

Artigo de revisão

## Variação genotípica de *Leishmania (Viannia) braziliensis* permitindo sua adaptação no Estado de São Paulo e outras regiões brasileiras

### *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypic variation associated with its adaptation in São Paulo State and other Brazilian regions

Lasaro Teixeira Ferreira e Vera Lucia Pereira-Chioccola

Laboratório de Biologia Molecular de Parasitas e Fungos, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças – Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil.

#### RESUMO

A leishmaniose cutânea ou tegumentar é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários de dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*). Normalmente produz úlceras em diferentes partes do corpo como face, pernas, braços, e em grande número, causando sérios problemas psicológicos e sociais. *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresenta considerável importância clínica e é considerada a principal espécie causadora da leishmaniose cutânea Americana (LCA) no Brasil. No Estado de São Paulo, LCA é uma doença reemergente provocando lesões tegumentares, que são associadas a metástases mucosas. Neste artigo de revisão discute-se a complexa interação entre a diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores, reservatórios silvestres e urbanos em variados ambientes geográficos. Todos esses fatores aliados às formas de resposta do hospedeiro originam as distintas formas clínicas. Aborda-se também a complexidade de elementos que envolvem a transmissão da LCA, as diversas formas clínicas que a doença apresenta, bem como, as dificuldades em se estabelecer o diagnóstico preciso, a diversidade de perfis epidemiológicos, a distribuição dos vetores, dados ecopidemiológicos da doença, e os mecanismos de adaptação de *L. (V.) braziliensis*. Diferentes estudos que envolvem a epidemiologia molecular contribuíram para o entendimento da constante adaptação desse parasita a seus diversos hospedeiros. Este artigo de revisão foi elaborado com base em artigos científicos, livros e portais eletrônicos apontando ampla distribuição associada a tipos heterogêneos de transmissão. Diferentes estudos atribuem a variabilidade genética exibida por *L. (V.) braziliensis* como fenômeno responsável pela adaptação em infectar múltiplos hospedeiros e vetores, assim como habitar em diferentes regiões geográficas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leishmaniose Cutânea. *Leishmania braziliensis*. Polimorfismo genético. Epidemiologia molecular.

**ABSTRACT**

Cutaneous or tegumentary leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by parasite protozoa belong to two subgenera (*Leishmania* and *Viannia*). Cutaneous leishmaniasis normally produces ulcers in different parts of the body such as face, legs and arms. Normally the ulcers are in large numbers and they cause serious psychological and social problems in affected populations. *Leishmania (V.) braziliensis* presents considerable clinical importance, since is considered the main species that causes American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil. In São Paulo State, ACL is a re-emerging disease causing cutaneous lesions that has been associated with mucosal metastasis. This review discussed the complex interaction between the diversity of *Leishmania* species, vectors, wild and domestic reservoirs in different geographical environments. All these factors combined to the different host response originated the different clinical forms. Other important cited topics were the complexity of elements involving ACL transmission; the different clinical forms of the disease, as well as the difficulties in to establish the accurate diagnosis. Also, the article discussed the epidemiological diversity with the vector distribution, the ecopidemiological data of the disease, and the mechanisms *L. (V.) braziliensis* adaptation. Different studies involving molecular epidemiology contributed for the knowledge of the constant parasite adaptation in different hosts. This review was based on scientific articles, books, and electronic portals. These data point a wide distribution associated with heterogeneous types of transmission. Different studies justify the genetic variability exhibited by *L. (V.) braziliensis* as phenomenon for adaptation to infect multiple hosts and vectors as well as living on different geographic regions.

**KEYWORDS:** Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. Genetic polymorphism. Molecular epidemiology.

**INTRODUÇÃO**

A leishmaniose cutânea ou tegumentar é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários de dois subgêneros. Um deles é o subgênero *Leishmania*, que é encontrado tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo; e o outro é *Viannia*, que se restringe ao Novo Mundo. Normalmente produz úlceras em diferentes partes do corpo como face, pernas, braços, e em grande número, causando sérios problemas psicológicos e sociais.<sup>1</sup>

Nas Américas, a leishmaniose cutânea Americana (LCA) é amplamente distribuída, estendendo-se do sul dos Estados Unidos ao norte

da Argentina. Nessas regiões a LCA é causada por 11 espécies, incluindo *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis* e *L. (L.) pifanoi*.<sup>2</sup>

O curso da doença pode variar de uma úlcera com cura espontânea a uma grave destruição muco cutânea.<sup>3,4</sup> De acordo com a diversidade clínica, a forma cutânea é 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 sociais, psicológicos e econômicos dos indivíduos afetados.<sup>5-7</sup>

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho de revisão foi elaborado realizando-se uma análise documental e pesquisa bibliográfica com base em livros, manuais, teses de doutorado, artigos científicos, utilizando-se portais eletrônicos. Consultaram-se as seguintes bases de dados: Medline, Lilacs, SciELO, PubMed, Biblioteca Virtual de Saúde, Sinan-DataSUS e Google Acadêmico, nos quais foram pesquisadas informações recentes sobre *Leishmania* e leishmaniose cutânea. Os unitermos pesquisados foram: *Leishmania*, *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, subgênero *Leishmania*, subgênero *Viannia*, epidemiologia, diagnóstico e manifestações clínicas.

### Aspectos gerais e ciclos de vida

Os parasitas da família *Trypanosomatidae* são protozoários flagelados, cuja caracterís-

tica é a de apresentar flagelos compostos por nove microtúbulos, dispostos em círculo e aos pares. Pertencem à Classe Kinetoplastida cujas formas evolutivas apresentam o cinetoplasto. Esta organela é composta de moléculas de DNA circulares (kDNA) e se apresenta em formas diferentes dependendo do estágio evolutivo do parasita. No gênero *Leishmania*, os amastigotas, que vivem em hospedeiros vertebrados são estruturas pequenas (2 a 6 µm de comprimento por 1,5 a 3 µm de largura), achatadas, imóveis, com núcleos grandes e redondos ocupando grande parte do corpo celular. São formas intracelulares com cinetoplastos visíveis e flagelos reduzidos (Figura 1A). Os promastigotas são alongados (14 a 20 µm de comprimento e 1,5 a 4 µm de largura), achatados e com cinetoplastos localizados na posição anterior dos parasitas, próximo aos flagelos (Figura 1B).<sup>4-6</sup>

Todas as espécies de *Leishmania* são transmitidas pela picada de fêmeas de dípteros infectados da sub-família Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo).

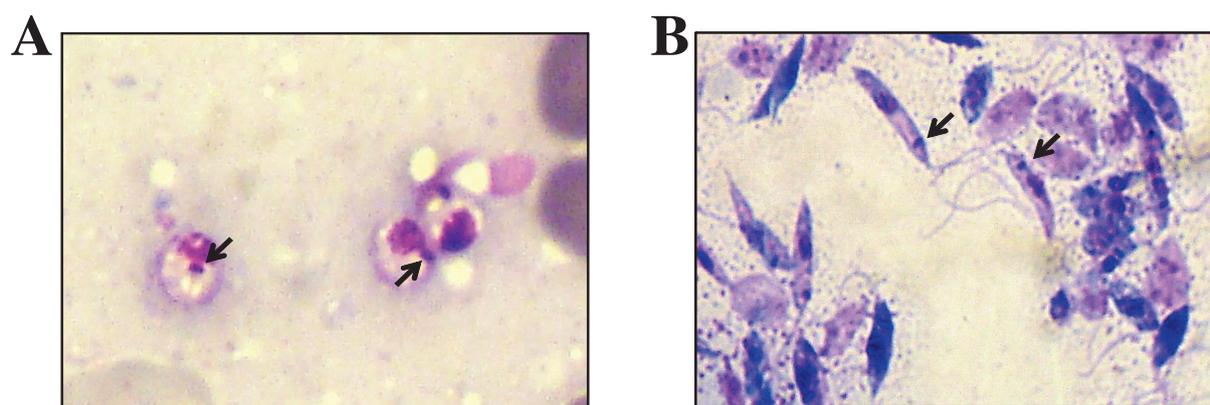


Figura reproduzida com permissão de Maria de Fátima Lereño (confeção das lâminas) e Sansão da Rocha Westphalen (confeção das fotos). Ambos do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

**Figura 1.** Formas evolutivas de *Leishmania*. Esfregaço de biópsia de lesão de um paciente com LCA contendo formas amastigotas (A). Promastigotas provenientes cultivo em meio bifásico BAB/BHI (Blood Agar Base/Brain Heart Infusion) (B). As flechas indicam os cinetoplastos em ambas as formas evolutoras. Coloração Giemsa, aumento 1000 X.

Os flebotomíneos como vetores, quando infectados, ao se alimentar diretamente do sangue de hospedeiros vertebrados (repasto sanguíneo) inoculam promastigotas neles. Tais formas são fagocitadas por macrófagos e neutrófilos e, no interior dos fagolisossomos, transformam-se em amastigotas, replicam-se e infectam macrófagos adjacentes. Por meio de um novo repasto sanguíneo os vetores ingerem os amastigotas. No intestino do vetor os amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas flageladas, que se replicam intensamente. Rapidamente essas formas se direcionam para a cavidade bucal, onde serão introduzidas em novo hospedeiro durante o repasto sanguíneo.<sup>8,5,6</sup>

### Formas clínicas e diagnóstico

A complexa interação entre a diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores, reservatórios silvestres e urbanos em variados ambientes geográficos, aliada às formas de resposta do hospedeiro, originam as distintas formas clínicas da LCA.<sup>9,7</sup>

As infecções causadas pelas espécies de *Leishmania* apresentam manifestações clínicas similares, mas com diversos prognósticos durante o curso da infecção. As úlceras causadas por parasitas do subgênero *Viannia* são mais agressivas e podem recidivar após o tratamento específico. Por outro lado, as causadas por parasitas do subgênero *Leishmania* são menos severas, mais susceptíveis ao tratamento e possíveis de serem curadas espontaneamente.<sup>10,11,4</sup>

A *leishmaniose cutânea localizada* é caracterizada por lesões ulceradas com fundo granuloso e borda elevada. Esta forma geralmente é acompanhada por linfadenopatia regional e representa cerca de 95% dos casos.

As lesões iniciam-se no ponto de inoculação dos promastigotas. O período de incubação varia de 10 a 90 dias e as lesões surgem de forma única ou múltipla, dependendo da quantidade de picadas.<sup>12,13</sup> Via de regra, os pacientes afetados apresentam boa resposta ao tratamento ou cura espontânea. Contudo, dependendo da resposta imunológica a infecção pode evoluir para outros tipos de lesões.<sup>14,15</sup>

Já na *leishmaniose cutânea disseminada*, as lesões primárias são difundidas para várias partes do corpo via hemática ou linfática. As múltiplas lesões (100-300) exibem aspecto papular acneiforme e ulceroso. Cerca de 30% dos casos de leishmaniose cutânea evoluem para a forma mucosa. A sintomatologia inclui pirexia, indisposição, mialgias, emaciação, dentre outros.<sup>16,13,14</sup>

A *leishmaniose cutânea difusa* caracteriza-se por uma lesão inicial com posterior difusão para outras regiões do corpo. Indivíduos anérgicos são os mais acometidos por apresentarem resposta imunológica deficiente aos antígenos de *Leishmania*. 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.<sup>13,14,16</sup>

A *forma recidiva cutis* 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.<sup>13,16</sup>

A *leishmaniose mucosa* (ou mucocutânea) é a forma mais grave da LCA, pelo grande risco do desenvolvimento de deformidades permanentes no septo cartilaginoso nasal e mucosa oral.

Existem casos de acometimento de laringe, faringe e cordas vocais e, em estágios mais avançados, comprometimento do ouvido médio. Os principais sintomas incluem otite média crônica, tosse, obstrução, sangramento e prurido nasal, dificuldade de deglutição e dificuldade respiratória.<sup>17,12,15,16</sup> Esta manifestação clínica está associada à resistência natural e à magnitude da resposta imunológica do hospedeiro.<sup>17</sup> A forma mucosa pode, ainda, manifestar-se após a cura clínica ou tratamento inadequado da forma cutânea. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea evoluem num período de 10 anos para a forma mucocutânea tardia. Destes, 50% ocorrem nos primeiros dois anos após a cicatrização das lesões cutâneas.<sup>16</sup>

Considerando as deformidades causadas pela doença e a potente toxicidade exibida pelos medicamentos disponíveis do mercado, o diagnóstico preciso torna-se indispensável. Porém, não existe um teste disponível que possa ser considerado padrão ouro, por não demonstrar sensibilidade suficiente para a detecção dos parasitas.<sup>18,19</sup>

O diagnóstico tradicional da LCA normalmente é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Dentre as dificuldades do diagnóstico incluem-se aqueles pacientes que apresentam poucos parasitas nas úlceras. Outro problema é o de distinguir a verdadeira infecção com outras doenças de pele em regiões endêmicas para LCA, onde uma lesão cutânea e um único resultado do teste intradérmico de Montenegro submete pacientes ao tratamento específico da LCA.<sup>20,21</sup>

Dentre as metodologias laboratoriais utilizadas incluem o exame microscópico direto, cultura *in vitro*, exames histopatológicos, imunológicos e moleculares.<sup>4,11,16</sup>

Os exames parasitológicos contemplam as técnicas de esfregaço, que permite a observação direta do parasita, cultivo do material proveniente de lesões e a inoculação em animais.<sup>22</sup> As diferentes espécies de *Leishmania* apresentam diversidade em meios de cultura, sendo que algumas são bem difíceis de serem mantidas em cultivo. Outro problema são as comuns contaminações, considerando que as biópsias de lesões normalmente apresentam também bactérias e fungos.<sup>20</sup>

Os amastigotas provenientes de biópsias, raspagem ou punção das lesões são corados com Giemsa ou Leishman e evidenciados em microscópio óptico. A porcentagem de sucesso na identificação microscópica de amastigotas varia com o número de parasitas presentes na amostra analisada. Via de regra, o exame direto apresenta baixa sensibilidade, variando de 50% a 70%. Por outro lado, os exames que detectam a resposta imunológica geralmente apresentam boa sensibilidade, mas baixa especificidade.<sup>7</sup>

Dentre os exames que detectam a resposta imunológica, destaca-se o teste intradérmico de Montenegro, que consiste numa reação intradérmica com antígeno preparado de promastigotas mantidos em meio de cultura. Esse teste detecta a presença de hipersensibilidade tardia, uma vez que a LCA pode causar intensa resposta celular. O teste consiste no inoculo do antígeno de promastigotas no antebraço do paciente. A reação é considerada positiva quando, na leitura de 48 ou 72 horas detecta-se endurecimento igual ou superior a 5 mm.<sup>12,16</sup> As reações sorológicas são pouco utilizadas na LCA, pois pacientes infectados desenvolvem baixos níveis de resposta humoral. Como tais anticorpos são fracamente detectados, as reações sorológicas são pouco sensíveis. Em adição, elas são também pouco específicas pela

ocorrência de reações cruzadas com doença de Chagas e leishmaniose visceral.<sup>12,15,16</sup>

Outro fator que corrobora para interferir na especificidade dos métodos laboratoriais tradicionalmente empregados é a diversidade endêmica encontrada nas regiões brasileiras. A identificação de espécies de *Leishmania* é imprescindível para estudos clínicos e epidemiológicos, uma vez que a leishmaniose cutânea e a visceral podem ser prevalentes numa mesma região.<sup>23</sup> Dentro desta perspectiva, os testes moleculares são excelentes para o diagnóstico da LCA, pois além de determinar a espécie do agente infectante apresenta alta especificidade e sensibilidade. A reação em cadeia da polimerase (PCR), tanto a convencional como a em tempo real, por ser relativamente simples e rápida, quando bem padronizada, é a que tem sido mais utilizada. Contudo, ainda hoje a sua utilização restringe-se aos centros especializados.<sup>24,19,23</sup>

A PCR permite a rápida detecção de *Leishmania* em flebotomíneos e reservatórios. Pode ser aplicada em uma diversidade de amostras biológicas como vetores, sangue periférico, aspirado de medula óssea, linfonodos e baço, biópsia de lesões, amostras fixadas em formol em blocos de parafina.<sup>25-28</sup>

### **Diversidade epidemiológica – Distribuição mundial**

A leishmaniose cutânea está largamente distribuída preferencialmente em populações com baixo poder aquisitivo. Atualmente mais de 98 países e territórios são endêmicos para as leishmanioses. Estima-se que aproximadamente 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea ocorrem por ano mundialmente. Cerca de um terço dos casos ocorrem preferencialmente

em regiões da América Latina, Mediterrâneo, Ásia e África. Os 10 países com maior número de casos são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria. A prevalência global da leishmaniose cutânea é de 70 a 75% e está associada à má nutrição, problemas de moradia e falhas do sistema imune do hospedeiro.<sup>1</sup> A Figura 2 mostra a distribuição da leishmaniose cutânea no mundo em 2013.

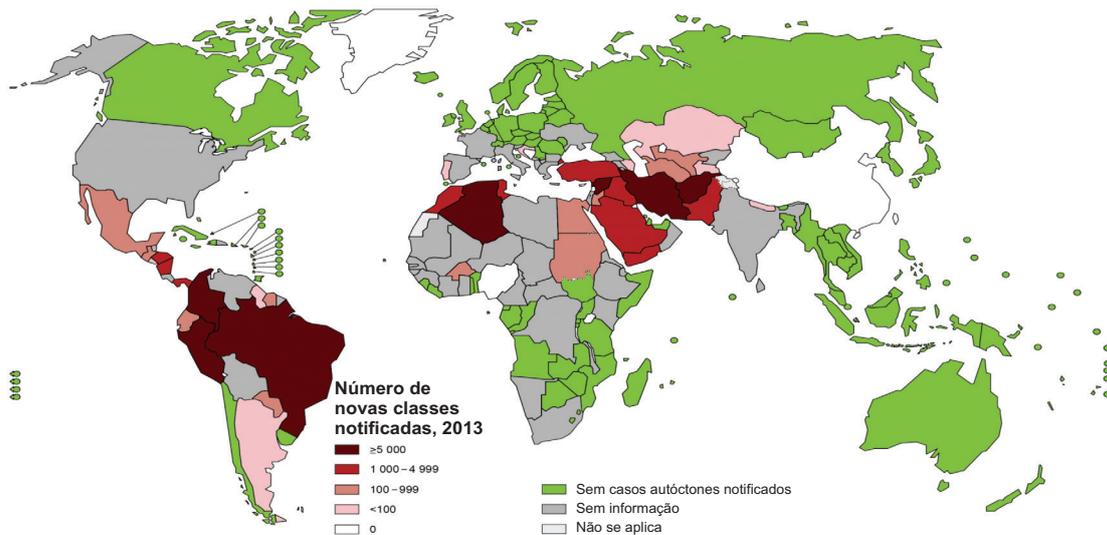
Fora das Américas é caracterizada por grandes surtos em cidades com alta densidade demográfica, especialmente em guerras, zonas de conflito, campos de refugiados e locais de alta concentração de populações imigrantes.<sup>1,7,14</sup>

Nas Américas, a LCA é endêmica e apresenta variações intra e interespecíficas como: (i). ciclos de transmissão; (ii). hospedeiros e vetores; (iii). manifestações clínicas; (iv). respostas à terapia; e (v). concomitância de espécies de *Leishmania* circulando numa mesma área geográfica. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru. Entre 2001 e 2011 foram registrados cerca de 650.000 casos. A América do Sul concentra o maior número de casos (43,81%), seguida pelos países que compõem a Comunidade Andina das nações (40,36%). Os países pertencentes à América Central somam 15,73% dos casos, sendo que o México registrou 468 casos em 2011.<sup>1</sup>

### **Padrões epidemiológicos brasileiros**

Os diferentes padrões epidemiológicos da LCA no Brasil são caracterizados pelos modelos de transmissão.

No *padrão silvestre* a transmissão ocorre em regiões de vegetação primária envolvendo animais silvestres. A infecção humana pode ocorrer eventualmente.



Países que relataram importação de novas classes			
Libano	1.033	Iraque	13
Jordânia	103	Bélgica	12
Nepal	28	Kuwait	11
		Alemanha	10
		Qatar	8
		Rússia	5
		Armênia	2
		Finlândia	2
		Lituânia	1
		Bangladesh	1
		Itália	1
		República Checa	1

Figura reproduzida com a permissão de World Health Organization, Geneva, 2015, WHO Leishmaniasis control programme. Annual country reports, 2013, Topic of neglected tropical diseases. Fact sheet no. 134: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>

**Figura 2.** Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo. Dados de 2013 (Endemicity of cutaneous leishmaniasis, 2013)

No *padrão silvestre modificado ou ocupacional* a transmissão humana ocorre pela exploração de florestas com a derrubada da vegetação primária.

No *padrão rural* a transmissão ocorre em áreas de colonização antiga. Caracteriza-se por ser uma zoonose de matas residuais.

No *padrão periurbano* a transmissão ocorre em áreas de colonização antiga, mas com boa adaptação do vetor ao peridomicílio. Neste caso, a participação de animais domesticados como reservatórios é importante, caracterizando-se por uma zoonose e antroponose.<sup>16,29,30</sup>

### As características brasileiras

A teoria amazônica sobre a expansão da LCA no Brasil foi proposta por Marzochi e Marzochi.<sup>29</sup> Segundo essa teoria, a LCA 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. Por volta de 1920, 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 LCA para vários estados das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul.<sup>6,9,29</sup>

A hipótese da origem amazônica da LCA é alicerçada por meio de estudos moleculares no parasita, em que foi constatada a heterogeneidade genética de *L. (V.) braziliensis* na região amazônica em comparação a sua homogeneidade genética fora desta região, sugerindo sua posterior introdução, longe de sua origem e propagação clonal.<sup>31</sup>

Assim, no cenário brasileiro, o aumento do número de casos é constante com a ampliação de regiões geográficas. Atualmente, a LCA é prevalente em todos os Estados brasileiros, mas com diferentes perfis epidemiológicos e padrões de transmissão.<sup>32</sup> No período de 1990 a 2013, cerca de 500 mil casos de LCA foram causados por diferentes espécies como *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonenses*.<sup>33</sup>

### LCA no Estado de São Paulo

A transmissão da LCA no Estado de São Paulo ocorre desde 1884 e em dois perfis epidemiológicos, que incluem as áreas residuais florestadas e as regiões urbanizadas. No primeiro, o homem se infecta entrando em contato com o ciclo enzoótico silvestre. Já no segundo, a transmissão ocorre no ciclo domiciliar envolvendo o homem, animais sinantrópicos e espécies de flebotomíneos que estão se adaptando aos ambientes rurais e periurbanos ou em áreas com profundas modificações no ambiente natural.<sup>34-36</sup>

Inicialmente a transmissão ocorria devido ao contato entre os vetores e os trabalhadores que exerciam atividades em regiões de mata, como em construções ferroviárias, em áreas próximas às margens do Rio Tietê. A devastação florestal induziu a adaptação dos vetores aos diversos ambientes geográficos, climas e áreas urbanas. Este fato foi propiciado pela co-evolução da tríade vetor-*Leishmania*-reservatório. As mudanças ocorridas devido a atividades de agricultura e pecuária influenciaram drasticamente a composição da fauna de flebotomíneos no Estado de São Paulo.<sup>34</sup>

Com o passar dos anos ocorreu a redução progressiva da cobertura vegetal do Estado de

São Paulo, aliada principalmente com a expansão das plantações de café no século 19, construções de fazendas, abertura de estradas e ferrovias em direção ao litoral.<sup>37</sup> Concomitantemente, o número de casos da LCA aumentou drasticamente. Após várias décadas, o perfil de transmissão foi se modificando e, a partir dos anos 70, um novo quadro epidemiológico surgiu, com a ocorrência de casos esporádicos e micro surtos, comprovando o perfil de transmissão extra florestal da LCA.<sup>38</sup> A partir da década de 1980 houve aumento significativo no número de casos autóctones, com ampliação da transmissão de caráter endêmico para novas regiões, acometendo indivíduos de ambos os sexos, de todas as faixas etárias, na periferia de centros urbanos. Atualmente, a transmissão da LCA tem se manifestado em todas as faixas etárias e indistintamente entre os sexos masculino, feminino ou profissão.<sup>39,20,36</sup> No período de 1998 a 2014 foram notificados no estado 9.235 casos, sendo 9.084 em pessoas residentes e, dentre esses, 6.746 casos (74,3%) com local provável de infecção em um dos 340/645 municípios paulistas.<sup>40</sup>

### LCA e a urbanização

Nas Américas, o ciclo de transmissão é predominantemente zoonótico, dotado de grande complexidade devido a uma grande variedade de espécies de vetores (cerca de 50 espécies de flebotomíneos potencialmente transmissoras). Estas espécies de vetores são adaptadas aos diversos tipos de clima, padrões geográficos, reservatórios (domésticos e selvagens) e parasitas.<sup>41,12,30</sup>

Dentre as espécies prevalentes nas Américas, *L. (V.) braziliensis* destaca-se por exibir ampla distribuição com implicações importantes na saúde pública. Assim, ocorreu a propagação do parasita do ambiente silvestre para o ciclo urbano

em espécies de flebotomíneos peridomésticas, refletindo a capacidade de adaptação às mudanças de seus habitats florestais originais.<sup>42</sup>

O fenômeno da urbanização é considerado o principal fator de risco para a disseminação das leishmanioses.<sup>1</sup> Tal fenômeno viabilizou o processo de colonização de seus vetores em ambientes onde ocorre a presença da fauna sinantrópica na periferia das cidades e em áreas com vegetação densa. O mecanismo de translocação cromossômica de *L. (V.) braziliensis* (rearranjo de partes entre cromossomos não-homólogos) no ambiente peridoméstico ofereceu maior risco para a ocorrência de zoonoses emergentes.<sup>43,44</sup> 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 LCA tenham diagnóstico, acompanhamento médico e tratamento adequados.<sup>44,1</sup>

No Estado de São Paulo, o táxon *Lutzomyia intermedia* é a espécie mais importante na transmissão da LCA e está presente preferencialmente em ambientes modificados com constante presença no intra e peridomicílio.<sup>45,46,38</sup> *Nyssomyia neivai*, *N. whitmani*, *N. mingonei* e *Pintomyia pessoai* também foram identificadas como vetoras.<sup>37</sup>

### 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 do DNA mitocondrial.<sup>47</sup>

O conhecimento do genoma de *Leishmania* permitiu um maior entendimento da dinâmica do processo evolutivo, virulência e patogênese do agente.<sup>48</sup> A análise molecular no cariótipo de *Leishmania* spp apontou polimorfismos ao longo dos cromossomos e um alto grau de plasticidade em seu genoma.<sup>4</sup> Um estudo comparativo entre os genomas de *L. (L.) major*, *L. (L.) infantum* e *L. (V.) braziliensis* apontaram grande semelhança em conteúdo e organização, porém em *L. (V.) braziliensis* a presença de retrotransposons e componentes de RNAi permitem maior diversidade nesta espécie.<sup>48</sup> *L. (V.) braziliensis* possui um genoma de 32 Mb, com 35 cromossomos (união entre os cromossomos 20 e 34), com 60,4% de Guanina-Citocina. Possui 8.314 genes, sendo 49 espécie-específicos, 161 pseudogenes e 33 genes compartilhados com *L. (L.) infantum* e 5 com *L. (L.) major*.<sup>49</sup> 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*. Apesar de *Leishmania* ser considerada um organismo diplóide, pesquisas apontam a ocorrência de formas triploides, em consequência da troca genética 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 a drogas.<sup>50,47</sup> *Leishmania* pode demonstrar drásticas alterações em sua expressão gênica ocasionada por diferentes estímulos externos, permitindo a adaptação a novas situações, como, por exemplo, às 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, podem ocorrer mudanças na expressão gênica devido a fatores como “trans-splicing” alternativo, alterações no transcriptoma, eventos diferenciais de

fosforilação, mudanças estruturais na cromatina, dentre outros.<sup>51</sup>

### A contribuição da epidemiologia molecular

Diferentes metodologias moleculares foram inseridas em estudos epidemiológicos investigativos sobre as leishmanioses.<sup>52</sup> Marcadores moleculares específicos foram utilizados para demonstrar diferenças genéticas entre espécies de *Leishmania*.<sup>53,23</sup> As técnicas de genotipagem são ferramentas que possibilitam a identificação de espécies simpátricas ou importadas em determinada região, de espécies associadas com a falha do tratamento, de novos reservatórios e vetores, de combinações gênicas entre parasita e o vetor e de espécies de *Leishmania* híbridas.

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 à fase de metaciclogênese, no trato gastrointestinal do inseto vetor.<sup>54</sup> 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.<sup>56,54,55</sup>

Em relação à tipagem de cepas, esses métodos moleculares podem identificar as fontes do parasita estabelecendo relação ao seu genótipo, diferenciar os ciclos de transmissão, identificar genótipos associado com recidivas ao tratamento e identificar e comparar cepas oriundas de diferentes hospedeiros.<sup>57,54-56</sup> Patógenos que produzem diferentes variantes genéticas são mais propensos a infectar múltiplos hospedeiros.<sup>55,56</sup>

Nas últimas décadas, os estudos evidenciando o polimorfismo genético de isolados de *L. (V.)*

*braziliensis* provenientes do vetor e de amostras clínicas proporcionaram maior entendimento da epidemiologia molecular da doença em diversas regiões brasileiras.<sup>58-63,42,57</sup>

O polimorfismo genético de *L. (V.) braziliensis* foi identificado em isolados provenientes de pacientes antes e após o tratamento, em casos de reativação da doença e fracasso terapêutico com antimonial, dentre outros. Este conjunto de resultados sugere a adaptação destes parasitas às mudanças observadas nas condições ambientais como em mecanismos de resistência a tratamento, a reativação de lesões e a diferentes pacientes e regiões.<sup>64-68,42,58,61,63</sup>

Amostras de *L. (V.) braziliensis* provenientes de cães e pacientes infectados e moradores de diferentes localidades do Estado de São Paulo também apresentam variantes genéticas. O estudo<sup>60</sup> foi realizado com auxílio do método molecular de PCR-RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”). Como ilustração, Figura 3 mostra os padrões genotípicos de *L. (V.) braziliensis* e como distribuído no Estado de São Paulo. Todos estes dados analisados em conjunto sugerem que os parasitas sofrem modificações no repertório de minicírculos, provavelmente para que possam se adaptar a diferentes reservatórios, ou hospedeiros acidentais, que compõem o ciclo de transmissão. Especificamente, diante do quadro epidemiológico da transmissão da LCA no Estado de São Paulo, as variações genotípicas exibidas por *L. (V.) braziliensis* podem ser justificadas pela necessidade dos parasitas em adaptar-se às mudanças no quadro de transmissão que originalmente pertencia aos ambientes florestados. A 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 heterogêneo de circulação de *Leishmania*.<sup>69</sup>

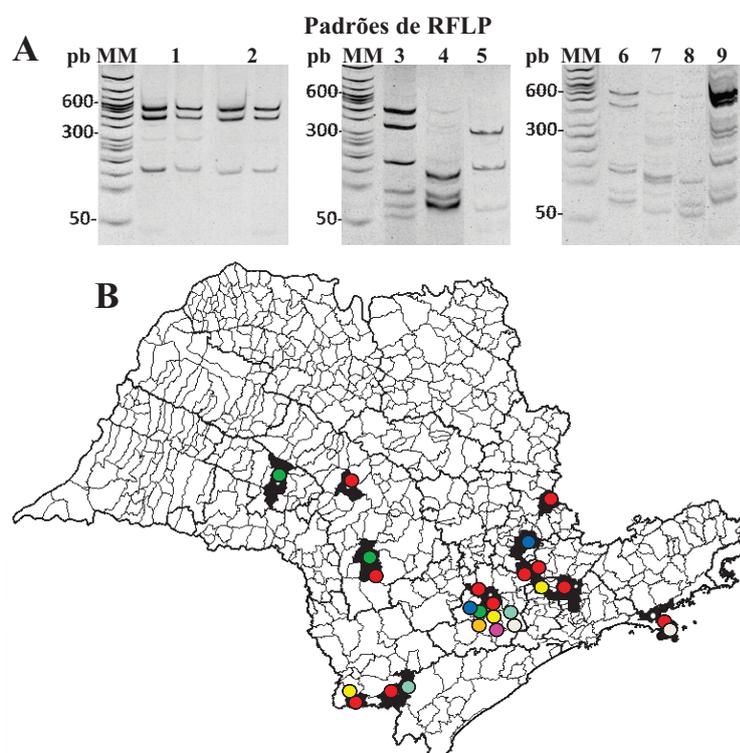
### Considerações finais

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 à contínua exploração do meio ambiente, os vetores da LCA encontram-se em franca expansão, ocasionando sequelas físicas no homem.<sup>14,40,42</sup>

Estudos apontam que o material genético de *L. (V.) braziliensis* de portadores da LCA apresenta considerável plasticidade, demonstrando polimorfismo nuclear e no cinetoplasto. Tais mudanças facilitarão a adaptação dos parasitas às alterações ambientais e aos modos de transmissão, que originalmente pertenciam a ambientes florestados. A partir da progressiva retirada da cobertura vegetal, os parasitas ampliaram sua capacidade de infectar maior diversidade de flebotomíneos e reservatórios. Assim, no Estado de São Paulo e outras regiões brasileiras, o ciclo heterogêneo de circulação de *Leishmania* compõe uma estreita ligação entre áreas selvagens com áreas povoadas e urbanas.

### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi parcialmente financiado pela Fapesp. Proc-2011/13.939-8. Bolsa Capes (LTF) e Produtividade CNPQ, Proc 303.489/2012-0 (VLPC).



**Figura 3.** (A): Produtos (de 1-1.2 kilo-base) amplificados (por PCR), de uma região do genoma de *L. (V.) braziliensis* (denominada de internal transcribed spacers), obtidos de amostras clínicas (pacientes e cães) foram digeridos com a enzima de restrição HhaI gerando os padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Das 52 amostras clínicas analisadas foram gerados 9 padrões de restrição. Os produtos digeridos foram analisados em géis de poliacrilamida a 8% corados pelo brometo de etídio. MM, Marcador molecular de 50-pb (pares de base). (B): Mapa do Estado de São Paulo indicando os municípios estudados e a distribuição geográfica dos 9 padrões de *L. (V.) braziliensis*. 1 (vermelho), 2 (amarelo), 3 (verde), 4 (azul), 5 (lilás), 6 (laranja), 7 (rosa), 8 (azul claro) e 9 (cinza).

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis. [acesso em Abril de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>
2. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters, Killick-Dendrick. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press, 1987, p. 1-20.
3. Ashford RW, Desjejum P, Deraadt P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. Parasitol Today. 1992; 8: 104-5.
4. Grimaldi GJ, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for the future research. Clin Microbiol Rev. 1993; 6: 230-50.
5. Rey L. O complexo "*Leishmania braziliensis*" e as Leishmaniases tegumentares americanas. In: Rey L. Rey: Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 3. edição, 2001, p. 227-39.
6. Coura JR. Leishmaniose tegumentar americana. In Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005, p. 697-712.
7. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8:419-33.
8. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005; 4:1561-77.
9. 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.
10. Pirmez C1, da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1819-23.
11. Ramos-E-Silva M, De Moura Castro Jacques C. Leishmaniasis and other dermatozoonoses in Brazil. Clin Dermatol 2002; 20: 122-34.
12. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36: 71-80.
13. Costa JML, Saldanha ACR, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Barral A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. Gaz Med Bahia. 2009; 79.
14. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26: 293-307.
15. Guimarães LH, Machado PRL, Lessa HA, Lessa M, Oliveira AD, Carvalho EM. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. Gaz Med Bahia. 2008; 74.
16. Ministério da Saúde do Brasil. 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 2015]. 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)
17. Lessa MM, Lessa H A, Castro T WN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. Rev Bras Otorrinolaringolo. 2007; 73: 843-7.
18. Elmahallawy EK, Sampedro Martinez A, Rodriguez-Granger J, Hoyos-Mallecot Y, Agil A et al. Diagnosis of leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2014; 13: 961-72.
19. Gomes CM, de Paula NA, Morais OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN.

- Complementary exams in the diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* 2014; 5: 701-9.
20. 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.
  21. Martins AL, Barreto JA, Lauris JR, Martins AC. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *An Bras Dermatol.* 2014; 1: 52-8.
  22. de Vries HJ, Reedijk SH, Schallig HD. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am J Clin Dermatol.* 2015;16:99-109.
  23. Gomes AH, Ferreira IM, Lima ML, Cunha EA, Garcia AS, Araujo MF et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2007; 144: 234-41.
  24. Pereira-Chiocola VL. Molecular diagnosis of leishmaniasis: contribution to the American visceral leishmaniasis surveillance program in Sao Paulo state. *BEPA.* 2009; 68: 4-13.
  25. Degraive 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: 463-9.
  26. Costa JML, Saldanha ACR, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Barral A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. *Gaz Med Bahia.* 2009; 79 (3): 70-83
  27. Colombo FA, Odorizzi RM, Laurenti MD, Galati EA, Canavez F, Pereira-Chiocola VL. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. *Parasitol Res.* 2011; 109: 267-74.
  28. Gomes AH, Martines RB, Kanamura CT, Gava R, Barbo MLP, Iglezias S D'A et al, In situ immune response in human American cutaneous leishmaniasis – a possible role for IL-10, IL-17 and NK cells. *Plos one.* 2015: in press.
  29. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil-emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pub.* 1994; 10: 359-75.
  30. Basano AS, Camargo LMA. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev Bras Epidemiol.* 2004; 7: 328-37.
  31. 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 Manguinhos.* 2003; 10: 852-82.
  32. Costa JML. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. *Gaz Med Bahia* 2005; 75: 3-17.
  33. Ministério da Saúde. Portal Saúde. [acesso em Abril de 2015]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>
  34. Gomes AC. Sandfly vectorial ecology in the State of São Paulo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89: 457-60.
  35. 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.
  36. Silva LMR, Cunha PR. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no Município de Campinas-São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. *An Bras Dermatol.* 2007; 82: 515-9.

37. 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.
38. Tolezano JE. Ecoepidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89: 427-34.
39. Silva RA, Mercado VTC, Henriques LF, Ciaravolo RMC, Wanderley DMV. Magnitude e tendência da leishmaniose tegumentar Americana no Estado de São Paulo, Brasil, 1975 a 2008. *Rev Bras Epidemiol*. 2012; 15: 617-26.
40. Reinaldo VB, Buzzar MR. A situação epidemiológica da leishmaniose tegumentar Americana no Estado de São Paulo no período de 2007 a 2014. *BE CVE*. 2016; 6 (01). (no prelo).
41. 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.
42. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 3126-32.
43. Salomón OD, Quintana MG, Mastrángelo AV. Leishmaniasis tegumentária americana salud pública y conservación de la biodiversidad. In: Barral A, Costa J. *Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas*. 2011. p. 39-54.
44. PAHO. *Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas*. 2013. n.1. [acesso em Abril de 2015]. Disponível em: [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)
45. 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. Ano 1. Disponível em: [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa1\\_Ita.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa1_Ita.htm)
46. Condino MLF, Sampaio SMP, Henriques LF, Galati EAB, Wanderley DMV, Corrêa FMA. Leishmaniose tegumentar americana: flebotomíneos de área de transmissão no município de Teodoro Sampaio, região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1998; 31: 355-60.
47. Kazemi B. Genomic organization of *Leishmania* species. *Iran J Parasitol*. 2011; 6: 1-18.
48. Smith DF, Peacock CS, Cruz AK. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. *Int J Parasitol*. 2007; 37: 1173-86.
49. Dujardin JC. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? *Infect Genet Evol*. 2009; 9: 290-7.
50. 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.
51. Kramer S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol Biochem Parasitol*. 2012; 181: 61-72.
52. 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.
53. 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.
54. 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: e1001004.
  55. 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.
  56. Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. Genetics. *Leishmania* exploit sex. Science. 2009; 324: 187-9.
  57. Marlow MA. Epidemiologia molecular da leishmaniose tegumentar americana no Estado de Santa Catarina, Brasil. [Tese de doutorado da Universidade Federal de Santa Catarina]. Florianópolis, SC., 2013.
  58. Cupolillo E, Momen H, Grimaldi G Jr. Genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1998; 93: 663-8.
  59. 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
  60. Ferreira LT, Gomes, AHS, Pereira-Chioccia VL. Genotype characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2015. *In press*
  61. Oliveira FS, Valette-Rosalino CM, Schubach AO, Pacheco RS. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010. 66: 361-5.
  62. Silva LA, de Sousa CS, Graça GC, Porrozzini 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.
  63. 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.
  64. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, de Freitas CML, Guimarães SPA, Helena SBJ, 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; 2012:808132.
  65. 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.
  66. De Oliveira GM, Madeira MF, Oliveira FS, Pires MQ, Pacheco RS. Canine cutaneous leishmaniasis: Dissemination and tissue tropism of genetically distinct *Leishmania (Viannia) braziliensis* populations. Vet Med Int. 2013; 2013:982183.
  67. Schriefer ALF, Souza RS, Guimarães LH, Góes-Neto A, Schriefer A. Papel do parasita e do hospedeiro na expressão clínica das Leishmanioses. Gaz Med Bahia. 2008; 74
  68. Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging

disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. J Clin Microbiol. 2012; 12: 4028-34.

69. 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.

---

---

**Correspondência/Correspondence to:**

Centro de Parasitologia e Micologia – Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 351, 8º andar, São Paulo-SP, cep 01246-902, Brasil  
Tel: +55 11 3068 2991; Fax: +55 11 3068 2890  
E-mail: pchioccola@gmail.com