

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA EM PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM
HANSENÍASE E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE UBERLÂNDIA, CREDESH-UFU

Fernanda Cristina Assis Silva

Uberlândia - MG

Setembro/2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM HANSENÍASE E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, CREDESH-UFU

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial a obtenção do título de mestre em imunologia e parasitologia aplicadas

Aluna: Fernanda Cristina Assis Silva

Orientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (ICBIM/UFU)

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas (ICBIM/UFU)

Uberlândia - MG

Setembro/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586d
2017 Silva, Fernanda Cristina Assis, 1989
 Diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em
 pacientes atendidos no centro de referência em hanseníase e
 dermatologia sanitária da Universidade Federal de Uberlândia,
 CREDESH-UFU [recurso eletrônico] / Fernanda Cristina Assis Silva. -
 2017.

Orientador: Sydney Magno da Silva.

Coorientadora: Michelle Aparecida Ribeiro de Freitas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1332>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Leishmaniose. 3. Leishmania. 4.
Imunohistoquímica. I. Silva, Sydney Magno da, 1986, (Orient.). II.
Freitas, Michelle Aparecida Ribeiro de, 1975, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado junto ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa da Dissertação de Mestrado número 236 do PPIPA.

Data: 29 de setembro de 2017

Discente: FERNANDA CRISTINA ASSIS SILVA

Matrícula: 11522IPA002

Título do Trabalho: “Diagnóstico molecular da leishmaniose tegumentar americana em pacientes atendidos no centro de referência em hanseníase e dermatologia sanitária da Universidade Federal de Uberlândia, CREDESH-UFU”

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Linha de Pesquisa: Imunopatologia e Alergia

Às 9 horas e 30 minutos do dia 29 de setembro do ano de 2017 no Anfiteatro do Bloco 8C - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta: Profa. Dra. Silvia Regina Costa Dias – CENTRO UNIV. ESTÁCIO/JUIZ DE FORA-MG, Dra. Renata Cristina de Paula – PÓS-DOC/UFU e Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da banca Dr. Sydnei Magno da Silva apresentou a comissão examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público e concedeu ao(à) discente a palavra para exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais.

Em face do resultado obtido, a banca examinadora considerou o(a) candidato(a) aprovado(a).

Esta defesa de dissertação é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre(a). O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, legislação e regulamentação interna da UFU, e do Conselho de Pós-graduação e Pesquisa desta Universidade.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 12 horas e 15 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela banca examinadora.

SecDias

Profa. Dra. Silvia Regina Costa Dias – CENTRO UNIV. ESTÁCIO/JUIZ DE FORA/MG

Renata Cristina de Paula
Dra. Renata Cristina de Paula – ICBIM/UFU

Sydnei Magno da Silva
Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva – ICBIM/UFU (orientador)

"É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada certa. Mas a
graça das graças é não desistir nunca" *Dom Hélder Câmara*

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, a ele todo poder, honra e glória para sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por permitir que tudo isso aconteça em minha vida e por ser meu refúgio sempre, principalmente nas horas mais difíceis.

Aos meus pais Isabel e João e minha irmã Flávia pelo amor, carinho, apoio e confiança.

Ao meu esposo Roger pelo amor, compreensão, companheirismo, apoio e carinho que me ajudaram a seguirem frente.

Ao Professor Sydnei por me receber como sua orientanda, pelos inúmeros ensinamentos, pela paciência, confiança, auxílio, compreensão e pela amizade.

A Professora Michelle por ter aceitado me co-orientar neste projeto, obrigada pelo apoio e incentivo.

A Juliana Miranda, pela apoio diário, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Dificilmente conseguiria concluir este projeto sem toda sua ajuda, aprendi muito com você.

Ao colaborador deste projeto Prof. Wagner Tafuri pela parceria e por ter se disponibilizado na realização dos testes imunohistoquímicos.

A Dra. Isabela Goulart e toda a equipe do CREDESH pela disponibilização das amostras e apoio na coleta de dados os quais foram essenciais para realização deste trabalho.

A Dra. Ceres Luciana pela ajuda na interpretação dos dados do sequenciamento gênico.

Aos colegas do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* Iasmin, Eliane, Gabriela, Marco, Karen, a minha prima Tamires e á Renata pela colaboração nos experimentos, apoio, e principalmente pela amizade e convivência diárias que deixaram os dias mais leves e mais divertidos.

Aos pacientes por aceitarem a fazer parte desta pesquisa.

As empresas financiadoras pelo apoio financeiro que viabilizou a execução deste trabalho.

A Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas pela oportunidade fornecida para o desenvolvimento desta dissertação.

RESUMO

A leishmaniose representa um complexo de doenças parasitárias com altas taxas de morbimortalidade que estão extremamente associadas à pobreza. O diagnóstico definitivo de LTA é baseado em dados clínicos e epidemiológicos associados ao diagnóstico laboratorial. O PCR provou ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico da leishmaniose, porque é mais rápido e mais sensível do que os métodos convencionais e pode identificar as espécies em diferentes amostras clínicas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da PCR para o diagnóstico da LTA, identificar as espécies *Leishmania* em amostras de pacientes atendidos pelo Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia. Um total de 37 amostras de pele coletadas de pacientes com lesões cutâneas sugestivas de LTA foram submetidas ao diagnóstico de IHC e PCR e posterior análise de PCR-RFLP de amostras positivas. Foram utilizadas dez amostras positivas para Hanseníase e negativas para *Leishmania* (teste de pele de Montenegro e resultados negativos de IHC) para testar a ausência de anelamento dos iniciadores com *Mycobacterium leprae*. Por consenso, um resultado foi considerado positivo quando pelo menos três das cinco técnicas de diagnóstico testadas foram positivas, resultando em 30 (73%) amostras consideradas positivas e 11 como negativas (27%). A IHC mostrou menor sensibilidade e NPV quando comparado com os outros três testes de PCR, mas apresentou alta especificidade e PPV. Os valores de sensibilidade, especificidade, PPV e VPL para os iniciadores 13A / 13B e L150 / 152 foram de 80% e 100% e 90% e 100%, 100 e 100%, 50% e 66,6%, respectivamente. Os primers HSP70 e LITS1 / L5.8S apresentam resultados semelhantes atingindo 100% de sensibilidade, especificidade, VPL e PPV. Os quatro ensaios de PCR apresentaram melhores resultados para o diagnóstico de ATL quando comparados ao IHC e outros métodos rotineiramente utilizados. A identificação de espécies através de PCR-RFLP foi capaz de identificar as quatro espécies propostas neste estudo *L.braziliensis*, *L. amazonensis*, *L.guyanensis* e *L.infantum*. Em conclusão, os ensaios PCR-RFLP de ITS1 e HSP70 foram capazes de diagnosticar e identificar o agente causador de LTA com alta sensibilidade e especificidade, no entanto, o HSP70 PCR-RFLP mostrou maior aplicabilidade na rotina diagnóstica de LTA no Brasil devido à sua alta sensibilidade, especificidade e características operacionais.

ABSTRACT

Leishmaniasis represents a complex of parasitic diseases with high rates of morbimortality which are extremely associated with poverty. The definitive diagnosis of ATL is based on clinical and epidemiological data associated to the laboratory diagnosis. PCR has proved to be a valuable tool in the diagnosis of leishmaniasis, because it is a faster and more sensitive than conventional methods, and can identify the species in different clinical samples. The objective of this study was to evaluate the efficacy of PCR for the diagnosis of ACL, to identify *Leishmania* species in samples from patients attended by the National Reference Center on Leprosy and Sanitary Dermatology, Federal University of Uberlândia. A total of 37 skin samples collected from patients with skin lesions suggestive of ATL and four suspects were submitted to the diagnosis of IHQ and PCR and subsequent PCR-RFLP analysis of positive samples. A total of 37 skin samples collected from patients with cutaneous lesions suggestive of ATL were submitted to IHC and PCR diagnosis, following by PCR-RFLP analysis of positive samples. Ten samples positive for leprosy and negative for *Leishmania* (Montenegro Skin test and IHC negative results) were used for test the absence of primers annealing with *Mycobacterium leprae*. By consensus a result was considered as positive when at least three of the five diagnostic techniques tested were positive, resulting in 30 (73%) samples considered positives and 11 as negative (27%). IHC showed the lower sensitivity and NPV when compared with the other three PCR tests, but it showed high specificity and PPV. The values of the sensitivity, specificity, PPV and NPV for the primers 13A/13B and L150/152 were 80% and 100%, and 90% and 100%, 100 and 100%, 50% and 66.6%, respectively. The primers HSP70 and LITS1/L5.8S present similar results reaching 100% of sensitivity, specificity, NPV and PPV. The four PCR assays presented better results for ATL diagnosis when compared to the IHC and the others methods routinely used. The identification of species through PCR-RFLP was able to identify the four species proposed in this study *L.braziliensis*, *L. amazonensis*, *L.guyanensis* and *L.infantum*. In conclusion, ITS1 and HSP70 PCR-RFLP assays were able to diagnosing to identify the ATL causative agent with high sensitivity and specificity, however, the HSP70 PCR-RFLP showed better applicability in the diagnostic routine of ATL in Brazil due to its high sensitivity, specificity and operational characteristics.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Principais formas clínicas de leishmaniose tegumentar e espécies de *Leishmania* relacionadas.....7
- Quadro 2.** Sequência dos iniciadores e principais condições das reações de PCR.....20
- Quadro 3.** Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e índice kappa determinado pela análise dos resultados da IHQ e de quatro ensaios de PCR.....37
- Quadro 4.** Representação de todas as amostras avaliadas, testes realizados e seus resultados.....60

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1. Representação do ciclo evolutivo de <i>Leishmania spp.</i>	3
Figura 2. Casos de leishmaniose tegumentar por município, Brasil.....	10
Figura 3. Gel de acrilamida 6% demonstrando o limite de detecção dos iniciadores HSP70 direto e reverso em DNA extraído de cultura axênica de <i>L. braziliensis</i>	24
Figura 4. Gel de acrilamida 6% demonstrando o limite de detecção dos iniciadores LITSR/L5.8S (LITS1) em DNA extraído de cultura axênica de <i>L. braziliensis</i>	25
Figura 5. Gel de Poliacrilamida 6% representativo com o produto da amplificação da PCR utilizando os iniciadores LITSR/L5.8S (LITS1), HSP70 direto/HSP70 reverso (HSP70) , L150/152 e 13A/13B utilizando DNA extraído de cultura axênica de <i>Leishmania</i>	26
Figura 6. Gel de Poliacrilamida 6% representativo da amplificação com o iniciador de β -ACTH.....	26
Figura 7. Gel de Poliacrilamida 6% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores L150/152.....	27
Figura 8. Gel de Poliacrilamida 6% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores HSP70 direto e reverso.....	28
Figura 9. Gel de Poliacrilamida 6% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores LITS1/L5S8.....	29
Figura 10. Sequências gênicas referentes ao gene da proteína HSP70 de quatro espécies de <i>Leishmania</i> (<i>L. braziliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> , <i>L. guyanensis</i> e <i>L. infantum</i>) e o número de acesso no GenBank.....	31
Figura 11. Gel de Poliacrilamida 6%, in silico, representando o perfil de bandas esperado para a reação PCR-RFLP HSP70.....	32
Figura 12. Representação dos testes diagnósticos que os pacientes foram submetidos e seus resultados.....	36

Gráfico 1. Frequência e percentual das espécies identificadas na RFLP utilizando o produto das amostras positivas para <i>Leishmania</i> na PCR-HSP70.....	29
Gráfico 2. Frequência e percentual das espécies identificadas na RFLP utilizando o produto das amostras positivas para <i>Leishmania</i> na PCR-ITS1.....	30
Gráfico 3. Percentual da localização das lesões dos 37 pacientes com lesões sugestivas de LTA.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM :antimoniato de meglumina

BSA: *Bovine serum albumine*

CREDESH: Centro de Referência em Hanseníase e Dermatologia Sanitária

LC: Leishmaniose cutânea

LM: Leishmaniose mucocutânea

LT: Leishmaniose tegumentar

LV: Leishmaniose visceral

MST : Teste de Montenegro

OMS: Organização Mundial de Saúde

q.s.p.: quantidade suficiente para

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmanioses	1
1.2. Controle das Leishmanioses	4
1.3. Leishmaniose Tegumentar	5
1.3.1. Características Clínicas	6
1.4. Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil	9
1.5. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	11
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Declaração Ética	17
4.2. Amostras	17
4.3. Caracterização Molecular	18
4.3.1. Extração de DNA	18
4.3.2. PCR	18
4.3.3. Reações de <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	21
4.4. Sequenciamento gênico	21
4.5. Imuno-histoquímica	22
4.6. Levantamento Clínico-Epidemiológico	23
4.7. Análise Estatística	23
5. RESULTADOS	24
5.1. Caracterização Molecular	24
5.1.1. PCR	24

5.1.3. RFLP	27
5.2. Sequenciamento gênico	30
5.3. Imuno-histoquímica	33
5.4. Dados Clinicoepidemiológicos	33
5.3.1. Teste de Montenegro e Anatomopatológico	36
5.5. Avaliação dos Métodos Diagnósticos	36
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE	62
ANEXO	63

1.Introdução

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses representam um complexo de doenças parasitárias graves e negligenciadas que apresentam grande diversidade epidemiológica (WHO, 2010, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) essa enfermidade é a segunda afecção parasitária de maior relevância para a saúde pública, depois da malária (WHO, 2010; DESJEUX, 2004).

Estimativas apontam que 14 milhões de pessoas em 98 países e territórios sofram com a leishmaniose, além disso, cerca de 350 a 400 milhões encontram-se em risco de serem infectadas (WHO, 2010). Ainda segundo esses dados, a incidência anual das leishmanioses é de aproximadamente 1,5 a 2,0 milhões de pessoas infectadas. Deste total, um milhão de casos correspondem a forma tegumentar e 200.000 - 400.000 da forma visceral, da qual cerca de 59 mil casos evoluem para o óbito (WHO, 2013; ALVAR et al., 2012).

O protozoário causador das leishmanioses pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, como característica da ordem exibe um cinetoplasto pequeno em forma de bastão, o qual está localizado preferencialmente entre o núcleo oval e o maior volume de citoplasma, embora sua posição possa variar (COELHO et al., 2011). Essa organela cumpre a função de mitocôndria e contém material genético que é composto por dois componentes, o maxicírculo (30-50 cópias) e minicírculo (10.000-20.000 de cópias) (SIMPSON, 1986).

Os parasitos do gênero *Leishmania* estão divididos em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (ROSS, 1903). Tais subgêneros são determinados com base no comportamento do parasito no intestino do inseto vetor durante a metaciclogênese, sendo que o primeiro se desenvolve na parte média-anterior e o segundo no intestino posterior de onde migra para as regiões anteriores, respectivamente (BATES, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam em seu ciclo de vida as formas evolutivas promastigota e paramastigota encontradas no tubo digestivo do inseto vetor, e amastigota, observada no interior das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) dos hospedeiros vertebrados (BATES, 2008; WHO, 2010). Por pertencerem ao filo Sarcomastigophora, tais parasitos apresentam um flagelo durante todo seu ciclo evolutivo. O flagelo é uma estrutura celular, que além de fornecer um meio de locomoção, também está envolvido em mecanismos de aderência ao intestino do inseto vetor. As formas promastigotas e paramastigotas apresentam motilidade, as amastigotas não são móveis, mas possuem um flagelo rudimentar não aparente (BATES, 2008).

De acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida, com os hospedeiros invertebrados e reservatórios, as leishmanioses podem apresentar caráter antroponótico ou zoonótico, onde os principais reservatórios do parasito são membros das ordens: Carnivora (cães e gatos), Rodentia (ratos e outros roedores), Primatas (humanos e não humanos), Marsupialia (gambás), Cingulata (tatus), Pilosa (preguiças e tamanduás) e Chiroptera (morcegos)(GRAMICCIA; GRADONI, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; ROQUE; JASEN, 2014). A exceção dos locais onde possui perfil antroponótico, como nos países do subcontinente indiano, no Sudão, Sudão do Sul, Quênia e nordeste da China, por exemplo, as leishmanioses são zoonoses. Nesses casos, seres humanos têm uma suscetibilidade variada à doença e, embora não façam parte da cadeia de transmissão habitual, são acometidos acidentalmente pela infecção (DESJEUX, 2004; LAINSON et al., 1985; WHO, 2010).

A transmissão do parasito dá-se através do repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor, os flebotomíneos, que pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (BATES, 2007; PIGOTT et al., 2014; ROGERS, 2004). No Velho Mundo, as leishmanioses são transmitidas por flebotomíneos do gênero *Phlebotomus*, enquanto que no Novo Mundo são transmitidas por insetos do gênero *Lutzomyia* (SHOWLER; BOGGILD, 2015; WHO, 2010).

Por apresentar dois hospedeiros, o ciclo evolutivo é considerado heteroxênico (LAINSON; SHAW,1978). Após o inseto vetor realizar o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, ele ingere as formas amastigotas presentes nas células do SMF. No intestino do flebotomíneo, as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas flageladas, que se aderem ao epitélio luminal e replicam intensamente (BATES, 2007). As promastigotas passam por um processo de metaciclogênese no tubo digestivo do flebotomíneo, onde ocorrem mudanças morfológicas e fisiológicas, originando as formas promastigotas metacíclicas infectantes (SACKS, 1989). Essas formas se direcionam para a cavidade bucal do inseto (denominada probóscide), e durante o repasto sanguíneo são inoculadas e regurgitadas na solução de continuidade provocada pela picada (BATES, 2008; HARHAY et al., 2011; SACKS; SHER, 2002;). Após serem internalizadas pelos fagócitos do hospedeiro vertebrado, as promastigotas transformam-se novamente em

A LC pode apresentar diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LD) (SILVEIRA et al., 2004). No Brasil, onde a LC também é conhecida como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), são descritas sete espécies de *Leishmania* como agentes etiológicos: *L. (V.) brazilliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis*. No país, a *L. (V.) braziliensis* é o principal agente causal da LTA (LAINSON et al., 1987; SILVEIRA et al., 2002).

1.2. Controle das Leishmanioses

Devido ao complexo ciclo de transmissão que envolve o hospedeiro humano, o parasito, o vetor e, em alguns casos, o reservatório animal, a prevenção e o controle das leishmanioses requer uma combinação de estratégias de intervenção. As principais estratégias de prevenção e controle envolvem a detecção precoce e o tratamento imediato dos casos, o controle vetorial, a vigilância eficaz da doença, o controle dos reservatórios animais, a mobilização e a educação da comunidade (WHO, 2017).

O controle do vetor usando pulverização interna das habitações com inseticidas é determinado pelo comportamento das espécies de flebotomíneos presentes em cada área. Entretanto, por razões logísticas e de custo, a pulverização periódica de paredes como estratégia de controle é difícil de sustentar ao longo do tempo (ALVAR, 2006).

As ações voltadas para o diagnóstico oportuno e o tratamento adequado dos casos são as formas mais efetivas de controle. Dentre essas, a quimioterapia é considerada a principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem (WHO, 2010). Os fármacos de primeira escolha são derivados do antimônio pentavalente que, apesar de serem potencialmente tóxicos, têm sido utilizados por mais de 70 anos no tratamento das leishmanioses (WHO, 2010). Além de apresentar toxicidade, os antimoniais possuem diversos efeitos adversos como dor no local da aplicação, mialgia, náuseas, artralgia, vômitos, dor abdominal, prurido, fraqueza, cefaléia, febre, insônia, edema, nervosismo, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e insuficiência renal aguda que podem dificultar a adesão do paciente ao tratamento (FRÉZARD et al., 2009, ALMEIDA e SANTOS, 2011).

Além dos antimoniais, OMS (2010) aponta com opções de tratamento sistêmico das leishmanioses anfotericina b, pentamidina, sulfato de paromomicina, miltefosina e

cetoconazol, e orienta que existem diferentes respostas ao tratamento nas diferentes espécies e regiões geográficas, e em alguns casos indica a associação de drogas para o tratamento.

No Brasil e na maior parte dos países acometidos pela LV, o antimoniato de meglumina (AM), droga de primeira escolha, é utilizado em doses de 20mg/kg/dia, com aplicação endovenosa (EV) ou intramuscular (IM), por no mínimo 20 e no máximo 40 dias. Em alguns países como a Índia e o Nepal, cerca de 60% dos pacientes com LV não apresentam resposta satisfatória ao tratamento com esse fármaco, e nesses casos a droga recomendada é a anfotericina B lipossomal (WHO, 2010, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Ministério da Saúde do Brasil recomenda que o tratamento dos pacientes com LTA seja indicado de acordo com a forma clínica, com o apoio do diagnóstico laboratorial e obedecendo aos critérios estabelecidos para cada situação. A recomendação da droga para os pacientes com LCL deve considerar a espécie da *Leishmania* infectante, observando as evidências preexistentes sobre a circulação do parasito no local provável de infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

No tratamento das formas LCL (causada por *L. braziliensis* e outras espécies, exceto *L. guyanensis*), LM e LD recomenda-se como primeira escolha o AM. A dose pode variar entre 10 mg e 20 mg Sb+5/ kg/dia, sugerindo-se 15 mg Sb+5/kg/dia durante 20 dias seguidos e, caso haja necessidade, o esquema terapêutico deverá ser repetido (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Para pacientes gestantes, quando não for possível adiar o tratamento para após o parto, e pacientes com idade a partir de 50 anos, insuficiência renal, cardíaca e hepática e transplantados renais, recomenda-se, como primeira escolha, a anfotericina B lipossomal, na dose de 2 mg a 3 mg/kg/dia. A outra opção terapêutica é o desoxicolato de anfotericina B, como droga de segunda escolha nesses casos. Para o tratamento da LCD e LCL (áreas com predomínio de *L. guyanensis*) recomenda-se preferencialmente o uso de isotiocianato de pentamidina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

1.3. Leishmaniose Tegumentar

Segundo a OMS a LC é considerada uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pela sua capacidade de produzir deformidades, seu impacto psicológico e econômico. Dos 0,7 a 1,3 milhões de casos essa forma clínica, cerca de 90% são registrados

no Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Brasil (DESJEUX, 2004;WHO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A LC geralmente não leva a morte dos pacientes infectados, visto que as lesões, úlceras e nódulos geralmente evoluem para a cura. Entretanto, os danos teciduais são permanentes, o que dependendo do tamanho e local, podem atuar como estigma estético e afetar a vida do portador (DU et al., 2016). Cerca de 2,4 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (*DALYs* – do inglês *disability-adjusted life years*) são perdidos devido a LC e a LV mundialmente, 946.000 em homens e 1.410.000 em mulheres (ALVAR et al., 2006). Apesar dos números para LC ainda estarem em avaliação, Murray e colaboradores (2015) apontam que somente a LC leva a perda de aproximadamente 42 mil *DALYs*.

1.3.1. Características Clínicas

O primeiro sinal clínico da LC tipicamente é um pequeno eritema no local onde o flebotômico realizou o repasto sanguíneo (AMEEN, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A lesão ulcerada é precedida por uma mácula, que perdura de um a dois dias depois da picada infectante. O aparecimento das lesões cutâneas ocorre após um período pré-patente variável (entre duas semanas a três meses) após a picada e geralmente são encontradas em partes mais expostas do corpo como o rosto, braços e pernas (GOTO; LINDOSO, 2010). Após este período de incubação, o eritema dá origem a uma pequena pápula ou nódulo eritematoso, que aumenta progressivamente produzindo, geralmente, uma úlcera (AMEEN, 2010).

A úlcera clássica da LC é geralmente indolor com formato arredondado ou ovalado, o tamanho varia de alguns milímetros até alguns centímetros, apresentam bordas aumentadas bem delimitadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras, e base eritematosa, infiltrada e de consistência firme (FERNANDES et al., 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A lesão pode progredir para a cura espontaneamente ou evoluir, geralmente após alguns meses (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010). Os pacientes infectados podem apresentar uma ou várias lesões que, dependendo das espécies de *Leishmania*, podem progredir em nódulos eritematosos, secos ou acompanhados de exsudato (DAVID; CRAFT, 2009).

As espécies de *Leishmania* que tipicamente causam as diferentes formas clínicas de LC em seres humanos estão listadas no Quadro 1.

Quadro 1. Principais formas clínicas de leishmaniose tegumentar e espécies de *Leishmania* relacionadas

Forma Clínica	Espécies Causadoras	Manifestação Clínica
Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	<i>L. (L.) major</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (L.) tropica</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (V.) panamanensis</i> , <i>L. (L.) infantum</i> , <i>L. (L.) donovani</i> ,	Número único ou limitado de lesões; Úlceras formadas, secas ou exsudativas com borda elevadas. Númeroparasitos moderadas em biópsias da borda da lesão. Teste de Montenegro positivo.
Leishmaniose Mucosa (LM)	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamanensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> .	Lesões altamente inflamatórias envolvendo mucosas; Pode ser desfigurante. Parasitos raros presentes em biópsias; Reação forte ao teste de Montenegro.
Leishmaniose Cutânea Difusa Anérgica	<i>L. (L.) amazonensis</i> , <i>L. (L.) mexicana</i> , <i>L. (V.) pifanoi</i> , <i>L. (L.) aethiopica</i> , <i>L. (L.) major</i> .	Nodular múltiplo, disseminado, lesões não ulcerativas; Muitos parasitos nas lesões; Resposta ausente no teste de Montenegro.
Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD)	<i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L. (V.) panamanensis</i> , <i>L. (V.) guyanensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> .	Numerosas lesões papulares/ acneiformes em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, comumente envolvendo membranas mucosas. Poucos parasitos em Lesões; Reação forte ao teste de Montenegro.

Adaptada de SCORZA et al.,2017.

A LCL representa a forma mais frequente da doença, variando entre uma e múltiplas lesões. Os agentes etiológicos são parasitos dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, *L. braziliensis*, no entanto, é considerado como o parasito mais importante associado a esta forma de doença nas Américas. A lesão geralmente é uma úlcera redonda e indolor, que está bem delimitada com uma crosta central, às vezes é hemorrágica. Pode curar

espontaneamente, deixando uma cicatriz hipopigmentada, lisa e fina (GOTO E LINDOSO 2010).

Em lesões causadas por *L. amazonensis* verifica-se uma grande infiltração na borda da lesão, devido a um denso infiltrado de macrófagos vacuolados na derme que estão cheios de amastigotas, e que dão ao infiltrado a aparência de um granuloma macrofágico. Nos casos de LCL causados por *L. braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, as características histológicas demonstram uma infiltração mais modesta na pele e em que macrófagos e parasitos são geralmente escassos, e as células mais frequentes são os linfócitos e plasmócitos. Além da lesão ulcerada, alguns pacientes podem apresentar outros tipos de manifestações cutâneas como lesões vegetativas verrucosas, pápulas, nódulos e infiltrações (SILVEIRA et al., 2004).

A forma disseminada da LTA é uma expressão incomum, representa cerca de 2% dos casos. Esta síndrome é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares (podendo chegar a centenas) de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco. A história natural da doença nestes pacientes inicia com uma ou várias lesões localizadas com as características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. As duas principais espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são *L. braziliensis* e a *L. amazonensis*, embora a maioria dos casos relatados na literatura seja infecção por *L. braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). O processo de disseminação é relativamente rápido nos casos com infecção devido a *L. braziliensis* ou outras espécies do subgênero *Viannia*. Em dois ou três meses, podem aparecer uma centena ou mais pápulas eritematosas e/ou lesões cutâneas ulceradas. Em casos de evolução tardia (mais de um ano), alguns pacientes não tratados podem apresentar lesões cutâneas e mucosas simultaneamente, em 29% dos casos encontra-se uma lesão mucosa (GOTO; LINDOSO, 2010; SILVEIRA 2004).

A leishmaniose cutânea difusa disseminada é uma condição rara, e é caracterizada pela presença de lesões nodulares que não ulceram. As lesões são ricas em parasitos e as espécies envolvidas são *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* no Novo Mundo e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo (GOTO E LINDOSO 2010).

Esta forma clínica da doença é caracterizada por uma infiltração difusa da pele, com uma grande quantidade de nódulos, pápulas e placas infiltradas que raramente se tornaram ulceradas, raramente envolvem a nasofaringe e membranas mucosas. Nos casos mais antigos da doença, lesões disseminadas podem cobrir grande parte do corpo, mas são predominantemente nas extremidades. A característica histopatológica é a infiltração de

macrófagos contendo grande quantidade de amastigotas, já linfócitos e plasmócitos são raros (SILVEIRA 2004).

A LM, também conhecida como espundia, é caracterizada por envolvimento e destruição da mucosa do nariz, cavidade oral, faringe ou laringe e evoluindo potencialmente para lesões desfigurantes. A sintomatologia depende da localização das lesões e pode incluir obstrução nasal, dificuldades na deglutição, hemorragia local e rouquidão (COBO et al., 2016).

Esta forma clínica ocorre anos após o início da LC e pode estar acompanhada de lesões cutâneas. Na maioria dos casos o agente etiológico é a *L. braziliensis*, mas outras espécies também são encontradas: *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (GOTO; LINDOSO 2010).

Segundo Silveira e colaboradores (2004), na maioria dos casos do Brasil amazônico a LM resultou de uma doença antiga, prolongada e não tratada (autocura), causada por *L. braziliensis*. Nesta forma da doença a necrose do tecido mucoso nasofaríngeo está associada a uma forte resposta inflamatória das células T. A necrose das estruturas cartilagosas é a seqüela principal.

A importância da LM está na possibilidade de lesões destrutivas, desfigurantes e incapacitantes, com grandes repercussões no aspecto psicossocial do indivíduo. O envolvimento da mucosa da região dos lábios é muito incomum e é caracterizado clinicamente como um processo gradual em um ou ambos os lábios. Muitas vezes demonstram inchaço e uma pápula, nódulo ou placa que pode ser coberta por crostas (MOHAMMADPOUR, 2017).

1.4. Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição, é endêmica no Centro-Oeste, Sudeste, Norte e Nordeste, com registro de casos em todas as regiões do país, e na maioria dos casos pode ser considerada uma doença ocupacional (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Cerca de 26.008 casos/ano de LC foram relatados no Brasil no período 2003 a 2007, sendo que autores sugerem que esta média pode estar subestimada, e que a real incidência nesse período seria de 72.800 a 119.600 casos / ano (ALVAR et al., 2012).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) no ano de 2015, foram confirmados 20.187 casos de LTA no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Os estados Bahia, Pará e Mato Grosso foram que mais registraram casos em 2015 e Minas Gerais notificou 1.331 casos, sendo 1.070 autóctones, e Uberlândia sete casos, quatro autóctones (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

As regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba são consideradas endêmicas para a LTA. Registrou-se uma microepidemia de LTA, a partir de julho de 1987, caracterizada por um rápido surgimento de casos autóctones da doença, em especial nos Municípios de Uberlândia e Indianópolis (NISHIOKA et al.,1988; MACHADO et al.,1992).

A LTA ocorre em ambos os sexos e em todas as faixas etárias, entretanto, na média do país, predominam os maiores de 10 anos (92,5% do total de casos) e o sexo masculino (74%) no ano de 2014. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A figura 2 demonstra a distribuição de casos de LTA no Brasil, cada ponto representa um caso registrado no município no ano de 2015.



Figura 2. Casos de leishmaniose tegumentar por município, Brasil – 2015. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017

Devido aos padrões epidemiológicos, a variedade de vetores, reservatórios, ecossistemas, hospedeiros e agentes etiológicos da doença, medidas para o controle da LTA no Brasil são complexas e difíceis de serem estabelecidas (SILVEIRA et al., 2004, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Os aspectos epidemiológicos da LTA deverão ser considerados para definir as estratégias de controle da doença, uma vez que estes indicarão a necessidade da adoção de medidas de controle da doença. Destaca-se que o diagnóstico precoce e tratamento adequado dos casos humanos, bem como as atividades educativas, devem ser priorizados em todas as situações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

1.5. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana

O diagnóstico definitivo da LTA é baseado em dados clínicos e epidemiológicos associados ao diagnóstico laboratorial, que consiste principalmente de testes diretos, cultura em meios específicos e exames histopatológicos, e visam identificar diretamente o parasito. Os testes mais utilizados para o diagnóstico desta doença são a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), o teste de Montenegro (MST), o exame histopatológico e a reação em cadeia da polimerase (PCR) (FERREIRA, 2006; GOMES, 2014).

A identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção é muito importante para o conhecimento da epidemiologia das LTA e planejamento de estratégias de controle, principalmente em regiões onde as diferentes formas clínicas ocorrem simultaneamente (BAÑULS; PRUGNOLLE, 2007).

O teste de RIFI apresenta sensibilidade de 87-100% e especificidade de 77-100%. São utilizadas formas promastigotas como antígenos, a resposta de anticorpos é detectável muito cedo na infecção e torna-se indetectável de seis a nove meses após a cura, em média. Para realização dessa técnica, é necessário um microscópio de fluorescência, o qual restringe a utilização do teste para laboratórios de referência, além da necessidade de técnicos qualificados. É alta taxa de reatividade cruzada da RIFI com outros tripanossomatídeos, como *Trypanosoma cruzi* (ELMAHALLAWY et al., 2014).

A intradermoreação de Montenegro (MST) fundamenta-se na resposta de hipersensibilidade celular retardada, podendo ser negativa nas primeiras seis semanas após o surgimento da lesão cutânea, porém após esse período, o MST costuma ser positivo em mais de 90% dos pacientes. Um MST negativo em pacientes com lesões com mais de seis semanas de evolução indica a necessidade de outras provas diagnósticas para LTA e diagnóstico diferencial. Pacientes com LC costumam apresentar resposta exacerbada ao MST, entretanto na LCD, o MST geralmente é negativo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O MST representa o principal exame complementar para o diagnóstico da LTA em áreas endêmicas, possui sensibilidade variando entre 86 e 100% e especificidade de

aproximadamente 100%, porém, existem relatos de reação cruzada e de resultados falsos negativos quando a infecção é recente (JOSÉ et al.,2001).

O exame histopatológico é um método relativamente rápido, barato e amplamente disponível. Esta abordagem pode ser específica para a detecção de alguns microrganismos e pode ajudar a estabelecer outros diagnósticos diferenciais, como neoplasias cutâneas. Entretanto, no caso da LTA, a principal limitação deste método diagnóstico é a baixa sensibilidade (QUINTELLA et al.,2012).

As características histopatológicas da LTA correspondem a um granuloma difuso que difere de acordo com o estágio da infecção e o tipo clínico. Em aproximadamente 80% dos casos, os granulomas epiteliais de células gigantes e linfócitos estão presentes. O diagnóstico é realizado através da identificação de amastigotas (BARI; RAHMAN, 2006).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) tornou-se um dos mais importantes técnicas para o diagnóstico de várias doenças, e tem sido empregada para o diagnóstico da LTA no Brasil por ser mais sensível que os testes histológicos convencionais (ALVES et al., 2013).

A eletroforese de enzima multilocus é considerada o método padrão-ouro para a identificação de espécies de *Leishmania*. No entanto, este método tem a desvantagem da necessidade de isolar e cultivar os parasitos, o que pode impedir e/ou atrasar a identificação (DA SILVA, 2010).

De maneira geral, as técnicas de diagnóstico da LTA têm muitas limitações. Exames microscópicos de raspados de pele são rápidos e de baixo custo, entretanto demonstram limitações com relação à sensibilidade, o MST apesar de boa especificidade não distingue entre infecções atuais e passadas, e as técnicas sorológicas apresentam baixa sensibilidade além da possibilidade de reatividade cruzada. As técnicas moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), oferecem uma abordagem alternativa para encontrar os parasitos em diferentes amostras clínicas (OLIVEIRA et al., 2011).

A PCR tem provado ser uma ferramenta valiosa no diagnóstico das leishmanioses, pois se trata de um método rápido e mais sensível do que os métodos convencionais, além de identificar as espécies de parasitos em diferentes amostras clínicas de seres humanos, reservatórios e vetores, como sangue, nódulos linfáticos, raspado conjuntival, urina e lesões cutâneas (GUALDA et al., 2015).

A amplificação de sequências gênicas do kDNA dos minicírculos (~10.000 cópias por célula) e da subunidade menor do DNA ribossomal (SSUO rDNA) (40-200 cópias por

célula) têm sido largamente utilizados para o diagnóstico etiológico da LTA através da PCR, incluindo em amostras que contém pequenas quantidades de DNA do parasito, demonstrando altos índices de sensibilidade. Entretanto, estes alvos identificam os parasitos apenas em nível de gênero ou sub-gênero (AMPUERO et al., 2009; DE ANDRADE 2004; KOLTAS 2009; VOLPINI 2006; LACHAUD et al.,2003; MOUTTAKI et al., 2014; SCHÖNIAN et al., 2011).

Rodgers et al. (1990) foram um dos pioneiros a descrever a PCR utilizando o kDNA como alvo para o diagnóstico de *Leishmania* sp. Os autores, compararam sequências de minicírculos de diferentes espécies de *Leishmania*, identificando uma região de aproximadamente 200pb que é conservada sendo, portanto, um alvo para o diagnóstico das leishmanioses (RODGERS et al., 1990).

De Grave et al. (1994) também descreveram a PCR com amplificação do kDNA, utilizando uma sequência de oligonucleotídeos de 120pb com alta sensibilidade para detecção das espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.

A PCR seguida pela RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) – PCR-RFLP– é um método sensível que possibilita a distinção entre as espécies de *Leishmania* em diferentes tipos de amostras (TELES et al., 2015). A determinação da espécie de *Leishmania* utilizando enzimas de restrição tem sido descrita como um método mais barato e mais rápido do que o sequenciamento do produto da PCR (ROTUREAU et al., 2006).

As proteínas de choque térmico (*hsp*) são proteínas essenciais que garantem a viabilidade da célula, destacando a família Hsp70 que é ubíqua e altamente conservada em vários organismos, pois está presente em todos os compartimentos celulares. As *hsp70* estão envolvidas na resposta ao estresse e afetam diretamente a sobrevivência de *Leishmania* durante a adaptação do vetor ao hospedeiro (DORES-SILVA, 2017).

Autores têm utilizado o gene HSP70 em estudos de identificação e variabilidade genética de *Leishmania*, com base na avaliação do polimorfismo por RFLP, com resultados satisfatórios que demonstram a capacidade da técnica em distinguir entre as espécies do parasito (DA SILVA et al., 2010; GARCIA et al., 2004, 2005, 2007).

Graça e colaboradores (2012), desenharam um par de iniciadores para amplificação de uma região conservada do gene HSP70 de *Leishmania*, variando de 234 a 384pb, e avaliaram a possibilidade de distinguir entre espécies do parasito através da digestão do produto da PCR com enzimas de restrição. Foram utilizadas 70 cepas (incluindo cepas de referência) de várias espécies de *Leishmania*, e os autores concluíram que este par de

iniciadores, além da capacidade de detectar *Leishmania* em amostras clínicas, podem também discriminar entre todas as espécies do parasito que circulam no Brasil através da PCR-RFLP.

Schönian e colaboradores (2003) descreveram uma reação de PCR para o diagnóstico das leishmanioses, utilizando a amplificação do espaçador transcrito interno ribossomal 1 (ITS1) e identificação das espécies por RFLP (PCR-RFLP ITS1). A PCR-RFLP ITS1 utilizando diferentes enzimas de restrição como *RsaI* e *HaeIII* tem sido utilizado para identificação de espécies de *Leishmania* no Velho e Novo Mundo em estudos de polimorfismos e a maioria das espécies são distinguidas por esta técnica (CUPOLILLO et al., 2003; DA SILVA et al., 2010; EL TAI et al., 2001; GARCIA et al., 2002; MONROY-OSTRIA et al., 2014; ROTUREAU, 2006).

Alguns estudos demonstraram que o PCR-RFLP utilizando primers de kDNA também foram capazes de diferenciar algumas espécies de *Leishmania* de pacientes humanos e caninos (DE ANDRADE, 2004; VOLPINI, 2006).

Os métodos utilizados na rotina de diagnóstico da leishmaniose de uma maneira geral apresentam alta especificidade, porém baixa sensibilidade, os protocolos de PCR aumentaram a velocidade e a sensibilidade do diagnóstico da leishmaniose em comparação com as técnicas convencionais e a sua inclusão como um dos métodos diagnósticos na rotina de sistema públicos de saúde poderia ser muito benéfico, entretanto as abordagens moleculares permanecem caras e exigem conhecimentos tecnológicos, esforços são necessários para tornar as técnicas de PCR mais econômicas e fáceis de usar, especialmente em áreas onde a leishmaniose é endêmica. (REITHINGER; DUJARDIN, 2007)

2. Justificativa

O Centro de Referência em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia - CREDESH-UFU, criado em outubro de 2009, é um centro de referência nacional, que atende pacientes do estado de Minas Gerais de outros estados. Atua em pesquisas básicas aplicadas e operacionais e na assistência em todos os níveis de complexidade do SUS em hanseníase e dermatoses de interesse sanitário.

Em 2014 foi estabelecida uma parceria entre o CREDESH-UFU e o Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICBIM-UFU e, a partir de então, amostras de lesões dos pacientes com suspeita de LTA são encaminhadas ao Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* para o diagnóstico molecular e subsequente identificação das espécies de *Leishmania*.

A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato, pois a doença pode ser inicialmente confundida com outras dermatoses levando a um diagnóstico errôneo e tratamento inadequado. Por isso, a opção por técnicas mais específicas e sensíveis torna-se fundamental para um diagnóstico acurado.

O conhecimento das espécies envolvidas na infecção também é de suma importância para determinar o protocolo de tratamento mais adequado, principalmente em casos de recidivas, uma vez que algumas espécies de *Leishmania* podem apresentar maior resistência aos medicamentos.

Os protocolos de tratamento atualmente utilizados para LTA são potencialmente tóxicos e podem gerar vários eventos adversos, além disso, o tratamento oportuno e adequado é de grande importância para prevenir a evolução da doença para formas mais destrutivas e graves. Portanto, o presente estudo se faz necessário devido a necessidade de se investigar métodos diagnósticos mais sensíveis que possibilitem identificar as espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção.

Espera-se que esses resultados proporcionem um avanço no estudo sobre o diagnóstico da LTA, aumentando a eficácia, reduzindo o custo e tempo do tratamento dos pacientes atendidos no CREDESH/UFU.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia da PCR para o diagnóstico da LTA e identificar as espécies de *Leishmania* em amostras de pacientes atendidos pelo Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Objetivos Específicos

- Realizar o diagnóstico molecular e imuno-histoquímico para LTA em amostras de pacientes atendidos no CREDESH/UFU, no período de 2014 a 2017;
- Identificar as espécies de *Leishmania* envolvidas nos casos confirmados de LTA;
- Comparar os resultados dos métodos utilizados no diagnóstico da LTA na rotina de atendimento do CREDESH/UFU;
- Caracterizar o perfil clínico epidemiológico dos casos de LTA atendidos pelo CREDESH-UFU, no mesmo período.

4. Material e Métodos

4.1. Declaração Ética

Esta pesquisa foi realizada seguindo os preceitos éticos e legais e foi aprovada pelo Comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia – CEP-UFU, CAE: 65736416.2.0000.5152 (ANEXO 1).

4.2. Amostras

Para realização deste trabalho foram utilizadas 51 amostras, sendo que 37 eram amostras de pele de pacientes com lesões sugestivas para LC, a maioria proveniente de áreas endêmicas, atendidos na rotina do CREDESH-UFU no período de 2014 a 2017; dez amostras de DNA extraído de pacientes com hanseníase sem sinais clínicos de LTA apresentando resultados negativos em MST e IHQ para *Leishmania* as quais pertenciam ao biobanco de DNA CREDESH / UFU; e quatro amostras de DNA de pacientes com suspeita de leishmaniose visceral atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) em 2016 provenientes do biobanco de DNA do laboratório de bioensaios em *Leishmania* as quais foram incluídas no estudo como controles para a espécie *L. infantum*.

As amostras de pele dos 37 pacientes com lesões cutâneas sugestivas de LTA foram coletadas do local da lesão por biópsia no CREDESH-UFU por profissionais habilitados. Foram encaminhados ao Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* dois fragmentos de pele de 31 destes pacientes, uma para realização dos ensaios de PCR, que foi conservado em nitrogênio líquido e a outro para realização de IHQ, conservado em solução de formalina tamponada a 10% até a sua utilização. Em seis dos 37 pacientes não foi possível a coleta de dois fragmentos de pele devido ao local da lesão que impossibilitava a coleta, para cada um destes foi encaminhada apenas uma amostra de pele e foram utilizadas para a realização dos ensaios de PCR, portanto para estes pacientes não foi realizada a IHQ.

Dentre estes 37 pacientes com lesões suspeitas de LTA, 25 realizaram o MST e 30 foram submetidos a biópsia para realização de anatomopatológico. Estes procedimentos foram realizados no CREDESH-UFU como parte da rotina de atendimento.

4.3. Caracterização Molecular

A caracterização molecular das amostras de pele colhidas no CREDESH – UFU foi realizada no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* sobre a supervisão do Prof. Dr. Sydney Magno da Silva, coordenador do projeto.

4.3.1. Extração de DNA

Cerca de 20mg de cada amostra de pele foi utilizada para realização da extração de DNA. A extração foi realizada empregando-se o kit de extração Nucleo Spin Tissue® (Macherey Nagel Ink, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi eluído em 100 µl de tampão de eluição (kit Nucleo Spin Tissue®) e, a concentração do DNA das amostras foi determinada por espectrofotometria (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). As amostras e foram, então, acondicionadas a -20°C até o momento das análises.

4.3.2. PCR

O DNA extraído das amostras de pele coletadas foi submetido à análise molecular utilizando quatro pares de iniciadores que amplificam sequências conservadas de genes das espécies do gênero *Leishmania*, a saber:

Os iniciadores 13A / 13B e L150 / 152 descrito por Rodgers et al. (1990) e Degraeve et al. (1994), respectivamente, que amplificam sequencias do DNA do minicirculo do cinetoplasto e geram um produto de 120 pb; os iniciadores HSP70 direto e reverso que amplificamum fragmento de 240 pb da proteína de choque térmico 70kDA de *Leishmania* como descrito por Graça et al. (2012) resultando num produto; e. os iniciadores LITSR / L5.8S descritos por Schönian et al. (2003), que amplificam um fragmento de 300-350 pb da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal (ITS1) (Quadro 2).

Em todas as reações, o DNA de *L. infantum* (MHOM/BR/1972/BH46), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/ M2903), *L. guyanensis* (MHOM/BR /1975/M4147) e *L. amazonensis* (IFLA/ BR/1967/ PH8), obtidos a partir de cultura axênica, foram utilizados como controles positivos, e substituição de DNA por água livre de nucleases como controle negativo da reação.

As reações de PCR foram realizadas utilizando o Kit “Go Taq® Green Master Mix” (Promega®, EUA), seguindo as instruções do fabricante e as condições de cada reação foram otimizadas para cada ensaio usando o DNA das cepas de referência de *Leishmania* (Quadro 2).

Para verificar o limite de detecção de DNA das reações foi realizada uma PCR com cada par de iniciadores utilizando diluições seriadas, na razão 2, de DNA de *Leishmania braziliensis* partindo da concentração de 1ng / µl a 0,01pg / µl (que correspondente a 10.0000 a 0,1 parasitos, respectivamente).

As PCRs foram realizadas em um volume final de 15 µl para o 13A / 13B, 10 µl para L150 / L152, de 25 µl para a PCR com o HSP70 e de 20 µl para LITSR / L5.8S e foram realizadas em termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Thermo Fisher Scientific Inc, EUA).

O par de iniciadores específicos (ACTB) foi desenhado usando o Primer Express Software for Real Time PCR versão 3.0 (Applied Biosystems, EUA) e usado para amplificar um fragmento de 102 pb da β-actina humana (Sequência de Referência NCBI: NM_001101.3) como um controle endógeno. Todas as amostras foram submetidas a PCR com este iniciador a fim de avaliar a qualidade da extração de DNA. Todos os iniciadores também foram testados nas dez amostras de DNA extraídas de pacientes com resultado positivo para hanseníase, a fim de verificar a ausência de resultados falsos positivos.

Quadro 2. Sequência dos iniciadores e principais condições das reações de PCR

Iniciadores	Sequência (5' para 3')	Alvo	Amplicon (pb)	Condições da PCR
13A/13B RODGERS, et al., 1990	Direto: GTG GGG GAG GGG CGT TCT Reverso: ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT	Sequência conservada do minicírculo cinetoplasto (kDNA)	120	100 nM de cada iniciador. Desnaturação Inicial: 95°C por 5 min; 30 ciclos (95°C por 30 seg; 63°C por 45 seg; 72°C por 30 seg); Extensão Final: 72°C por 5 min
L150/152 DEGRAVE et al., 1994	Direto: GGG KAG GGG CGT TCT SCG AA Reverso: SSS MCT ATW TTA CAC CAA CCCC	Sequência conservada do minicírculo cinetoplasto (kDNA)	120	50 nM de cada iniciador. Desnaturação Inicial: 95°C por 6 min; 30 ciclos (95°C por 1 min; 55°C por 35 seg; 72°C por 30 seg) Extensão Final: 72°C por 5 min
HSP70 direto/ HSP70 reverso GRAÇA et al., 2012	Direto: GGA GAG ATC GAG CGC ATG GT Reverso: TCC TTC GAC GCC TCC TGG TTG	Sequência conservada da proteína de choque térmico 70kDA	234	800 nM de cada iniciador. Desnaturação Inicial: 94°C por 5 min; 30 ciclos (94°C por 30 seg; 61°C por 1 min; 72°C por 30 seg) Extensão Final: 72°C por 8 min
LITSR / L5.8S SCHONIAN et al., 2003.	Direto: CTG GAT CAT TTT CCG ATG Reverso: TAG TAC CAC TTA TCG CAC TT	Sequência conservada da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal	300-350	750 nM de cada iniciador. Desnaturação Inicial: 95°C por 2 min; 35 ciclos (95°C por 20 seg ; 56°C por 30 seg; 72°C por 1 min) Extensão Final: 72°C por 6 min
β -ACTH	Direto: TTG CAT TCC AGG CTG TGC TAT C Reverso: CCT CGT AGA TGG GCA CAG TGT	β-actina humana	102	250 nM de cada iniciador. Desnaturação Inicial: 95°C por 5 min; 30 ciclos (95°C por 30seg; 62°C por 30 seg; 72°C por 1 min) Extensão Final: 72°C por 10 min

Cinco microlitros dos produtos das reações de PCR e três microlitros do padrão de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotec, Brasil) foram aplicados em géis de poliacrilamida 6% e submetidos à eletroforese em tampão TBE 1X, durante 60 minutos a uma tensão constante de 100 V. A seguir os géis foram fixados em solução de álcool etílico 10% v/v e ácido acético 0,5% v/v, corados em solução de nitrato de prata 0,1% p/v e os fragmentos de DNA evidenciados em solução reveladora de hidróxido de sódio 3% p/v e formaldeído 3% v/v (DA SILVA et al., 2009).

4.3.3. Reações de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Os produtos da PCR das amostras com resultado positivo para o gênero *Leishmania* foram submetidos à restrição enzimática utilizando a enzima de restrição *HaeIII* (Promega, EUA), que corta o DNA nos sítios GG[▼]CC CC[▲]GG do DNA, para determinação das espécies envolvidas nos casos clínicos.

A reação foi realizada de acordo com o protocolo do fabricante, brevemente descrito a seguir: 2µl dos produtos positivos na PCR genérica foram digeridos a 37 °C durante três horas com mix contendo 5U de enzima *HaeIII*, 0,2µl de BSA acetilado e água deionizada livre de nucleases *q.s.p.* 20µl.

Os produtos das reações de restrição foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e 10% conforme descrito no tópico 4.3.2 para a visualização do perfil de bandas correspondentes a cada espécie.

4.4. Sequenciamento gênico

Para confirmar se os perfis obtidos na RFLP-PCR após a digestão ou não dos produtos obtidos da PCR HSP70 seriam correspondentes à espécie *Leishmania*, o produto da amplificação de onze amostras positivas de pacientes (selecionadas de forma aleatória) e os quatro controles positivos utilizados nas reações de RFLP (*L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*) foram enviadas para sequenciamento gênico.

As amostras foram codificadas, e para cada reação de sequenciamento, foram utilizados 70 ng do produto da PCR-HSP70 (234 pb) DNA e 10 pmol do iniciador HSP70 direto em água ultra pura qsp 6 µl. As amostras foram encaminhadas a empresa Myleus Biotecnologia, Brasil, para o sequenciamento.

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar (ABI 3730 DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) e a qualidade das sequências obtidas foi analisada utilizando-se o software FinchTV 1.4 (disponível em <<http://www.dnabaser.com>>). As sequências geradas foram alinhadas utilizando o *MultAlin* (CORPET, 1988) e analisadas utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

4.5. Imuno-histoquímica

Das 37 amostras de pele encaminhadas para realização de testes moleculares no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania*, 31 foram encaminhadas ao Laboratório de Patologia das Leishmanioses (LPL) do Departamento de Patologia Geral do ICB, coordenado pelo professor Wagner Luiz Tafuri, colaborador deste projeto, para realização da IHQ. Os fragmentos de pele fixados em formol tamponado foram processados pela técnica de IHQ, de acordo com Alves et al. (2013), com modificações, cujos procedimentos básicos são citados a seguir.

Os fragmentos foram emblocados em parafina, para o processamento de cortes de 5mm de espessura em micrótomo, e as lâminas preparadas com três cortes de cada fragmento. Os fragmentos foram desparafinados em xilol por 60 minutos e hidratados em solução de álcoois decrescentes (álcool absoluto I e II, 90°, 80° e 70°, respectivamente), por três minutos cada e submetidos a um banho por cinco minutos em PBS (Solução de Tampão Fosfato 0,01M, pH 7,2).

Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena, pela adição de peróxido de hidrogênio 30 volumes a 4% por 30min, e realizado o bloqueio de interações inespecíficas com solução de bloqueio (PBS com leite em pó desnatado a 6% p/v). Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas com soro hiperimune de cão infectado com *L. infantum* e a seguir foi adicionado anticorpo biotilado (anti-soro de coelho biotilado anti-camundongo), na diluição de 1:100 (Link-DAKO, kit LSAB2, Dakocytomation Inc., EUA). Posteriormente foi feita nova incubação em câmara úmida e adição de estreptoavidina-peroxidase (Kit Link-DAKO). A revelação da peroxidase foi obtida pela adição de solução de diaminobenzidina (DAB) a 0,024% p/v em PBS e peróxido de hidrogênio 30 volumes a 0,16% v/v. A seguir as lâminas foram lavadas e coradas com hematoxilina de Harris, desidratadas, diafanizadas e montadas com bálsamo do Canadá. A leitura foi realizada em

microscópio óptico para a identificação da reação que corresponde à presença de formas amastigotas de *Leishmania*.

4.6. Levantamento Clínico-Epidemiológico

Foram coletados dados dos prontuários dos 37 pacientes com suspeita de LTA, atendidos no CREDESH/UFU no período de 2014 a 2017 para caracterização da epidemiologia dos casos atendidos. Os dados coletados incluem cidade de origem, sexo, idade, tratamento, ocorrência de recidivas, exames complementares que foram submetidos e seus resultados. A coleta e interpretação dos dados dos prontuários foram realizados com acompanhamento e supervisão da Dra. Isabela Goulart, coordenadora do CREDESH-UFU e colaboradora deste trabalho.

4.7. Análise Estatística

Para comparação dos cinco métodos diagnósticos utilizados foram calculados a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos (VPP), valores preditivos negativos (NPV) e índice Kappa (k). O nível de concordância (k) foi definido da seguinte forma: fraca (<0,0) Leve (0- 0,20), justo (0,21 - 0,40), moderado (0,41-0,60), substancial (0,61-0,80) e perfeito (0,81-1,00) (LANDIS, 1977). Para o cálculo das variáveis foi estabelecido um critério de consenso, onde o resultado foi considerado como verdadeiro positivo quando pelo menos três dos cinco métodos diagnósticos (quatro protocolos de PCR e IHQ) apresentaram resultado positivo para *Leishmania* sp, conforme descrito por MOUTTAKI e colaboradores (2014). Foi considerado resultado verdadeiro negativo quando as amostras apresentaram resultado negativo nos quatro ensaios da PCR.

Para o cálculo dessas variáveis foram utilizadas as amostras dos 31 pacientes com lesões suspeitas de LC atendidos no CREDESH-UFU e que foram submetidas a IHC e aos quatro ensaios de PCR, e das dez amostras de DNA dos pacientes com hanseníase provenientes do biobanco do CREDESH.

Para avaliação dos dados clínicos epidemiológicos foi utilizada estatística descritiva.

5. Resultados

5.1. Caracterização Molecular

5.1.1. PCR

A PCR realizada com o par de iniciadores L150/152 apresentou o limite de detecção mais baixo, amplificando concentrações de 0,02 pg/ μ l de DNA extraído de cultura axênica de *L. braziliensis*, correspondendo a aproximadamente 0,2 parasitos por reação. A PCR com o par de iniciadores HSP70 foi capaz de amplificar concentrações de até 0,2 pg/ μ l de DNA do parasito (figura 3).

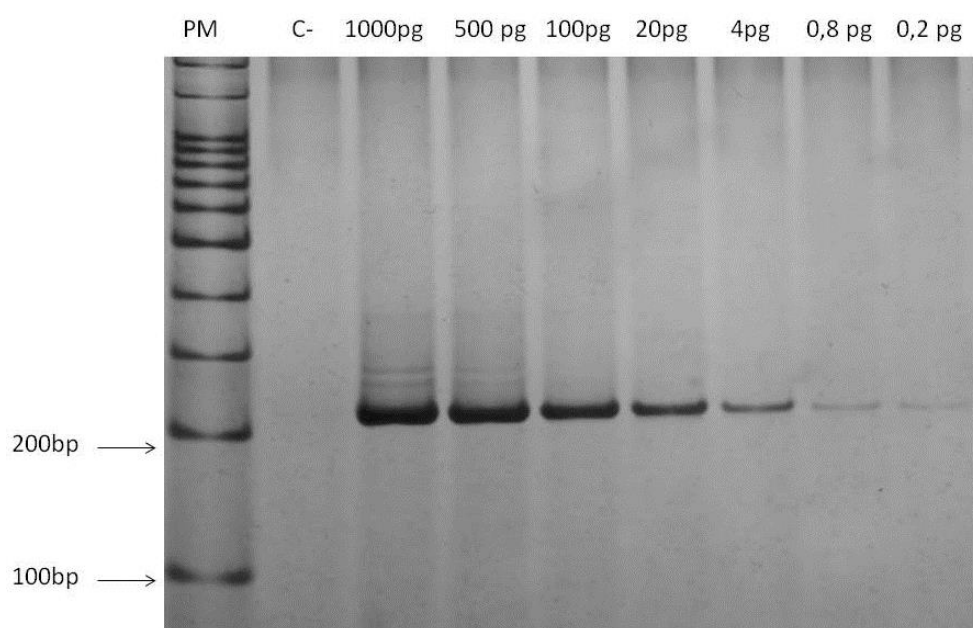


Figura 3. Gel de acrilamida 6% demonstrando o limite de detecção dos iniciadores HSP70 direto e reverso em DNA extraído de cultura axênica de *L. braziliensis*. C- (controle negativo). Concentrações do DNA 1000 pg, 500 pg, 100 pg, 20pg, 4 pg, 0,8 pg e 0,2 pg. PM- Marcador de peso molecular

Já os iniciadores 13A/13B e LITSR/L5.8S (ITS1) demonstraram capacidade de detectar o DNA do parasito em concentrações de até 4pg/ μ l e 0,8pg/ μ l de DNA de *Leishmania* respectivamente. O limite de detecção do iniciador ITS está demonstrado na figura 4.

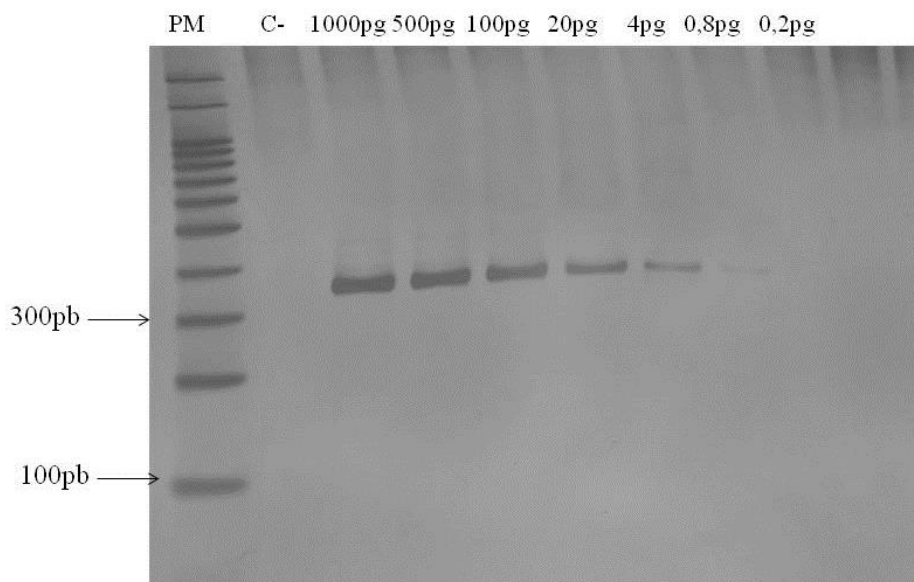


Figura 4. Gel de acrilamida 6% demonstrando o limite de detecção dos iniciadores LITSR/L5.8S (LITS1) em DNA extraído de cultura axênica de *L. braziliensis*. C- (controle negativo). Concentrações do DNA 1000 pg, 500 pg, 100 pg, 20pg, 4 pg, 0,8 pg e 0,2 pg. PM- Marcador de peso molecular

A amplificação da região do kDNA gerou fragmentos de aproximadamente 120 pb para todas as amostras positivas (figura 5) tanto para os iniciadores 13A/13B, quanto para L150/152. A PCR com os iniciadores 13A/13B apresentou resultado positivo para 33 (80,5%) amostras e negativo para 8 (19,5%) amostras, a menor taxa de positividade. Já na PCR com o par de iniciadores L150/152 35 (85,4%) das foram amostras positivas e 6 (14,6%) amostras negativas.

A PCR com o par de iniciadores HSP70 gerou fragmentos de aproximadamente 240 pb para todas as amostras positivas (figura 5). Entre as amostras testadas, 40 (97,5%) foram positivas e uma (2,5%) negativa na PCR que utilizou estes iniciadores.

A amplificação da região ITS-1 gerou fragmentos de aproximadamente 300 pares de bases para todas as amostras utilizadas (figura 5). Na PCR com o par de iniciadores LITSR / L5.8S 40 (97,5%) amostras foram positivas e uma (2,5%) negativa, mesmo resultado obtido pela PCR-HSP70.

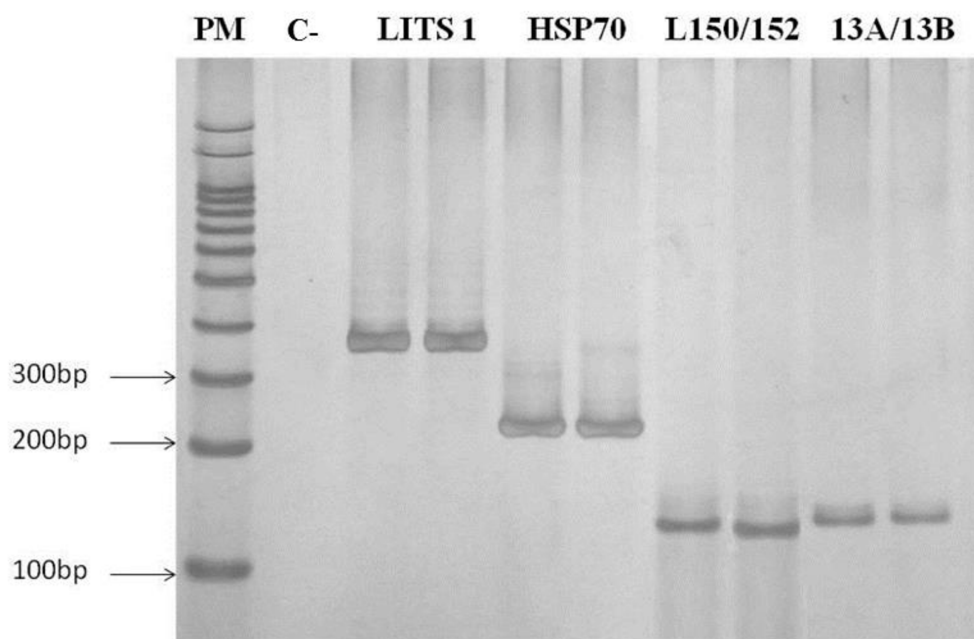


Figura 5. Gel de Poliacrilamida 6% representativo com o produto da amplificação da PCR utilizando os iniciadores LITSR/L5.8S (LITS1), HSP70 direto/HSP70 reverso (HSP70) , L150/152 e 13A/13B utilizando DNA extraído de cultura axênica de *Leishmania*. C- = controle negativo. PM- Marcador de peso molecular 100pb

Todas as amostras foram submetidas aos cinco ensaios de PCR descritos, sendo que a PCR com o iniciador de β -ACTH foi utilizado como controle de extração. Todas as amostras foram positivas na PCR de controle de amplificação interna usando iniciadores de β -ACTH, conforme demonstrado na figura 6.

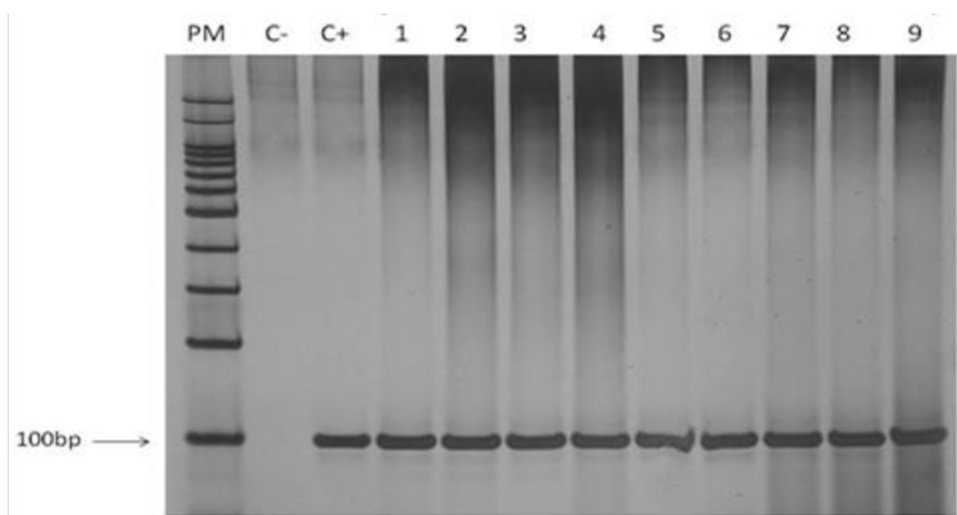


Figura 6. Gel de Poliacrilamida 6% representativo da amplificação com o iniciador de β -ACTH. PM- Marcador de peso molecular. C- Controle Negativo. C+ - DNA extraído de paciente não infectado. 1 a 9 amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar americana

5.1.3. RFLP

Os produtos amplificados das amostras positivas na PCR-L150/152, PCR-HSP70 e PCR-ITS1 foram submetidos à RFLP para a identificação das espécies envolvidas na infecção.

A digestão dos produtos da PCR-L150/152 possibilitou a diferenciação entre apenas três das quatro espécies presentes no estudo e revelou duas bandas de 80 pb e 40 pb para *L. braziliensis* e para *L. guyanensis*, duas bandas de 120pb e 60 pb para *L. infantum* e duas bandas de 110 pb e 60 pb para *L. amazonensis*. A digestão dos produtos da PCR do L150/152 pela enzima *HaeIII* não apresentou resultados satisfatórios, não sendo possível a diferenciação entre *L. guyanensis* e *L. braziliensis* conforme mostrado na figura 7.

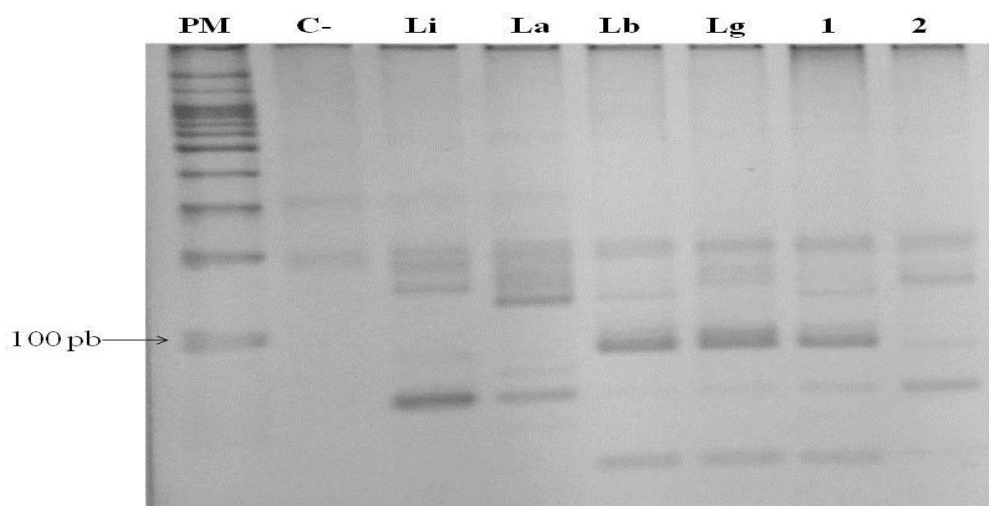


Figura 7. Gel de Poliacrilamida 6% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores L150/152. PM- Marcador de peso molecular. C- controle negativo. Li- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. infantum*, La- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. amazonensis*, Lb- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. braziliensis*, Lg- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. guyanensis*. 1 e 2 - produto da digestão do produto da PCR realizada com DNA de pacientes positivos

Estudos anteriores sugerem que o produto da PCR com os iniciadores 13A/13B não é adequado para realização de identificação de espécies através da RFLP, dessa forma os resultados de RFLP com os iniciadores L150/152 e 13A/13B não foram apresentados neste estudo.

A digestão dos produtos da PCR-HSP70 possibilitou a diferenciação entre as quatro espécies presentes no estudo e revelou bandas de 140 pb para *L. braziliensis*, 90, 80 pb, 70

pb para *L. infantum* , 230 pb para *L. amazonensis* e 180 pb para *L.guyanensis* como mostrado na figura 8.

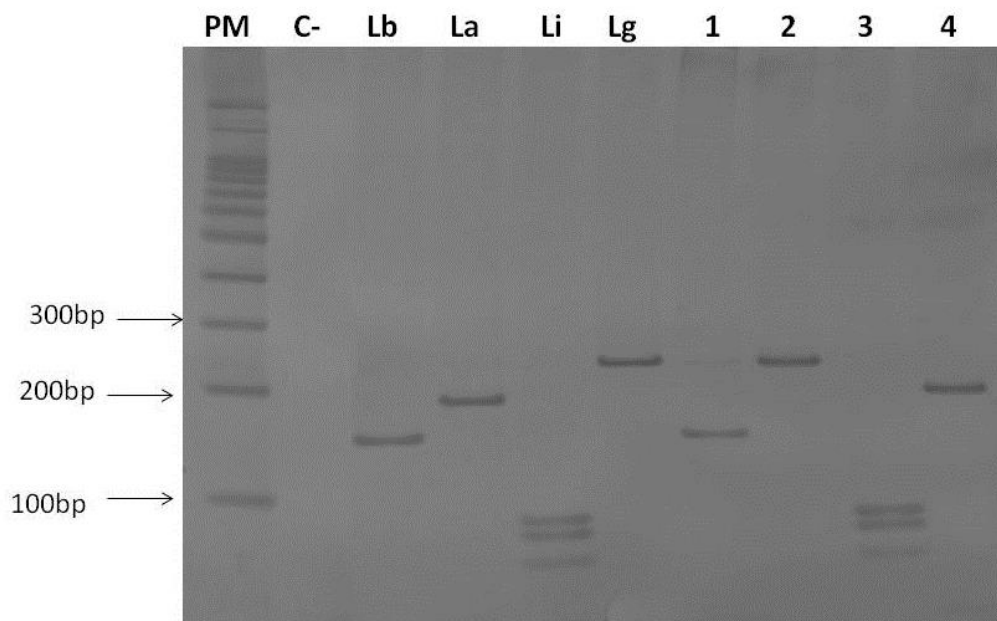


Figura 8. Gel de Poliacrilamida 6% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores HSP70 direto e reverso. PM- Marcador de peso molecular. Lb- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. braziliensis*, La- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. amazonensis*, Lg- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. guyanensis*, Li- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. infantum*. 1 a 4 - produto da digestão do produto da PCR realizada com DNA de pacientes positivos

A PCR-RFLP com o iniciadores HSP70 identificou as espécies em 28 das amostras positivas, 18 (64,3 %) amostras foram caracterizadas como *L. braziliensis* e 9 (32,2%) foram caracterizada como *L.amazonensis* e uma como *L.infantum* (3,5%) proveniente de uma das amostras de DNA de paciente do HC-UFU com suspeita de LV.

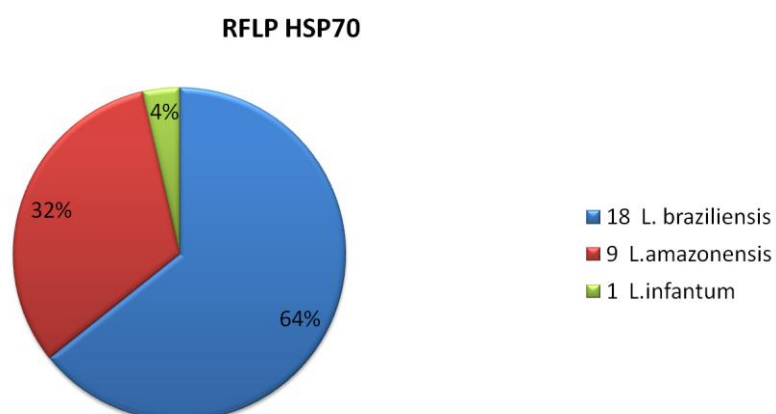


Gráfico 1. Frequência e percentual das espécies identificadas na RFLP utilizando o produto das amostras positivas para *Leishmania* na PCR-HSP70.

A digestão do produto da amplificação da PCR-ITS1 com a enzima de restrição *Hae*III também distinguiu entre as quatro espécies de *Leishmania* testadas. Para *L. braziliensis* foram encontradas duas bandas de ~ 150 pb e 140 pb, três bandas para *L. infantum* (190 pb, ~ 70 pb, ~ 60 pb), ~ 190 e 140 pb para *L. amazonensis* e ~ 150 pb e 130 pb para *L. guyanensis* como mostrado na figura 9.

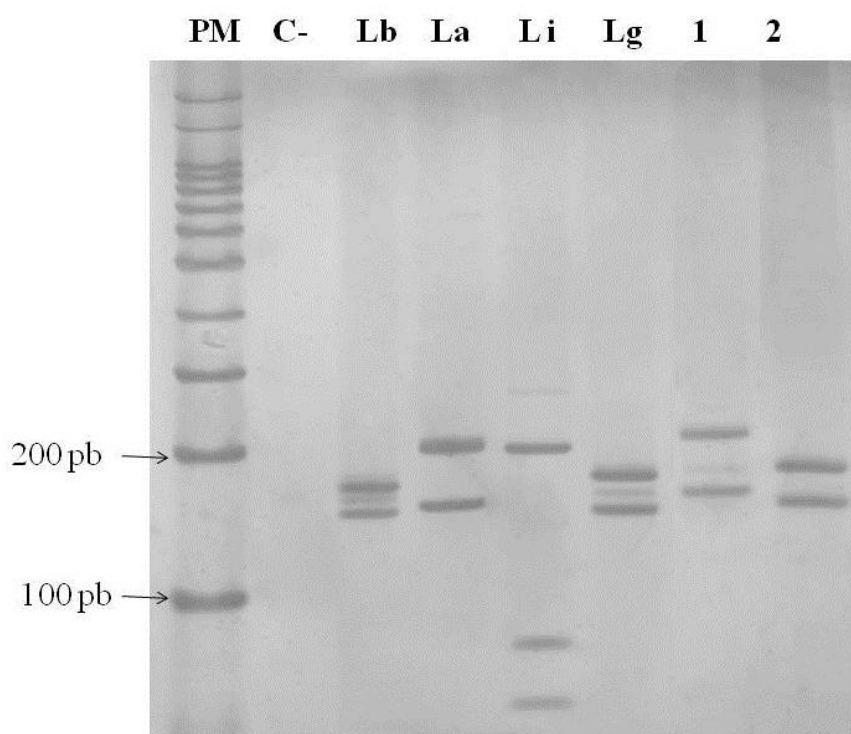


Figura 9. Gel de Poliacrilamida 10% representativo do perfil de bandas geradas pela RFLP com os produtos da PCR, utilizando o par de iniciadores LITS1/L5S8. PM- Marcador de peso molecular, Lb- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. braziliensis*, La- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA de *L. amazonensis*, Lg- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. guyanensis*, Li- padrão de digestão do produto da PCR realizada com DNA *L. infantum*. 1 a 4 - produto da digestão do produto da PCR realizada com DNA de pacientes positivos.

A identificação das espécies foi possível em 24 amostras utilizando o produto da PCR-ITS1, 18 (75%) amostras foram caracterizadas como *L. braziliensis*, 4 (16,6%) foram caracterizadas como *L. amazonensis*, uma (4,2%) como *L. guyanensis* e uma como (4,2%) *L. infantum* conforme mostrado no gráfico 2.

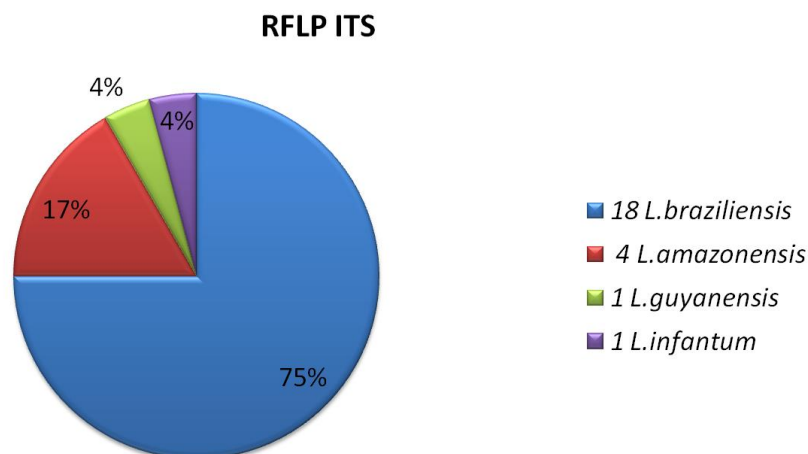


Gráfico 2. Frequência e percentual das espécies identificadas na RFLP utilizando o produto das amostras positivas para *Leishmania* na PCR-ITS1.

As espécies de 19 amostras foram identificadas pela RFLP dos produtos de ambos iniciadores HSP70 e ITS1, e mostraram os mesmos resultados. Dessas amostras 15 foram caracterizadas como *L. braziliensis*, 3 como *L. amazonensis* e 1 como *L. infantum*.

Neste trabalho não foi possível identificar as espécies envolvidas na infecção através da RFLP para todos os pacientes com resultado positivo nas PCR-HSP70 e PCR-ITS, algumas amostras apresentaram resultado negativo nessa técnica, apesar de positivos na PCR, não apresentando nenhum produto de digestão, outras apresentaram produto de digestão diferente dos controles positivos das espécies estudadas como, por exemplo, a presença de um padrão digestão que seria compatível com infecção mista e por esse motivo 11 amostras positivas de pacientes (escolhidos de forma aleatória) foram encaminhadas para sequenciamento gênico para confirmar se os perfis obtidos na RFLP-PCR após a digestão ou não dos produtos obtidos da PCR HSP70 seriam correspondentes à espécie *Leishmania*.

5.2. Sequenciamento gênico

A figura 10 mostra as sequências gênicas referentes a proteína HSP 70 (obtidas no banco de dados do GenBank) para as espécies de *L. infantum* (número de acesso: XM_003392632.1), *L. amazonensis* (número de acesso: EU599090.1), *L. braziliensis* (número de acesso: GU071173.1), e *L. guyanensis* (número de acesso GU071172.1), bem como as sequências gênicas alvos de amplificação correspondente a 234 pares de bases (pb), os locais de anelamento dos iniciadores e sítio para enzima de restrição *HaeIII*, quando presente na sequência.

L. infantum (XM_003392632.1)

ATGCCATGGTACCTCTTCTCCACCACGCTCTCTCTCGCTGCGCCCTCCCTCTCCCTCCCTTCTATCCGC
CAAACACACCGCAGGATCCTAAACACGCACTCGCACTCAAGCTGTCCGAAGAGAACACATACGGCCACAG
GCATACGCTCTCTCGCTCTGCGCTCTATACGTAACCCCTATAACCAACCCCTCCFCCCCCAACCCCATC
CCACACGCACATACACACAGCACCCTGCGCAGAGATGACATTCGACGGCGCCATCGGCATCGACCTGG
GCACGACGTACTCGTGGCTGGGCGTGTGGCAGAACGAACGCGTGGATATCATCGCGAACGACCGGGGAA
CCGCACGACCCGCTGTAAGCTTGCCTTACCGGACTCGGAGCGCTGATCGGCGATGCCGGAAGAACCAG
GTGGCAATGAACCCGCACACACCGGTGTTGACGCGAAGCGCTGATGGCCGCAAGTTCAACGACTCGG
TTGTGCAGTCCGACATGAAGCACTGGCCGTTCAAGGTGACGACGAAGGGCGACGACAAGCCATGATTGC
GGTGCAGTACCGCGCGAGGAGAAGACCTTACGCGCGGAGGAGATCAGCTCGATGGTGTCTGTAAGATG
AAGGAGACGGCGGAGGCGTACCTGGGAAGCAGGTGAAGAAGCCGTGGTGACGGTGCCTGGCTACTTCA
ACGACTCGCAGCGCCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTGCTGGCCTGGAGGTGCTGCGCATCATCAA
CGAGCCGACCGCGCGCCATCGCGTACGGCCCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGCTGCTG
ATCTTCGACCTTGGCGCGGCCAGTTCGATGTGACGCTGTTGACGATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGA
AGGCGACGAACCGCGACACGCACTTGGCGCGGAGGACTTCGACAACCGCTCGTCACTTCTTACCGA
GGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAAGAACCTGGCGTGCAGCCACCGCGCTGCGCGCTGCGCGAG
GCGTGCAGCGCGGAAGCGCACGCTGTGCTCCGCGACGCGAGCGAGATCGAGATCGACGCGTGTGTCG
AGAACGTTGACTTTTTCAGGCCACCATCACGCGCGCGCTTTCGAGGAGCTGTGCGCGGACCTGTTCCG
CACGATCCAGCCGTTGAGCGCGTGTGACGAGCGGAAGATGGACAAGCGCTCCGTCGACGACGTTGGT
TGTGGTGGCGGGTCAACGCGCATCCCGAAGGTGCACTCCCTCGTGTGCGACTTCTTCGGCGGCAAGGAGC
TGAACAAGGACATCAACCCGACGAGGCTGTGCGCTACGGCGCGCGCTTTCGAGGCGGAGCGCGGATGACG
CGCAAGAGCAAGCAGACGAGGCGCTGCTGCTGCTGGACGTCGACCGCTGACGCTGGGCATCGAGACG
GCCGCGCGCGTGTGACGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATTCCGACCAAGAAGGACGAGATCTTCT
GACGTAACGCGGACCAACCCGCGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGCGGAGCGCGGATGACGGAAGA
CTGCCACCTGCTGGGCACGTTGACCTGTCCGCGCATCCCGCGCGCGCGGCTGTGCCGAGATCGAG
GTGACGTTGACCTGGACGCAACCGCATCCTGAACGTTGTCGCGGAGGAGAAGGGCACCGGCAAGCGCA
ACCGATCACCATCACCAACGACACAAGGGCGCGCTGAGCAAAGGACGATCGAGCGCATGGTGAACGACG
GATGAAGTACGAGGCGGACGACGAGGCGGACCGCGTGGAGGCAAGAAGGAGGCGGAGACTTAC
CGCTACTCGATGAAGAACCGCTCGGCGACTCGAACGTTCCGGCAAGCTGGACGATAGCGACAAAGGCG
CGCTGAACAAGGAGATCGACGTCGAGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCGAGGCGGACGAAAGGAAGG
CGAGCACAAAGCAGAAGGAGCTGGAGAGCGTATGCAACCGGATCATGACCAAGATGTACAGAGCATGGGC
GGTGTGGGGCGGATGCCGCGGCTATGCCGACATGAGCGGATGAGCGGTGGTGGGGCCCGGCC
CGGTGCGTCTTGGCCCAAGGTCGAGGAGGTCGACTAA

L. amazonensis (EU599090.1)

CGACTCGCAGCGCAGGCAACGAAGGACGCCGGCACGATTTCTGGGCTGGAGGTGTTGCGCATCATCAAC
GAGCCGACGCGCGCGGCCATCGCGTACGGCTGGACAAGGGCGACGACGGCAAGGAGCGCAACGTTGCTGA
TCTTCGACCTTGGCGCGCGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACCATCGACGGCGGCATCTTCGAGGTGAA
GCGCAGCAACCGCGCACGCAACCTTGGCGCGGAGGACTTCGACAACCGCTCGTCACTTCTTACCGGAG
GAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGCAAGAACCTGGCGTGCAGCCACCGCTCGCTGCGCCGCTCTGCGCACGG
CTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTGCTCCGCGACGACGCGGACGATCGAGATCGACGCGCTGTTCGA
TAACTGTGACTTCCAGGCCACCATCACGCGCGCGCGCTTTCGAGGAGCTGTGCGCGGACCTGTTCCCGCAG
ACGATTCAGCCGTTGAGCGCGTGTGACGAGCGCAAGATGGACAAGCGCTCCGTCGACGACGTTGGTGC
TGGTGGGCGGTTCCACCGCATCCCGAAGGTGACGTCCTCGTGTGCGACTTCTTCGGCGCAAGGAGCT
GAACAAGGACATCAACCCGACGAGGCTGTGCGTACGGCGTGGGCTGCGGTTGACGCGCTTTCATCCGACGGG
GGCAAGAGCAAGCAGACGAGGCGCTGCTGCTGCTGGACGTAACCGCGTGCAGCTGGGCATCGAGACGG
CCGCGCGGCTGTGACGCGCTGATCAAGCGCAACACACAGATCCCGCAAGAAGAGCCAGATCTTCTC
GACGTAACCGGACAACCGCCGCTGTGACATCCAGGTCTTCGAGGCGGAGCGCGGATGACGAAGGAC
TGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACCTGTCCGGCATCCCGCGCGCGCGCGCGCTGGCCGATCGAGG
TGAGTTTCGACTTGGACGCAACCGCATCCTGAACGTTGTCGCGGAGGAGAAGGGCACCGGCAAGCGCAA
CCAGATCACCATCACTAACGACAAGGCGCGCTGAGCAAAGGACGATCGAGCGCATGGTGAACGACGCA
ATGAAGTACGAGGCGGACGACAAGGCGCGCGGACCGCGTGGAGGCAAGAAGCGCTTGGAGAACTACG
CGTACTCGATGAAGAACAACGCTCGGCGACTCGAACGTTGTCGCGCAAGCTGGACGACACCGCAAGTCCG
ACTGAACAAGGAGATCGAGGCGCGCTGGAGTGGCTGAGCAGCAACCGAGGCAACGAAGGAGGAGTAT
GAGCACARGCAGAAGGAGCTGGAGAAGTATGCAACCGGATCATGACCAA

L. braziliensis (GU071173.1)

GGTGTGCGCATCATCAACGAGCCAAACGCGTCCGCCATCGCGTACGGCTGGACAAGGGCGACGACGGC
AAGGAGCGCAACGTGCTATCTTCGACCTTGGCGCGGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACG
GCGGATCTTCGAGGTGAAGCGGACGAACGTTGACACGCACTTGGCGCGAGGACTTTCGACAACCGCT
CGTCACTTCTTACGCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGTAAGGACTTTCGTCGAGCCACCGCGCG
CTGCGCGCTGCGCACGCGCTGCGAGCGCGCAAGCGCACGCTGTGCTCCGCGACGCGAGGCGACGATCG
AGATCGACGCGCTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAATCACGCGCGCGCGCTTTCGAGGAGCTGTG
CGCGACCTGTTCCGACGCAAAATGACGCGGTGGAGCGCGTGTGACGAGCGGAAAGATGACAAGCGC
TCCGTGCACGACGTTGTTGGTGGCGGGTTCGACGCGCATCCCGAAGGTGACGTCCTCGTGTGCGACT
TCTTCGGCGCAAGGAGCTGAACAAGGACATCAACCCGACGAGGCTGTGCGTACGGCGCTGCGGTGCA
GGCGTTTATCTTACGCGCGGCAAGAGCAAGCAGACGAGGCGCTGCTGCTGCTGGATGTGACGCGCTG
ACCTTGGGCAATTGACGCGCGCGCGCTGATGACGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGGACCA
AGAAGGCGCAGATCTTTCGACGTAACCGGACAACCGCGCGCTGACATCCAGGTTTCGAGGCGGA
GCGCGGATGACGAGGACTGCCACCTGCTGGGACGTTTCGACTGTGCGGCGATCCCGCGCGCGCGCG
GGCTGCGCGAGATCGAGTTCGACTGACGCTGGACGCGCAACGCGCATCTGACGTTGCTGCGCGGAGGA
AGGGCACCGCAAGCGCAACCATATCACCATCAACGACAAGGGCGGACTGAGCAAAGGACGATCGA
GCGCATGGTGAACGATGCGTCAAGTACGAGCAAGGCGGACGACAAGATGACGCGCGAGCGCGTGGAGGCGA
AACGGCTGGAGAATACCGCTACTCGATGAAGAACAACGCTTCCGACGCAAGCTGTGCGGCAAGCTGG
AGGAGCGCAGGTCGCGCTGAACTCGGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACGCAACGAGGA
GGCTCGAAGGAGAGTACGAG

L.guyanensis (GU071172.1)

```

GGTGTGCGCATCATCAACGAGCCAACAGCGGGCCATCGCGTACGGCTGGACAAGGGCGACGACGGC
AAGGAGCGCAACGTGCTCATCTTCGACCTTGGCGGGCGCACGTTTCGATGTGACGCTGCTGACGATCGACG
GCGGCATCTTCGAGGTGAAGGGCGACGACGGTGACACGCACCTTGGCGGCGAGGACTTTGACAACCGCCT
CGTCAAGTTCTTCAACCGAGGAGTTCAAGCGCAAGAACAAGGGTAAGGACCTTTTCGTCGAGCCACCGCGC
CTGGCGCGCCTGCGCACGGCGTGGCAGCGCGGAAGCGCACGCTGTCGTCGCGGACGCGAGGCGACGATCG
AGATCGACGCGCTGTTTCGACAACGTCGACTTCCAGGCCAACATCACGCGCGCGCTTCGAGGAGCTGTG
CGGCGACCTGTTCCGACGACAAATGCAGCCGGTGGAGCGCGTGTGCAGGACGCGAAGATGGACAAGCGC
TCCGTGCACGACGCTGGTGTGGTGGCGGGTTCGACGCGCATCCCCAAGGTGCAGTCCCTCGTGTGCGACT
TCTTCGCGGCAAGGAGCTGAACAAGGATCAACCCGACGAGGCTGTCGCGTACGGCGCTGCGGTGCA
GGCGTTCATCTGACGGGCGCAAGAGCAAGCAGACGGAGGGCCTGCTGCTGGATGTGACGCGCGT
ACCTGGGCATTTGAGACGGCCGGCGCGTGTGACGGCGCTGATCAAGCGCAACACGACGATCCCGACCA
AGAAGAGCCAGATCTTTCGACGTACGCGGACAACCAGCCCGCGTGCACATCCAGGTCTTCGAGGGCGA
GCGCGCATGACGAAGGACTGCCACCTGCTGGGCACGTTTCGACTTGTCCGGCATCCCGCCAGCGCGCGC
GGCGTGGCGCAGATCGAGGTGACGTTTCGACCTGGACGCGAAGCGCATCTGAACGTGTCGCGGAGGAGA
AGGGCACCGCAAGCGCAACCATATCACCATCACCAACGACAAGGGCCGACTGAGCAAGGACGAGATCGA
GCGCATGGTGAACGATCGCTCGAAGTACGAGCAGGCCGACAAGATGCAGCGGAGCGCTGGAGGGCGAAG
AACGGTCTGGAGAACTACGCGTACTCGATGAAGAACACGATCGCCGACACGACGTTGTCGCGCAAGCTGG
AGGAGAGCGACAGGACCGCTGAACCTCGCGATCGACACGGCGCTGGAGTGGCTGAACAGCAACAGGA
GGCGTCAAGGAAGAGTACGAG
    
```

Figura 10. Sequências gênicas referentes ao gene da proteína HSP70 de quatro espécies de *Leishmania* (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. infantum*) e o número de acesso no GenBank. Sequência gênica alvo de amplificação (em vermelho) correspondente a 234 pb. Locais de anelamento dos iniciadores na sequência gênica alvo (sublinhado). Sítio para enzima de restrição *Hae*III (destaque amarelo), quando presente na sequência alvo

As sequências obtidas foram alinhadas individualmente com as sequências alvo dos genes das quatro espécies de *Leishmania* (obtidas no GenBank), para gerar uma sequência consenso, e comparadas. Os resultados obtidos durante a análise do sequenciamento demonstraram correspondência entre as sequências, tanto para as amostras controle quanto para as amostras positivas de pacientes, apresentando, portanto, concordância e validando os resultados obtidos na PCR-RFLP HSP70.

Baseado nos resultados do sequenciamento das quatro espécies de *Leishmania* foi construído, *in silico*, um gel com as condições utilizadas na RFLP dos produtos da PCR-HSP70, para orientar as análises e comparar com os resultados visualizados nos géis (Figura 10), com auxílio da ferramenta NEBcutter V2.0 (disponível em <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>).

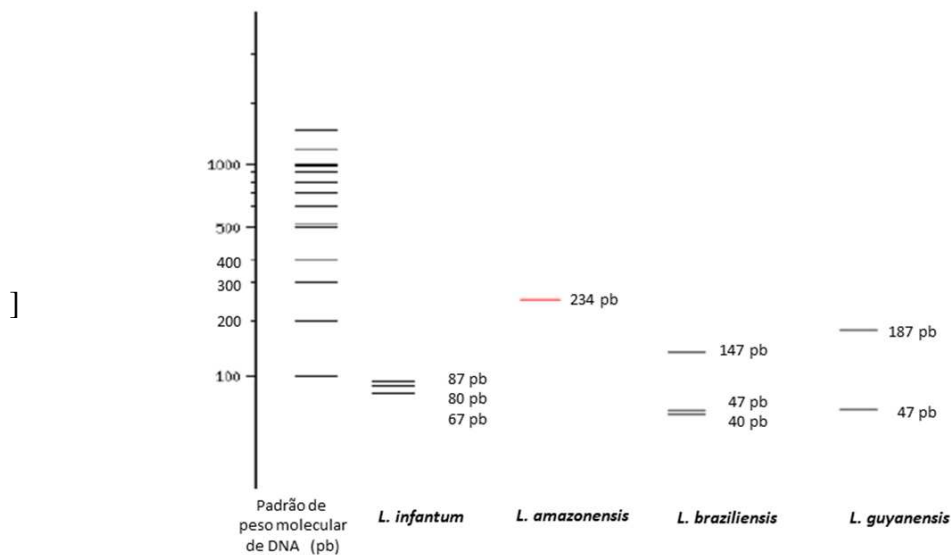


Figura 11. Gel de Poliacrilamida 6%, in silico, representando o perfil de bandas esperado para a reação PCR-RFLP HSP70

5.3. Imuno-histoquímica

Das 31 amostras de pele encaminhadas para realização da IHQ, 15 (48%) tiveram resultado positivo e 16 (52%) resultado negativo. Todos os resultados positivos na IHQ foram confirmados por resultados positivos em pelo menos três dos quatro ensaios de PCR.

5.4. Dados Clinicoepidemiológicos

As informações descritas neste estudo sobre os quatro pacientes do HC-UFU se resumem a idade, sexo e identificação das espécies envolvidas na infecção uma vez que estas amostras foram incluídas como controles de *L.infantum*, e não se teve acesso ao prontuário desses pacientes.

Dentre as amostras recebidas, 34 (81%) eram proveniente de homens e sete (19%) de mulheres. A idade dos pacientes variou entre 18-84 anos com média de 48 anos.

Todos os 37 pacientes avaliados no CREDESH-UFU eram procedentes de áreas endêmicas do estado de Minas Gerais. Dentre estes, 13 (35%) eram residentes em Uberlândia, nove (24,3%) em Coromandel, três (8,1%) em Patrocínio, três (8,1%) em Abadia dos Dourados, (5,5%) dois em Monte Carmelo, (5,5%) dois em Campina Verde, um (2,7%) em Vazante, um (2,7%) em Ituiutaba, um (2,7%) em Cascalho Rico, um (2,7%) no Prata e um (2,7%) em Grupiara.

É importante salientar que dentre os pacientes residentes em Uberlândia, dois tiveram os primeiros sinais da doença na cidade natal (Torixoréu - Mato Grosso e Tasso Fragoso - Maranhão). Além disso, um dos pacientes relata que observou o início da lesão sugestiva de LTA após uma viagem a Manaus-AM.

Dos 37 pacientes avaliados, 35 (94,5%) apresentaram apenas uma lesão e somente em dois casos os pacientes apresentaram mais de uma lesão, um deles com três lesões na perna e o outro com múltiplas lesões, sendo a lesão inicial no antebraço e evoluindo com lesões no couro cabeludo, dorso nasal e coxa.

Quanto ao local das lesões suspeitas, todas foram encontradas em superfícies mais expostas do corpo, sendo 22 (59,5%) nas pernas, seis (16,2%) nos braços, três (8,1%) lesões infiltrativas na orelha, uma (2,7%) nos lábios, uma (2,7%) na face e quatro (10,8%) casos no nariz, sendo que em dois desses casos houve perfuração do septo nasal. As lesões variaram entre recentes com cerca de dois meses de evolução, até lesões mais antigas com até 20 anos de evolução (média de cinco meses).

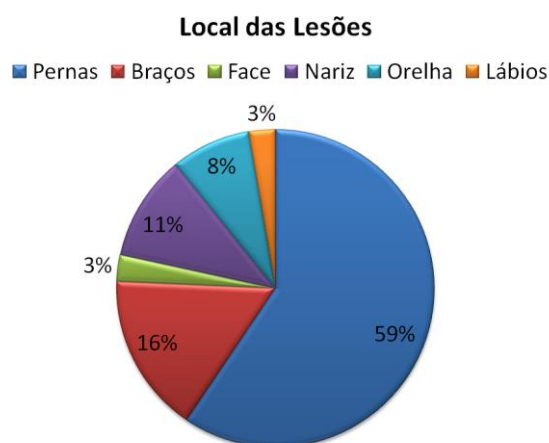


Gráfico 3. Percentual da localização das lesões dos 37 pacientes com lesões sugestivas de LTA.

Quanto a características das lesões, 17 (45,9%) pacientes apresentaram apenas uma lesão com bordas bem delimitadas e elevadas, sendo que as lesões de 12 (32,4%) (pacientes apresentavam fundo granuloso e cinco (13,5%) fundo com crostas ou seco com aspecto necrótico, sugerindo o diagnóstico clínico de LC localizada. A espécie identificada como causadora das infecções nesses casos foram a *L. amazonensis* em cinco casos, *L. braziliensis* em oito casos, em três casos não foi possível identificar a espécie envolvida, e um paciente foi negativo em todos os testes, sendo diagnosticado com hanseníase.

Quatro (11%) pacientes apresentaram lesões com fundo granuloso, porém com bordas irregulares e infiltradas, sendo que a espécie identificada nesses casos foi *L. braziliensis* (3) e *L. amazonensis* (1). Outro paciente apresentou uma única lesão rasa com fundo purulento e a espécie envolvida foi a *L. braziliensis*.

Um (3%) paciente apresentou uma úlcera vegetante extensa no membro inferior esquerdo com 20 anos de evolução e a espécie identificada como causadora da infecção foi a *L. amazonensis*. Outro apresentou lesão residual de uma ulcera na perna que cicatrizou a espécie não foi identificada.

As lesões na orelha em dois dos pacientes apresentaram características diferentes, sendo que uma tratava-se de lesão infiltrativa granulomatosa destrutiva, a qual não foi possível identificar a espécie relacionada à infecção e a outra uma lesão nodular com centro crostoso causada por *L. amazonensis*. Um paciente apresentou uma lesão ulcerativa granulomatosa, destrutiva nos lábios inferiores e superiores, a espécie envolvida na infecção não foi identificada.

Três (8%) pacientes apresentaram úlceras verrucosas com superfície áspera ou com crostas e a espécie envolvida foi a *L. amazonensis* em dois casos sendo que um dos casos a lesão estava na face e no terceiro caso não foi possível identificar a espécie.

Apenas dois (5,5%) pacientes apresentaram mais de uma lesão e a espécie identificada foi a *L. braziliensis*, sendo que ambos apresentaram resultado negativo no MST e positivo na IHQ. O primeiro paciente apresentou três úlceras de bordas elevadas e fundo granuloso na perna, quadro sugestivo de LC localizada.

No outro caso, o paciente apresentou inicialmente uma lesão ulcerada no antebraço e posterior aparecimento de outras lesões papulosas no couro cabeludo e no dorso nasal, além disso, este paciente apresentou resistência ao tratamento com Glucantime® sendo necessário realizar novo ciclo de tratamento com esse medicamento por 30 dias; a hipótese diagnóstica nesse caso foi a de LCD.

Os quatro (11%) pacientes que apresentaram lesões no nariz foram diagnosticados como portadores de LM, e a espécie causadora da infecção em dois destes casos foram identificadas como *L. braziliensis*, em um dos casos foi a *L. guyanensis* e em outro a espécie não foi identificada. Apesar de todos os pacientes avaliados no CREDESH-UFU serem residentes em regiões de Minas Gerais, alguns são procedentes de outros estados. Um dos pacientes com perfuração septal era procedente de Tasso Fragoso (MA), e o paciente com resultado de identificação de espécie para *L. guyanensis* era procedente da cidade de Torixoréu (MT).

Em dois (50%) dos casos de LM os pacientes não responderam adequadamente ao tratamento convencional com Glucantime®, e foram encaminhados ao setor de Moléstias Infeciosas do HC-UFU para tratamento com anfotericina b lipossomal. Um desses casos trata-se de um paciente de 37 anos com história clínica de LC aos cinco anos (não tratada), com recidiva aos treze anos de idade e tratamento irregular com Glucantime®, quando residia no Maranhão. No momento da coleta das amostras apresentava manifestação clínica

de LM com várias recidivas, e resistência ao tratamento convencional com Glucantime® e também a Anfotericina B lipossomal. A espécie identificada nesse caso foi *L. braziliensis*.

Dos pacientes diagnosticados com LM apenas o do caso descrito no parágrafo anterior realizou o MST, com resultado positivo (13mm).

5.3.1. Teste de Montenegro e Anatomopatológico

Dentre os 25 pacientes que realizaram o MST, 12 pacientes (48%) apresentaram resultado positivo ($\geq 5\text{mm}$) e 13 negativos (52%) e dos 30 foram submetidos a biópsia para realização de anatomopatológico, apenas dez (33,3%) tiveram resultado positivo para LTA .

Na figura 11 estão representados os testes diagnósticos que os pacientes avaliados foram submetidos e seus resultados.

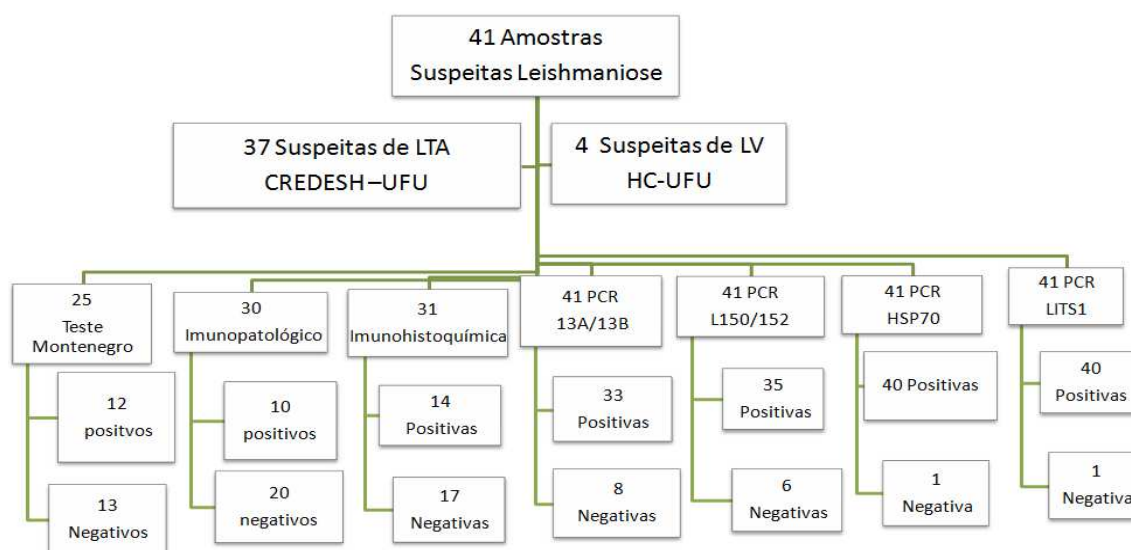


Figura 12. Representação dos testes diagnósticos que os pacientes foram submetidos e seus resultados

5.5. Avaliação dos Métodos Diagnósticos

Das 41 amostras utilizadas nesta avaliação, 11 amostras foram consideradas verdadeiras negativas, 10 destas amostras eram dos pacientes com diagnóstico de hanseníase do bio banco de DNA CREDESH-UFU utilizados como controle negativo das reações e um paciente com lesão suspeita de LTA atendido no CREDESH-UFU o qual apresentou resultados negativos para todos os testes utilizados neste trabalho.

De acordo com o critério de consenso, 30/41 (73,1%) das amostras de pacientes suspeitos de LTA foram consideradas verdadeiras positivas. Dessas, 11/30 (36,6%) foram positivas nos quatro ensaios de PCR e no IHC, enquanto 11/30 (36,6%) apresentaram resultado negativo do IHQ, mas foram positivos em todos os quatro ensaios de PCR. As oito amostras restantes (26,6%) apresentaram resultados positivos em pelo menos três ensaios de PCR diferentes.

O resultado do cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e índice kappa estão descritos na Quadro 3.

Quadro 3: Valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e índice kappa determinado pela análise dos resultados da IHQ e de quatro ensaios de PCR

Ensaio Diagnóstico	Número de positivos	Verdadeiros Positivos	Número de negativos	Verdadeiros negativos	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	KAPPA
IHQ	15	15	26	11	50%	100%	100%	42%	0,349
13A/13B	24	24	17	11	80%	100%	100%	64%	0,682
PCR L150/152	27	27	14	11	90%	100%	100%	78%	0,828
HSP70	30	30	11	11	100%	100%	100%	100%	1
ITS	30	30	11	11	100%	100%	100%	100%	1

VPP: Valor Preditivo Positivo; VPN: Valor Preditivo Negativo; Intervalo de confiança de 95%

Embora a IHQ tenha apresentado menor sensibilidade (50%) e VPN (42%) quando comparado com os quatro testes de PCR, apresentou alta especificidade (100%) e PPV (100%). O nível de concordância entre os resultados do consenso e a IHQ foi justo ($k = 0,349$).

A PCR-13A/13B apresentou menor sensibilidade quando comparado aos demais ensaios de PCR. A concordância entre os resultados do consenso com a PCR 13A / 13B foi substancial ($k = 0,682$) (Quadro 3).

A PCR-L150/152 apresentou maior sensibilidade (90%) quando comparado a PCR-13A/13B (Quadro 3). A especificidade, VPP e VPN foram 100%, 100% e 78%, respectivamente. O nível de concordância entre os resultados do consenso e a PCR L150/152 foi perfeito ($k=0,828$).

A PCR-HSP70 e PCR-ITS1 apresentaram resultados semelhantes, 100% de valores de sensibilidade e especificidade. VPP e VPN para estes ensaios também foram de 100% (Quadro 3). O nível de concordância entre os critérios de consenso e esses resultados de PCR foi perfeito ($k = 1$).

Com base nos critérios estabelecidos neste trabalho, os iniciadores HSP70 e ITS1 demonstraram o melhor desempenho para o diagnóstico de *Leishmania sp* em amostras de pele de pacientes suspeitos para LTA, apresentando os melhores valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN.

6. Discussão

No Brasil, a LTA apresenta uma ampla distribuição com casos em todas as regiões do país, e é uma infecção dermatológica de grande magnitude devido ao envolvimento psicológico e risco de ocorrência de deformações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Autores sugerem que a incidência da LTA no Brasil pode estar subestimada, sendo que cerca de 26.008 casos /ano de LTA foram relatados no Brasil no período de 2003 a 2007 e acredita-se que o valor real esteja entre 72.800 e 119.600 casos/ano (ALVAR et al., 2012).

A PCR-13A/13B nas condições utilizadas neste trabalho apresentou alta sensibilidade e especificidade, no entanto, sua sensibilidade foi menor quando comparada as outras três reações de PCR. Estudos anteriores sugerem melhores taxas de sensibilidade quando os iniciadores 13A/13B são utilizados para o diagnóstico das leishmanioses, em relação aos iniciadores LITS1/L5.8S (KOLTAS et al., 2016). Nesse mesmo estudo produto da PCR-13A/13B não foi digerido pela enzima de restrição *HaeIII*, motivo pelo qual o PCR-RFLP 13A/13B não foi realizado em nosso estudo (KOLTAS et al., 2016). Alguns fatores poderiam explicar essas diferentes taxas de sensibilidade entre os estudos, como os diferentes padrões consensos considerados, regiões geográficas distintas e o tempo de infecção, o que poderia afetar as cargas parasitos (KOLTAS et al., 2016).

A PCR-L150/152 foi capaz de amplificar pequenas quantidades de DNA de *Leishmania*, correspondentes a menos de meio parasito por reação. Esses resultados corroboram com Koltas e colaboradores (2016), que diagnosticaram menos de 0,01 *Leishmania* por reação de PCR utilizando iniciadores para regiões do kDNA do parasito.

A PCR-13A/13B e PCR-L150/152 apresentaram alta sensibilidade e especificidade. A alta sensibilidade da reação pode estar relacionada aos iniciadores, que visam as sequências de minicírculo de kDNA conservadas, por possuírem elevado número de cópias (~10,000 a 20,000 minicírculos por célula no genoma de *Leishmania*) e o tamanho pequeno dos produtos de PCR (120 pb), que podem ser amplificados eficientemente usando poucas quantidades de amostras clínicas (LACHAUD et al., 2003). Por isso, ensaios de PCR utilizando estes iniciadores, em especial L150/L152, podem ser uma boa opção para o diagnóstico das leishmanioses ao nível de gênero.

Em nossas condições, a PCR-HSP70 e PCR-ITS1 apresentou o melhor desempenho para o diagnóstico de *Leishmania* sp em amostras de pele, levando em consideração a

sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e *k*. As duas reações amplificam regiões conservadas do DNA de *Leishmania* com alta sensibilidade e especificidade (100%), o que torna seu uso no diagnóstico rotineiro da LTA confiável, uma vez que regiões com polimorfismos altos podem levar a resultados falsos negativos. Da mesma maneira, outros autores demonstraram altas taxas de sensibilidade e especificidade da PCR-ITS1 e PCR-HSP70, em comparação com outros ensaios de PCR e métodos de convencionais de diagnóstico (DE ANDRADE et al., 2006; GARCIA et al., 2004; GRAÇA et al., 2012; MOUTTAKI et al., 2014). Além disso, os produtos da PCR que utiliza esses iniciadores permitiram a identificação de espécies de *Leishmania* através de RFLP.

Em 96,7% das amostras avaliadas o resultado foi positivo para LTA. Este dado, amplamente apoiado pelos resultados da PCR genérica, reforça a importância da inclusão do diagnóstico molecular da LTA em pacientes com lesões cutâneas e características epidemiológicas clínicas sugestivas da doença, especialmente em áreas com sobreposição de ocorrência de doenças com apresentação clínica similar, como hanseníase, paracoccidiodomicose e esporotricose (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO 2010; REITHINGER et al., 2007).

Todas as amostras foram positivas na PCR com os iniciadores de β -ACTH. A β actina é expressa constitutivamente em células humanas em condições fisiológicas normais e, é frequentemente utilizada como gene constitutivo em estudos de expressão gênica e controle de extração de DNA (LIN, 2012). Os resultados obtidos pela PCR de β -ACTH confirmam a presença do DNA extraído das amostras de pele, e excluem a possibilidade de resultados falso-negativos pela ausência de DNA nas reações. Assim, a PCR com iniciadores de β -ACTH apresentou bom desempenho e pode ser utilizada como controle interno para o diagnóstico molecular da LTA em amostras humanas.

Todas as reações de PCR para *Leishmania* apresentaram resultados negativos nas amostras de DNA dos pacientes com hanseníase, sem suspeita clínica de LC, além disso, um dos pacientes com suspeita de LTA foi negativo em todos os testes e foi diagnosticado com hanseníase. Estes resultados demonstram a especificidade das reações de PCR propostas para o diagnóstico da LTA, e sugerem que não houve anelamento inespecífico dos iniciadores com sequências de DNA de *Mycobacterium leprae*. Este fato é relevante, uma vez que a especificidade de um determinado método de diagnóstico é primordial para o estabelecimento de protocolo terapêutico apropriado no caso de doenças infecciosas, especialmente aquelas com manifestações clínicas semelhantes (REITHINGER et al., 2007).

Autores sugerem que a PCR-RFLP usando iniciadores L150/152 é capaz de diferenciar entre *L.amazonensis*, *L.braziliensis* e *L.infantum* de pacientes humanos e caninos (DE ANDRADE et al.,2006; VOLPINI et al., 2004).

Em nosso estudo, a RFLP usando o produto da PCR-L150/L152 apresentou padrões de digestão diferentes dos demonstrados por Andrade e colaboradores (2006) para *L.amazonensis* e *L.infantum*, e padrões de digestão semelhantes para *L.braziliensis*. A PCR-RFLP L150/L152 possibilitou a diferenciação entre *L.amazonensis*, *L.braziliensis* e *L.infantum*, porém não foi capaz de diferenciar *L. guyanensis* de *L. braziliensis*. Este resultado sugere que a PCR-RFLP usando esses iniciadores não é capaz de diferenciar entre estas duas espécies pertencentes ao complexo *L. braziliensis*. Assim seu uso em áreas de ocorrência concomitante dessas espécies deve ser cuidadosamente avaliado.

A PCR-RFLP com o iniciadores HSP70 permitiu identificar as espécies em 70% das amostras positivas destas 64,3 % amostras foram caracterizadas como *L.braziliensis*, 32,2% foram caracterizadas como *L. amazonensis* e 3,5% como *L.infantum*.

O padrão de bandas encontradas em nosso trabalho para as espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. guyanensis* no HSP70 PCR-RFLP foi semelhante ao obtido em estudo prévio (GRAÇA et al.,2012). Além disso, esses padrões de bandas geradas após a digestão de *Hae*III permitiram diferenciar claramente as espécies *Leishmania*, o que torna viável o uso da PCR-RFLP HSP70 na rotina da identificação dos agentes causadores da LTA.

Vários estudos sugerem a alta sensibilidade e especificidade do PCR-RFLP HSP70 no diagnóstico da LTA (DE ANDRADE et al., 2006; GARCIA et al.,2004 MOUTTAKI et al., 2014). Graça et al. (2012) demonstraram que o par iniciadores usado em nosso estudo pode discriminar eficientemente entre todas as espécies circulantes de *Leishmania* no Brasil. Além disso, quando comparado ao ensaio de eletroforese de enzima multilocus, considerado como padrão-ouro para a identificação de espécies de *Leishmania*, os resultados obtidos pelo PCR-RFLP HSP70 tiveram total concordância (DA SILVA, 2010).

A região do gene HSP70 escolhida para a amplificação é uma região conservada, que apresenta alguns polimorfismos gênicos, que podem ser utilizados para diferenciar as espécies de *Leishmania* através do sequenciamento do genômico. O resultado do sequenciamento das amostras confirmou aquele obtido na análise da PCR-RFLP HSP70 das amostras, tanto para os padrões de *Leishmania* obtidos de culturas axênicas quanto para as

amostras dos pacientes. Este resultado confirma a eficiência e a confiabilidade da PCR-RFLP HSP70 para o diagnóstico e diferenciação entre as espécies da LTA mais comuns no Brasil. Por isso, esse ensaio diagnóstico poderia ser utilizado como uma ferramenta eficaz para o diagnóstico e identificação das espécies causadoras da LTA por toda a rede de assistência do SUS, independente da região geográfica do país.

Moultaki e colaboradores (2014) demonstraram excelentes resultados de sensibilidade e especificidade (100%) da PCR utilizando iniciadores para a região ITS1, em comparação com outros ensaios de PCR e métodos de diagnóstico.

Autores demonstraram padrões de bandas similares aos encontrados para as espécies testadas neste estudo, usando a restrição de ITS com a enzima *HaeIII* (SCHONIAN et al., 2003, MONROY-OSTRIA et al., 2014). Através da RFLP utilizando o produto da PCR-ITS1 foram identificadas em 60% das amostras positivas para *Leishmania* sp. Destas 75% foram caracterizadas como *L. braziliensis*, 16,6% como *L. amazonensis*, 4,2% como *L. guyanensis* e 4,2% como *L. infantum*.

A PCR-RFLP ITS1 utilizando diferentes enzimas de restrição como *RsaI* e *HaeIII* tem sido usada para estudos de polimorfismos e identificação de espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, e a maioria destas são distinguidas por esta técnica (CUPOLILLO et al., 2003; EL TAI et al., 2001; GARCIA et al., 2004). No entanto, em alguns casos, mais de uma enzima de restrição é necessária para distinguir melhor algumas espécies (ROTUREAU et al., 2006).

Autores sugerem que a restrição dos produtos da PCR-ITS1 com *HaeIII* não foi suficiente para distinguir todas as espécies no subgênero *Viannia*, especialmente *L. braziliensis/L. naiffi* e *L. lainsoni/L. guyanensis* (ROTUREAU et al., 2006). Em nosso estudo, apesar do padrão de bandas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* ser semelhante, foi possível diferenciá-las quando foi utilizado um gel com uma concentração superior a usada rotineiramente para visualização dos produtos da PCR genérica. Dessa forma, enfatiza-se que mesmo sendo viável a utilização da PCR-RFLP utilizando os iniciadores LITSR/L5.8S para diferenciação das espécies de *Leishmania*, o seu uso na rotina do diagnóstico pode exigir uma interpretação criteriosa dos resultados.

Nossos resultados mostraram concordância perfeita entre a PCR-RFLP HSP70 e PCR-RFLP ITS1. Da mesma forma, Graça et al. (2012) encontraram baixa discrepância (6,5%) quando compararam os resultados destas duas técnicas.

Leishmania braziliensis foi a espécie mais frequente identificada neste trabalho. A IHQ apresentou menor sensibilidade e VPN quando comparado aos quatro ensaios de PCR, entretanto, apresentou alta especificidade e VPP. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Marques e colaboradores (2017), que analisaram biópsias de pele de pacientes com diferentes formas clínicas de LTA submetidas a IHC e obtiveram baixa sensibilidade relativa (70,5%), quando comparadas à PCR. Apesar disso, autores sugerem que o IHC é uma das técnicas mais importantes para o diagnóstico de LTA no Brasil, porque é mais sensível do que os testes histológicos convencionais, apresenta alta concordância com o MST e pode ser empregado para o diagnóstico de diferentes formas clínicas de LTA (MARQUES et al., 2017; ALVES et al., 2013).

Outros estudos sugerem que a IHQ pode contribuir significativamente para o diagnóstico parasitológico de LTA, uma vez que se trata de método diagnóstico sensível para a detecção de formas de amastigotas em tecido com lesões causadas por LC ativa (QUINTELLA et al., 2009).

A IHQ, o MST e o teste anatomopatológico apresentaram positividade inferior quando comparados aos quatro ensaios de PCR. ESPIR e colaboradores (2016), em um estudo de avaliação de diferentes métodos de diagnóstico de LTA na Amazônia legal brasileira, encontraram 60% de positividade no MST, valor superior ao descrito na rotina de atendimento do CREDESH-UFU. Os autores descrevem as mesmas dificuldades encontradas pela equipe do CREDESH-UFU na realização do MST, uma vez que muitos pacientes não voltam para realizar a leitura do resultado, ou não retornam no período correto (48 horas). Outro fator que reflete a dificuldade de diagnóstico da LTA é que não foi possível a realização do MST em todos os pacientes, pois durante a realização da pesquisa houve falta de insumos fornecidos pelo SUS para realização do teste.

O MST é descrito como sendo um método sensível e específico, porém geralmente apresenta resultado positivo para as formas localizadas e negativo nas formas anérgicas. Um teste positivo suporta o diagnóstico, mas um teste negativo não o exclui (TORRES et al., 2017).

As características histopatológicas da LTA variam de um infiltrado inflamatório de células mononucleares e neutrófilos, a reações granulomatosas com ou sem necrose o que dificulta o diagnóstico. Estudos tentaram estabelecer a importância da histopatologia no diagnóstico da LTA, no entanto, diferentes achados morfológicos foram encontrados, sem o estabelecimento de um padrão. Em razão disso, a análise histopatológica das lesões não deve

ser utilizado como primeira opção para o diagnóstico de rotina da LTA (VENTAKARAM et al.,2001; RAHMAN,2006).

Os dados epidemiológicos encontrados neste trabalho estão de acordo com as estatísticas demonstradas na literatura, sendo que a maioria dos casos foi diagnosticada em homens, o que está de acordo com os dados notificados ao SINAN em 2015, em que 72,9% dos casos de LTA diagnosticados no Brasil no ano de 2015 foram em homens.

A espécie encontrada como principal causadora da LTA na região estudada foi a *L. braziliensis* seguida da *L. amazonensis*. Este resultado era esperado, uma vez que *L. braziliensis* é endêmica na América Latina e é a espécie predominante no Brasil (MEDEIROS et al.,2002; PEREIRA et al.,2017; QUEIROZ et al.,2012).

Estudos anteriores encontraram resultados semelhantes em pacientes com lesões cutâneas suspeitas de LTA da Bolívia com 96,4% das amostras identificadas foi *L. braziliensis* (GARCIA et al.,2004).

Na maioria dos casos, as lesões estavam nos membros superiores ou inferiores e todas estavam em áreas expostas do corpo, dados que corroboram com o descrito por outros autores, que sugerem que as lesões geralmente são encontradas em partes mais expostas do corpo (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010).

A maioria dos pacientes apresentaram manifestações clínicas sugestivas de LC localizada, e este resultado era esperado, uma vez que a LCL representa a forma mais frequente da doença (GOTO; LINDOSO 2010).

Apesar da maioria dos pacientes com diagnóstico de LCL apresentarem lesão única, com características da lesão clássica com bordas bem delimitadas e elevadas, com fundo granuloso, muitos apresentaram lesões com características diferentes, pois conforme já descrito anteriormente as manifestações clínicas e gravidade da doença estão condicionadas a resposta imune do indivíduo infetado e a espécie do parasito envolvido na infecção (ALVAR 2006).

Estes dados confirmam o descrito por Silveira et al. (2004) que descreveram que na LCL, além da lesão ulcerada, alguns pacientes podem apresentar outros tipos de manifestações cutâneas, como lesões vegetativas verrucosas, pápulas, nódulos e infiltrações. Além disso, em pacientes com lesões causadas por *L. amazonensis* verifica-se uma grande infiltração na borda da lesão, devido a um denso infiltrado de macrófagos vacuolados na derme que estão cheios de amastigotas e que dão ao infiltrado a aparência de um granuloma macrofágico (SILVEIRA et al., 2004).

Quatro (11%) dos pacientes com suspeita de LTA foram diagnosticados com LM, estes dados corroboram com os descritos na literatura, que demonstram que as taxas de LM variam de 3% a 20% em áreas endêmicas (HANDLER, 2015). A *L. braziliensis* foi identificada em dois destes casos como espécie causadora da infecção, conforme já esperado pois a LM tem como agente etiológico principal a *L. braziliensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Em apenas um dos casos foi levantada hipótese diagnóstica de LD, e a espécie identificada como sendo a envolvida na infecção foi a *L. braziliensis*. Este paciente apresentou MST negativo e resistência ao tratamento com o Glucantime. A história clínica desse paciente está em concordância com as informações apresentadas por, França Costa et al. (2012), que descrevem a LD como uma apresentação clínica rara, caracterizada pela presença de múltiplas lesões e pela predominância de pápulas, lesões acneiformes e alta frequência de envolvimento de mucosas. Além disso, os pacientes com LD mostram inibição dos mecanismos imunológicos mediados por células, resultando em respostas negativas no MST.

A PCR demonstrou ser o método mais sensível, com maior capacidade de detectar indivíduos doentes, além disso, os iniciadores testados demonstraram não apresentar reação cruzada com o *Micobacterium leprae*.

Além disso, quando agrupados os dados referente às formas e manifestações clínicas da LTA com a identificação das espécies causadoras da infecção pode-se observar uma concordância com os dados apresentados na literatura de uma forma geral.

Levando em conta os resultados do limite de detecção das quatro reações, e as características operacionais, como a possibilidade de utilizar o mesmo par de iniciadores para identificação e diferenciação de espécies, com utilização de eletroforese e visualização do produto da PCR nas mesmas condições para o diagnóstico e diferenciação de espécies, e facilidade na interpretação dos dados, em nossas condições, a PCR e a PCR-RFLP com o HSP70 demonstraram o melhor desempenho tanto para o diagnóstico de rotina de LTA, como para a subsequente diferenciação de espécies de *Leishmania* envolvidas nos casos confirmados.

Os iniciadores HSP70 e ITS1 podem ser indicados tanto para o diagnóstico de gênero quanto para a identificação das espécies de *Leishmania* envolvidas na infecção, porém

recomendamos o uso preferencial dos iniciadores HSP70, que oferece resultados confiáveis e de fácil interpretação.

7. Conclusão

- A PCR demonstrou melhores resultados quando comparada com os métodos diagnósticos utilizados na rotina do CREDESH-UFU.
- As reações de PCR apresentaram bom desempenho para identificação de *Leishmania*, com alta sensibilidade, alta especificidade e concordância variando de substancial à perfeita entre as técnicas.
- As reações de PCR com melhores índices de sensibilidade, especificidade, VPP, VPB e *k* para identificação de *Leishmania* foram as que utilizaram os iniciadores HSP70 e LITSR/L5.8S (ITS1).
- A RFLP com os produtos da amplificação da PCR-L150/152 não foi capaz de distinguir as espécies de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.
- A RFLP com os produtos da amplificação da PCR-HSP70 e PCR-ITS1 foi capaz de identificar as espécies de *Leishmania* em amostras de pacientes positivos para LTA.
- A RFLP com os produtos da amplificação PCR-HSP70 apresentou o melhor desempenho para diagnóstico e identificação das espécies avaliadas neste estudo.
- *L. braziliensis* é a principal espécie envolvida nos casos de LTA dos pacientes do CREDESH-UFU, e a forma clínica diagnosticada com maior frequência foi a LCL.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.

<https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000300012>

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in parasitology**, v. 61, p. 223-274, 2006.

[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61006-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61006-8)

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ALVES, C.F.; ALVES CF, FIGUEIREDO, M.M., SOUZA, C.C., MACHADO-COELHO, G.L., MELO, M.N., TAFURI, W.L., RASO, P.; SOARES; R.P.; American tegumentary Leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS One**, v.8, n.5, 2013.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063343>

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2010.03851.x>

AMPUERO, J.; RIOS, A.P.; CARRANZA-TAMAYO, C.O.; ROMERO, G.A.S. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 992-997, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700009>

BAÑULS, A.; HIDE, M; PRUGNOLLE, F.; *Leishmania* and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v.64, p.1-109, 2007.

[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

BARI, A.; RAHMAN, S.B.; Correlation of clinical, histopathological, and microbiological findings in 60 cases of cutaneous Leishmaniasis. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v.72, p.28-32, 2006.

<https://doi.org/10.4103/0378-6323.19714>

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BATES, P.A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p. 340-344, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: DF, 2007.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: DF, 2010.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde, 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Notificação de Agravos de Notificação. Leishmaniose tegumentar, 2015. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>. Acesso em 25/04/2017.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Brasília: DF, 2017.

COBO, F.; RODRÍGUEZ-GRANGER, J.; GÓMEZ-CAMARASA, C.; SAMPEDRO, A.; ALIAGA-MARTÍNEZ, L.; NAVARRO, J. M.; FERNÁNDEZ, J. G. Localized mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* mimicking cancer in the rhinolaryngeal region. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 50, p. 54-56, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.003>

COELHO, H.E.; CARVALHO, T.F.; ALBERTO, H.; FERNANDES, J.M.; SOUZA, K.B.; MAGALHÃES, A. O.C.; Ocorrência de Leishmaniose visceral em um cão em Uberaba, Minas Gerais. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n.16, s/p, 2011.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

<https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; DE OLIVEIRA-NETO, M. P.; DE BRITO, M. E. F.; FALQUETO, A.; GRIMALDI, G. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, 2003.

<https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3126-3132.2003>

DA SILVA, S.M.; RIBEIRO, V.M.; RIBEIRO, R.R.; TAFURI, W.L.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S. First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.166, n.1-2, p.159-62, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>

DA SILVA, L.A.; SOUSA, C.S.; GRAÇA, G.C.; 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. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 77-83, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.11.001>

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x>

DE ANDRADE, H. M.; REIS, A. B.; DOS SANTOS, S. L.; VOLPINI, Â. C.; MARQUES, M. J.; ROMANHA, A. J. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. **Veterinary parasitology**, v. 140, n. 3, p. 231-238, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.031>

DEGRAVE, W. F. O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.L.U.; Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* a min review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p.463-469, 1994.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761994000300032>

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, n.5, p. 305-18, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DORES-SILVA, P. R., NISHIMURA, L. S., KIRALY, V. T., & BORGES, J. C. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis* mitochondrial Hsp70:

Similarities and dissimilarities to human orthologues. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 613, p. 43-52, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.11.004>

DU, R.; HOTEZ, P. J.; AL-SALEM, W. S.; ACOSTA-SERRANO, A. A Old World Cutaneous Leishmaniasis and Refugee Crises in the Middle East and North Africa. **PLoS Negl Trop Dis**, v.10, n.5, p. e0004545, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004545>

EL TAI, N. O.; EL FARI, M.; MAURICIO, I.; MILES, M. A.; OSKAM, L.; EL SAFI, S. H.; SCHÖNIAN, G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. **Experimental parasitology**, v. 97, n. 1, p. 35-44, 2001.

<https://doi.org/10.1006/expr.2001.4592>

ELMAHALLAWY, E.K.; MARTÍNEZ, A.S.; GRANGER, J.R.; HOYOS-MALLECOT, Y. ; AGIL, A.; MARI, J.M.N.; FERNÁNDEZ, J.G.; Diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.8, n.8, p. 961-972, 2014.

<https://doi.org/10.3855/jidc.4310>

ESPIR, T. T.; GUERREIRO, T. S.; DE FARIAS NAIFF, M.; DE PAULA FIGUEIRA, L.; SOARES, F. V.; DA SILVA, S. S.; FRANCO, A. M. R. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental parasitology**, v. 167, p. 1-6, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>

FERNANDES, A. C. B. S.; Pedroso, R. B.; VENZAZZI, E. A. S.; Zanzarini, P. D.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. American cutaneous leishmaniasis with unusual clinical presentation and response to treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

FERREIRA, M.P.; ROSELINO, A.M.F.; NASCIMENTO, M.M.P.; AIRES, J.M. & FIGUEIREDO, J.F.C.; Sensitivity of an immunoenzymatic test for detection of anti-*L. braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**,v.48, n.4, p. 215-217, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000400008>

FRANÇA-COSTA, J.; WANDERLEY, J. L. M.; DEOLINDO, P.; ZARATTINI, J. B.; COSTA, J.; SOONG, L.; BORGES, V. M. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e36595, 2012.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036595>

FRÉZARD F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, 14(7): 2317-2336, 2009.

<https://doi.org/10.3390/molecules14072317>

GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H.; LLANOS-CUENTAS, A.; DONCKER, S.D.; AREVALO, J.; TINTAYA, K.W.Q.; DUJARDIN, J.C. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 5, p. 2294-2297, 2004.

<https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2294-2297.2004>

GARCIA, A. L.; KINDT, A.; QUISPE-TINTAYA, K. W.; BERMUDEZ, H.; LLANOS, A.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, n. 2, p. 109-116, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.07.003>

GARCIA, A. L.; PARRADO, R.; DE DONCKER, S.; BERMUDEZ, H.; DUJARDIN, J. C. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368-371, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.06.009>

GOMES, C.M.; DE PAULA, N.A.; CESETTI, M.V.; ROSELINO, A.M.; SAMPAIO, R.N.; Mucocutaneous *Leishmaniasis*: accuracy and molecular validation of noninvasive procedures in a *L. (V.) braziliensis* endemic area. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.79, p. 413-418, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.002>

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

<https://doi.org/10.1586/eri.10.19>

GRAÇA, G.C., VOLPINI, A.C., ROMERO, G.A., OLIVEIRA, N. M.P., HUEB, M., PORROZZI, R., BOITÉ, M.C., CUPOLILLO, E. Development and validation of PCR based assays for diagnosis of American cutaneous Leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n.5, p. 664-74, 2012.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000500014>

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11, p. 1169-1180, 2005.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>

GUALDA, K.P.; MARCUSSI, L.M.; ABREU, H.C.N.; ARISTIDES, S.M.A.; LONARDONI, M.V.C.; CARDOSO, F.F.; SILVEIRA, T.G.V.; New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, n.5, p.377-383, 2015.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000500002>

HANDLER, M. Z.; PATEL, P. A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.09.014>

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

KOLTAS, I.S.; EROGLU, F.; UZUN, S.; ALABAZ, D. A comparative analysis of different molecular targets using PCR for diagnosis of old world leishmaniasis. **Experimental parasitology**, v. 164, p. 43-48, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.007>

LACHAUD, L.; MARCHERGUI-HAMMAMI, S.; CHABBERT, E.; DEREURE, J.; DEDET, J.P.; BASTIEN, P. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for

detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

<https://doi.org/10.1128/JCM.40.1.210-215.2002>

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595-600, 1978.

<https://doi.org/10.1038/273595a0>

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761987000300015>

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R. S. M.; SILVEIRA, F. T. Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 2, p. 223-226, 1985.

[https://doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90340-2](https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90340-2)

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, p.159-17, 1977.

<https://doi.org/10.2307/2529310>

LIN, J.; REDIES, C. Histological evidence: housekeeping genes beta-actin and GAPDH are of limited value for normalization of gene expression. **Development genes and evolution**, V.222,n.6:, p.69-376,2012.

<https://doi.org/10.1007/s00427-012-0420-x>

MACHADO, M. I.; NISHIOKA, S. A.; FERREIRA, M. S.; SILVA, A. R.; ROCHA, A.; COSTA-CRUZ, J. M.; GONÇALVES, M. R. F.; Leishmaniose tegumentar americana no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v.8, p.17-28, 1992.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X1996000300005>

MEDEIROS, A.C.R.; RODRIGUES, S.S.; ROSELINO, A.M.F.; Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of

American cutaneous Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.421-424, 2002.

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2002000400002>

MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: Desafios e Perspectivas. **Rev Bras Parasitol Vet** , v.23, n.1, p. 41-45, 2004.

<http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

MOHAMMADPOUR, I.; MOTAZEDIAN, M. H.; HANDJANI, F.; HATAM, G. R. Lip leishmaniasis: a case series with molecular identification and literature review. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 96, 2017.

<https://doi.org/10.1186/s12879-016-2178-7>

MONROY-OSTRIA, A.; NASEREDDIN, A.; MONTEON, V. M.; GUZMÁN-BRACHO, C.; JAFFE, C. L. ITS1 PCR-RFLP diagnosis and characterization of *Leishmania* in clinical samples and strains from cases of human cutaneous leishmaniasis in states of the Mexican Southeast. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, 2014.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/607287>

MOUTTAKI, T.; MORALES-YUSTE, M.; MERINO-ESPINOSA, G.; CHIHEB, S.; FELLAH, H.; MARTIN-SANCHEZ, J.; RIYAD, M. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and identification of the causative *Leishmania* species in Morocco by using three PCR-based assays. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 420, 2014.

<https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-420>

MURRAY, C. J.; BARBER, R. M.; FOREMAN, K. J.; OZGOREN, A. A.; ABD-ALLAH, F.; ABERA, S. F.; ABU-RMEILEH, N. M. Global, regional, and national disability-adjusted life years (DALYs) for 306 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 188 countries, 1990–2013: quantifying the epidemiological transition. **The Lancet**, v. 386, n. 10009, p. 2145-2191, 2015.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61340-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61340-X)

NISHIOKA, S. A.; FERREIRA, M. S.; MACHADO, M. I.; SILVA, A. M.; ROCHA, A.; COSTA-CRUZ, J. M. & GONÇALVES, M. R. F.; An outbreak of cutaneous Leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.21 p. 209, 1988.

<https://doi.org/10.1590/S0037-86821988000400010>

OLIVEIRA, D.M.; VALDRINEZ, M.; LONARDONI, C.; TEODORO, U.; SILVEIRA, T.G.V.; Comparison of different primers for PCR- based diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.3, p.204-210, 2011.

[https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70176-3](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70176-3)

PIGOTT D.M.; BHATT S.; GOLDING N.; DUDA, K.A.; BATTLE, K.E.; BRADY, O.J.; MESSINA, J.P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J.S.; FREIFELD, C.C.; MEKARU, S.R.; GETHING, P.W.; GEORGE, D.B.; MYERS, M.F.; REITHINGER, R.; HAY, S.I.; Global distribution maps of the Leishmaniasis. **Elife**, v.3, n. 02851, 2014.

<https://doi.org/10.7554/eLife.02851>

QUEIROZ, A.; SOUSA, R.; HEINE, C.; CARDOSO, M.; GUIMARÃES, L.H.; MACHADO, P.R.L.; CARVALHO, E.M.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; SCHRIEFER, A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. **Journal of clinical microbiology**, p. JCM. 02064-12, 2012.

<https://doi.org/10.1128/JCM.02064-12>

QUINTELLA, L. P.; CUZZI, T.; MADEIRA, M. D. F.; OKAMOTO, T.; SCHUBACH, A. D. O. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 2, p. 83-86, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000200005>

QUINTELLA, L.P. ; PASSOS, S.R.L.; DE MIRANDA, L.H.M.; CUZZI, T. ; BARROS, M.B. DE L.; FRANCESCONI-DO-VALE, A.C. ; GALHARDO, M.C.G. ; MADEIRA, M. DE F.; CARVALHO, M.H. F.DE.; SCHUBACH, A.DE O.; Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary Leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. **British Association of Dermatologists**, v.167, p. 837–846, 2012.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11012.x>

RAHMAN, S. B.; UL BARI, A. Comparative cellular immune host response in acute vs healed lesions of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Ayub Medical College, Abbottabad**, v. 18, n. 3, p. 7-12, 2006.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)

REITHINGER, R; DUJARDIN, J. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21-25, 2007.

<https://doi.org/10.1128/JCM.02029-06>

RODGERS, M. R; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F; Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v.71, p. 267-275, 1990.

[https://doi.org/10.1016/0014-4894\(90\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0014-4894(90)90031-7)

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A.; BATES, P. A. TRANSMISSION of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 463, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nature02675>

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International journal for parasitology. Parasites and wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.08.004>

ROTUREAU, B.; RAVEL, C.; COUPPIÉ, P.; PRATLONG, F.; NACHER, M.; DEDET, J.P.; Use of PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.459-467, 2006.

<https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.459-467.2006>

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100-103, 1989.

[https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90176-8](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90176-8)

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nature immunology**, v. 3, n. 11, p. 1041-1047, 2002.

<https://doi.org/10.1038/ni1102-1041>

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I. L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138, n. 4, p. 405-425, 2011.

<https://doi.org/10.1017/S0031182010001538>

SCHÖNIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N.; SCHWEYNOCHA, A. C.; SCHALLIG, H. D. F. H.; PRESBERA, W.; JAFFEB, C. L. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 7, n. 1, p. 349–358, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1296, 2017.

<https://doi.org/10.3390/ijms18061296>

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K.; Cutaneous Leishmaniasis in Travellers: a Focus on Epidemiology and Treatment in 2015. **Current Infectious Disease Reports**, v. 17, p. 37, 2015.

<https://doi.org/10.1007/s11908-015-0489-2>

SILVEIRA, F. T., LAINSON, R., & CORBETT, C. E. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, 2004.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>

SILVEIRA, F. T.; ISHIKAWA, E. A. Y.; DE SOUZA, A. A. A.; 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**, v. 9, n. 1, p. 43-50, 2002.

<https://doi.org/10.1051/parasite/200209143>

SILVEIRA, F. T.; SILVA, S. M.; GONTIJO, C. M.; TAFURI, W. L. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. **Parasitology international**, v. 66, p. 884-888, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.10.003>

SIMPSON, L. Kinetoplast DNA in trypanosomid flagellates. **International review of cytology**, v. 99, p. 119-179, 1986.

[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61426-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61426-6)

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, 2017.

<https://doi.org/10.12688/f1000research.11120.1>

VENTAKARAM, M.; MOOSA, M.; DEVI, L. Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: A study in Oman. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v. 67, n. 6, p. 294, 2001.

VOLPINI, A. C.; MARQUES, M. J.; LOPES DOS SANTOS, S.; MACHADO- COELHO, G. L.; MAYRINK, W.; ROMANHA, A. J. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa- stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. **Clinical microbiology and infection**, v. 12, n. 8, p. 815-818, 2006.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01422.x>

VOLPINI, Â. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 31-37, 2004.

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.10.008>

WORLD HEALTH ORGANIZAION (WHO). Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. **In:** WHO Technical Report Series, n. 949. ed. Genebra, World Health Organization, p. 201, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZAION (WHO). Leishmaniasis fact sheet. <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>, Acesso em 30/06/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. World Health Organization, p.67, 2013.

APÊNDICE

Paciente	Montenegro	IHC	Iniciadores 13A/13B	Iniciadores L150/152	Iniciadores HSP70	Espécie	Iniciadores LITS1	Espécie
1	+	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	
2	+	-	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
3	-	-	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	<i>L.amazonensis</i>
4	+	-	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
5	+	-	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
6	+	+	-	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
7	+	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
8	+	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
9	+	-	+	+	+		+	<i>L.braziliensis</i>
10	-	-	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
11	-	-	-	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
12	-	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
13	-	NR	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
14	+	+	-	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
15	NR	-	-	-	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
16	-	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
17	+	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
18	-	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
19	-	-	+	+	+		+	<i>L.amazonensis</i>
20	-	NR	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
21	-	+	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	<i>L.amazonensis</i>
22	+	+	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
23	-	-	-	-	-	-	-	
24	+	NR	+	+	+		+	
25	NR	NR	+	-	+	<i>L.amazonensis</i>	+	<i>L.amazonensis</i>
26	NR	NR	+	-	+		+	
27	-	+	-	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
28	NR	NR	NR	+	+		+	<i>L.braziliensis</i>
29	-	-	+	+	+	<i>L.amazonensis</i>	+	
30	NR	+	+	+	+		+	<i>L.braziliensis</i>
31	NR	NR	-	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
32	NR	+	+	+	+	<i>L.infantum</i>	+	<i>L.infantum</i>
33	NR	NR	-	+	+		+	
34	NR	NR	+	+	+		+	
35	NR	-	+	-	+		+	
36	NR	-	+	+	+		+	
37	NR	-	+	-	+		+	
38	NR	-	+	+	+		+	<i>L.guyanensis</i>
39	NR	-	+	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	<i>L.braziliensis</i>
40	NR	-	-	+	+	<i>L.braziliensis</i>	+	
41	NR	+	+	-	+	<i>L.braziliensis</i>	+	

Quadro 4. Representação de todas as amostras avaliadas, testes realizados e seus resultados. NR: Não realizado; + : Resultado Positivo; - : Resultado Negativo.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM HANSENÍASE E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, CREDESH- UFU

Pesquisador: Sydney Magno da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65736416.2.0000.5152

Instituição Proponente: Instituto de Ciências Biomédicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.010.572

Apresentação do Projeto:

O protocolo de pesquisa intitulado "DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM PACIENTES ATENDIDOS NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM HANSENÍASE E DERMATOLOGIA SANITÁRIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, CREDESH- UFU", a ser desenvolvido em sede de pós-graduação pretende padronizar o diagnóstico molecular e identificar as espécies de Leishmania causadoras da LTA (Leishmaniose Tegumentar Americana) nos pacientes atendidos no Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia, CREDESH/UFU. Esclarecem os pesquisadores que o diagnóstico definitivo da LTA deve ser baseado em dados clínico/epidemiológicos associados ao diagnóstico laboratorial, que consiste principalmente de testes diretos como o exame direto de lâminas de raspado de lesões, cultura, exames histopatológicos, e sorológicos como a intradermorreação de Montenegro. Entretanto estes métodos possuem baixa sensibilidade. O tratamento atualmente utilizado para as LTA é potencialmente tóxico e pode gerar vários eventos adversos, incluindo o óbito. Para isso, é de fundamental importância que o diagnóstico seja realizado com a maior rapidez e acurácia. Dentre

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica

Bairro: Santa Mônica

CEP: 38.408-144

UF: MG

Município: UBERLÂNDIA

Telefone: (34)3239-4131

Fax: (34)3239-4335

E-mail: cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.010.572

as técnicas utilizadas o diagnóstico molecular feito através da PCR (Reação em cadeia da polimerase) possui elevada sensibilidade e especificidade se revelando uma ferramenta promissora para o diagnóstico da LTA. A hipótese é que o uso de técnicas moleculares que identifiquem as espécies causadoras da LTA pode aumentar a acurácia do diagnóstico e sua utilização na rotina pode reduzir o custo e tempo de tratamento dos pacientes no âmbito do SUS.

METODOLOGIA: O Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia (CREDESH/UFU) atende na sua rotina pacientes da macrorregião de Uberlândia com suspeita de LTA. Estes pacientes são submetidos ao exame clínico seguido do teste de Montenegro. Quando estes pacientes se apresentarem para realizar exames de rotina serão abordados pelos pesquisadores que explicarão os benefícios e riscos da participação na pesquisa. Além dos exames já realizados na rotina, serão coletados dois fragmentos da lesão por biópsia pela equipe médica do CREDESH-UFU, sendo que um será fixado em formalina tamponada a 10% e outro conservado em nitrogênio líquido. Os fragmentos serão encaminhados para o Laboratório de Bioensaios em Leishmania da UFU, para realização de testes moleculares e imuno-histoquímicos. Além das análises laboratoriais serão coletados dados dos prontuários dos pacientes com suspeita de LTA, atendidos no CREDESH/UFU no período de 2017 a 2018 para caracterização da clinicoepidemiológica dos casos atendidos. Os dados a serem coletados incluem cidade de origem, sexo, idade, tratamento, ocorrência de recidiva, exames a que foram submetidos e seus resultados.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO: Serão inclusos pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 85 anos com suspeita de LTA atendidos no CREDESH-UFU e que forem submetidos à coleta de fragmentos de lesão por biópsia pela equipe médica do CREDESH-UFU, no período de 2017 a 2018.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO: Serão excluídos pacientes que não forem submetidos a coleta de fragmentos de lesão por biópsia pela equipe médica do CREDESH-UFU.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o projeto:

Objetivo Primário: Padronizar o diagnóstico molecular e identificar as espécies de Leishmania

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.010.572

causadoras da Leishmaniose Tegumentar nos pacientes atendidos no Centro de Referência Nacional em Hanseníase e Dermatologia Sanitária da Universidade Federal de Uberlândia, CREDESH/UFU.

Objetivo Secundário: • Padronizar o diagnóstico molecular para LTA em amostras de pacientes atendidos no CREDESH-UFU. • Identificação, por testes moleculares, das espécies envolvidas nos casos clínicos de LTA em amostras de pacientes atendidos no CREDESH-UFU. • Comparar os resultados dos métodos moleculares com utilizados no diagnóstico da LTA na rotina de atendimento do CREDESH/UFU e com os testes imuno-histoquímicos. • Caracterizar o perfil clínico epidemiológico dos casos de LTA atendidos no CREDESH/UFU.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores:

Riscos: O primeiro está relacionado à coleta das amostras, mas a equipe esclarece que serão coletadas por biópsia de pele no CREDESH por profissional qualificado, experiente e com habilitação profissional. Outro risco que o participante da pesquisa está sujeito é o de revelação da sua identidade, porém a equipe executora se compromete a manter sigilo absoluto em relação as informações referentes ao diagnóstico realizado e as obtidas nos prontuários.

Benefícios: A LTA produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico nem sempre simples ou imediato, pois a doença pode ser inicialmente confundida com outras dermatoses levando a um diagnóstico errôneo e tratamento inadequado. A determinação das espécies envolvidas na infecção é de suma importância para determinar as drogas para o tratamento da infecção, principalmente em casos de recidivas, uma vez que algumas espécies de Leishmania podem apresentar maior resistência aos medicamentos. O tratamento medicamentoso previne a evolução da doença para formas mais destrutivas e graves, sendo potencialmente tóxico e podendo gerar vários eventos adversos. Assim, é de grande necessidade e importância a investigação de métodos diagnósticos mais sensíveis que possibilitem identificar as diferentes espécies de Leishmania envolvidas na infecção.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa demonstra relevância acadêmica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.010.572

Termos devidamente anexados (folha de rosto, links para currículo, termo de compromisso, declaração de co-participantes, TCLE, instrumento de coleta de dados sociodemográficos); cronograma e orçamento adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

PENDÊNCIAS:

A) A equipe não apresenta cálculo amostral que justifique o recrutamento de 80 (oitenta) participantes da pesquisa, nem esclarece o número mínimo necessário para manutenção da pesquisa.

=====

Responder às pendências em um documento (WORD[.doc] ou .pdf) anexo e alterar no corpo do projeto os tópicos que forem diretamente impactados pelas respostas às pendências.

CASO O PESQUISADOR NÃO ANEXE ESTE DOCUMENTO COM O DETALHAMENTO DAS RESPOSTAS ÀS PENDÊNCIAS, O PROTOCOLO SERÁ DEVOLVIDO AO PESQUISADOR SEM TER SIDO ANALISADO PELO CEP E PERMANECERÁ COM PENDÊNCIAS.

O pesquisador tem prazo de 30 dias para responder à(s) pendência(s). Após este prazo o mesmo deverá submeter Novo PROTOCOLO de pesquisa para avaliação pelo sistema CEP/CONEP.

Considerações Finais a critério do CEP:

OBS: o CEP/UFU informa que a recorrência de uma mesma pendência por três vezes acarretará na "NÃO APROVAÇÃO" do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_672217.pdf	15/03/2017 11:21:56		Aceito

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLÂNDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br

Continuação do Parecer: 2.010.572

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil.docx	15/03/2017 11:21:30	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_Consentimento_livre.docx	09/03/2017 11:49:23	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	INSTRUMENTO_COLETA_DADOS.doc	09/03/2017 11:37:43	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_coparticipacao.pdf	09/03/2017 11:36:59	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_compromisso_equipe_executora.pdf	07/12/2016 11:17:42	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_assinada.pdf	07/12/2016 11:16:54	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito
Outros	Lattes_equipe_executora.docx	31/10/2016 17:06:04	Fernanda Cristina Assis Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLANDIA, 11 de Abril de 2017

Assinado por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Endereço: Av. João Naves de Ávila 2121- Bloco "1A", sala 224 - Campus Sta. Mônica
Bairro: Santa Mônica **CEP:** 38.408-144
UF: MG **Município:** UBERLANDIA
Telefone: (34)3239-4131 **Fax:** (34)3239-4335 **E-mail:** cep@propp.ufu.br