_lta.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.ed. atual. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2010. [Acesso em Abril de 2014]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação: normas e rotinas. 2.ed. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2007.[Acesso em Abril de 2014]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07\\_0098\\_M.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/07_0098_M.pdf)

Brandão-Filho SP, Torres FD, Tolezano JE, Shaw JJ. Hospedeiros reservatórios de *Leishmania spp.* associados à leishmaniose tegumentar americana, com especial ênfase no Brasil. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas.* 2011. p. 65-74.

Brenière SF, Telleria J, Bosseno MF, Buitrago R, Bastrenta B, Cuny G, Banuls AL, Brewster S, Barker DC. Polymerase chain reaction-based identification of new world *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop.* 1999; 73: 283-93.

Briones MRS, Nelson K, Beverley SM, Affonso HT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania* tarentolae taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992; 53: 121-28.

Bruijn MH, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop.* 1992; 52: 45-58.

Buitrago R, Cupolillo E, Bastrenta B, Le Pont F, Martinez E, Barnabé C, Brenière SF. PCR-RFLP of ribosomal internal transcribed spacers highlights inter and intra-species variation among *Leishmania* strains native to La Paz, Bolivia. *Infect Genet Evol.* 2011; 11: 557-63.

Camargo-Neves VLF, Gomes AC, Antunes JLF. Correlação da presença de espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) com registros de casos da leishmaniose tegumentar americana no Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35: 299-306.

Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhaes A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol.* 2007; 29: 251–58.

Colombo FA. Detection of RNA of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in fleas and ticks collected from naturally infected dogs and standardization of a real-time PCR for diagnosis and differentiation of *Leishmania* species.

[tese]. São Paulo. Secretaria da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças, 2012.

Condino ML, Azevedo CC. Aspectos Epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Ubatuba, Litoral Norte - Estado de São Paulo - 1993-2003. Boletim Epidemiológico Paulista. 2004. Ano1. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa1\\_Ita.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa1_Ita.htm)

Costa JML, Saldanha ACR, Silva ACDM, Serra Neto A., Galvão CES, Silva CDMP, et al. Estado atual da leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Estado do Maranhão: II. Aspectos epidemiológicos, clínico-evolutivos. Rev Soc Bras Med Trop.1992; 25: 115-23.

Costa JML, Saldanha ACR, Nasciento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Barral A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. Gazeta Médica da Bahia. 2009; 79.

Costa JML. Modalidades clínicas da leishmaniose tegumentar. In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 2011. p. 136-145.

Costa JML, Santana GS, Bezerril ACR, Elkoury NA. Vigilância Epidemiológica da leishmaniose tegumentar no Brasil. In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 2011. p. 191-98.

Coura JR. Identificação de Leishmania. p. 733-738. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2005a. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Coura JR. Leishmaniose tegumentar americana. p. 697-712. In: Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2005b. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. American journal of tropical medicine and hygiene. 1994; 50: 296-311.

Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. Mol Biochem Parasitol. 1995; 73: 145-55.

Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 663-8.

Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias Naiff M, Grimaldi G Jr. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. J Clin Microbiol. 2003; 41: 3126-32.

CVE-SES-SP. Centro de Vigilância Epidemiológica- Secretaria de Estado da Saúde. Divisão de Zoonoses. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2012. [Acesso em Abril de 2014]. Disponível em [ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/ZOO/LTA12\\_aula\\_VE.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/ZOO/LTA12_aula_VE.pdf)

Degrave W, Fernandes O, Campebell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1994; 89: 463-69.

Delgado O, Cupolillo E, Bonfante-Garrido R, Silva S, Belfort E, Grimaldi G Jr, et al. Cutaneous leishmaniasis in Venezuela caused by infection with a new hybrid between *Leishmania (Viannia) brasiliensis* and *L. (V.) guyanensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. RJ. 1997; 92: 581-82.

Dorval ME, Oshiro ET, Cupollilo E, Castro AC, Alves TP. Occurrence of american tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania* (*Leishmania*). Am Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39: 43-6.

Dujardin JC. Structure, dynamics and function of Leishmania genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? Infect Genet Evol. 2009; 9: 290-97.

El Tai NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Trans. R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 575-79.

Felley-Bosco E, Pourzand C, Zijlstra J, Amstad P, Cerutti P. A genotypic mutation system measuring mutations in restriction recognition sequences. Nucleic Acids Res. 1991; 19: 2913-19.

Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degrave WM, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. Mol Biochem Parasitol. 1994; 66: 261-77.

Fernandes O, Bozza M, Pascale JM, de Miranda AB, Lopes UG, Degrave WM. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania* (*Viannia*). Mem Inst Oswaldo Cruz. 1996. 91:279-284.

Ferreira AW & Avila SLM. Leishmanioses. In: Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-imunes. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2º edição; 2001b p. 255-262.

Ferreira AM, Vitor RW, Carneiro AC, Brandão GP, Melo MN. Genetic variability of Brazilian *Toxoplasma gondii* strains detected by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) and simple sequence repeat anchored-PCR (SSR-PCR). *Infect Genet Evol.* 2004. 4: 131-42.

Ferreira GA, Soares FC, Vasconcellos SA, Rodrigues EH, Werkhäuser RP, de Brito ME, Abath FG. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by KDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J Parasitol.* 2007; 93: 712-14.

Figueiredo FB, Bonna IC, Nascimento LD, Costa TD, Baptista C, Pacheco TM, Amendoeira MR, Madeira Mde F. Serological evaluation for detection of anti-*Leishmania* antibodies in dogs and cats in the district of Santa Rita de Cássia, municipality of Barra Mansa, State of Rio de Janeiro. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42: 141-5.

Fonseca, E S. Visão geográfica integrada das estratégias de controle das leishmanioses no município de Teodoro Sampaio, SP, com o apoio do geoprocessamento [tese]. Presidente Prudente, 2013.

Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Lianos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Ttaya KWQ, et al. Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol.* 2004. 42: 2294-97.

Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Lianos A, Arevalo J, et al. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol.* 2005; 5: 109-16.

Garcia FCB, dos Santos SSR, Chociay, MF, Medeiros ÂCR, Roselino AM F. Métodos subsidiários para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do seqüenciamento de DNA e

da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmania em amostras cutâneo-mucosas. An Bras Dermatol. 2005; 80: 339-44.

Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2007. 101: 368–71.

Gomes AC, Yamamoto YI, Capinzaik AN, Amaral NMM, Guimarães AJG. Aspectos ecológicos da leishmaniose tegumentar americana, prevalência/incidência da infecção nos municípios de Pedro de Toledo e Miracatu, SP, Brasil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1992; 34: 149-58.

Gomes AC, Camargo-Neves VL. The strategy and prospects for the control of cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 1998. 31: 549-52.

Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF, Pereira-Chiocola VL. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. Vet Parasitol. 2007; 144: 234-41.

Gomes AH, Armelin IM, Menon SZ, Pereira-Chiocola VL. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. Exp Parasitol. 2008; 119: 319-24.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 71-80.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010. 8:419-33.

Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26: 293-307.

Grimaldi GJ, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 230-250.

Guimarães L H, Machado P R L, Lessa H A, Lessa M, Oliveira AD, Carvalho E.M. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. Gazeta Médica da Bahia. 2008; 74.

Gutierrez A, Tolezano L F C, Westphalen E V N, Hiramoto R M, Shaw J J, Tolezano J E. Estimativa do número mínimo de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* necessário para a proliferação em sistema de cultivo em micropilhas. Boletim Epidemiológico Paulista. 2010; 7: 4-11.

Harris E, Kropp G, Belli A, Rodrigues B, Agabian N. Single-step multiplex pcr for characterization of New World *Leishmania* complexes. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1989-95.

Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature. 1996; 13: 571-79.

Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. Mol Biochem Parasitol. 2012;181: 61-72.

Kazemi B. Genomic organization of leishmania species. Iran J Parasitol. 2011; 6: 1-18.

Kullberg M, Nilsson MA, Arnason U, Harley EH and Janke A. Housekeeping genes for phylogenetic analysis of eutherian relationships. Mol. Biol. Evol. 2006; 23: 1493-503.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution.

In Petters & Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine; London, Academic Press. 1987; 1:1-20.

Lainson R, Shaw JJ. New world leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases. London: Arnold; 1998. Vol 5:241-66.

Lee CN, Cavanagh HM, Lo ST, Ng CS. Human papillomavirus infection in non-neoplastic uterine cervical disease in Hong Kong. Brit J of Biomed Science. 2001; 58: 85-91.

Lessa MM, Lessa H A, Castro T WN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. Rev Bras Otorrinolaringologia. 2007; 73: 843-47.

Lima EBD, Porto C, Motta, JOCD, Sampaio, R N R. Treatment of american cutaneous leishmaniasis. An. bras. Dermatol. 2007; 82: 111-24.

Madeira Md Mde F, Uchôa CM, Leal CA, Macedo Silva RM, Duarte R, Magalhães CM, Barrientos Serra CM. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in naturally infected dogs. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 551-55

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. 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. 2003; 41: 3147-53.

Marlow MA. Epidemiologia molecular da leishmaniose tegumentar americana no Estado de Santa Catarina, Brasil. [tese]. Florianópolis, SC. Universidade Federal de Santa Catarina, 2013

Marzochi MCA & Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cadernos de Saúde Pública*.1994; 10: 359-75.

Marzochi MCA, Schubach AO, Marzochi KBF. Leishmaniose tegumentar americana. In Cimerman B & Cimerman. S. *Parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. São Paulo, Atheneu. 1999; 39-64.

Martinelli M. Estado de São Paulo: aspectos da natureza. *Confins. Revista franco-brasileira de geografia*. 2010; 9.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006; 32: 449-60.

Mayer MG, Floeter-Winter LM. Identification of SL addition trans-splicing acceptor sites in the internal transcribed spacer I region of pre-rRNA in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107: 1070-72.

Melo MR, Martins AR, Barbosa I V, Romano P, Shcolnik W. Collection, transport and storage of samples for molecular diagnosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2010; 46: 375-81

Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. Genetics. *Leishmania* exploit sex. *Science*. 2009; 324: 187-89.

Miranda JC, Dias ES. Vetores das leishmanioses nas Américas. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 2011. p. 55-64.

de Morais RC, Gonçalves-de-Albuquerque Sda C, Pessoa e Silva R, Costa PL, da Silva KG, da Silva FJ, et al. Detection and quantification of

*Leishmania braziliensis* in ectoparasites from dogs. Vet Parasitol. 2013; 196: 506-8.

Murray HW. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. Am J Trop Med Hyg. 2012; 86: 434-40.

Noyes HA, Belli AA, Maigon R. Appraisal of various random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction primers for leishmania identification. Am J Trop Med Hyg. 1996; 55: 98-105.

Noyes HA, Reyburn H, Baley JW, Smith D. *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan. J Clin Microbiol. 1998; 36: 2877-81.

Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. Parasitol Today. 1997; 13:196-200.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Schubach Ade O, Pacheco Rda S. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010. 66: 361-65.

Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Pacheco SJ, Costa FA, Schubach AO, Pacheco RS. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. Parasit Vectors. 2013; 6: 189.

Oliveira GM, Madeira Mde F, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco Rda S. Canine Cutaneous Leishmaniasis: Dissemination and tissue tropism of genetically distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* populations. Vet Med Int. 2013.

Orlando TC, Rubio MA, Sturm NR, Campbell DA, Floeter-Winter LM. Intergenic and external transcribed spacers of ribosomal RNA genes in lizard-infecting *Leishmania*: molecular structure and phylogenetic relationship to mammal-infecting *Leishmania* in the subgenus *Leishmania* (*Leishmania*). Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002; 97: 695-701.

Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Romanha AJ. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Tropica. 1999; 72: 251-8.

PAHO. Leishmaniases: Epidemiological Report of the Americas. 2013. n.1 [cited 2014 April]. Available from:  
[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=21608&Itemid=](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid=)

Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet. 2007; 39: 839-47.

Pena SD, Barreto G, Vago AR, De Marco L, Reinach FC, Dias Neto E, et al. Sequence-specific gene signatures can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91: 1946-49.

Pereira-Chioccola VL. Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the american visceral leishmaniasis surveillance program in Sao Paulo state. BEPA. 2009; 68: 4-13.

Pereira SAE, Gurgel HC. American cutaneous leishmaniasis and its relations with the social environment in Ubatuba-SP. *Confins. Revue franco-brésilienne de géographie.* 2011;13.

Pimenta, PFP, Freitas, VC, Secundino, NFC. A Interação do Protozoário *Leishmania* com seus Insetos Vetores. In: Termignoni C, Masuda H, Neto M, Silva AC. *Temas Avançados em Entomologia Molecular.* Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. 2013. Available from: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/biblioteca/arthrolivro-1/capitulo-12-a-interacao-do-protozoario-leishmania-com-seus-insetos-vetores/view>

Pinheiro RO. Leishmaniose tegumentar americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. *Infarma.* 2004; 16: 7-8

Ramírez CA, Requena JM, Puerta CJ. Identification of the HSP70-II gene in *Leishmania braziliensis* HSP70 locus: genomic organization and UTRs characterization. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 166.

Rasmussen, H B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting, Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Dr. Sameh Magdeldin. InTech, 2012. Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restrictionfragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>

Reithinger R, Davies CR. Is the domestic dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of american cutaneous leishmaniasis? A critical review of the current evidence. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61: 530-41.

Rey L. *Parasitologia.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 2001a.

Rey L. O complexo “*Leishmania braziliensis*” e as Leishmaniases tegumentares americanas. In: Rey L. – Rey: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 3º edição; 2001b, p. 227-239.

Ríos Yuil JM, Yuil Ríos E. Parasitologic, immunologic, histopathologic and molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Scientific Medical Journal. 2012; 23.

Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of american cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol. 2002; 40: 3572-76.

Rogers WO, Wirth DF. Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987; 84: 565–69.

Romero GA, Ishikawa E, Cupolillo E, Toaldo CB, Guerra MV, Paes MG, et al. The rarity of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* among patients from the Manaus region of Amazonas state, Brazil, who have cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96: 131-36.

Rougeron V, De Meeûs T, Kako Ouraga S, Hide M, Bañuls AL. “Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. PLOS Pathog. 2010; 6.

Salomón OD, Quintana MG, Mastrángelo AV. Leishmaniasis tegumentaria americana salud pública y conservación de la biodiversidad. In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 2011. p. 39-54.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory manual. V. 32nd edition. New York: Cold Spring Harbor; 1989.

Schallig HD, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. Trop Med Int Health. 2002; 7: 641-51.

Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. Infect Immun. 2004; 72: 508-14.

Schriefer ALF, Souza RS, Guimarães LH, Góes-Neto A, Schriefer A. Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das Leishmanioses. Gazeta Médica da Bahia. 2008; 74

Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003; 47: 349-58.

Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Cañavate C, Boelaert M, Dujardin JC. Leishmaniasis in the mediterranean in the era of molecular epidemiology. Trends Parasitol. 2008; 24:135-42

Schönian G, Kuhls K, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. Parasitology. 2011; 138: 405-25.

Secundino NFC, Freitas VC, Pimenta PFP. A Biologia da interação dos flebotomíneos com a *Leishmania*. In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas. 2011. p. 90-101.

Serra CM, Leal CA, Figueiredo F, Schubach TM, Duarte R, Uchôa CM, Silva RM, Madeira Mde F. Canine tegumentary leishmaniasis in Morada das Aguias (Serra da Tiririca), Maricá, Rio de Janeiro, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2003; 19: 1877-80.

Shimabukuro PH, da Silva TR, Ribeiro FO, Baton LA, Galati EA. Geographical distribution of american cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Parasit Vectors*. 2010; 3: 121.

da Silva MAL, Medeiros RA, Brandão-Filho S, de Melo FL, Medeiros Z. Alvos moleculares utilizados em PCR para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 2011; 7: 15.

da Silva LA, de Sousa Cdos S, da Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol*. 2010; 10: 77-83.

da Silva RA, Mercado VT, Henriques Lde F, Ciaravolo RM, Wanderley DM. Magnitude and trend of american tegumentary leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil, 1975 to 2008. *Rev Bras Epidemiol*. 2012; 15: 617-26.

Silveira FT, Ishikawa EA, De Souza AA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite*. 2002; 9:43-50.

Simpson AG, Lukes J, Roger AJ. The evolutionary history of kinetoplasts and their kinetoplasts. *Mol Biol Evol*. 2002; 19: 2071-83.

de Souza MA, da Silva AG, Afonso-Cardoso SR, Favoreto SJ, Ferreira MS. Immunoglobulin isotype and IgG subclass profiles in american tegumentary leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005; 38: 137-41.

Sogin ML, Elwood HJ, Gunderson JH. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rRNA genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 1383-7.

Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2007; 37: 1173-86.

Suzuki H, Miyashita N, Moriwaki K, Kominami R, Muramatsu M, Kanehisa T, et al. Evolutionary implication of heterogeneity of the nontranscribed spacer region of ribosomal DNA repeating units in various subspecies of *Mus musculus*. *Mol Biol Evol.* 1986; 3: 126-137.

Taniguchi HH, Pereira-Chioccola VL, Cunha EA, Gomes AHS, Araújo MFL, Bisugo MC. et al. Leishmaniose tegumentar americana (LTA) por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em paciente de região endêmica do Estado de São Paulo, Brasil: Relato de caso. In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz; Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social de 3 a 6 outubro de 2005; São Paulo. *Rev. Inst Adolfo Lutz.* 64:172.

Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 1335-9.

Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89: 427-34.

Tolezano JE, Taniguchi HH, Elias CR, Larosa R. Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Estado de São Paulo. III. Influência da ação antrópica na sucessão vetorial da LTA. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2001; 60: 47-51.

do Vale ECS, Furtado T. Tegumentary leishmaniasis in Brazil: a historical review related to the origin, expansion and etiology. An bras dermatol 2005; 80: 421-8.

Volpini AC, de Azeredo Passos VM, Romana AJ. Attempt to differentiate *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* using the SSR-PCR technique. Parasitol Res. 2001; 87: 1056-9.

Volpini AC, Passos VM, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing american cutaneous leishmaniasis. Acta Trop. 2004; 90: 31-7.

Xiao J, Xin X, Luan X, Wei, D, Yang S. A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorphism (SNP) typing. Genetics and Molecular Biology. 2004; 29: 562-565

Winter LMF, Cruz AK. Biologia molecular da *Leishmania*: Genoma da *Leishmania*. In: Barral A, Costa J. Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas américas. 2011. p. 24-38.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski J, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990; 18: 6531-5.

World Health Organization. The Weekly Epidemiological Record. 2002. N 44, 365–372.[Acesso em Abril de 2014 [cited 2014 April]. Available from <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/wer7744.pdf?ua=1>

Wu KS, Jones R, Danneberger L, Scolnik P. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acid Res.* 1994; 22: 3257-58.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) - anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.*1994. 20: 176-83.

Zijlstra EE, El-Hassan AM. Leishmaniasis in Sudan. 3. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene.*2001; 95:27-58.

Zurita AL, Rodriguez J, Pinero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, et al. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol.* 2003. 89: 372-8.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Cadastro no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CTC / IAL



Projeto nº 0051D-2010 (Protocolo 96028/2010)

Caracterização genotípica de isolados de *Leishmania* obtidos de hospedeiros portadores de leishmaniose tegumentar americana

Coordenação: Vera Lucia Pereira Chioccola

Senhora Coordenadora,

Comunicamos que o projeto supra citado foi **cadastrado** no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, após aprovação quanto o mérito científico e após aprovação quanto aos aspectos éticos pela Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz/CEPIAL.

ADRIANA BUGNO  
Presidente do CTC/IAL

São Paulo, 22 de Novembro de 2010

1ª via: CTC/IAL

2ª via: Coordenador

Anexo 2 - Parecer da Comissão Científica do Instituto Adolfo Lutz.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
**INSTITUTO ADOLFO LUTZ**  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859 e-mail: [cepial@ial.sp.gov.br](mailto:cepial@ial.sp.gov.br)



São Paulo, 22 de novembro de 2010.

Protocolo: 092/2010

Projeto de Pesquisa: “Caracterização genotípica de isolados de *Leishmania* obtidos de hospedeiros portadores de leishmaniose tegumentar americana”

Pesquisador Responsável: Vera Lucia Pereira Chioccola

Instituição: Instituto Adolfo Lutz

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em reunião de novembro de 2010, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e suas resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/96 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Luz Marina Trujillo  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via – coordenador  
2ª via - CEPIAL  
LMT/dvmp

**Anexo 3-** Ferreira LT, Gomes AHS, Pereira-Chioccola VL. Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with american cutaneous leishmaniasis. 2014. Acta Tropica. Submit.

Manuscript Number:

Title: Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis

Article Type: Research Paper

Keywords: American cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, RFLP-PCR, polymorphism.

Corresponding Author: Dr. Vera Lucia Pereira-Chioccola, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituto Adolfo Lutz

First Author: Lasaro Teixeira Ferreira

Order of Authors: Lasaro Teixeira Ferreira; Aparecida Helena de Souza Gomes, PhD; Vera Lucia Pereira-Chioccola, PhD

Abstract: American cutaneous leishmaniasis (ACL) can be caused by protozoa belonging to the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. ACL evolution results in single or multiple initial(s) lesion(s) as a localized infection and can develop to disseminated or diffuse forms depending of host deficiencies in cell response. In Brazil, this infection presents a variety of agents, reservoirs and vectors.

This study aims to determine the genetic variability of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates from patients and dogs with ACL. The diagnosis and *Leishmania* species was determined by PCR. The 132 biopsies were collected in different regions of São Paulo State, Brazil (36 municipalities). The genetic characterization of *L. (V.) braziliensis* isolates was tested by RFLP-PCR using DNA extracted from clinical samples. The primer set amplified a specific region of *Leishmania* internal transcribed spacers of the ribosomal DNA locus. Out of the 132 samples, 52 (40%) were completely genotyped by RFLP-PCR (44 from patients and 8 from dogs), and the results showed 9 distinct patterns. The majority of the genotyped samples were from Sorocaba (21), and the others were distributed among 16 other municipalities. The first pattern was more frequent (29 samples), followed by pattern 2 (nine samples), pattern 3 (three samples). Patterns 4, 6, 7, 8 and 9 were composed of two samples each and pattern 5, with one sample. These results suggest that polymorphic strains of *L. (V.) braziliensis* circulate in São Paulo state. These data are consistent with studies in other regions of Brazil, showing a great variability of these natural populations of endemic foci.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CENTRO DE PARASITOLOGIA E MICOLOGIA



Profa. Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola  
Pesquisadora Científica  
Tele: 3058 2991 - 99247 9820  
pchioccola@gmail.com

Dear  
Editor-in-Chief  
Acta Tropica

Sao Paulo, March 19, 2014.

We would like to submit the manuscript "*Genotype characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis*". All of us (Lasaro Teixeira Ferreira, Aparecida Helena de Souza Gomes and Vera Lucia Pereira-Chioccola) contributed in the same way for this work and we approve the manuscript submission. In addition we inform you that: i. each of us has read the manuscript and accepts responsibility for its contents, a statement of financial or other relationship that might lead to a conflict of interests; ii. we have read and are familiar with the current "Instructions to Authors" and comply with the instructions and stated conditions; iii. the submission is original and unpublished and has not been simultaneously submitted to another journal.

Thank you for your attention.

Sincerely,

Lasaro Teixeira Ferreira

Aparecida Helena de Souza Gomes

Vera Lucia Pereira Chioccola

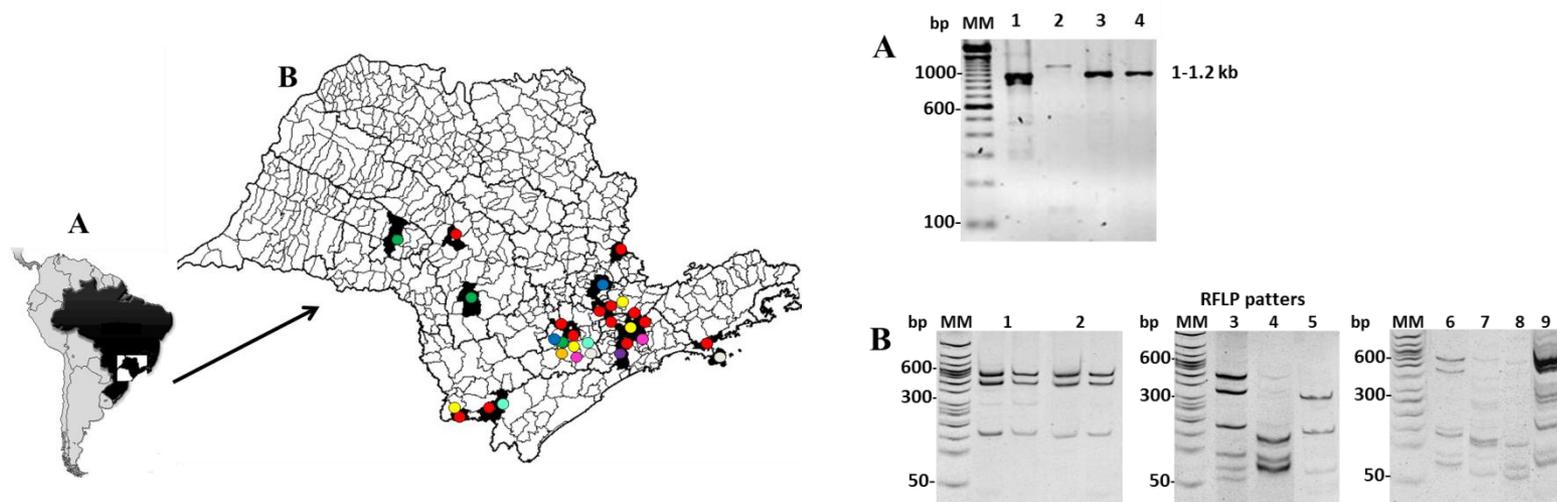
Corresponding author

## Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis

Lasaro Teixeira Ferreira<sup>1</sup>, Aparecida Helena de Souza Gomes<sup>2</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>1\*</sup>

1. Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil; 2 Laboratório Regional de Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, SP, Brazil.

This article investigated the genetic variability of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates



## Highlights

- We studied the genetic variability of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates
- The genetic characterization was tested by RFLP-PCR in 52 clinical samples.
- Nine distinct *L. (V.) braziliensis* patterns were shown in Sao Paulo, Brazil.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
CENTRO DE PARASITOLOGIA E MICOLOGIA



Profa. Dra. Vera Lucia Pereira Chioccola  
Pesquisadora Científica  
Tels: 3068 2991 - 9247 9820  
pchioccola@gmail.com.

---

Potential Reviewers to Manuscript

*“Genotype characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis”.*

1. Elizabeth Ferreira Rangel
2. Thaís Gomes Verzignassi Silveira
3. Jorge D. Marco

Vera Lucia Pereira Chioccola

Corresponding author

**Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from  
human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis**

Lasaro Teixeira Ferreira<sup>1</sup>, Aparecida Helena de Souza Gomes<sup>2</sup>, Vera Lucia Pereira-Chioccola<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup> Laboratório Regional de Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz, Sorocaba, SP, Brazil.

\*Address correspondence to: Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr Arnaldo, 351 8 andar, CEP 01246-000, São Paulo, SP, Brazil. Phone (55 11) 3068 2991. Fax (55 11) 3068 2890. E-mail: [pchioccola@gmail.com](mailto:pchioccola@gmail.com).

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Abstract

1 American cutaneous leishmaniasis (ACL) can be caused by protozoa belonging  
2 to the *Leishmania (Viannia) braziliensis* complex. ACL evolution results in single or  
3 multiple initial(s) lesion(s) as a localized infection and can develop to disseminated or  
4 diffuse forms depending of host deficiencies in cell response. In Brazil, this infection  
5 presents a variety of agents, reservoirs and vectors.  
6  
7  
8  
9  
10  
11

12 This study aims to determine the genetic variability of *Leishmania (V.)*  
13 *braziliensis* isolates from patients and dogs with ACL. The diagnosis and *Leishmania*  
14 species was determined by PCR. The 132 biopsies were collected in different regions  
15 of São Paulo State, Brazil (36 municipalities). The genetic characterization of *L. (V.)*  
16 *braziliensis* isolates was tested by RFLP-PCR using DNA extracted from clinical  
17 samples. The primer set amplified a specific region of *Leishmania* internal transcribed  
18 spacers of the ribosomal DNA locus. Out of the 132 samples, 52 (40%) were  
19 completely genotyped by RFLP-PCR (44 from patients and 8 from dogs), and the  
20 results showed 9 distinct patterns. The majority of the genotyped samples were from  
21 Sorocaba (21), and the others were distributed among 16 other municipalities. The first  
22 pattern was more frequent (29 samples), followed by pattern 2 (nine samples), pattern 3  
23 (three samples). Patterns 4, 6, 7, 8 and 9 were composed of two samples each and  
24 pattern 5, with one sample. These results suggest that polymorphic strains of *L. (V.)*  
25 *braziliensis* circulate in São Paulo state. These data are consistent with studies in other  
26 regions of Brazil, showing a great variability of these natural populations of endemic  
27 foci.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

51 Keywords: American cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*,  
52 RFLP-PCR, polymorphism.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 1. Introduction

The genus *Leishmania* causes leishmaniasis, which constitutes a variety of chronic diseases. These parasites are transmitted from animals to humans by the bite of infected female sand flies. There is a wide spectrum of clinical forms, including those affecting skin, mucosa, or internal organs (Grimaldi and Tesh, 1993; Lainson and Shaw, 1998; MSB, 2010).

The genus *Leishmania* in Latin America is divided into two subgenera. The first is *Leishmania* composed of *L. (L.) mexicana* and *L. (L.) amazonensis*, responsible for localized or diffuse cutaneous disease, and *L. (L.) infantum* the causative agent of the American viscerotropic leishmaniasis. The second subgenus is *Viannia*, causative agent of the new world cutaneous leishmaniasis comprising the species *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* and others (Rioux et al., 1990; Lainson and Shaw, 1998). Infections by these species cause three clinical types of the American cutaneous leishmaniasis (ACL): localized cutaneous, mucosal, and disseminated leishmaniasis. The most striking feature that distinguishes cutaneous infection from either mucosal or disseminated is the degree of metastasis of lesions from the original inoculation site. The cutaneous lesions are restricted to the entry site of the parasites, whereas the mucosal is defined by spreading to mucosal surfaces of the upper digestive and airway tracts. The disseminated is characterized by wide dissemination to distant cutaneous sites (Carvalho et al., 1994; Goto and Lauletta Lindoso, 2010; Queiroz et al., 2012; Goto and Laureta Lindoso, 2012).

Despite the fact that cutaneous leishmaniasis is caused by at least seven different *Leishmania* species in Brazil, the vast majority of cases are caused by the *L. (V.) braziliensis* complex that could be transmitted by different phlebotomine sand fly vectors by animal reservoirs with different geographic distribution (Grimaldi and Tesh, 1993; Shaw, 1994; Azulay and Azulay, 1995; Lainson and Shaw, 1998, Desjeux, 2001).

1 The worldwide prevalence of cutaneous forms caused by *Leishmania* is  
2 estimated at 0.7 million to 1.3 million new cases occurring worldwide annually (WHO,  
3 2014). In Brazil, ACL is also widely distributed. From 2001 to 2011 around 270,500  
4 cases were reported, with an average of 27,500 new cases/year. Around 3 to 5% of the  
5 patients who develop cutaneous or mucocutaneous lesions have leishmaniasis (PAHO,  
6 2014). In Sao Paulo State, the incidence is approximately 400 new cases per year.  
7 Another considerable problem is the urbanization of the infection. Autochthonous cases  
8 have been described in urban areas. The incidence of peri-urban and urban cases has  
9 been increasing. Approximately 10% of the population living in endemic areas is at risk  
10 for acquiring the infection (Silva et al., 2013; CVE, 2014). ACL was also considered  
11 one of the most common dermatological syndromes diagnosed in travelers (or tourists)  
12 who had visited endemic areas (Goto and Lauletta Lindoso, 2012).

13 The cycle life of *L. (V.) braziliensis* includes different reservoirs such as  
14 humans, wild and domestic mammals, as well as different vector species. Thus,  
15 *Leishmania* strains can be maintained in both rural and urban cycles affecting the  
16 epidemiology of the infection. Studies including molecular techniques to characterize *L.*  
17 *(V.) braziliensis* populations have contributed to better understanding the abilities  
18 facilities of these parasites and their vectors to adapt to changes in their original forested  
19 habitats with important public health implications (Gontijo and Carvalho, 2003; MSB,  
20 2010).

21 One of the methods used to evaluate the genetic polymorphism of *L. (V.)*  
22 *braziliensis* isolates in different Brazilian regions is the analysis of restriction fragment  
23 length polymorphism (RFLP) of the internal transcribed spacers (ITS) of the ribosomal  
24 DNA (rDNA) locus. These studies have shown that molecular markers are suitable for  
25 population genetics and epidemiological studies (Cupolillo et al., 1995; Cupolillo et al.,  
26 1998; Cupolillo et al., 2003).

1 Despite the importance of ACL for the Brazilian public health system, the  
2 genetic diversity of *L. (V.) braziliensis* in some Brazilian endemic areas has been poorly  
3 studied in São Paulo state. Thus, this study aimed to analyze genetic diversity of *L. (V.)*  
4 *braziliensis* population collected from patients and dogs with cutaneous lesions from  
5 Sao Paulo State avoiding *in vitro* cultivation. The results demonstrated the possibility of  
6 performing genotyping directly in clinical samples without the isolation of the parasite.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

## 16 **2. Material and Methods**

### 17 **2.1. Patients and samples**

18 Originally, 132 DNA extracted from biopsies and positive for *L. (V.) braziliensis*  
19 were analyzed for genotype determination. These DNA samples were from patients and  
20 dogs living in 36 different municipalities in endemic areas for ACL in São Paulo State,  
21 Brazil, as shown in Table 1. The randomized selection of positive samples for *L. (V.)*  
22 *braziliensis* was made in biopsies received by our Laboratory over 9 years (2003 to  
23 2012). The biopsies were collected by medical or veterinary health services. The human  
24 or canine lesions were previously cleaned with antiseptics after the administration of a  
25 local anesthetic. The borders of the lesions were scraped or smears of material were  
26 obtained by punch biopsy of the lesions and immediately added to tubes containing 1-2  
27 ml of a sterile 0.85% NaCl and 200 µg/ml gentamicin solution, sent to the laboratory  
28 within 48 hours, and immediately processed to confirm the clinical diagnosis.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 **2.2. Ethical considerations**

51 This study was performed according to recommendations of the Human Ethics  
52 Committee (CONEP-IAL) and “Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de  
53 Laboratório/Colegio Brasileiro de Experimentação Animal” (SBCAL/COBEA). Both  
54 Ethic Committees of Instituto Adolfo Lutz approved this study.  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### 2.3. *Leishmania* strains

For genotype standardization the following standard WHO *Leishmania* strains were used: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (L.) major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH), *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75), and *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903). *Leishmania* strains were maintained by serial passages and grown at 24° C in M-199 medium supplemented with 10% calf serum and 0.25% hemin (Reimão et al., 2011). In the log curve phase,  $1 \times 10^8$  parasites were harvested, washed twice in phosphate-buffered saline (pH 7.2) at 1,000g for 10 min. The parasite pellets were used for DNA extraction. *L. (V.) braziliensis* strain DNA also was used in reactions as a positive control.

### 2.4 DNA purification

Before performing the DNA extraction, clinical samples and *Leishmania* WHO reference strains were crushed and digested, until complete tissue lysis, in a lysis buffer (This-HCl, 10 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100µg/ml) by incubation in water bath at 56° C. Then DNA molecules were extracted by PureLink Genomic DNA Kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. DNA concentrations and purity were determined by the ratio of O. D. at 260 and 280 nm in a NanoDrop ND1000 (Thermo Scientific).

## 2.5 Routine *Leishmania* diagnosis

1  
2  
3 **2.5.1. Parasitological diagnosis** – A portion of samples was plated onto a glass slide,  
4 fixed with methanol, and stained with Giemsa (MSB, 2010). The presence of  
5 amastigotes was observed microscopically (magnification 1,000).  
6  
7  
8  
9

10  
11  
12 **2.5.2. PCR targets for *Leishmania* and internal controls:** *Leishmania* genus was  
13 identified by a 120-bp PCR product amplified from a conserved region of kDNA  
14 minicircles of *Leishmania* spp by using the molecular marker set 150/152. *L. (V.)*  
15 *braziliensis* was determined by an amplified fragment of 146-149 bp from the multicopy  
16 spliced leader (SL) RNA gene using the molecular marker set LU-5A/LB-3C, which  
17 amplifies a 146-149 bp sequence from the SL. These reactions were run following the  
18 same conditions as described elsewhere (Gomes et al., 2007, Gomes et al., 2008). To  
19 control the course of DNA extraction and check for PCR inhibitors, canine and human  
20 samples were assayed by using a reference gene whose molecular markers were  
21 GAPDH4F/GAPDH4R and  $\beta 1$ - $\beta 2$ , respectively, in the same conditions as previously  
22 described (Gomes et al., 2008; Colombo et al., 2011). After thermal cycles, PCR  
23 products were electrophoresed in 2% agarose gel and stained with ethidium bromide.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

DNA fragments were visualized under UV illumination.

## 2.6. *L. (V.) braziliensis* complex genotyping

PCR for diagnosis and genotyping was done directly from clinical DNA  
samples. Each reaction was performed by adding 5  $\mu$ l of each DNA template and 25  
pmol of each primer to a final volume of 25  $\mu$ l. The amplifications were carried out with  
a kit purchased from Promega (Go Taq Green Master Mix). The PCR mix (12.5  $\mu$ l) was  
composed of 1 unit of Taq DNA polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.5; 50 mM KCl;

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>; and 200 mM of each dNTP. In genotype reactions the molecular marker set used was IR1/IR2 (5'-GCTGTAGGTGAACCTGCAGCAGCTGGATCATT-3' and 5'-GCGGGTAGTCCTGCCAAACACTCAGGTCTG-3'), which amplified a 1-1.2-kb sequence from the ITS region between the small and large subunits of the rDNA locus in a temperature annealing at 56° C (Cupulillo et al., 1995). PCR amplified products were digested with an HhaI restriction enzyme, which were separated by electrophoresis in an 8% polyacrylamide gel and stained with ethidium bromide. DNA fragments were visualized under UV illumination. The images from reactions for diagnosis and genotyping were analyzed by a Mini Bis Gel Imager and Documentation (BioSystematica). The size of fragments was based on comparison with molecular mass ladders. In genotyping reactions, the banding patterns were used to group the isolates in genotypes with the same banding pattern for the restriction enzyme.

**2.7. Quality assurance:** Each DNA extraction batch included a DNA extraction from *Leishmania*-free eukaryotic samples as a negative control. In each PCR reaction, a tube containing nuclease-free water and PCR mix was used as a blank control. Separate rooms were used for DNA extraction, PCR mix preparation, loading of unknown DNA extracts, loading of the positive control, and for the post-PCR agarose gel electrophoresis analysis.

### 3. Results

The first experiments were conducted by using the DNA extracted from WHO reference strains to establish the genotype by RFLP-PCR using the molecular marker set IR1/IR2 and additional treatment with HhaI enzymes. Figure I shows the restriction patterns of the six WHO reference strains. *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) braziliensis* revealed the same restriction profile. On the other hand, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.)*

*major* and *L. (L.) infantum* had specific restriction profiles.

1           Next, the genotype experiments were conducted in the 132 DNA samples (Table  
2  
3 1) from biopsies that had a positive parasitological diagnosis and were positive for *L.*  
4  
5 *(V.) braziliensis* complex by PCR. *Leishmania* complex in clinical samples was  
6  
7 previously determined by the LU-5A/LB-3C molecular marker set. The amplified  
8  
9 region is located in the nuclear genome in tandem array of approximately 200 copies.  
10  
11 This region is highly conserved in *Leishmania* complexes, but is different only in point  
12  
13 mutations. Each copy contains both a transcribed conserved and a non-transcribed  
14  
15 variable region that differs between *Leishmania* complexes (in sequence and size). The  
16  
17 non-transcribed variable regions differ in both sequence and size (140 to 350 bp) among  
18  
19 the complexes of *Leishmania*. For the *L. (V) braziliensis* complex, products range in  
20  
21 size from 146 to 149 bp (Fernandes et al., 1994; Harris et al., 1998).  
22  
23  
24  
25  
26

27           Out of the 132 DNA samples, only 52 (40%) were successfully genotyped, since  
28  
29 1 to 1.2 kb products were amplified by a IR1/IR2 primer set (Figure 2A). The other 80  
30  
31 samples were not genotyped, as PCR products were not amplified by this primer set. As  
32  
33 expected, no amplification was detected in DNA extracted from DNA as negative  
34  
35 control and PCR products were obtained for all positive controls.  
36  
37  
38  
39

40           Table 2 shows the specification of the 52 genotyped samples in detail, which  
41  
42 included the date collection of the biopsies (2003 to 2012) as well as host (human or  
43  
44 canine) and locality of Sao Paulo State. The 52 samples were distributed in 9 distinct  
45  
46 patterns as shown in Figure 2B.  
47  
48

49           Pattern 1 was identical to those found in *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.)*  
50  
51 *braziliensis* WHO reference strains (Figure 1). In addition, this *L. (V.) braziliensis*  
52  
53 pattern was the most frequent since from the 52 genotyped samples, 29 (56%) belong to  
54  
55 pattern I and were distributed in 13 different municipalities. Pattern 2 was frequent in 9  
56  
57 samples distributed in 4 municipalities. The other patterns (3 to 9) were unusual and  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 were shown in few samples. Pattern 3 (3 municipalities), 4 (2 municipalities), 5 (1  
2 municipality), 6 (1 municipality), 7 (2 municipalities), 8 (2 municipalities), 9 (2  
3 municipalities), respectively. The details and the distribution of the clinical samples  
4 from the 44 patients and 8 dogs for each *L. (V.) braziliensis* isolate were shown in Table  
5 3 and Figure 3. The majority of the samples (21) were from Sorocaba. The others (31)  
6 were distributed in the other 16 municipalities.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15

#### 16 **4. Discussion**

17  
18 ACL has been growing in incidence and range worldwide, principally due the  
19 increasing population mobility. This mobility contributes to leishmanial infection  
20 emergence in low or non-endemic areas (Gontijo and Carvalho, 2003; MSB, 2010). To  
21 prevent new cases in these areas, epidemiological strategies must be implemented such  
22 as rapid diagnosis, treatment and vector control. The importance of studies of  
23 *Leishmania* genetic variability is due mainly to the correlation with the epidemiological  
24 aspects of the disease such as geographic location, clinical forms, virulence,  
25 pathogenicity, drug resistance and antigenic variation among others.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

37  
38 Species belonging to the *L. (V.) braziliensis* complex are highly prevalent in  
39 patients with ACL in Brazil. Different Brazilian studies have shown the genetic  
40 variability of these parasites, which would explain the adaptation of these parasites in  
41 changes into environmental conditions (Cupolillo et al, 1998; Cupolillo et al 2003).  
42 Thus, by this plasticity, these parasites are more likely to infect multiple hosts.  
43 Although different genetic studies have analyzed *L. (V.) braziliensis* isolates from other  
44 Brazilian regions (Cupolillo et al, 1995; Cupolillo et al, 2003; Schriefer et al, 2004;  
45 Garcia et al., 2004; Garcia et al., 2007; Oliveira et al 2013), none have been conducted  
46 in Sao Paulo State.  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 The idea of conducting this study in Sao Paulo State was motivated by the  
2 increase of ACL incidence in the last 20 years in this state. Currently, 147  
3 municipalities have already presented transmission (CVE, 2014). Thus, in this study we  
4 investigated clinical samples in 24.5% of these municipalities (36). However, due to the  
5 low sensitivity of the IR1/IR2 primer set, only samples from 17 municipalities were  
6 genotyped.  
7  
8  
9  
10  
11  
12

13 Despite the low sensitivity of the IR1/IR2 primer set and that the clinical  
14 samples presented a small amount of parasites compared with culture isolates, 40%  
15 (52/132) of them were genotyped. Similar data were previously shown (Motoie et al.,  
16 2013), demonstrating the possibility of performing RFLP-PCR using small amounts of  
17 *Leishmania* DNA from host tissues. Thus, it is possible to genotype *Leishmania*  
18 populations with the analysis of DNA extracted directly from clinical samples. This  
19 information is important since in many laboratories there are no conditions to isolate  
20 and culture parasites from clinical samples (Motoie et al., 2013). Another interesting  
21 finding was the fact that DNA samples isolated 11 years ago (2003) presented good  
22 quality and were able to be used to genotype *L. (V.) braziliensis* isolates as shown in  
23 Table 2.  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 The results showed that *L. (V.) braziliensis* seems to be a species with great  
41 genetic diversity, since nine different patterns were observed in 52 different DNA  
42 samples from 17 municipalities using PCR-RFLP. As shown in Figure 3, the different *L.*  
43 *(V.) braziliensis* patterns were spread throughout the regions. These data are consistent  
44 with other Brazilian studies (Cupolillo et al, 2003; Schriefer et al, 2004; Garcia et al.,  
45 2004; Garcia et al., 2007; Oliveira et al 2013).  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53

54 Genotypic variations exhibited by *L. (V.) braziliensis* can be explained by  
55 adaption of parasites to changes in the transmission process, since originally the  
56 biological cycle was restricted to forested environments. As in other Brazilian regions,  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

in Sao Paulo, gradual removal of vegetation has also occurred in recent years (Silva et al., 2012). As a result, these parasites have improved their ability to infect a wider diversity of sand flies and reservoirs.

### Acknowledgments

This study was supported by grants from the FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo, Brazil). Proc-2011/13939-8. L.T.F. was supported by a fellowship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior, Brazil). V.L.P.C. was supported by a fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) Produtividade em Pesquisa, Proc. 303489/2012-0. Jim Hesson of AcademicEnglishSolutions.com proof read the English.

### References

- Azulay, R.D., Azulay, Junior, D.R. 1995. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *International Journal of Dermatology* 34, 303–307.
- Carvalho, E.M., Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A., Marsden, P. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56, 315–325.
- Colombo, F.A., Odorizzi, R.M., Laurenti, M.D., Galati, E.A., Canavez, F., Pereira-Chiocola, V.L. 2011. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitology Research* 109,267-274.
- Cupolillo, E., Brahim, L.R., Toaldo, C.B., Oliveira-Neto, M.P., Brito, M.E., Falqueto, A., Farias Naiff, M., Grimaldi, G. Jr. 2003. Genetic polymorphism and molecular

epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal Clinical Microbiology* 41, 3126-3132.

Cupolillo, E., Grimaldi Júnior, G., Momen, H., Beverley, S.M. 1995. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73, 145-155.

Cupolillo, E., Momen, H., Grimaldi, G. Jr. 1998. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93, 663-668.

CVE-SES-SP. Centro de Vigilância Epidemiológica - Secretaria de Estado da Saúde.Divisão de Zoonoses.Leishmaniose Tegumentar Americana (Surveillance Epidemiological Center of Sao Paulo State). Site in Portuguese. Available at: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/pdf/aula12\\_LTA\\_VE.pdf](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/pdf/aula12_LTA_VE.pdf). Accessed January 2014.

Desjeux, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 95, 239–243.

Fernandes, O., Bozza, M., Pascale, J.M., Miranda, A.B., Lopes, U.G., Degrave, W.M. 1996. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91, 279-284.

Garcia, A.L., Parrado, R., De Doncker, S., Bermudez, H., Dujardin, J.C. 2007. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 101, 368–371.

Garcia, L., Kindt, A., Bermudez, H., Lianos-Cuentas, A., De Doncker, S., Arevelo, J., Ttaya, K.W.Q., Dujardin, J.C. 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *Journal Clinical Microbiology* 42, 2294-2297.

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- Gomes, A.H., Armelin, I.M., Menon, S.Z., Pereira-Chiocola, V.L. 2008. *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 119,319-324.
- Gomes, A.H., Ferreira, I.M., Lima, M.L., Cunha, E.A., Garcia, A.S., Araujo, M.F., Pereira-Chiocola, V.L. 2007. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology* 144, 234-241.
- Gontijo, B., Carvalho, M.L.R. 2003. American cutaneous leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 71-80.
- Goto, H., Lauletta Lindoso, J.A. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 8, 419-433.
- Goto, H., Laureta Lindoso, JA. 2012. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease Clinics of North America* 26, 293-307.
- Grimaldi G., Tesh, R.B. 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. *Clinical Microbiology Reviews* 6, 230-250.
- Harris, E., Kropp, G., Belli, A., Rodriguez, B., Agabian N. 1998. Single-step multiplex PCR assay for characterization of New World *Leishmania* complexes. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 1989-1995.
- Lainson, R., Shaw J.J. 1998. New world leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. In: Collier, L, Balows, A, Sussman, M (eds). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases*. 9th ed. Vol 5. London: Arnold, pp. 241-266.
- Motoie, G., Ferreira, G.E., Cupolillo, E., Canavez, F., Pereira-Chiocola, V.L. 2013. Spatial distribution and population genetics of *Leishmania infantum* genotypes in São Paulo State, Brazil, employing multilocus microsatellite typing directly in dog infected tissues. *Infection, Genetics and Evolution* 18, 48-59.

- MSB - Ministério da Saúde do Brasil (Health Ministry of Brazil). “Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2010” (American tegumentary leishmaniasis: surveillance. Technical manual). Article in Portuguese. Available at:[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf).
- Oliveira, G.M., Madeira, M.F., Oliveira F.S., Pires M.Q., Pacheco R.S. 2013. Canine cutaneous leishmaniasis: Dissemination and tissue tropism of genetically distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* populations. Veterinary Medicine International. *In press*.
- PAHO, Leishmaniasis: Epidemiological report of the Americas. Report Leishmaniasis. 2013. Available at [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=21608&Itemid=%20](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=21608&Itemid=%20). Accessed January, 2014
- Queiroz, A., Sousa R., Heine, C., Cardoso, M., Guimarães, L.H., Machado, P.R., Carvalho, E.M., Riley, L.W., Wilson, M.E., Schriefer, A. 2012. Association between an emerging disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. Journal Clinical Microbiology 50,4028-4034.
- Reimão, J.Q., Colombo, F.A., Pereira-Chiocola, V.L., Tempone, A.G. 2011. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. Experimental Parasitology 128,111-115.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. 1990. Taxonomy of *Leishmania*, use of isozymes. Suggestions for a new classification, Annales de Parasitologie Humaine et Comparee 65, 111–125.

- Schriefer, A., Schriefer, A.L., Góes-Neto, A., Guimarães, L.H., Carvalho, L.P., Almeida, R.P., Machado, P.R., Lessa, H.A., Jesus, A.R., Riley, L.W., Carvalho, E.M. 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.
- Shaw, J.J. 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 89, 471-478.
- Silva, R.A., Mercado, V.T., Henriques, L.F., Ciaravolo, R.M., Wanderley, D.M. 2012. Magnitude and trend of American tegumentary leishmaniasis in the State of São Paulo, Brazil, 1975 to 2008. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 15, 617-626.
- WHO-(World Health Organization), Leishmaniasis -Fact sheet N°375, Updated January 2014. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/index.html>. Assessed February 2014.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## Legends to figures and tables

**Figure 1.** Restriction patterns of PCR products digested with HhaI in DNA extracted from standard *Leishmania* strains include the following: *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147) (1), *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) (2), *L. (L.) major* (MHOM/SU/1973/5-ASKH) (3), *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1974/PP75) (4), and *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) (5). Digested products were resolved in 2% agarose gel stained with ethidium bromide. MM, 50-bp ladder.

**Figure 2.** Amplified products (1-1.2 kb) of clinical samples (1-4) of the ITS region between the small and large subunits of rDNA locus from *L. (V.) braziliensis* (A). Among the 52 clinical samples, nine restriction patterns of PCR products digested with HhaI (RFLP patterns) were shown (B). PCR and digested products were resolved in 8% polyacrylamide gels stained with ethidium bromide. MM, 100-bp (A) and 50-bp (B) ladders.

**Figure 1.** Map of South America and Brazil (A) indicating location of São Paulo State (A). Map of São Paulo State (B) indicating the municipalities studied and geographical distribution of the *L. (V.) braziliensis* patterns: 1 (red), 2 (yellow), 3 (green), 4 (blue), 5 (purple), 6 (orange), 7 (pink), 8 (light blue) and 9 (gray).

**Table 1.** Epidemiological distribution of 132 clinical samples positive for *L. (V.) braziliensis* analyzed in this study.

**Table 2.** Clinical samples genotyped by RFLP-PCR in this study

**Table 3.** Distribution of the 9 *L. (V.) braziliensis* profiles isolated from human and canine clinical samples in 17 municipalities of Sao Paulo State

Table 1 Ferreira et al.

Municipality*	DNA clinical samples ( <i>n</i> )	Municipality*	DNA clinical samples ( <i>n</i> )
Alumínio	2	Itapera	1
Aruja	1	Itupeva	2
Avaré	1	Jaboticabal	1
Bauru	4	Jundiai	6
Bragança Paulista	1	Mairipora	1
Cajamar	1	Marília	1
Campinas	5	Miracatu	1
Caraguatatuba	2	Mirandópolis	3
Cerquillo	1	Mogi Guaçu	1
Conhal	1	Monte Mor	6
Cubatão	1	Pilar do Sul	2
Guapiara	1	Ribeira	5
Guarulhos	12	Salto	2
Ibirá	1	Sao Paulo	11
Ilha Bela	4	Sorocaba	42
Indaiatuba	1	Suzano	1
Iperó	2	Tatui	1
Iporanga	3	Tiete	1
<b>Total of samples</b>		<b>132</b>	

\*Municipalities of Sao Paulo State, Brazil.

Table 2 Ferreira et al.

Sample code-month/year	Host	Municipality	Sample code-month/year	Host	Municipality
07-09/2003	Human	Sorocaba	1063-07/2008	Human	Guarulhos
18-09/2003	Human	Sorocaba	1153-11/2008	Human	Campinas
20-09/2003	Canine	Sorocaba	1324-02/2009	Human	Sorocaba
26-10/2003	Canine	Marilia	1622-08/2009	Human	Guarulhos*
64-09/2004	Human	Sorocaba	1758-02/2010	Human	Jundiai
65-09/2004	Human	Sorocaba	1945-06/2010	Human	Jundiai
84-11/2004	Canine	Ilha Bela	1946-10/2010	Human	Jundiai
115-03/2005	Human	Sorocaba	1985-11/2010	Human	Bauru
125-03/2005	Human	Sorocaba	2001-12/2010	Human	Sorocaba
157-06/2005	Human	Itupeva	2036-02/2011	Canine	Iporanga
194-08/2005	Human	Sao Paulo*	2037-02/2011	Canine	Iporanga
253-11/2005	Human	Sorocaba	2038-02/2011	Canine	Iporanga
274-05/2006	Human	Mairiporã	2072--04/2011	Human	Iperó
275-05/2006	Human	Cajamar	2098-06/2011	Human	Guarulhos*
279-05/2006	Human	Itapera	2135-09/2011	Human	Sorocaba
281-05/2006	Human	Sorocaba	2136-09/2011	Human	Sorocaba
282-05/2006	Human	Sorocaba	2150-09/2011	Human	Sorocaba
288-06/2006	Human	Itupeva	2151-09/2011	Human	Sorocaba
304-08/2006	Human	Sorocaba	2152-09/2011	Human	Sorocaba
327-08/2006	Canine	Avaré	2163-10/2011	Human	Guarulhos*
354-10/2006	Human	Sao Paulo*	2302-01/2012	Human	Guarulhos*
504-09/2007	Human	Sorocaba	2538-05/2012	Human	Sorocaba
560-12/2007	Human	Sorocaba	2656-07/2012	Human	Ribeira
684-03/2008	Human	Sorocaba	2657-07/2012	Human	Ribeira
829-05/2008	Human	Sao Paulo*	2658-07/2012	Human	Ribeira
832-05/2008	Canine	Caraguatatuba	2883-12/2012	Human	Iperó

\*Biopsies were collected from patients attending medical health services in the municipalities of Sao Paulo and Guarulhos, but patient histories were unknown.

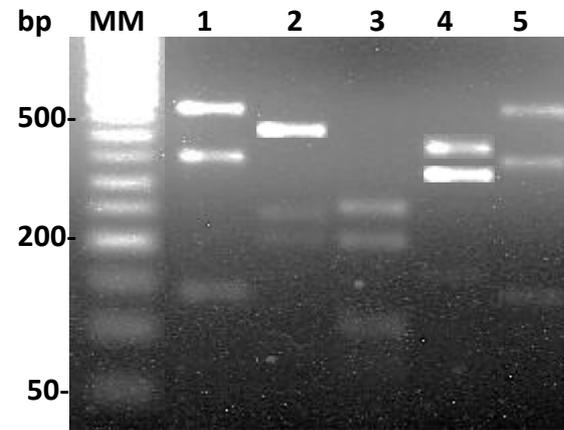
Table 3 Ferreira et al.

<i>L. (V.) braziliensis</i> genotyping (n)	Municipality (n=17)	Human	Canine
Pattern 1 (29 samples)	Bauru	1	-
	Cajamar	1	-
	Caraguatatuba	-	1
	Guarulhos	1	-
	Iperó	2	-
	Iporanga	-	2
	Itapera	1	-
	Itupeva	2	-
	Jundiai	2	-
	Mairipora	1	-
Ribeira	2	-	
Sao Paulo	2	-	
Sorocaba	10	1	
Pattern 2 (9 samples)	Guarulhos	3	-
	Jundiai	1	-
	Ribeira	1	-
Pattern 3 (3 samples)	Sorocaba	4	-
	Avaré	-	1
Pattern 4 (2 samples)	Marilia	-	1
	Sorocaba	1	-
Pattern 5 (1 sample)	Campinas	1	-
	Sorocaba	1	-
Pattern 6 (2 samples)	São Paulo	1	-
	Sorocaba	2	-
Pattern 7 (2 samples)	Guarulhos	1	-
	Sorocaba	1	-
Pattern 8 (2 samples)	Iporanga	-	1
	Sorocaba	1	-
Pattern 9 (2 samples)	Ilha Bela	-	1
	Sorocaba	1	-
Total of samples		44	8

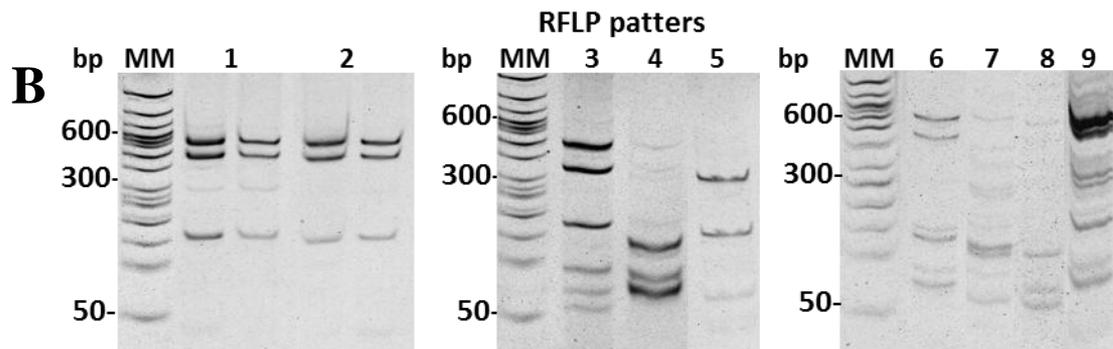
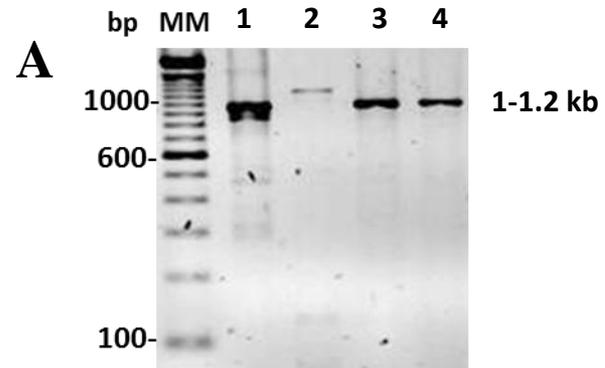
Figure

[Click here to download Figure: Figures 1 to 3 ACL AT.pptx](#)

# Ferreira et al. Figure 1



# Ferreira et al. Figure 2



Ferreira et al. Figure 3

