

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS

DOUTORADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA

ESTUDO CLÍNICO-MOLECULAR NA LEISHMANIOSE MUCOCUTÂNEA:
Diagnóstico e Rastreamento de Subpopulações de *Leishmania*
(*Viannia*) *braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes

Rio de Janeiro

2011

Estudo Clínico-Molecular na Leishmaniose
Mucocutânea: Diagnóstico e Rastreamento de
Subpopulações de *Leishmania (Viannia) braziliensis*
nos níveis inter e intrapacientes

FERNANDA SANTOS DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Pesquisa
Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa
Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de
Doutor em Ciências

Orientadoras: Dra. Cláudia Maria Valete-Rosalino
Dra. Raquel da Silva Pacheco

Rio de Janeiro

2011

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

O482

Oliveira, Fernanda Santos de.

Estudo Clínico-molecular na Leishmaniose Mucocutânea: diagnóstico e rastreamento de subpopulações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes. / Fernanda Santos de Oliveira. – Rio de Janeiro, 2011.

xv, 101 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2011.

Bibliografia: f. 81-101

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Leishmaniose mucocutânea. 3. Leishmaniose disseminada. 4. Leishmaniose mucosa. 5. HIV. 6. PCR. 7. LSSP-PCR. I. Título.

CDD 616.9364

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ sob a orientação da Dra. Cláudia Maria Valet-Rosalino e no Laboratório de Sistemática Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ sob a orientação da Dra. Raquel da Silva Pacheco, com o suporte financeiro do Instituto Kinder do Brasil (IKB), CNPq e FAPERJ.

Aos meus pais, Orondo e Iza, que me ensinaram a agir com respeito, dignidade e honestidade. Sem vocês nada disto faria sentido... a vocês, tudo dedico.

Ao meu amado Alê, por todo o seu amor, carinho, companheirismo, apoio, paciência e por sua alegria e otimismo constantes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proporcionar tão grandes coisas em minha vida e pela sua presença constante, amparando-me em todos os momentos.

Aos meus irmãos, tios, cunhados, sogros e minha fofa sobrinha “Gabi”, pelo amor, apoio e por torcerem por mim durante toda a minha caminhada. A vocês todo o meu carinho e gratidão!

À Dra. Raquel da Silva Pacheco, minha eterna gratidão pelo seu carinho, sua amizade, sua preciosa e competente orientação, pela confiança e pela relação de respeito desde o início de nossa convivência. E, sobretudo, por me oferecer inúmeras oportunidades que tanto contribuíram para a minha formação profissional. Obrigada por ser minha “mãe científica”! Obrigada por tudo!

À Dra. Cláudia Maria Valete-Rosalino e Dr. Armando de Oliveira Schubach, por terem me recebido em sua equipe, pela oportunidade e credibilidade depositada que permitiram o desenvolvimento dessa tese.

À Dra. Maria de Fátima Madeira pelo carinho e atenção, e por ter aceitado avaliar todo o processo de desenvolvimento dessa tese.

À equipe do laboratório de Vigilância em Leishmanioses, especialmente aos médicos do setor de dermatologia e otorrinolaringologia, por coletarem os fragmentos de biópsias dos pacientes.

Ao Dr. Sandro Javier Bedoya e Dra. Maria Inês Pimentel, pelas valiosas sugestões nos momentos precisos.

Ao Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa, pela ajuda nas análises estatísticas e valiosa colaboração na finalização dessa tese.

Aos alunos de iniciação científica, Tiago Martins e Mayara Malhado, pelo auxílio na realização das atividades laboratoriais.

A todos do laboratório de Sistemática Bioquímica que, direta ou indiretamente, me ajudaram no decorrer desse trabalho.

À Dra. Fátima Conceição da Silva, Dra. Aline Fagundes e a Cláudia de Paula Reis, por repassarem os fragmentos de biópsias dos pacientes.

Ao meu amigo Sandro, pela amizade, paciência, disponibilidade e pelo constante apoio.

À Marize, por sua amizade, atenção e indispensável ajuda em todos os momentos.

Aos meus amigos, Patrícia, Jair, Cora, Andrea e Arlete pelos momentos agradáveis de convivência e pelas palavras de incentivo.

Ao setor de prontuários por permitir o acesso às informações dos pacientes.

Agradeço aos pacientes por terem aceitado colaborar neste estudo e pela confiança na pesquisa e na medicina.

À Priscila de Augustinis e Miriam Lins Caetano, pelas revisões da língua portuguesa e sugestões.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da minha bolsa de doutorado.

À FAPERJ e ao Instituto Kinder do Brasil, por financiarem este projeto e a minha participação em eventos científicos.

“Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.”

(Albert Einstein)

Oliveira, F S. **Estudo Clínico-Molecular na Leishmaniose Muco-cutânea: Diagnóstico e Rastreamento de Subpopulações de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes**. Rio de Janeiro, 2011. 101 f. Tese [Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a diversidade genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes, diretamente em lesões cutâneas e mucosas de indivíduos com leishmanioses mucocutânea (LMC), disseminada (LD) e mucosa (LM), incluindo indivíduos coinfectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV). Um total de 61 amostras procedentes de 38 pacientes foi analisado pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase (PCR), da reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estrigência (LSSP-PCR) e da análise fenética, tendo como alvo molecular a região variável do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA). Neste estudo, predominaram indivíduos do sexo masculino e com acometimento mucoso nasal. A presença de DNA do parasita foi evidenciada pela banda diagnóstica de 750 pb, em todas as amostras analisadas, possibilitando o diagnóstico específico. Na investigação do perfil genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis*, através da LSSP-PCR, foi revelado o polimorfismo genético intrafragmento traduzido como uma assinatura do kDNA do parasito para cada amostra. Assinaturas de kDNAs similares em amostras de paciente coletadas ao mesmo tempo (mucosa oral e nasal), e a divergência nos perfis genéticos em amostras coletadas em tempos diferentes na mesma localização (mucosa nasal) sugerem a clonalidade do inóculo inicial, como consequência da estrutura populacional clonal de *Leishmania*. No estudo da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes foram evidenciadas similaridades genotípicas entre as amostras de lesões cutânea e mucosa intrapacientes. As análises fenética e estatística possibilitaram afirmar que a diversidade genética no nível intrapacientes é menor do que a observada entre os pacientes. Nenhuma associação pode ser observada entre os perfis genéticos de *L. (V.) braziliensis* e as formas clínicas da doença (LM, LMC, LD), e nem em relação à localização da lesão cutânea ou mucosa (nasal ou oral). O polimorfismo genético de *L. (V.) braziliensis* também foi evidenciado nos pacientes coinfectados pelo HIV, cuja análise fenética reuniu os perfis genéticos em dois grupos distintos, os quais discriminaram entre as amostras obtidas de pacientes com infecção *Leishmania/ HIV* daquelas obtidas de pacientes não coinfectados. A discriminação de perfis genéticos diferenciados de *L. (V.) braziliensis* em pacientes coinfectados pelo HIV sugere que a imunossupressão tem impacto na estrutura populacional do parasita. Os nossos resultados corroboram a complexidade genética existente nos parasitos do gênero *Leishmania*, reforçando a diversidade na dinâmica populacional e na plasticidade genética de *L. (V.) braziliensis*.

Palavras-chave: 1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2. Leishmaniose mucocutânea; 3. Leishmaniose disseminada; 4. Leishmaniose mucosa; 5. Coinfecção *Leishmania/ HIV*; 6. PCR; 7. LSSP-PCR.

Oliveira, F S. **Clinical and molecular study in mucocutaneous leishmaniasis: Diagnoses and screening of subpopulation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the inter and inpatient levels.** Rio de Janeiro, 2011. 101 f. Thesis [PhD in Clinic research in Infectious Diseases] – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT

The present study has as its main objective to evaluate the genetic diversity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the inter and inpatient levels, directly from cutaneous and mucosal lesions of individuals with mucocutaneous (MCL), disseminated (DL) and mucosal (ML) leishmaniasis, including individuals with the human immunodeficiency virus (HIV) infection. A total of 61 samples recovered from 38 patients was analyzed by the techniques of polymerase chain reaction (PCR), low-stringency single-specific-primer PCR (LSSP-PCR) and phenetic analysis, directed to the variable region of the kinetoplast DNA (kDNA) minicircles. In this study, male individuals with nasal mucosa involvement predominated. The presence of the parasite's DNA was revealed by the diagnosis band of 750 bp, in all analyzed samples, making the specific diagnosis possible. In the investigation of the genotypic profile of the subpopulations of *L. (V.) braziliensis*, through LSSP-PCR, it was revealed the intrafragment genetic polymorphism translated as a kDNA signature for each sample. Similar kDNAs signatures in patient's samples collected simultaneously (oral and nasal mucosa), and the divergence in the genetic profiles in samples collected at different times on the same location (nasal mucosa) suggest the clonality of the initial inoculum, as a consequence of the clonal population structure of *Leishmania*. In the study of the genetic variability of *L. (V.) braziliensis* in the inter and inpatient levels, genotypic similarities were observed among the cutaneous and mucosal lesions inpatients. The statistic and phenetic analyzes made it possible to assure that the genetic diversity in the inpatient level is lower than the observed among the patients. No association could be observed between the genetic profiles of *L. (V.) braziliensis* and the clinical forms of the disease (ML, MCL, DL) and neither in relation to the location of the cutaneous or mucosal lesion (nasal or oral). The genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* was also detected in the HIV-infected patients. The phenetic analysis has grouped the genetic profiles into two different clusters, which discriminated between samples from patients with *Leishmania/ HIV* co-infections from that of non-HIV-infected patients. The discrimination of *L. (V.) braziliensis* divergent genetic profiles in patients co-infected with HIV suggests that the immunosuppression has some impact on the parasite's populational structure. Our results corroborate the genetic complexity in parasites of the genus *Leishmania* reinforcing the diversity in the populational dynamics and genetic plasticity of *L. (V.) braziliensis*.

Keywords: 1. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 2. Mucocutaneous leishmaniasis; 3. Disseminated leishmaniasis; 4. Mucosal leishmaniasis; 5. *Leishmania/ HIV* co-infection; 6. PCR; 7. LSSP-PCR.

PREFÁCIO

Esta tese está organizada da seguinte forma:

Capítulo 1: Introdução, Justificativa, Modelo Conceitual, Hipóteses de Trabalho e Objetivos

Neste capítulo encontram-se informações e dados extraídos da literatura sob diversos aspectos relacionados à leishmaniose tegumentar americana e ao agente etiológico do gênero *Leishmania*. São abordados alguns pontos relacionados às apresentações clínicas da doença, incluindo a coinfeção pelo HIV, e a organização genômica do parasito. Fez-se também uma breve revisão referente às técnicas moleculares aplicadas no diagnóstico e em estudos da variabilidade genética do parasito, enfocando a PCR e LSSP-PCR, que foram empregadas neste trabalho. No final do capítulo são mencionados a justificativa, o modelo conceitual, as hipóteses de trabalho e os objetivos, geral e específicos, deste estudo.

Capítulo 2: Artigos

Neste capítulo estão anexados os três artigos que compõem esta tese, sendo ordenados da seguinte forma:

- **Artigo 1:** apresenta os resultados da avaliação da diversidade interpacientes na investigação do perfil genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* circulante em amostras de lesões mucosas de pacientes com LM utilizando o marcador molecular polimórfico LSSP-PCR.
- **Artigo 2:** refere-se ao estudo da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes diretamente em lesões cutâneas e mucosas de indivíduos com diferentes manifestações clínicas de LTA.
- **Artigo 3:** apresenta os resultados da avaliação do impacto da imunossupressão pelo HIV na diversidade populacional de *L.(V.) braziliensis*.

Capítulo 3: Discussão e Conclusões

Neste capítulo consta a discussão dos resultados obtidos referentes à avaliação clínica e epidemiológica da população estudada e à aplicação da técnica de PCR, tendo como alvo os minicírculos do kDNA, utilizando diretamente amostras de lesões cutâneas e mucosas de pacientes com diferentes manifestações clínicas da LTA. Discutimos a aplicabilidade da

LSSP-PCR no estudo da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes. Os resultados foram interpretados avaliando-se dois cenários (i) o indivíduo, por si só, funcionando como um filtro biológico em que populações mais adaptadas seriam selecionadas e (ii) as interações ecoepidemiológicas existentes em distintas áreas endêmicas e seu reflexo na dinâmica populacional das populações circulantes de *L. (V.) braziliensis*. No final deste capítulo encontram-se as principais conclusões desta tese.

SUMÁRIO

Lista de símbolos e abreviaturas

CAPÍTULO 1

1. Introdução	1
1.1 – A doença e sua distribuição geográfica	1
1.1.1 – Leishmaniose cutânea (LC)	3
1.1.2 – Leishmaniose disseminada (LD)	3
1.1.3 – Leishmaniose mucosa (LM)	4
1.2 – Aspectos epidemiológicos da LTA	5
1.3 – Coinfecção <i>Leishmania</i> / HIV associada à LTA	6
1.4 – O parasito – <i>Leishmania</i>	8
1.5 – Diagnóstico e tipagem molecular	9
1.5.1 – A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)	10
1.6 – Variabilidade genética de <i>L. (V.) braziliensis</i>	13
1.6.1 – Reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estrigência (LSSP-PCR)	14
2. Justificativa	15
3. Modelo conceitual	16
4. Hipóteses de trabalho	17
5. Objetivos	17
5.1 – Objetivo geral	17
5.2 – Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 2	
6. Artigos	20
6.1 – Artigo 1	21
6.2 – Artigo 2	27
6.3 – Artigo 3	49
CAPÍTULO 3	
7. Discussão	72
8. Conclusões	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
Cbp	cisteína proteinase B
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxinucleosídeos trifosfatos
dCTP	2' - deoxicitidina 5' - trifosfato
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G6PD	glucose-6-fosfatase desidrogenase
gp63	glicoproteína gp63
HCL	ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hs70	proteína de choque térmico hsp70
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITS	regiões espaçadoras internas transcritas
Kb	kilobases
KCL	cloreto de potássio
kDNA	DNA do cinetoplasto
VigiLeish	Laboratório de Vigilância em Leishmanioses
LASIBI	Laboratório de Sistemática Bioquímica
LC	Leishmaniose Cutânea
LD	Leishmaniose Disseminada
LM	Leishmaniose Mucosa
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LSSP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Primer Único em Condições de Baixa Estringência
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LVA	Leishmaniose Visceral Americana
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro

mm ³	milímetro cúbico
mmol	milimolar
μL	microlitros
μmol	micromolar
nDNA	DNA nuclear
ng	nanogramas
pb	pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	picomoles
RAPD	Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso
RFLP	Polimorfismos de Tamanho dos Fragmentos de Restrição
RNA	Ácido ribonucléico
SD	Desvio Padrão
Sm	Coefficiência de Concordância Simples
SSU rRNA	pequena subunidade de RNA ribossomal
Tris	Tris hidroxil metil amino metano
SDS	sódio dodecil sulfato
SSC	salina citrato de sódio
<i>Taq</i>	DNA polimerase termoestável derivada da bactéria termófila <i>Thermus aquaticus</i>
U	Unidade
UPGMA	Método não Ponderado de Agrupamento aos Pares por Média Aritmética
α ³² P	fósforo 32 na posição α

CAPÍTULO 1

1 – INTRODUÇÃO

1.1 - A doença e sua distribuição geográfica

As leishmanioses representam um grande problema de saúde pública, ocupando um lugar de destaque entre as seis doenças infectoparasitárias de maior importância no mundo. Esta doença incide de forma endêmica em países de clima tropical e subtropical de quatro continentes - Ásia, África, Europa e América, afetando populações de 88 países (66 do Velho Mundo e 22 do Novo Mundo). Estima-se uma prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas e de aproximadamente 350 milhões de pessoas expostas ao risco de adquirir a doença (DESJEUX 2001). No entanto, estimativas exatas quanto à incidência e prevalência são bastante difíceis, uma vez que o número de casos ocorridos pode ser consideravelmente maior do que os notificados oficialmente. Tal diferença entre a realidade e o número de casos reportados pode ser explicada por vários fatores, dentre eles a obrigatoriedade de notificação da doença em apenas 33 dos 88 países endêmicos (DESJEUX 2004).

No Novo Mundo, as leishmanioses podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA), de acordo com a espécie e os distintos tropismos dos parasitos envolvidos na infecção. A LTA é considerada como uma doença autóctone do continente americano (LAINSON 1983; ALTAMIRANO-ENCISO et al. 2003), com uma incidência anual estimada em 1.5 milhões de casos. A distribuição da LTA estende-se desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. No Brasil, a expansão geográfica da LTA vem sendo observada em todo o território brasileiro, com casos autóctones registrados em todas as unidades federadas. Entre 2000 e 2008, foram notificados 238.749 casos de LTA, com média anual de 26.528 casos novos no Brasil, e as regiões Norte e Nordeste vêm se destacando com as maiores incidências dos casos no país (MINISTÉRIO DE SAÚDE 2010a).

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Este parasito é transmitido ao homem e animais silvestres e domésticos através da picada de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), amplamente distribuídos no Novo Mundo, conhecidos como flebotomíneos. Uma grande variedade de mamíferos silvestres e domésticos, como roedores, canídeos, marsupiais, primatas e edentados são os hospedeiros vertebrados da *Leishmania*, sendo considerados reservatórios naturais aqueles responsáveis pela manutenção do parasito na natureza (GRIMALDI Jr. &

TESH 1993; ASHFORD 1996). Em relação aos hospedeiros invertebrados, são conhecidas pelo menos 400 espécies de flebotômíneos, porém, somente 40 foram incriminadas como possíveis vetores nas Américas (LAINSON & RANGEL 2003). As leishmanioses apresentam uma situação epidemiológica bastante complexa em decorrência da multiplicidade de espécies do parasito, de flebotômíneos vetores, de diferentes reservatórios e hospedeiros e dos distintos ecótopos (LAINSON & SHAW 1998; REITHINGER et al. 2007). O homem adquire a infecção acidentalmente quando se expõe ao ciclo natural de transmissão das leishmanioses.

O gênero *Leishmania* engloba 31 espécies descritas que infectam mamíferos hospedeiros silvestres ou domésticos e vetores, sendo que 22 espécies são encontradas infectando o homem (SHAW 1994; ASHFORD 2000; SILVEIRA et al. 2002). No Novo Mundo são conhecidas 21 espécies, das quais 11 pertencem ao subgênero *L. (Leishmania)* Safjanova 1982 e 10 pertencem ao subgênero *L. (Viannia)* Lainson & Shaw 1987. Nas Américas, 15 espécies são responsáveis pela doença humana, das formas cutâneas, mucosa e visceral (SHAW 1994; SILVEIRA et al. 2002). No Brasil, seis espécies associadas à LTA humana pertencem ao subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lindenbergi*, além de uma espécie pertencente ao subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*.

A infecção humana por *Leishmania* produz um amplo espectro de manifestações clínicas que é atribuído a uma complexa interação entre a resposta imunológica do paciente e as características fenotípicas das espécies infectantes. Clinicamente, a LTA se expressa pela presença de lesão cutânea localizada (leishmaniose cutânea localizada), lesões múltiplas (leishmaniose cutânea disseminada) ou lesões mucosas (leishmaniose mucosa), além de uma forma anérgica difusa que produz lesões nodulares não ulcerativas, sendo de difícil tratamento (leishmaniose cutânea difusa) (CONVIT et al. 1993; revisadas por REITHINGER et al. 2007 e GOTO & LINDOSO 2010).

No Brasil, os principais agentes etiológicos responsáveis pelas leishmanioses cutâneas são *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, sendo estas duas últimas espécies também associadas à forma leishmaniose mucocutânea ou mucosa (MARZOCHI & MARZOCHI 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010b). As formas clínicas de interesse deste estudo serão abordadas a seguir com mais detalhes.

1.1.1 - Leishmaniose cutânea (LC)

A doença é caracterizada, inicialmente, pela presença de um nódulo ou pápula eritematosa em área da pele exposta, no local da picada do flebotomíneo, que pode ulcerar e curar espontaneamente ou, então, se tornar uma lesão ulcerativa. A úlcera típica de leishmaniose cutânea (LC) é indolor, apresenta formato arredondado, com borda eritematosa, infiltrada e de consistência firme, bem delimitada e com fundo necrótico granuloso e úmido, configurando a clássica lesão com bordas em moldura. O fundo da úlcera pode apresentar exsudato seropurulento e crostas, quando associado à infecção bacteriana (PESSÔA & BARRETTO 1948; MARSDEN 1986). A linfadenopatia e nódulos cutâneos podem acompanhar o processo de evolução. Após o tratamento, as lesões cutâneas costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa e áreas de hipo ou de hiperpigmentação. Algumas vezes podem tornar-se hipertróficas ou podem passar despercebidas, por sua coloração, tamanho, forma ou localização. Se não tratadas, as lesões tendem à cura espontânea (MARSDEN et al. 1984a; COSTA et al. 1990) em período de alguns meses a poucos anos. No entanto, as lesões também podem permanecer ativas por vários anos e coexistir com lesões mucosas que surgem posteriormente, caracterizando a forma leishmaniose mucocutânea (LMC) (PESSÔA & BARRETTO 1948; MARSDEN et al. 1984b). Estima-se que menos de 5% dos casos da forma cutânea possam desenvolver lesões mucosas localizadas destrutivas secundárias e, quando ocorrem, tendem a se manifestar preferencialmente nas mucosas das vias aerodigestivas superiores (MARSDEN 1986; HERWALDT 1999).

1.1.2 - Leishmaniose disseminada (LD)

A leishmaniose disseminada (LD) é uma forma clínica relativamente rara da LTA (COSTA et al. 1986, MINISTÉRIO DE SAÚDE 2010b) e caracteriza-se principalmente por apresentar numerosas lesões acneiformes e papulosas distribuídas por todo o corpo, mais frequentemente na face e tronco. A doença inicia-se com uma ou várias lesões localizadas com as características de úlcera típica da LC, e posteriormente ocorre a disseminação das lesões por via hemática ou linfática. O número de lesões pode alcançar as centenas. As múltiplas lesões podem apresentar-se sob diferentes aspectos, tais como papulosas, acneiformes, nodulares e ulceradas. Aproximadamente 30% dos pacientes com LD apresentam o acometimento mucoso simultaneamente (TURETZ et al. 2002). As principais manifestações sistêmicas incluem febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros. A visualização de parasitos nas lesões é muito baixa e a resposta

terapêutica é considerada satisfatória, embora a maioria dos casos necessite de doses adicionais para alcançar a cura clínica (MINISTÉRIO DE SAÚDE 2010b).

1.1.3 - Leishmaniose mucosa (LM)

A leishmaniose mucosa (LM) é a manifestação mais grave da LTA, sendo de difícil tratamento e sem cura espontânea. Manifesta-se com lesões destrutivas em mucosas do trato aerodigestivo superior, localizadas principalmente no nariz e boca e, ocasionalmente, na mucosa da faringe e laringe. Esta doença crônica progressiva, de evolução arrastada, pode levar à destruição extensiva do septo nasal e palatos mole e duro, provocando desfiguração facial e distúrbios respiratórios (MARSDEN 1986; AMATO et al. 2008). As mucosas apresentam-se eritematosas e infiltradas, evoluindo para um processo ulcerativo, resultando em perfuração septal e destruição de cartilagem. Os principais sinais e sintomas dos pacientes com LM incluem obstrução nasal, coriza, formação e eliminação de crostas nasais, epistaxe e, geralmente, ausência de dor. A evolução da doença é caracterizada pela extensão da lesão às asas do nariz e posterior infiltração ou destruição nasal generalizada. A infiltração edematosa do revestimento e das estruturas de sustentação do nariz resulta em um colapso do nariz anterior, com alargamento e achatamento, conhecido como “nariz de tapir”. A mucosa nasal, isolada ou associada a outras localizações, está envolvida na quase totalidade dos casos. O envolvimento de lábio, bochecha, palatos mole e duro, laringe e faringe, é observado nos casos mais graves (OLIVEIRA et al. 1995; MOTTA et al. 2007; REITHINGER et al. 2007). As lesões mucosas podem, raramente, atingir as conjuntivas oculares e mucosas de órgãos genitais (MARSDEN 1986), traqueia (DI LELLA et al. 2006), língua (MOTTA et al. 2007) e gengiva (PALMEIRO et al. 2007).

A forma mucosa geralmente aparece após meses ou mesmo vários anos após a cura espontânea ou terapêutica da lesão cutânea primária (PESSÔA & BARRETO 1948; WALTON et al. 1973; MARSDEN 1986). No entanto, Boaventura et al. (2006) conseguiram demonstrar o envolvimento precoce na mucosa nasal de pacientes com lesão cutânea primária em atividade. Embora a maioria dos pacientes com LM relate lesões cutâneas compatíveis com LC e "cicatrices cutâneas sugestivas" (MARSDEN et al. 1984b; AMATO et al. 2009), existem casos de pacientes sem histórias de lesões cutâneas primárias e nem a presença de cicatriz (SAMPAIO et al. 1980; JONES et al. 1987; OLIVEIRA et al. 1995; SHAREEF et al. 2005). O envolvimento secundário da mucosa tem sido atribuído à disseminação linfática e/ou hemática dos parasitos presentes na lesão cutânea primária (MARTINEZ et al. 1992; BARRAL et al. 1995, DE OLIVEIRA CAMERA et al. 2006).

Frequentemente, pacientes com LM referem-se à ausência de tratamento, ou tratamento inadequado, da lesão cutânea primária, o que leva a admitir que as curas espontâneas e os tratamentos curtos e irregulares possam estar associados ao desenvolvimento da LM (WALTON et al. 1973; MARSDEN 1986; JONES et al. 1987). Adicionalmente, outros fatores de risco que também poderiam influenciar na patogênese da LM têm sido relacionados à localização, quantidade e ao tempo de duração das lesões cutâneas e à condição nutricional do paciente (LLANOS-CUENTAS et al. 1984; MACHADO-COELHO et al. 2005). Entretanto, os fatores que contribuem para que uma doença inicialmente cutânea evolua para uma forma mucosa ainda não são conhecidos.

A LM é reconhecida conforme as seguintes formas clínicas: forma mucosa tardia, em que a LM ocorre até vários anos após o surgimento da lesão cutânea; forma mucosa primária, em que a lesão mucosa é eventualmente causada pela picada do vetor diretamente na mucosa ou semimucosa de lábios e genitais; forma mucosa indeterminada, quando a LM não é precedida de manifestação clínica cutânea primária; forma mucosa contígua, em que o envolvimento da mucosa ocorre em virtude da expansão direta de lesão cutânea de localização próxima à mucosa; e a forma mucosa concomitante ocorre quando a lesão mucosa aparece simultaneamente à lesão cutânea ativa (MARZOCHI & MARZOCHI 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010b).

1.2 - Aspectos epidemiológicos da LTA

Leishmania (Viannia) braziliensis se distribui amplamente por todas as regiões geográficas do Brasil, sendo o agente etiológico de maior prevalência dos casos de LTA (JONES et al. 1987; MARZOCHI & MARZOCHI 1994; PASSOS et al. 1999; OLIVEIRA-NETO et al. 2000; CASTRO et al. 2005; NAME et al. 2005; CARVALHO et al. 2006). A importância da LTA causada por *L. (V.) braziliensis* deve-se, além de sua distribuição geográfica, à ocorrência de quadros clínicos graves, com severas mutilações associadas a alterações funcionais e estéticas. A LTA associada a esta espécie apresenta uma diversidade de perfis epidemiológicos relacionada às características biogeográficas de cada região, aos hábitos e à biologia dos flebotomíneos, a uma variedade de possíveis reservatórios e, ainda, à proporção de indivíduos suscetíveis existentes em cada área (MARZOCHI & MARZOCHI 1994).

O processo de expansão geográfica da LTA no Brasil, observado nos últimos anos, vem sendo responsável pelas mudanças no padrão clássico de transmissão da doença. As alterações ambientais decorrentes de atividades humanas, seja por meio de desenvolvimento

agrícola ou habitacional, têm propiciado condições altamente favoráveis para o desenvolvimento do vetor e transmissão da doença e, assim, resultando em mudanças no perfil epidemiológico da infecção (DESJEUX 2001; COSTA 2005; REITHINGER et al. 2007). Desta forma, é possível observar a coexistência de perfis epidemiológicos, ocasionada pela manutenção de casos procedentes de focos antigos ou de áreas próximas a estes, e pelo surgimento de surtos epidêmicos associados, principalmente, ao processo predatório de colonização em áreas rurais, aliado a condições higiênicas e sanitárias precárias da população.

No Brasil, os diferentes padrões epidemiológicos da LTA são caracterizados conforme a transmissão: Padrão silvestre, Padrão ocupacional ou de lazer, e Padrão rural ou periurbano. No **Padrão silvestre**, a transmissão se dá exclusivamente em áreas de vegetação primária, onde ocorre naturalmente a enzootia silvestre, havendo transmissão ao homem quando este se interpõe neste ambiente; no **Padrão ocupacional ou de lazer**, em que a transmissão ao homem está associada a mudanças no ambiente silvestre, como a derrubada das matas para construção de estradas rodoviárias e ferroviárias, colonização em regiões pioneiras, a exploração desordenada de florestas para extração da madeira e desenvolvimento agropecuário e ecoturismo. Já o **Padrão rural ou periurbano** é verificado em áreas de colonização antigas ou em áreas de ocupação de encostas em torno de centros urbanos associado à presença de matas secundárias ou residuais, onde houve a adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar (MARZOCHI & MARZOCHI 1994; KAWA & SABROZA 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010b).

Do ponto de vista epidemiológico, o conhecimento da distribuição geográfica da LTA e as implicações epidemiológicas decorrentes de mudanças nos ecossistemas induzidas pelas ações antrópicas ao ambiente natural se tornam essenciais para compreender o padrão de transmissão. O conhecimento da epidemiologia das leishmanioses e a correta identificação da espécie são importantes para o fornecimento de subsídios aos programas de controle da doença e para o tratamento adequado.

1.3 - Coinfecção *Leishmania* / HIV associada à LTA

O panorama das leishmanioses, sob os aspectos clínicos e epidemiológicos, vem sendo modificado nos últimos vinte anos, em virtude do desenvolvimento da epidemia do vírus da imunodeficiência humana/ síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/ AIDS). A associação da infecção por *Leishmania* com o HIV foi registrada em 35 países, sendo a leishmaniose visceral a forma de maior prevalência e incidência nos países da região do Mediterrâneo na Europa (Espanha, Itália, França e Portugal) (DESJEUX & ALVAR 2003).

Essa distribuição geográfica expressiva possivelmente está associada a um progressivo fenômeno de sobreposição das duas doenças, em parte, da disseminação da AIDS nas áreas rurais e, por outro lado, pela urbanização das leishmanioses (CRUZ et al. 2006 ; ALVAR et al. 2008).

A coinfeção *Leishmania*/ HIV revela características peculiares na apresentação e evolução clínica, no perfil de diagnóstico laboratorial e na resposta ao tratamento específico. Na coinfeção *Leishmania*/ HIV, observa-se uma progressiva desregulação do sistema imunológico, uma vez que ambos os agentes afetam as mesmas células-alvos. *Leishmania* infecta e se multiplica no interior de macrófagos, e o HIV, por sua vez, invade e se replica nestas mesmas células, e também em células TCD4⁺. É possível que a interação entre esses patógenos possa exacerbar ambas as infecções (BERNIER et al. 1995; WOLDAY et al. 1998). Tem-se observado nesses pacientes uma importante diversidade clínica, com quadros mais graves e atípicos, maiores taxas de reinfecções e/ ou reativações, maior resistência terapêutica, bem como complicações relacionadas ao tratamento convencional (DESJEUX & ALVAR 2003; CRUZ et al. 2006; ALVAR et al. 2008).

Relatos de casos de coinfeção *Leishmania*/ HIV associada à LTA têm sido descritos na literatura, porém, em um número significativamente menor quando comparado à forma visceral. A maioria dos pacientes infectados por HIV tem mostrado diferentes apresentações clínicas de LTA, tais como lesões cutâneas disseminadas (COURA et al. 1987; MACHADO et al. 1992; MATTOS et al. 1998; BORGES et al. 1999), visceralização de espécies predominantemente dermatrópicas (HERNÁNDEZ et al. 1993; SILVA et al. 2002) e lesões mucosas com intenso parasitismo (ECHEVARRÍA et al. 1993, SASAKI et al. 1997, SOUZA E SOUZA et al. 1998; BORGES et al. 1999; DA-CRUZ et al. 1999; LINDOSO et al. 2009). Em alguns pacientes, as lesões mucosas se desenvolveram de forma isolada (DA-CRUZ et al. 1999) ou de forma concomitante às lesões de pele (SAMPAIO et al. 2002), ou ainda precederam uma disseminação cutânea (MACHADO et al. 1992; SASAKI et al. 1997).

Couppié et al. (2004) demonstraram que, em pacientes soropositivos ao HIV, a leishmaniose cutânea é caracterizada por uma maior taxa de reativação ou reinfecção e baixa resposta terapêutica, quando o paciente se encontra em situação de imunossupressão moderada (linfócitos T CD4⁺ > 200 células/ mm³). Por outro lado, em pacientes severamente imunossuprimidos (linfócitos T CD4⁺ < 200 células/ mm³), foram observadas manifestações clínicas da LTA atípicas, com lesões mucosas acometendo áreas não comuns, como lábios e genitália (LINDOSO et al. 2009) e múltiplas lesões em mucosa oral (SAMPAIO et al. 2002).

No continente Americano, o Brasil é o país com maior prevalência de coinfeção *Leishmania/ HIV* (ALVAR et al. 1997; CRUZ et al. 2006). Nesse país, o primeiro caso de LTA associado ao HIV foi reportado por Coura et al. (1987), que descreveram um paciente com manifestação clínica compatível com a leishmaniose cutânea difusa, com lesões não ulceradas, disseminadas e ricas em amastigotas. Rabello et al. (2003), em uma revisão de 91 casos brasileiros de coinfeção *Leishmania/ HIV*, registrados entre 1987 e 2003, revelaram que 63% apresentaram a forma tegumentar e, desses, 43% a forma mucocutânea ou mucosa.

A confirmação de *L. (V.) braziliensis* causando leishmaniose mucocutânea em paciente infectado por HIV foi descrita por Machado et al. (1992) em paciente que apresentou, inicialmente, lesões mucosas na região orofaríngea e nasal e, posteriormente, as lesões disseminaram-se pelo rosto e corpo, incluindo a região genital. Desde então, essa espécie tem sido identificada nos casos de leishmaniose cutânea e/ ou mucocutânea em pacientes soropositivos ao HIV (MATTOS et al. 1998; DA-CRUZ et al. 1999; SAMPAIO et al. 2002; LINDOSO et al. 2009).

1.4 - O parasito - *Leishmania*

O agente etiológico da leishmaniose é representado por várias espécies de protozoários flagelados heteroxenos pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Estes protozoários assumem basicamente duas formas distintas durante o seu ciclo de vida, desenvolvidas em hospedeiros invertebrados e vertebrados. A forma promastigota está presente no tubo digestivo dos flebotomíneos e, ao ser inoculada no hospedeiro vertebrado, se diferencia em amastigota no interior do vacúolo parasitóforo de macrófagos.

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem dois genomas, representados pelo DNA nuclear (nDNA) e pelo DNA do cinetoplasto (kDNA). Estes organismos são biologicamente distintos, pois apresentam uma mitocôndria peculiar, localizada próximo ao corpo basal do flagelo, denominada cinetoplasto. O kDNA corresponde a 20-30% do DNA total da célula, e está organizado em uma rede concatenada constituída por moléculas circulares: os maxicírculos e os minicírculos (SIMPSON 1987; SHLOMAI 2004). Os maxicírculos, formados por sequências homogêneas, estão presentes em torno de 50 cópias por rede e seu tamanho pode variar de 20 a 40 kilobases (kb), dependendo da espécie. Estas moléculas contêm os genes que codificam proteínas mitocondriais (SHAPIRO & ENGLUND 1995; SHLOMAI 2004). Os minicírculos são as moléculas responsáveis pela estrutura da rede (95%

do kDNA). São homogêneos em tamanho, usualmente heterogêneos em sequências e possuem cerca de 10.000 a 20.000 cópias. A heterogeneidade nas sequências não está distribuída igualmente em toda a molécula do minicírculo. O tamanho dos minicírculos e o grau de heterogeneidade variam entre as diferentes espécies de *Leishmania* (SIMPSON 1987; RODGERS et al. 1990). A principal função genética do minicírculo é a de codificar os pequenos RNAs guia que governam a especificidade da edição de RNA (STURM & SIMPSON 1990; SHAPIRO & ENGLUND 1995).

Nas moléculas de minicírculos do kDNA, são encontradas duas regiões distintas denominadas: região conservada e variável. A região conservada possui uma sequência nucleotídica de 120 a 200 pares de bases (pb), compartilhada intraespecificamente entre todos os minicírculos do kDNA (SIMPSON 1987). Nesta região, encontram-se pequenos blocos conservados de sequências muito semelhantes entre os diferentes tripanosomatídeos e um destes, idêntico a todos os membros desta família, conhecido como Sequência Universal dos Minicírculos (GGGGTTGGTGTA), que corresponde à origem de replicação dos minicírculos (RAY 1989). A região variável apresenta uma heterogeneidade nas sequências e difere entre as classes de minicírculos da mesma rede. Acredita-se que a rápida taxa evolutiva da região variável pode ter levado a uma grande diversidade de tipos de moléculas de minicírculos que, por sua vez, foram agrupadas em classes (SIMPSON 1987). Estima-se que o número de classes de minicírculos em *Leishmania* seja superior a 60 (YURCHENKO et al. 1999). As moléculas dos minicírculos do kDNA são consideradas excelentes alvos em estudos moleculares e genéticos devido ao grande número de cópias presentes na rede, assim como pela evidência das regiões conservada e variável encontradas em toda a molécula.

1.5 - Diagnóstico e tipagem molecular

Os estudos de identificação e classificação taxonômica de *Leishmania* são importantes na investigação epidemiológica, no diagnóstico da doença e na avaliação terapêutica. Baseando-se em características extrínsecas e intrínsecas do parasito, diferentes métodos podem ser empregados para caracterizar e classificar as espécies (DEANE & GRIMALDI JR. 1985; LAINSON & SHAW 1987).

Desde o surgimento da biologia molecular nos anos 80, várias abordagens foram usadas na tentativa de buscar marcadores taxonômicos que analisavam características genéticas, imunológicas e bioquímicas/ moleculares, e dentre elas se destacam a eletroforese de isoenzimas (RIOUX et al. 1990; THOMAZ-SOCCOL et al. 1993; CUPOLILLO et al.

1994), a análise do perfil de restrição do kDNA (LOPES et al. 1984; JACKSON et al. 1986; PACHECO et al. 1986), a reatividade de anticorpos monoclonais com antígenos espécie-específico do parasito (MCMAHON-PRATT & DAVID 1981; MCMAHON-PRATT et al. 1986; SHAW et al. 1986; GRIMALDI & MCMAHON-PRATT 1996), a hibridização com sondas moleculares espécie-específicas (WIRTH & MCMAHON-PRATT 1982), a análise de diferentes regiões do genoma, por sequenciamento ou por polimorfismo gerado por enzimas de restrição - RFLP (BEVERLEY et al. 1987; GUEVARA et al. 1992; FERNANDES et al. 1994; MENDOZA-LEON et al. 1995) e o polimorfismo pela amplificação aleatória de DNA polimórfico – RAPD (BHATTACHARYA et al. 1993; TIBAYRENC et al. 1993; GOMES et al. 1995).

O diagnóstico da LTA abrange evidências clínicas, dados epidemiológicos e resultados de testes laboratoriais, como os métodos clássicos de pesquisa parasitológica e ensaios imunológicos. O diagnóstico confirmatório é geralmente realizado por métodos parasitológicos de duas formas: direta e indireta. Na forma direta é feito por meio da evidenciação do parasito em lâmina por raspado (esfregaço) ou impressão por aposição (*imprint*) de fragmentos teciduais e cortes histológicos (histopatologia) e na forma indireta pelo isolamento do parasito em meios de cultura, realizados a partir de fragmentos de tecidos. O isolamento em cultura e a caracterização do parasito, que são primordiais em diversos estudos, podem sofrer interferências de acordo com as condições de coleta e armazenamento das amostras biológicas.

Na atualidade, os métodos de biologia molecular, baseados em análise dos ácidos nucleicos – DNA do núcleo e do cinetoplasto – vêm sendo aplicados no diagnóstico, no monitoramento dos pacientes em tratamento e em estudos da variabilidade genética dos parasitos. A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), descrita por Saiki et al. (1985), é uma excelente ferramenta, que permite a detecção e a tipagem de *Leishmania*, proporcionando um meio rápido e seguro quando aplicada no diagnóstico das leishmanioses. Esse método tem provado ser altamente sensível e específico, possibilitando detectar o DNA do parasito antes mesmo de aparecerem alguns sintomas ou sinais clínicos da doença (FIGUEROA et al. 2009).

1.5.1 - A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com a disponibilidade das ferramentas moleculares, protocolos baseados na técnica de PCR, através de análises das moléculas do kDNA ou do nDNA, foram desenvolvidos para a

detecção e a genotipagem de *Leishmania* (revistos por DEGRAVE et al. 1994 e REITHINGER & DUJARDIN 2007). Inúmeras regiões do genoma vêm sendo estudadas com a finalidade de determinar marcadores para o uso na identificação e no diagnóstico, como por exemplo: genes de pequena subunidade de RNA ribossomal (*Small Subunit of Ribosomal - SSU rRNA*) (VAN EYS et al. 1992; ULIANA et al. 1994) e suas regiões espaçadoras internas transcritas (*Internal Transcribed Spacers - ITS*) (CUPOLILLO et al. 1995; DAVILA & MOMEN 2000), gene de mini-exon (*Spliced leader*) (FERNANDES et al. 1994; HARRIS et al. 1998), microssatélites (RUSSELL et al. 1999; VOLPINI et al. 2001; ODDONE et al. 2009), genes específicos da glucose-6-fosfatase desidrogenase (*Glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD*) (CASTILHO et al. 2003; 2008), da glicoproteína gp63 (*Glycoprotein gp63*) (VICTOIR et al. 1998; BERZUNZA-CRUZ et al. 2009), da proteína de choque térmico hsp70 (*Heat-shock Protein 70 - hsp70*) (GARCIA et al. 2004) e da cisteína proteinase B Cpb (*Cysteine Proteinase B - Cpb*) (GARCIA et al. 2005).

Dentre os alvos moleculares, os minicírculos do kDNA foram os primeiros (RODGERS et al. 1990) e, atualmente, são os mais empregados na técnica de PCR para a detecção de DNA de *Leishmania*. Grupos de pesquisadores, analisando as regiões variáveis destas moléculas, desenvolveram iniciadores utilizados na PCR visando a identificação ao nível de subgênero ou complexos de *Leishmania*, responsáveis pelas leishmanioses tegumentares do Novo Mundo (DE BRUIJN & BARKER 1992; LOPEZ et al. 1993; ERESH et al. 1994; MARCUSSI et al. 2008). A presença em múltiplas cópias e a composição por regiões conservada e variáveis nos minicírculos do kDNA fazem dessas moléculas alvos potencialmente excelentes para o diagnóstico da LTA.

A aplicação da técnica de PCR vem oferecendo novas possibilidades e alternativas para as investigações clínicas e epidemiológicas da LTA em virtude de vantagens relacionadas à alta sensibilidade e especificidade, da rápida disponibilidade dos resultados e da possibilidade de examinar diretamente diferentes amostras clínicas, assim como evidenciar o parasito em pequenos fragmentos teciduais e com baixa carga parasitária.

Muitos estudos foram conduzidos empregando ensaios de PCR, utilizando uma variedade de amostras clínicas e diferentes métodos de coleta e conservação: fragmentos de lesões cutâneas (SMITH et al. 1998; BRECELJ et al. 2000; ROMERO et al. 2001; TOJAL DA SILVA et al. 2006; AMPUERO et al. 2009) e de lesões mucosas (PIRMEZ et al. 1999; MEDEIROS et al. 2002); aspirados e/ ou raspados de lesão cutânea (MATSUMOTO et al. 1999; ISAZA et al. 2002; GARCIA et al. 2007); sangue (DELGADO et al. 1996; PIÑERO et al. 1999; MARTINS et al. 2010); amostras por aposição em papel de nitrocelulose

(MARQUES et al. 2001), em papel filtro (BENOUSSAN et al. 2006; ROMERO et al. 2009; BOGGILD et al. 2010) e em lâminas coradas por Giemsa (MOTAZEDIAN et al. 2002; VOLPINI et al. 2006); amostras conservadas em formol (MIMORI et al. 1998), em etanol (MARQUES et al. 2001) e em parafina (LASKAY et al. 1995; SCHUBACH et al. 1998; SAFAEI et al. 2002; DE OLIVEIRA et al. 2003); exsudato de lesão cutânea (MIMORI et al. 2002) e de tecidos cutâneos e de mucosas, com ou sem lesão, coletados com cotonetes - *cotton swab* (FIGUEROA et al. 2009).

A aplicabilidade da técnica de PCR, como uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico da LTA, foi comprovada por pesquisadores em estudos clínicos e epidemiológicos realizados em diferentes áreas endêmicas. Essa técnica apresentou uma maior positividade dos resultados quando comparada com os métodos convencionais de diagnóstico, utilizando diretamente fragmentos de lesões cutâneas e mucosas (BELLI et al. 1998; AVILES et al. 1999; PIRMEZ et al. 1999; RODRIGUES et al. 2002; WEIGLE et al. 2002; VENZAZZI et al. 2006; GOMES et al. 2008; PEREIRA et al. 2008; FAGUNDES et al. 2010).

Nos últimos anos, a PCR revelou-se como uma ferramenta diagnóstica extremamente eficiente para a leishmaniose mucosa causada por *L. (V.) braziliensis*, uma vez que a escassez de parasitos presentes nas lesões mucosas pode influenciar na sensibilidade do diagnóstico parasitológico (DISCH et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2005; OVALLE-BRACHO et al. 2007).

Vale ressaltar que a PCR vem fornecendo informações relevantes para as investigações relacionadas ao fenômeno da persistência parasitária e a disseminação hemática/ linfática. Importantes estudos detectaram DNA de *L. (V.) braziliensis* em cicatrizes de lesões cutâneas de pacientes tratados e considerados clinicamente curados (SCHUBACH et al. 1998; MENDONÇA et al. 2004) e em amostras de sangue de pacientes clinicamente curados (GUEVARA et al. 1993, 1994; MARTINS et al. 2010), assim como em pacientes sem evidência de lesões ativas e/ ou história prévia de leishmaniose (DE OLIVEIRA CAMERA et al. 2006). Mais recentemente, Figueroa et al. (2009) destacaram a eficiência da técnica demonstrando a presença de DNA de *Leishmania* no tecido mucoso (nasal, amígdala e conjuntiva) aparentemente normal de pacientes com leishmaniose cutânea ativa.

1.6 - Variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis*

A utilização de métodos moleculares em estudos taxonômicos, evolutivos e de epidemiologia molecular do gênero *Leishmania* tem possibilitado o conhecimento aprofundado da diversidade genética e o estabelecimento das relações filogenéticas entre as espécies. A heretogeneidade intraespecífica em membros dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, revelada por meio destas metodologias, contribuíram para um melhor entendimento da epidemiologia em áreas endêmicas de LTA (PACHECO et al. 1986; THOMAZ-SOCCOL et al. 1993; CUPOLILLO et al. 1994; SARAVIA et al. 1998; PACHECO et al. 2000). Dentre as espécies do subgênero *Viannia*, *L. (V.) braziliensis* é considerada de grande importância em virtude de sua ampla distribuição geográfica e de sua associação com as distintas formas clínicas da doença.

Ferramentas moleculares baseadas na técnica de PCR que apresentam maior capacidade discriminatória vêm permitindo uma melhor compreensão da variabilidade genética e da dinâmica populacional de *Leishmania*. A existência de polimorfismos genéticos intra e interespecífico de *L. (V.) braziliensis* isolada de hospedeiros vertebrados e vetores, e ainda a evidência de estrutura genética multiclonal desta espécie, circulante nas diferentes regiões geográficas do Brasil, foram demonstradas em estudos que empregaram marcadores moleculares polimórficos direcionados aos diferentes alvos do genoma (GOMES et al. 1995; ISHIKAWA et al. 2002; CUPOLILLO et al. 2003; SCHRIEFER et al. 2004).

A teoria da propagação clonal, proposta por Tibayrenc et al. (1990), baseia-se no forte desequilíbrio de ligação gênica existente entre as populações de *Leishmania*, demonstrado pela presença de genótipos predominantes super-representados tanto em localidades particulares como em extensas áreas geográficas, e por longos períodos de tempo. Porém, não se pode excluir totalmente a possibilidade de eventos de recombinação genética (KELLY et al. 1991; BELLI et al. 1994; NOLDER et al. 2007). A estrutura populacional clonal é um modelo que reforça tanto a existência de elevada diversidade inter como de diferenças intraespecíficas, podendo ter um impacto clínico e epidemiológico. As espécies de *Leishmania* circulam, na natureza, como um conjunto de subpopulações heterogêneas. A policlonalidade de algumas cepas, como resultado de um inóculo inicial heterogêneo (PACHECO et al. 1990) ou o acúmulo de múltiplas infecções independentes em indivíduos vivendo em áreas endêmicas (SARAVIA et al. 1990) tem sido relatada.

É possível que a variabilidade intraespecífica de *L. (V.) braziliensis* das populações circulantes nas áreas endêmicas possa influenciar na expressão clínica e no prognóstico da LTA. Desta forma, estudos têm sido conduzidos na tentativa de buscar correlações entre as características genotípicas de subpopulações parasitárias e a manifestação clínica da doença em suas formas cutâneas e mucosa, utilizando diferentes marcadores polimórficos (CUERVO et al. 2004; SCHRIEFER et al. 2004; BAPTISTA et al. 2009).

A análise molecular da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* foi realizada, neste estudo, através de um marcador molecular que apresenta um alto poder discriminatório para a detecção do polimorfismo genético intraespecífico, como descrito a seguir.

1.6.1 - Reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência (LSSP-PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência (*Low Stringency Single Specific Primer – LSSP-PCR*), descrita por Pena et al. (1994), foi desenvolvida com a finalidade de detectar variações nas sequências de DNA. A execução é extremamente simples e rápida, além de altamente sensível e informativa. Esta técnica é baseada nos mesmos princípios da PCR e consiste na reamplificação de um fragmento alvo de DNA (previamente amplificado) sob condições de baixa estringência, utilizando-se concentrações elevadas de DNA polimerase e apenas um dos iniciadores específicos para uma das extremidades do fragmento analisado. O produto da reação, ao ser analisado, produz um *fingerprint* do fragmento de DNA, o qual reflete a sequência da região analisada. Desta forma, a LSSP-PCR pode ser considerada como uma impressão digital do DNA, pois gera um perfil de bandas típico, focalizando o polimorfismo existente em um único segmento gênico.

Esta metodologia vem sendo bastante empregada em distintas abordagens ao estudar a variação de sequência do DNA, traduzindo um polimorfismo intraespecífico em *Trypanosoma cruzi*, portanto, constituindo uma excelente ferramenta para os estudos de variabilidade genética em tripanosomatídeos (VAGO et al. 1996; 2000; LAGES-SILVA et al. 2006; SALAZAR et al. 2006; MANOEL-CAETANO et al. 2008).

O uso deste marcador molecular tendo como alvo o minicírculo de kDNA para discriminar diferentes variantes de parasitos diretamente de material clínico é uma ferramenta potencial para investigar assinaturas de kDNA (*kDNA signature*) das populações de parasitos. Como resultado, esta técnica produz perfis que refletem os polimorfismos de

classes de minicírculos predominantes, e pode ser útil em estudos que visam discriminar genótipos de espécies de *Leishmania* (FERREIRA et al. 2007; BAPTISTA et al. 2009).

2 – JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana causada por *L. (V.) braziliensis* caracteriza-se pela cronicidade, latência e comportamento metastático. Em alguns casos, após a instalação da lesão cutânea primária podem surgir lesões cutâneas disseminadas e em mucosas em consequência da disseminação hemática e/ ou linfática do parasito. As lesões recorrentes podem ser explicadas pelos mecanismos de reativação e/ ou reinfeção (SARAVIA et al. 1990). No entanto, é relevante mencionar que o mecanismo de disseminação e a emergência de *L. (V.) braziliensis* em novos sítios nos tecidos cutâneo e mucoso, como e onde o parasito sobrevive em latência no organismo humano durante anos, bem como o envolvimento de subpopulações clonais do parasito ainda não estão bem elucidados.

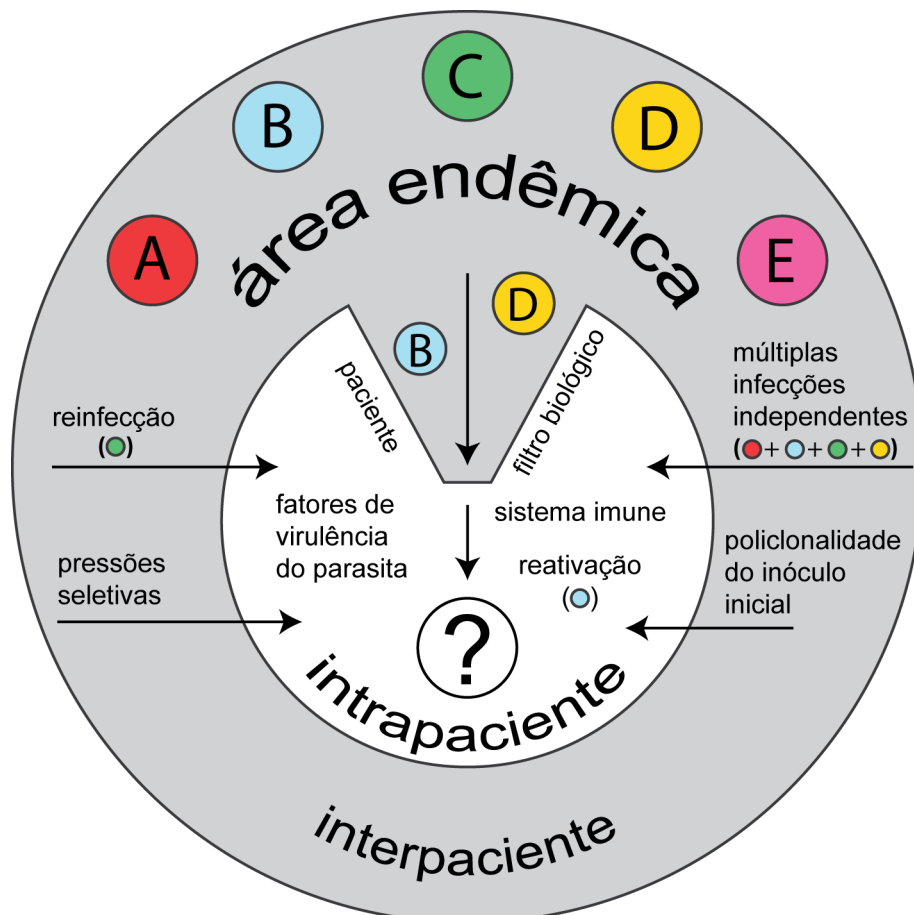
Os critérios clínicos e parasitológicos são fundamentais para o diagnóstico da LTA, porém, os avanços das ferramentas moleculares, especialmente a técnica da PCR, têm permitido um rápido diagnóstico com uma maior sensibilidade e especificidade quando comparada aos métodos convencionais. Além disso, é possível detectar o DNA do parasito antes mesmo de aparecerem alguns sintomas ou sinais clínicos. A PCR se tornou uma técnica promissora que pode ser adaptada apropriadamente para fornecer informações adequadas e oportunas aos estudos clínicos e moleculares na LTA.

Adicionalmente, técnicas baseadas na PCR com maior poder discriminatório proporcionam o conhecimento da variabilidade genética intraespecífica de *Leishmania*. A importância da espécie *L. (V.) braziliensis* foi reconhecida por sua associação às distintas manifestações clínicas observadas na LTA e pela existência de variado grau de heterogeneidade genética. Por este motivo, a correlação variabilidade genética *versus* manifestação clínica tem sido bastante explorada.

Está bem estabelecido que as espécies de *Leishmania* são, na verdade, um conjunto de subpopulações heterogêneas, as quais circulam na natureza entre o homem, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos. Situações epidemiológicas simples ou complexas, identificadas em áreas endêmicas, nas quais os indivíduos estão expostos, podem refletir na diversidade genética da população natural do parasito e, conseqüentemente, ter impacto clínico e epidemiológico (PACHECO et al. 1986; BRITO et al. 2009). Diversos estudos têm investigado se determinadas espécies e/ ou populações clonais estariam

relacionadas especificamente à forma clínica da doença. Desta forma, torna-se necessário o conhecimento da estrutura genética populacional de *L. (V.) braziliensis* na área endêmica estudada. Baseado no exposto acima, um modelo conceitual para o entendimento da diversidade genética nos níveis inter e intrapacientes foi idealizado e as hipóteses de trabalho formuladas.

3 – MODELO CONCEITUAL



Idealizado por Pacheco & Oliveira, 2011

Ilustração de um modelo conceitual para o entendimento da diversidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis inter e intrapacientes em área endêmica. Subpopulações heterogêneas circulando entre o homem, vetores, reservatórios silvestres e animais domésticos, e o indivíduo funcionando como um filtro biológico selecionando ou não subpopulações parasitárias.

No cenário interpaciente estariam presentes as interações ecoepidemiológicas existentes em uma área endêmica e seu reflexo na dinâmica populacional das populações circulantes de *L. (V.) braziliensis*. Neste sistema, as subpopulações heterogêneas circulariam entre o homem, os vetores, animais silvestres e domésticos em situações epidemiológicas de transmissão simples ou complexas e onde os indivíduos estariam expostos às pressões seletivas, à policlonalidade do inóculo inicial, às múltiplas infecções independentes podendo resultar em casos de reinfecção.

No cenário intrapaciente o indivíduo, por si só, funcionaria como um filtro biológico onde subpopulações parasitárias mais adaptadas poderiam ou não ser selecionadas. Dentro deste contexto, o homem estaria sujeito aos diferentes fatores de virulência do parasito, bem como do seu sistema imunológico e as subpopulações parasitárias que fossem mais adaptadas poderiam emergir sendo evidenciadas, por exemplo, em casos de reativação.

4 – HIPÓTESES DE TRABALHO

Nossas hipóteses de trabalho foram formuladas com os seguintes enfoques: (I) se subpopulações parasitárias geneticamente diferenciadas seriam identificadas em diferentes sítios anatômicos de lesões cutâneas e/ ou mucosas no mesmo paciente; (II) se há, ou não, associação entre perfil genético e diferentes manifestações clínicas na LTA; (III) se há congruência entre a diversidade genética inter e intrapacientes e (IV) se a condição de imunossupressão impacta na diferenciação de subpopulações parasitárias de *L. (V.) braziliensis*.

5 – OBJETIVOS

5.1 - Objetivo geral

Detectar, por diferentes abordagens moleculares, DNA de *L. (V.) braziliensis* diretamente em amostras teciduais de pacientes com distintas formas clínicas da LTA com comprometimento mucoso, atendidos no ambulatório do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish), Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), possibilitando o diagnóstico específico e o estudo da variabilidade genética.

5.2 - Objetivos específicos

- ✓ Realizar ensaios de PCR específicos para amplificação da região variável dos minicírculos do kDNA de *L. (V.) braziliensis* diretamente de fragmentos de lesões cutâneas e mucosas.
- ✓ Analisar o polimorfismo genético intrafragmento amplificado (minicírculo do kDNA) através do marcador molecular polimórfico LSSP-PCR.
- ✓ Realizar estudos de Taxonomia Numérica (análise fenética) com base nos perfis genéticos gerados pelo marcador molecular empregado.
- ✓ Identificar a presença de subpopulações parasitárias e correlacioná-las com as diferentes formas de apresentações clínicas da doença, bem como em relação à localização das lesões (cutâneas e mucosas).
- ✓ Avaliar a variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* aos níveis inter e intrapacientes utilizando dados da análise fenética e estatísticos.

CAPÍTULO 2

6 – ARTIGOS

Organização geral dos artigos

Os artigos são apresentados na seguinte ordem:

- **Artigo 1:** Avaliação da diversidade interpacientes na investigação do perfil genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis*. A população deste estudo foi composta por 22 pacientes que apresentavam lesões mucosas compatíveis com quadro clínico de LM.

- **Artigo 2:** Estudo da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis intra e interpacientes. A população estudada foi constituída por 35 pacientes com distintas manifestações clínicas de LTA com comprometimento mucoso, sendo incluídos 20 pacientes do Artigo 1.

- **Artigo 3:** Avaliação do impacto da imunossupressão por HIV na diversidade populacional de *L. (V.) braziliensis*. Foram estudados 03 pacientes com coinfeção LTA/ HIV (02 participaram do Artigo 1) e 05 pacientes, escolhidos aleatoriamente, que foram analisados no Artigo 1.

6.1 - Artigo 1

kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients

Publicado na revista Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

Leishmania (Viannia) braziliensis é o agente etiológico responsável pelos casos humanos de leishmaniose mucosa (LM) no estado do Rio de Janeiro. Esta doença de caráter crônico e progressivo manifesta-se com lesões destrutivas nas mucosas do trato aerodigestivo superior localizadas, preferencialmente no nariz e boca (MARSDEN 1986; AMATO et al. 2008). A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo o minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA), tem sido extremamente útil para a detecção de DNA de *L. (V.) braziliensis*, diretamente em amostras clínicas de pacientes com LM. A técnica da reação em cadeia da polimerase de baixa estringência (LSSP-PCR), metodologia baseada na PCR, tem sido empregada como uma nova ferramenta para os estudos de variabilidade genética desta espécie (FERREIRA et al. 2007; BAPTISTA et al. 2009).

Questionamentos

- Qual o perfil genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* que circulam nas lesões de mucosas de pacientes com LM?
- Seria possível correlacionar os perfis genéticos, gerados pelo marcador molecular polimórfico LSSP-PCR, com a localização clínica da lesão?

Resultados principais

A PCR detectou DNA de *L. (V.) braziliensis* em todas as amostras obtidas diretamente de lesões de mucosas nasal e oral dos pacientes analisados. O polimorfismo genético intrafragmento gerado pela LSSP-PCR forneceu uma assinatura do kDNA do parasito para cada amostra. Foi possível identificar assinaturas de kDNAs similares em amostras (mucosa nasal e oral) de mesmo paciente e perfis genéticos divergentes em amostras (mucosa nasal) de mesmo paciente coletadas em momentos diferentes. Não houve associação entre o perfil genético e a localização da lesão mucosa (nasal ou oral).

Parasitology

kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients

Fernanda Santos de Oliveira^{a,*}, Cláudia Maria Valete-Rosalino^{b,c},
Armando de Oliveira Schubach^b, Raquel da Silva Pacheco^a

^aLaboratório de Sistemática Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ CEP 21045-900, Brazil

^bLaboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21045-900, Brazil

^cDepartamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21944-970, Brazil

Received 30 July 2009; accepted 8 November 2009

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR) and low-stringency single-specific primer PCR (LSSP-PCR) analyses were used to detect *Leishmania (Viannia) braziliensis* DNA and investigate kDNA signatures of parasite populations present in oral and nasal mucosa lesions from mucosal leishmaniasis patients. A total of 25 samples from 22 patients were processed by specific PCR/hybridization assays. Parasite DNA was detected in all samples analyzed. The intraspecific polymorphism of the variable region of *L. (V.) braziliensis* kDNA minicircles was also investigated by LSSP-PCR. Similar kDNA signatures were observed in parasites recovered from nasal and oral mucosa lesions of the same patient. In contrast, genetically divergent profiles were detected in lesions from patients biopsied at different times within a period of 1 year. This is the first work to report genetic typing of *L. (V.) braziliensis* directly from human oral and nasal mucosal lesions.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Mucosal leishmaniasis; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; PCR/hybridization; LSSP-PCR

1. Introduction

In the state of Rio de Janeiro *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main etiologic agent responsible for human cases of American tegumentary leishmaniasis (ATL), a disease whose transmission cycle depends on the adaptation of the vector *Lutzomyia intermedia* to the domiciliary and peridomiciliary ecotopes (Marzochi and Marzochi, 1994). Mucosal leishmaniasis (ML) is the most severe clinical form of ATL, affecting the upper aerodigestive tract by causing lesions mainly in the nasal and oral mucosa and occasionally in the pharyngeal and laryngeal mucosa. This chronic progressive disease can lead to extensive destruction of the nasal septa and soft and hard

palates, and may result in facial disfiguration and respiratory disturbances (Amato et al., 2008; Marsden, 1986).

Mucosal disease usually appears months or even years after spontaneous or therapeutic healing of the primary cutaneous lesions being associated with delayed healing of primary lesions and failure to adequately treat primary cutaneous lesions (Marsden, 1986). Spontaneous reactivation (Saravia et al., 1990; Weigle et al., 1993) and also transmission by organ transplants (Golino et al., 1992) suggest the persistence of *Leishmania* parasites in humans. In addition, the finding of viable parasite in scars 11 years after clinical cure (Schubach et al., 1998) reinforces that the parasite persistence in human can be the rule instead of the exception. The recent detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis (Figuroa et al., 2009) has highlighted the importance of understanding the complicated relationship between parasites and mucosa.

Polymerase chain reaction (PCR) has been particularly useful for the diagnosis of infection by *L. (V.) braziliensis*

* Corresponding author. Tel.: +55-21-3865-8205; fax: +55-21-2590-3495.

E-mail address: fernandac@ioc.fiocruz.br (F. Santos de Oliveira).

using minicircle kinetoplast DNA (kDNA) as a molecular target in clinical samples from patients with ML (Disch et al., 2005; Oliveira et al., 2005b). The PCR-based technique known as low-stringency single-specific primer PCR (LSSP-PCR) has been applied to molecular epidemiology and to the study of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* (Vago et al., 1996) and *Leishmania* (Ferreira et al., 2007) parasites. The rationale underlying this approach is the use of specific primers to amplify a variable region of the parasite DNA directly from clinical samples. Specifically in the case of trypanosomatids, the polymorphism detected by LSSP-PCR can be translated into a specific and highly reproducible kDNA signature (Vago et al., 1996). More recently, intraspecific polymorphism of the variable region of kDNA minicircles of *L. (V.) braziliensis* has been reported using LSSP-PCR (Baptista et al., 2009).

In the present study, we exploited PCR and LSSP-PCR as molecular tools to detect the presence of *L. (V.) braziliensis* DNA and to investigate the genetic profiles (kDNA signatures) present in the oral and nasal mucosa lesions from patients with ML in the state of Rio de Janeiro, Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Patients and samples

Mucosal tissue fragments obtained from 22 patients living in the state of Rio de Janeiro and receiving treatment at the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, were analyzed. All patients participating in this study presented mucosa lesions compatible with ML as defined by otorhinolaryngologic evaluation and direct examination of the upper aerodigestive tract using an optical fibroscope.

The present study was approved by the Research Ethics Committee of IPEC/FIOCRUZ (process 0016.0.009-02), and informed consent was obtained from all patients before clinical evaluation.

2.2. DNA isolation and specific PCR assays

Isolation of DNA and specific PCR assays were carried out as previously described (Oliveira et al. 2005a). DNA extractions from approximately 10 mg of frozen tissue fragments were performed using GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA isolation kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ), following the manufacturer's instructions. *Leishmania* DNA was detected by specific PCR amplification of a 750-base pair (bp) fragment present in the variable region of minicircle kDNA from *Leishmania* of the *L. braziliensis* complex (De Bruijn and Barker, 1992), using primers B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') and B2 (5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'). A reaction mixture was prepared in a 50- μ L final volume containing

50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 0.2 mmol/L of each deoxyribonucleotide, 15 pmol of each primer, 2.5 U of Ampli-Taq DNA polymerase (Amersham Pharmacia), and 2 μ L of the extracted DNA. Amplification products were analyzed by agarose gel electrophoresis after ethidium bromide staining (0.5 μ L/mL) and visualized under ultraviolet light. Negative (all reaction components except DNA) and positive (all reaction components plus 50 ng of *L. [V] braziliensis* kDNA) controls were included in each experiment. All experiments were conducted under controlled conditions. To avoid contamination, we carried out in different areas the PCR mix and the electrophoresis. To confirm the absence of inhibition factors, we amplified an internal control corresponding to a segment of the human β -globin gene in all human samples (Saiki et al., 1985).

2.3. Molecular hybridization

PCR products were transferred to nylon membranes according to Southern (1975) and hybridized as previously described (Pacheco et al., 2000), with [α^{32} P] deoxycytosine triphosphate (dCTP) radiolabeled kDNA probe obtained from the reference strain *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/1975/M2903. Membranes were hybridized under high stringency conditions (1.5 \times saline sodium citrate [SSC], 1% sodium dodecyl sulfate [SDS], and 0.5% nonfat milk, overnight at 60 °C). After hybridization, membranes were washed 3 times for 30 min in 0.1 \times SSC, 0.5% SDS at the same temperature. Autoradiography was performed using X-ray film (Kodak X-OMAT, Rochester, NY) overnight at -70 °C.

2.4. Low-stringency single-specific primer PCR

L. (V.) braziliensis kDNA 750-bp fragments generated by specific PCR were purified with the Wizard PCR Prep system (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. LSSP-PCRs were performed by amplifying the purified DNA fragments with the B1 primer (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3'). Reactions were carried out with 40 pmol of primer, 200 μ mol/L deoxynucleoside triphosphate (dNTP)s, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.6), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 4 U of Taq polymerase, and 3 μ L (60 ng/ μ L) of the purified 750-bp fragment (final volume, 25 μ L). Amplification was performed in a thermocycler as follows: 95 °C for 5 min; 95 °C for 1 min, 36 °C for 30 s, and 72 °C for 2 min (45 cycles); and final extension at 72 °C for 10 min. Amplification products were analyzed on 1.8% agarose gels (High Resolution, Sigma) after ethidium bromide staining.

2.5. Phenetic analysis

Bands ranging in size from 350 to 750 bp were selected for phenetic analysis. The LSSP-PCR profiles were compared using the simple matching (Sm) coefficient of similarity to determine the proportion of mismatched

bands. The similarity matrix was transformed into a dendrogram by the unweighted pair group method arithmetical average (UPGMA) algorithm (Sneath and Sokal, 1962) using the NTSYS program (version 2.0; Exeter Software, Setauket, NY).

3. Results

3.1. Clinical and epidemiologic data

Twenty-two patients presented nasal and/or oral mucosa lesions, 17 (77.3%) men and 5 (22.7%) women (Table 1). The mean patient age was 49 years (ranging from 12 to 83 years). Nasal mucosal lesions were observed in 17 (77.3%) patients. Only 1 patient presented nasal and oral mucosa lesions concomitantly (32A and 32B). In 2 patients, 2 nasal mucosa lesion fragments were collected at 2 different times in a period of 1 year (27 and 34, 20 and 37).

3.2. PCR-hybridization analysis

A total of 25 samples (6 from oral mucosa lesions and 19 from nasal mucosa lesions) from 22 patients were processed by specific PCR/hybridization assays. The purity and integrity of the DNA samples were evaluated by gel electrophoresis before PCR analysis. Internal controls were performed by PCR amplification of a segment of the

human β -globin gene, which produced the expected 110-bp diagnostic band and confirmed the absence of inhibition factors in all samples analyzed. Diagnostic bands of 750-bp were detected in all samples tested. All 25 positive PCR products were subjected to Southern blot hybridization revealing a high copy number of homologous sequences with the *L. (V.) braziliensis* kDNA used as probe (not shown).

3.3. *L. (V.) braziliensis* kDNA signatures

LSSP-PCR analysis showed different genetic profiles providing a kDNA signature for each patient's sample (Fig. 1A-C). The reproducibility of the method was confirmed when identical electrophoretic profiles were observed in the assays repeated, at least, 3 times under the same conditions. Phenetic analyses have grouped the profiles into 4 clusters, which diverged by coefficients of similarity from 0.53 to 0.94 (Table 1, Fig. 1D). Most of the samples (76%) shared an average of 85% of common characteristics ($Sm = 0.76-0.94$) and were grouped into the second and third clusters. The *L. (V.) braziliensis* reference strain, with a coefficient of similarity of 0.75, was also grouped into the third cluster (Fig. 1D). Samples considered to be more genetically divergent based on their genetic profiles were grouped in the first and fourth clusters (1, 3, and 27; 35, 36, and 37, respectively) (Fig. 1B and D).

Similar LSSP-PCR profiles ($Sm = 0.94$) were observed in samples from the same patient (32A and 32B) and in samples from different patients (9 and 12, 20 and 23) (Fig. 1C and D). On the other hand, LSSP-PCR profiles obtained from samples collected from the same patient at different times (27 and 34, 20 and 37) were grouped into different clusters.

Table 1

Clinical and epidemiologic data of the patients studied and phenetic clusters defined by LSSP-PCR assays

Samples code	Sex	Age (years)	Mucosa lesion	Cluster
1	M	49	Nasal	1
27 ^a	M	48	Nasal	1
3	M	42	Nasal	1
6	M	70	Nasal	2
30	M	54	Nasal	2
13	F	44	Nasal	2
9	M	24	Oral	2
12	M	69	Nasal	2
19	F	52	Oral	2
20 ^a	F	32	Nasal	2
23	F	72	Nasal	2
26	M	49	Oral	2
11	M	39	Nasal	2
28	M	53	Nasal	2
31	M	83	Nasal	2
38	M	12	Nasal	2
29	M	61	Oral	2
25	M	18	Nasal	3
Lb				3
32A	M	48	Nasal	3
32B	M	48	Oral	3
33	M	52	Oral	3
34 ^a	M	48	Nasal	3
36	M	45	Nasal	4
37 ^a	F	32	Nasal	4
35	F	63	Nasal	4

Lb = *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); M = male; F = female.

^a Two lesion fragments collected of the same patients at different times.

4. Discussion

This study used a PCR-hybridization approach to detect *L. (V.) braziliensis* DNA in samples obtained directly from nasal and/or oral mucosa lesions of patients with ML. Intraspecific polymorphisms in the variable region of kDNA minicircles were also revealed after LSSP-PCR assays. The reproducibility of the profiles allowed us to affirm that the genotypic variations observed were not because of the amount of DNA loaded on the gel or artifacts.

Because isolation and culture of parasites are not always possible, especially when the disease is caused by *L. (V.) braziliensis*, because of the low number and dispersion of parasites present in mucosa lesions (Herwaldt, 1999; Lainson and Shaw, 1987), the combination of both methodologies has the advantage of simultaneously detecting and genotyping parasites.

In the present work, we observed that most of the kDNA signatures were 85% similar and could be grouped into 2 main clusters, to one of which the reference strain *L. (V.) braziliensis* was also assigned. It is also important to mention that parasites recovered from some patients were priorly

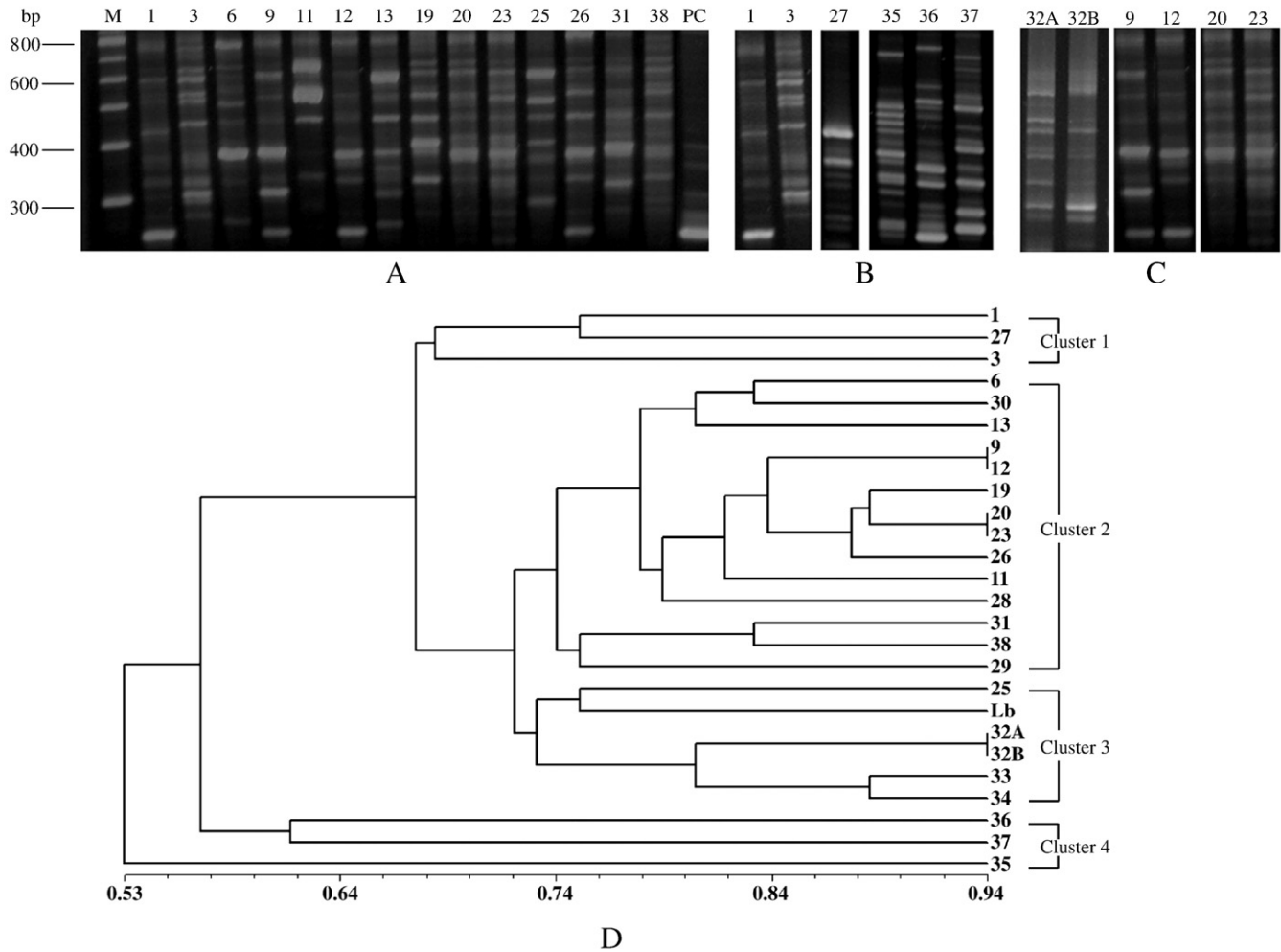


Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis showing representative kDNA signatures derived from the 750-bp fragments of *L. (V.) braziliensis* kDNA obtained from mucosal lesions (1, 3, 6, 9, 11, 12, 13, 19, 20, 23, 25, 26, 31, and 38). (B) kDNA signatures more genetically divergent grouped into the first and fourth clusters (1, 3, 27, 35, 36, and 37). (C) Similar kDNA signatures from the same and different patients grouped into the second and third clusters (32A, 32B, 9, 12, 20, and 23). M = 100-bp DNA ladder marker; PC = positive control (kDNA from *L. [V.] braziliensis* reference strain). (D) UPGMA dendrogram using the Sm coefficient of similarity based on the genetic profiles obtained from LSSP-PCR. Lb = *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903).

characterized as *L. (V.) braziliensis* by isoenzyme analysis using a system of 8 enzymatic loci. Phenetic analysis did not detect an association between the kDNA signature and the clinical location of the lesion (oral or nasal mucosa). This finding corroborates previous studies in which multiple PCR-based techniques were unable to detect a relationship between genetic polymorphism among *Leishmania* strains and clinical manifestation (Cuervo et al., 2004; De Oliveira et al., 2007). Such result is also consistent with recent work from our group reporting the detection of 9 different genotypes by LSSP-PCR in lesions from patients with typical or atypical clinical characteristics of ATL; no relationship was found between genetic profile and clinical condition (Baptista et al., 2009).

It is well established that *Leishmania* parasites circulate in nature as a set of heterogeneous subpopulations, and the demonstration of multiclonal origin of some *Leishmania* strains has already been reported (Pacheco et al., 1990).

Here, we observed similar kDNA signatures in nasal and oral mucosa lesions of the same patient (32A and 32B), suggesting monoclonality of the primary lesion. Similar kDNA signatures were also observed between different patients (9 and 12, 20 and 23). The polyclonality of some human isolates, possibly as a result of a heterogeneous infecting inoculum, and/or the accumulation of multiple independent infections (Saravia et al., 1990) cause difficulties in the interpretation of genetic diversity between parasites recovered from primary and secondary lesions. In the present work, dissimilar kDNA signatures were also obtained from biopsies taken from the same patients (27 and 34, 20 and 37) at different times within a 1-year period. Such result corroborates the hypothesis of polyclonality of the initial inoculum. Interestingly, some LSSP-PCR profiles (35, 36 and 37) revealed more polymorphisms in kDNA minicircles reflected by the appearance of additional bands. The endogenous generation of new polymorphisms in

kDNA minicircles (Lee et al., 1993; Pacheco et al., 1995) or the emergence of minor parasite subpopulation as a consequence of selection in vivo cannot be discarded.

This is the first work to our knowledge reporting the genetic typing of *L. (V.) braziliensis* directly from human oral and nasal mucosal lesions. The detection of similar and divergent kDNA signatures may reflect the clonality of the initial inoculum as a consequence of the clonal population structure of *Leishmania* parasites. Comparisons with other phenotypic characteristics from both parasite and host will be important to see if parallels can be drawn between parasite genetic polymorphism and clinical traits.

Acknowledgments

This work received financial support from Instituto Kinder do Brasil (IKB), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, and Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro—FAPERJ. The authors also thank the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses—IPEC/FIOCRUZ for providing biopsies of ML patients.

References

- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC (2008) Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 105:1–9.
- Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS (2009) *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 121:317–322.
- Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O (2004) *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol* 108:59–66.
- De Bruijn MHL, Barker DC (1992) Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 52:45–58.
- De Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, Barral A, de Oliveira CI (2007) Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis* 21:5.
- Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, Rabello A (2005) *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 51:185–190.
- Ferreira GA, Soares FC, Vasconcelos SA, Rodrigues BH, Werkhauser RP, de Brito ME, Abath FG (2007) Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signature produced by LSSP-PCR. *J Parasitol* 93:712–714.
- Figuroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, Diaz YR, Tellez JA, Saravia NG (2009) Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *J Infect Dis* 200:638–646.
- Golino A, Duncan JM, Zeluff B, DePriest J, McAllister HA, Radovancevic B, Frazier OH (1992) Leishmaniasis in a heart transplant patient. *J Heart Lung Transplant* 11:820–823.
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* 354:1191–1199.
- Lainson R, Shaw JJ (1987) Evolution, classification and geographical distribution, 1–120. In: *The leishmaniasis in biology and medicine*. Peters W, Killick-Kendrick R, Eds., vol. 1. London: Academic Press.
- Lee ST, Tarn C, Chang KP (1993) Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 58:187–204.
- Marsden PD (1986) Mucosal leishmaniasis (“espondia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 80:859–876.
- Marzochi MC, Marzochi KBF (1994) Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—emerging anthrozoosis and possibilities for their control. *Cad Saúde Pública* 10:359–375.
- Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS (2005a) PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 15:219–227.
- Oliveira JGS, Novais FO, de Oliveira CI, da Cruz Junior AC, Campos LF, da Rocha AV, Boaventura V, Noronha A, Costa JML, Barral A (2005b) Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 94:55–59.
- Pacheco RS, Grimaldi G, Momen H, Morel CM (1990) Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology* 100:393–398.
- Pacheco RS, Martinez JE, Valderama AL, Momen H, Saravia NG (1995) Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 69:197–209.
- Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, Degraeve W, Saravia NG, Campbell DA (2000) Intraspecific heterogeneity in the minicircle gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. *J Parasitol* 86:1250–1253.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350–1354.
- Saravia NC, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco RS, Labrada LA, Gonçalves A (1990) Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection—reactivation or reinfection? *Lancet* 336:398–402.
- Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, Pacheco RS, Momen H, Conceição-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KB (1998) Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg* 58:824–827.
- Sneath PH, Sokal RR (1962) Numerical taxonomy. *Nature* 193:855–860.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503–517.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LMC, Reis DA, Pereira MES, Simpson AJG, Tostes S, Pena SDJ (1996) Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol* 149:2153–2159.
- Weigle K, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG (1993) Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Colombia: a longitudinal study of the natural history, prevalence, and incidence of infection and clinical manifestations. *J Infect Dis* 168:699–708.

6.2 - Artigo 2

American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*:

Assessment of parasite genetic variability at the intra and interpatient levels

Enviado para a revista *Epidemiology and Infection*

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, caracteriza-se pela cronicidade, latência e comportamento metastático. A infecção humana produz um amplo espectro de manifestações clínicas que pode ser atribuído a uma variabilidade intraespecífica do parasito. Estudos de variabilidade genética, utilizando diferentes marcadores moleculares polimórficos, baseados na PCR, revelaram a existência de variado polimorfismo genético intraespecífico de *L. (V.) braziliensis* (GOMES et al. 1995; ISHIKAWA et al. 2002; CUPOLILLO et al. 2003; BAPTISTA et al. 2009). A presença de subpopulações parasitárias encontradas nas distintas lesões do mesmo paciente e a participação do homem atuando como filtro biológico responsável por esta seleção tem sido investigada.

Questionamentos

- A variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* observada entre os pacientes seria maior ou menor do que a observada intrapacientes?
- Existem subpopulações parasitárias, geneticamente mais adaptadas *in vivo*, que se disseminam da lesão cutânea inicial para o tecido mucoso?

Resultados principais

A variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* demonstrada pelo polimorfismo de assinaturas de kDNAs foi observada entre os pacientes, assim como no nível intrapaciente nas diferentes lesões. A análise fenética avaliou o grau de heterogeneidade dos minicírculos do kDNA agrupando os perfis genéticos em diferentes níveis de diferenciação, desde os mais similares até os mais divergentes. A diversidade genética no nível intrapacientes foi estatisticamente menor do que a observada entre os pacientes. Similaridades genótípicas foram evidenciadas entre as amostras de lesões cutânea e mucosa intrapacientes, sugerindo a possibilidade da existência de mesma população responsável tanto pelo acometimento cutâneo como mucoso.

1
2
3 **American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*:**

4
5 **Assessment of parasite genetic variability at the intra and interpatient levels**

6
7
8
9
10
11
12 F. S. Oliveira^{1*}, C. M. Vaete-Rosalino^{2,3}, S. J. B. Pacheco², F. A. Carvalho Costa¹,
13
14 A. O. Schubach² and R. S. Pacheco¹
15
16
17
18
19
20
21
22
23

24 ¹Laboratório de Sistemática Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo
25 Cruz (IOC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil
26
27

28
29
30
31 ²Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro
32 Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil
33
34
35
36
37

38
39 ³Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, Faculdade de Medicina,
40 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50
51 * Corresponding author: F. S. Oliveira, Laboratório de Sistemática Bioquímica,
52 IOC/FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro CEP 21040-900,
53 Brazil. (Email: fernandac@ioc.fiocruz.br)
54
55
56
57
58
59
60

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

SUMMARY

The genetic variability of *L. (V.) braziliensis* was assessed at the intra and interpatient levels of individuals with different clinical manifestations of ATL. Fifty-two samples provided by 35 patients were examined by LSSP-PCR and phenetic analysis. Genetic variability of *L. (V.) braziliensis*, in kDNA signatures, was observed between patients and also between different lesions of the same patient. Phenetic analysis was performed to evaluate the degree of heterogeneity of the kDNA minicircles. No correlation was observed between parasite genetic profiles and either clinical symptoms or location of the lesions. Genetic variability at the inpatient level was less pronounced than the variability observed between different patients. These results can be explained by two interpretations: i) the individual him/herself functions as a biological filter, through which highly adapted populations are selected, and ii) the eco-epidemiological interactions between distinct endemic areas influence the population dynamics of the circulating populations of *L. (V.) braziliensis*.

Key words: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; ATL; genetic variability; LSSP-PCR.

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

INTRODUCTION

American tegumentary leishmaniasis (ATL) caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* is characterized by chronicity, latency, and metastatic tendencies. In some cases, after the appearance of an initial cutaneous lesion, multiple cutaneous lesions (disseminated leishmaniasis, DL) and/or mucosal lesions (mucosal leishmaniasis, ML) can arise as a consequence of the dissemination of the parasite through the blood and lymphatic systems [1- 3]. Cutaneous lesions can persist active for many years and can coexist with mucosal lesions, as exhibited in the mucocutaneous leishmaniasis (MCL) form [4]. Less than 5% of the cases of cutaneous leishmaniasis develop destructive lesions in the upper respiratory tract, primarily in the nasal mucosa [5], and more than 25% of the cases of DL present damaged mucosa simultaneously with cutaneous manifestations [6]. However, approximately 16% of the cases of ML do not present a previous history of an initial cutaneous lesion [7].

Factors such as the immunological response of the patient and the genetic constitution of the parasite could influence the clinical manifestations and prognosis of this disease. It is also possible that these factors play a role in parasite persistence. Parasite persistence and reactivation have been reported to be contributing factors towards recurring episodes of ATL [8-10]. However, the mechanism of the dissemination and emergence of *L. (V.) braziliensis* to new cutaneous and mucosal tissue, the pathogenic process as well as the natural history of the recurrent leishmaniasis is not yet fully understood.

Human infection by *L. (V.) braziliensis* produces a broad spectrum of clinical manifestations that can be attributed to intraspecific variability of the parasite. The contribution of the parasite to the diversity of ATL patient clinical conditions has been

1
2
3 examined in several studies aiming to investigate whether certain species and/or clonal
4
5 populations of *Leishmania* are correlated with any clinical manifestations of the disease.
6
7 Intraspecific heterogeneity among members of the subgenera *Viannia* and *Leishmania*
8
9 was revealed by genetic and molecular studies, which contributed to a better
10
11 understanding of their epidemiology in diverse endemic areas [11-14].
12
13
14
15

16 Different polymorphic molecular markers based on the polymerase chain reaction
17
18 (PCR) have been used in several studies of the genetic variability of *L. (V.) braziliensis*
19
20 and of molecular epidemiology. The importance of this species was demonstrated by the
21
22 existence of various intraspecific genetic polymorphisms and by the variability of the
23
24 clinical manifestations observed in ATL. Previous studies have revealed a correlation
25
26 between genetic polymorphisms and the eco-epidemiological data of isolates [15-17].
27
28 Such studies reinforce the clonal population structure of *Leishmania*, as proposed by
29
30 Tibayrenc *et al.* [18]. *Leishmania* species naturally circulate as a group of
31
32 heterogeneous subpopulations, and demonstration of the polyclonality of the initial
33
34 inoculum of multiple strains has been reported [19]. These mechanisms could influence
35
36 the clinical prognosis of the disease and the efficiency of therapeutic strategies.
37
38
39
40
41

42 Our group recently demonstrated the application of low-stringency single-specific-
43
44 primer PCR (LSSP-PCR) towards the investigation of intraspecific polymorphisms in
45
46 the variable region of the kinetoplast DNA (kDNA) minicircles of *L. (V.) braziliensis* in
47
48 ATL patients [20, 21]. The purpose of the present study was to further investigate
49
50 parasite subpopulations, with a particular focus on the genetic variability of *L. (V.)*
51
52 *braziliensis* at the intra and interpatient levels. Towards this end, samples obtained from
53
54 cutaneous and mucosal lesions of patients with different clinical manifestations of ATL
55
56 were analyzed.
57
58
59
60

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

METHODS

Patients

This study included 35 patients with ATL and mucosal involvement, each attended at the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses / Lab. VigiLeish, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – IPEC/Fiocruz, Rio de Janeiro, from January 2005 to December 2009. Patients were grouped according to the following three categories, according to their clinical manifestations: i) mucocutaneous leishmaniasis (MCL) for patients that presented cutaneous and mucosal lesions in contiguous and concomitant forms; ii) mucosal leishmaniasis (ML) for patients that presented only mucosal lesions (nasal and/or oral) and iii) disseminated leishmaniasis (DL) for patients that presented multiple cutaneous lesions and mucosal involvement. All patients were subjected to dermatological and otolaryngological examination, including direct inspection of the upper respiratory tract using rigid optic Karl Storz 70° and 30°, to assess, respectively, the presence or absence of larynx and pharyngeal or nasal lesions. This study was approved by the Ethical Committee of Research at IPEC/FIOCRUZ (process 0016.0.009-02), and all of the patients signed informed consent forms.

Clinical samples and molecular diagnosis by PCR

Patient biopsy samples from cutaneous and/or mucosal lesions were processed for molecular analysis. Extraction of DNA and molecular diagnostic PCR-based assays were performed as previously described [21, 22]. *Leishmania* DNA was detected by amplifying a 750 base pair (bp) fragment corresponding to the variable region in the kDNA minicircles of *Leishmania* of the *L. braziliensis* complex [23], using the primers

1
2
3 B1 (5' GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG 3') and B2 (5'
4
5 CTAATTGTGCACGGGGAGG 3'). To prevent false negative results and as an internal
6
7 control, inhibition tests were first carried out on all samples through PCR amplification
8
9 of the human β -globin gene [24].
10
11
12
13
14

15 **Low-stringency single-specific-primer PCR reactions**

16
17 The 750 bp fragments generated by specific PCR were purified with a Wizard PCR
18
19 Prep System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. The
20
21 purified products were then submitted to a second round of amplification (LSSP-PCR)
22
23 using only one specific primer (B1: 5' GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG 3') under
24
25 conditions of low stringency. Reaction conditions and visualization of the products were
26
27 performed as described by Oliveira *et al.* [21].
28
29
30
31
32
33

34 **Phenetic analysis**

35
36 Bands varying in size from 350-750 bp were selected for phenetic analysis. Analysis of
37
38 the profiles generated by LSSP-PCR was performed by calculating the levels of
39
40 similarity using the Simple Matching Coefficient (Sm). The matrix of similarity was
41
42 transformed into a dendrogram through the Unweighted Pair Group Method
43
44 Arithmetical Average (UPGMA) algorithm, using the program NTSYS version 2.1
45
46 (Exeter Software).
47
48
49
50
51
52
53

54 **Comparison of inter and inpatient genetic variability**

55
56 Interpatient genetic variability was evaluated by: i) obtaining the coefficients of
57
58 similarity between the patient sample and all of the other samples (from all of the
59
60

1
2
3 patients), ii) calculating the arithmetic averages and their respective standard deviations
4
5 of those interpatient coefficients of similarity, and iii) calculating the average of those
6
7 mean values, with the aim of estimating the average interpatient similarity (i.e. the
8
9 variability existing among parasites recovered from lesions of different patients).
10
11 Inpatient genetic variability was estimated by calculating the average of the mean
12
13 coefficient of similarity of each patient, taking into account the cutaneous and mucosal
14
15 lesions present in the same patient. The averages and standard deviations (SD) of the
16
17 inter and inpatient coefficients of similarity were compared using the student's *t*-test.
18
19

20
21
22 Comparison of inter and inpatient similarities was also performed by analyzing the
23
24 percentages of shared characters (bands), defined by genetic profiles generated by
25
26 LSSP-PCR. The frequency of sharing of each character between interpatient samples
27
28 was calculated after first calculating the average of each frequency of sharing. The same
29
30 analysis was performed to compare different lesions from the same patient.
31
32
33
34
35

36 RESULTS

37 Clinical-epidemiological characteristics of the patients

38
39 The clinical forms of ATL exhibited by the patients were: 16 with MCL, 17 with ML
40
41 and 2 with DL. Of these patients, 25 (71.4%) were male and 10 (28.6%) were female.
42
43 Patient age varied from 12 to 77 years. The presence of lesions in the nasal mucosa was
44
45 observed in 77% of the patients. The 2 patients with DL (patients 1 and 87) presented
46
47 concomitant cutaneous and mucosal lesions. Only one patient with MCL (patient 32)
48
49 presented concomitant nasal and oral mucosal lesions. Of the 17 patients with ML, 12
50
51 reported the absence of an initial cutaneous lesion or scar suggestive of leishmaniasis.
52
53
54
55
56
57 Data are shown in Table 1.
58
59
60

Molecular diagnostics and analysis of genetic variability

From the 35 patients, 52 samples were analyzed, of which 13 originated from cutaneous lesions and 39 from mucosal lesions. Samples from cutaneous and mucosal lesions were only able to be obtained from 9 of the 16 patients with MCL. From two of the patients with ML (patients 20 and 76), fragments of the mucosal nasal lesions were collected at different times over a period of one year. From patient 1 with DL, 3 samples of cutaneous lesions were analyzed, two of which were collected at the same time as the sample of the mucosal lesion and one which was collected 6 months after treatment.

Internal controls for PCR inhibition were performed by amplifying a 110 bp fragment of the human β -globin gene. The expected 110 bp fragment was obtained in each sample tested (data not shown), confirming the absence of internal inhibitors. The 750 bp diagnostic band was observed in all samples analyzed (data not shown).

Different genetic profiles, representing kDNA signatures of the parasite, were obtained by LSSP-PCR analysis of each sample. Figure 1 shows selected representative results. Phenetic analysis grouped the LSSP-PCR profiles according to their coefficients of similarity (S_m), which diverged from 0.53 to 0.94 (Figure 2). The dendrogram illustrates that samples of cutaneous and mucosal lesions from two patients with MCL (patients 9 and 135) were genetically similar to each other, sharing an index of similarity of 0.94. In two other patients, one with MCL (patient 32) and one with DL (patient 87), the nasal and oral mucosal lesions also presented similar genetic profiles ($S_m = 0.94$), although somewhat differing genetic profiles ($S_m = 0.78$ and $S_m = 0.82$, respectively) were observed in the respective cutaneous lesions. Patients 20 and 23, with the ML clinical condition, also showed similar genetic profiles in the samples of their mucosal nasal lesion. On the other hand, distinct genetic profiles were detected in samples from the cutaneous and mucosal lesions of patients 30, 79, 149 and in the nasal

1
2
3 mucosal lesions of patients 20 and 76, which were collected at different times over a
4 period of one year. Interestingly, very divergent profiles were observed in the cutaneous
5 and mucosal lesion samples of patient 1 and also in the mucosal lesion samples of
6 patients 20, 35 and 76.
7
8
9
10
11

12 To evaluate interpatient genetic variability, the percentage of shared bands was
13 analyzed. This approach was validated by first demonstrating that, on average, each
14 character (band) was shared by 77% of the patients. Analysis of interpatient coefficients
15 of similarity revealed a similar average of 69% (SD=0.05%). On the other hand, the
16 average characters shared on the inpatient level was 89%, and the average of the
17 average coefficients of similarity was 80% (SD=0.12%). Comparison of the average
18 inter and inpatient coefficients of similarity and their standard deviations were
19 statistically significant ($p < 0.001$). Table 2 shows the obtained inter and inpatient
20 values of the coefficient of similarity for selected representative samples.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

37 DISCUSSION

38 Our group has recently been applying different molecular tools towards the study of
39 specific diagnostics and the genotypic behaviour of *L. (V.) braziliensis* subpopulations
40 in patients with mucocutaneous leishmaniasis [20, 21]. These studies served as a basis
41 for the present investigation, which aimed to explore the relationship between genetic
42 diversity of *L. (V.) braziliensis* at the inter and inpatient levels presenting distinct
43 clinical manifestations of ATL. At the same time, this study also aimed to evaluate such
44 genetic diversity following two hypothetical scenarios: (i) the individual, by him/herself,
45 acting as a biological filter whereby highly adapted populations are selected and (ii)
46 eco-epidemiological interactions occurring in distinct endemic areas as reflecting on the
47 population dynamics of the circulating populations of *L. (V.) braziliensis*.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

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

The observation that damaged nasal mucosa was the most frequent clinical manifestation among the patients is in accordance with published data regarding the predilection of this location in the ML, MCL and DL forms [4, 6, 25]. Curiously, the majority of the patients with ML did not present a history of an initial cutaneous lesion or scar suggestive of leishmaniasis, which has also been observed in other studies [26-28].

Genetic variability of *L. (V.) braziliensis*, demonstrated here by polymorphisms of kDNA signatures, was observed among the patients and among different lesions of the same patient. Phenetic analysis was used to evaluate the degree of heterogeneity of the kDNA minicircles and group them into genetic profiles of different levels of differentiation, from more similar to more divergent. No correlation was observed between the genetic profiles of *L. (V.) braziliensis* and either the clinical forms of the disease (mucosal, mucocutaneous and disseminated) or the location of the lesion (nasal or oral). Although this study did not uncover a relationship between parasite genotype and clinical manifestations of ATL, considerably divergent genetic profiles have been detected in nasal mucosal lesions of patients with ML. Schriefer *et al.* [29] noted that a higher frequency of a determined genotype of *L. (V.) braziliensis* in certain isolates of ML originated from the same endemic area in the state of Bahia. It is possible that the tropism of the parasite to the mucosa is based on interactions with molecules specific to the host. This idea is supported by data from patient 1, with DL, whose results show significant genetic diversity in the minicircles from distinct cutaneous and mucosal lesions collected both at the same time and also at different moments over a short period of time. Several studies using different polymorphic markers have been conducted with the aim of uncovering correlations between the molecular characteristics of parasite

1
2
3 populations and the clinical manifestations of the cutaneous and mucosal forms of ATL,
4
5 but have thus far yielded little fruit [20, 21, 30].
6

7
8 Despite the existence of heterogeneity, genotypic similarities between the samples
9
10 from cutaneous and mucosal lesions were evident on the inpatient level. The
11
12 percentage of shared inpatient characters (89%) was also of major significance,
13
14 indicating that the samples are genetically related. Therefore, we conclude that
15
16 inpatient genetic variability is less than that observed between different patients
17
18 (77%), a result that is also in accordance with the averages of the coefficients of
19
20 similarities (80%).
21
22

23
24 Elegant studies have demonstrated that the host immune system plays an important
25
26 role in the selection of parasite populations [31-33]. Considering this, it is possible that
27
28 humans may act as a biological filter towards the selection of parasite subpopulations
29
30 most adapted to develop in the host organism, and in this case, subpopulations can be
31
32 responsible for either cutaneous or mucosal damages.
33
34

35
36 On the other hand, the significant genetic variability observed between different
37
38 patients could also be a result of clonal propagation [18]. If the biological entity that
39
40 evolves is the clonal lineage one can imagine different clones being reshuffled and
41
42 propagated in the natural circulating population, sharing different factors of virulence or
43
44 competing for selective advantages such as distinct growth rates and differential
45
46 tropisms [34, 35]. From an epidemiological point of view, the complex cycle of
47
48 transmissions in which the individuals are exposed play a very important factor in the
49
50 possibility of reinfections through the accumulation of multiple independent infections
51
52 in patients residing in endemic areas [8, 36]. The complexity of transmission cycles,
53
54 involving sylvatic, domestic mammals and phlebotomine vectors surely contributes to
55
56 the large diversity of the natural population of *L. (V.) braziliensis* [37, 38]. An
57
58
59
60

1
2
3 understanding of the genetic diversity of circulating parasites population in an specific
4 endemic area, as well as an investigation of the clonality of the initial lesions, is
5 fundamentally important and assists us in interpreting the inter- and inpatient
6 variability.
7
8
9
10
11

12 13 14 15 **ACKNOWLEDGEMENTS**

16
17 The authors acknowledge the team of dermatologists and otolaryngologists at
18 the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses – IPEC/Fiocruz for collecting patient
19 biopsies. This work received financial support from Instituto Kinder do Brasil (IKB),
20 Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and
21 Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).
22 R.S. Pacheco and A.O. Schubach are investigators of CNPq.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **DECLARATION OF INTEREST**

36 None.
37
38
39
40
41
42

43 **REFERENCES**

- 44
45
46 1. Costa JM, *et al.* 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in
47 Bahia, Brazil: a report of eight cases. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*
48 1986; 89: 319–323.
49
50
51
52
53 2. Martinez JE, *et al.* Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two
54 cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination.
55
56
57
58
59
60

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

- Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1992; 86: 392-394.
3. Barral A, *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 53: 256-259.
4. Marsden PD, *et al.* Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III Mucosal disease presentation and initial evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1984; 17: 179-186.
5. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1986; 80: 859-876.
6. Turetz ML, *et al.* Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186: 1829-1834.
7. Weigle K, Saravia NG. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Clinics in Dermatology* 1996; 14: 433-450.
8. Saravia NC, *et al.* Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection – reactivation or reinfection? *Lancet* 1990; 336: 398-402.
9. Schubach AO, *et al.* Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *The Journal of Infectious Diseases* 1998; 178: 911-914.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
10. Mendonça MG, *et al.* Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189: 1018-1023.
11. Pacheco RS, *et al.* Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In: Rioux, J-A, (ed.) *Leishmania. Taxonomy and Phyogeny*. Montpellier: IMEEE, 1986, pp. 57-65.
12. Tomaz-Soccol V, *et al.* Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee* 1993; 68: 107-108.
13. Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1994; 50: 296-311.
14. Pacheco RS, *et al.* Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. *The Journal of Parasitology* 2000; 86: 1250-1253.
15. Gomes RF, *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Experimental Parasitology* 1995; 80: 681-687.
16. Ishikawa EA, *et al.* Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 96: S111-S121.
17. Cupolillo E, *et al.* Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 3126-3132.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
18. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 2414-2418.
19. Pacheco RS, *et al.* Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology* 1990; 100: 393-398.
20. Baptista C, *et al.* *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Experimental Parasitology* 2009; 121: 317-322.
21. Oliveira FS, *et al.* kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2010; 66: 361-365.
22. Oliveira FS, *et al.* PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Veterinary Parasitology* 2005; 15: 219-227.
23. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Tropica* 1992; 52: 45-58.
24. Saiki RK, *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
25. Oliveira-Neto MP, *et al.* American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *International Journal of Dermatology* 2000; 39: 506-514.
26. Jones TC, *et al.* Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases* 1987; 156: 73-83.
27. Oliveira MRF, *et al.* Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1995; 28: 325-232.
28. Shareef MM, Trotter MI, Cullen RJ. Leishmaniasis of the nasal cavity: a case report. *The Journal of Laryngology and Otology* 2005; 119: 1015-1017.
29. Schriefer A, *et al.* Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection Immunity* 2004; 72: 508-514.
30. Cuervo P, *et al.* *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Experimental Parasitology* 2004; 108: 59-66.
31. Jiménez M, *et al.* Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 131: 197-204.
32. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitology Today* 1998; 14: 119-124.

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

33. Brito CMM, Pires MQ, Pacheco RS. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2003; 2: 17-23.
34. Ayala FJ. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biological Research* 1993; 26: 47-63.
35. Pacheco RS, Brito CM. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 199-201.
36. Gontijo CM, *et al.* Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Tropica* 2002; 81: 143-150.
37. Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, (eds.) *Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections*. Arnold, London, United Kingdom, 1998, pp. 241-66.
38. Brito ME, *et al.* Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. *Tropical Medicine & International Health* 2009; 14: 1278-1286.

Table 1. *Clinical and epidemiological characteristics of the 35 patients analysed in this study*

Patient code	Age (years)	Sex	Clinical form	Location of lesion / Code	
				Cutaneous	Mucosal
33	52	M	MCL	Arm / 33MCL-C	Oral / 33MCL-O
26	48	M	MCL	Nostril / 26MCL-C	Oral / 26MCL-O
79	25	M	MCL	Arm / 79MCL-C	Nasal / 79MCL-N
134	54	M	MCL	ND	Oral / 134MCL-O
32	47	M	MCL	Arm / 32MCL-C	Nasal / 32MCL-N Oral / 32MCL-O
25	16	M	MCL	ND	Nasal / 25MCL-N
147	50	M	MCL	Face / 147MCL-C	Nasal / 147MCL-N
149	29	M	MCL	Trunk / 149LMC-C	Nasal / 149MCL-N
29	55	M	MCL	ND	Oral / 29MCL-O
3	42	M	MCL	ND	Nasal / 3MCL-N
135	52	F	MCL	Arm/ 135MCL-C	Nasal / 135MCL-N
9	25	M	MCL	Trunk/ 9MCL-C	Oral / 9MCL-O
19	52	F	MCL	ND	Oral / 19MCL-O
30	54	M	MCL	Upper lip / 30MCL-C	Nasal / 30MCL-N
12	69	M	MCL	ND	Nasal / 12MCL-N
109	65	M	MCL	ND	Oral / 109MCL-O
35	63	F	ML	A	Nasal / 35ML-N
28	53	M	ML	A	Nasal / 28ML-N
86	66	F	ML	A	Nasal / 86ML-N
31	71	M	ML	A	Nasal / 31ML-N
38	12	M	ML	A	Nasal / 38ML-N
129*	49	F	ML	A	Nasal / 129ML-N
6*	69	M	ML	A	Nasal / 6ML-N
110*	60	M	ML	A	Nasal / 110ML-N
70*	77	M	ML	A	Nasal / 70ML-N
96*	72	M	ML	A	Nasal / 96ML-N
23*	71	F	ML	A	Nasal / 23ML-N
11*	39	M	ML	A	Nasal / 11ML-N
117*	63	M	ML	A	Nasal / 117ML-N
13*	44	F	ML	A	Nasal / 13ML-N
20*	31	F	ML	A	Nasal / 20ML-N1 Nasal / 20ML-N2
76*	29	F	ML	A	Nasal / 76ML-N1 Nasal / 76ML-N2
133*	72	F	ML	A	Oral / 133LM-O
1	49	M	DL	Arm/ 1DL-C1 Trunk / 1DL-C2 Leg / 1DL-C3	Nasal / 1DL-N
87	41	M	DL	Nose / 87DL-C	Nasal / 87DL-N Oral / 87DL-O

*, patients reporting the absence of an initial cutaneous lesion or scar suggestive of leishmaniasis; M, male; F, female; MCL, mucocutaneous leishmaniasis; ML, mucosal leishmaniasis; DL, disseminated leishmaniasis; ND, not done; A, absence of cutaneous lesion at the time of clinical evaluation.

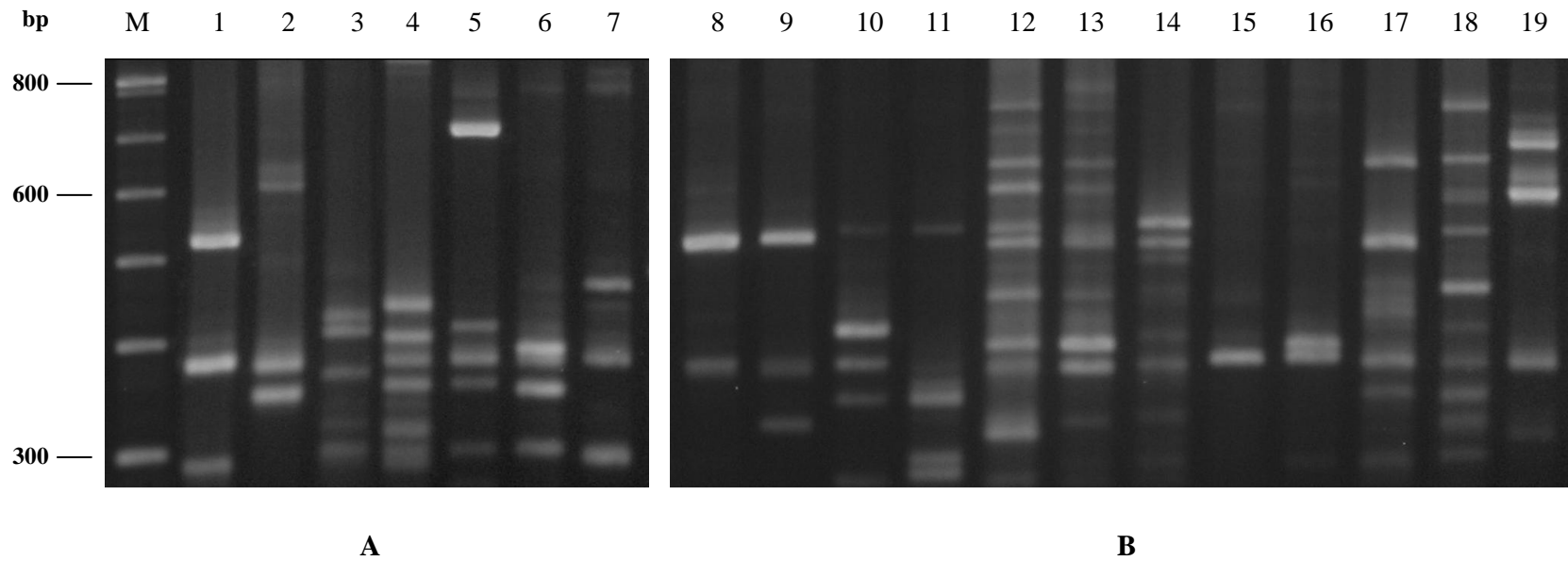


Figure 1

A: 1.8% High Resolution agarose gel electrophoresis showing representative genetic profiles derived from amplification of the 750 bp fragment from mucosal lesions of different patients. B: Similar and divergent genetic profiles from cutaneous and mucosal lesions observed at the inpatient level. Lanes: M – Molecular marker (100 bp ladder); lanes 1-7: 129ML-N, 96ML-N, 117ML-N, 134MCL-O, 109MCL-O, 133LM-O and 86ML-N; lanes 8-19: 135MCL-N, 135MCL-C, 79MCL-N, 79MCL-C, 32MCL-N, 32MCL-O, 32MCL-C, 87DL-N, 87DL-O, 87DL-C, 76ML-N1 and 76ML-N2.

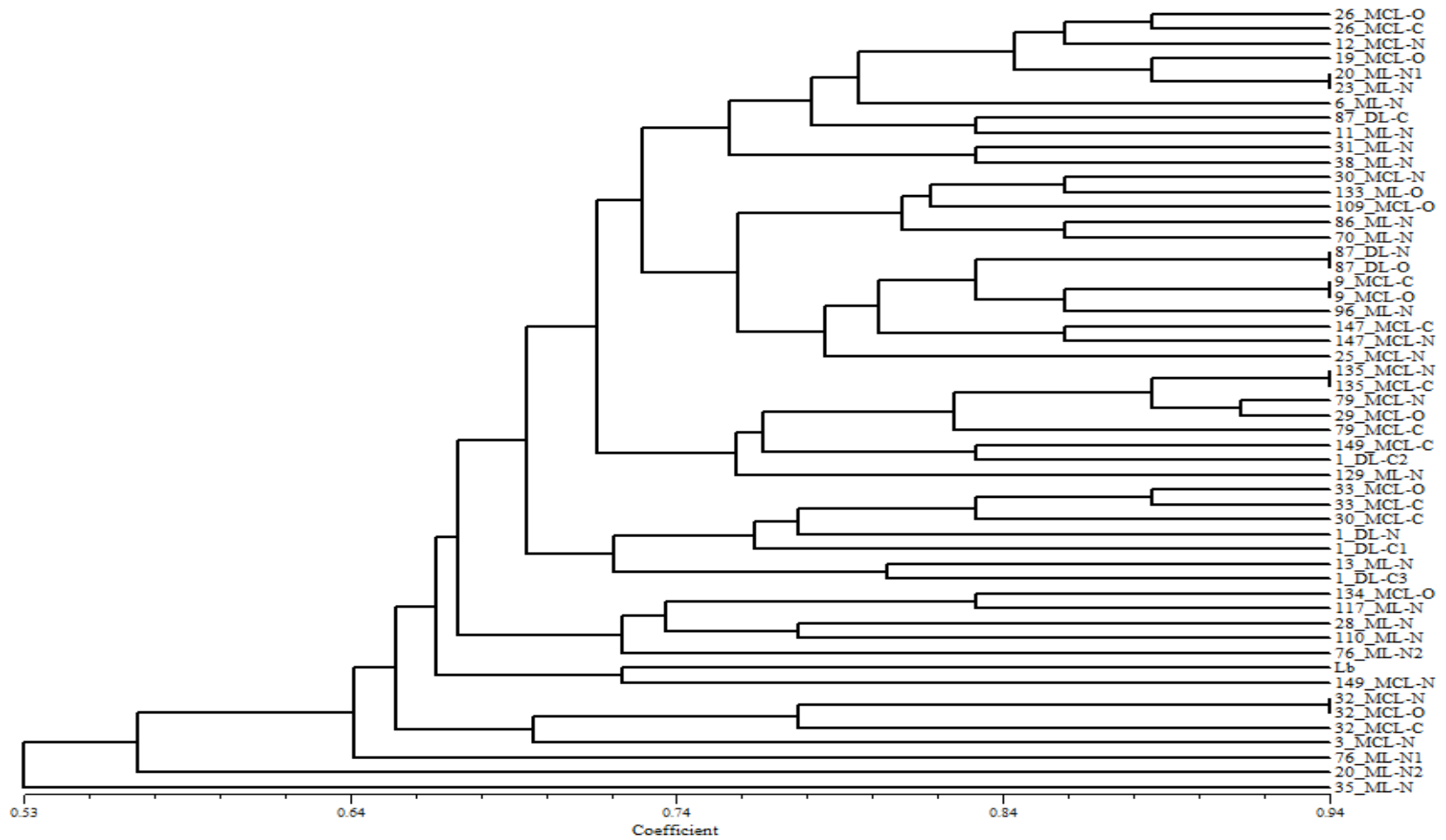


Figure 2

UPGMA dendrogram showing the “Simple Matching” coefficients of similarity based on the genetic profiles obtained by LSSP-PCR. Lb, *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903). MCL: mucocutaneous leishmaniasis; ML: mucosal leishmaniasis; DL: disseminated leishmaniasis; N: nasal; O: oral; C: cutaneous; C1-C3: different samples of cutaneous lesions collected at different moments; N1 and N2: different samples of mucosal nasal lesions collected at different moments.

Table 2

Table showing the values of the intra- and interpatient coefficients of similarity of selected representative samples

	32MCL-C	32MCL-N	32MCL-O	9MCL-C	9MCL-O	1DL-N	1DL-C1	1DL-C2	1DL-C3	20ML-N1	20ML-N2	29MCL-O	12MCL-N	6ML-N	31ML-N	133ML-O
32MCL-C	1.00															
32MCL-N	0.77	1.00														
32MCL-O	0.77	0.94	1.00													
9MCL-C	0.66	0.72	0.72	1.00												
9MCL-O	0.72	0.72	0.72	0.94	1.00											
1DL-N	0.69	0.58	0.58	0.69	0.69	1.00										
1DL-C1	0.55	0.61	0.66	0.66	0.66	0.75	1.00									
1DL-C2	0.69	0.58	0.63	0.75	0.75	0.77	0.75	1.00								
1DL-C3	0.72	0.72	0.72	0.66	0.66	0.69	0.77	0.75	1.00							
20ML-N1	0.66	0.72	0.72	0.77	0.77	0.63	0.66	0.63	0.66	1.00						
20ML-N2	0.50	0.55	0.50	0.55	0.61	0.58	0.55	0.52	0.50	0.55	1.00					
29MCL-O	0.72	0.66	0.66	0.77	0.83	0.69	0.55	0.75	0.61	0.72	0.66	1.00				
12MCL-N	0.75	0.63	0.63	0.80	0.80	0.72	0.69	0.72	0.75	0.86	0.58	0.75	1.00			
6ML-N	0.63	0.63	0.63	0.75	0.69	0.66	0.58	0.66	0.58	0.80	0.52	0.69	0.83	1.00		
31ML-N	0.72	0.77	0.77	0.77	0.83	0.63	0.61	0.63	0.61	0.83	0.55	0.83	0.69	0.69	1.00	
133ML-O	0.66	0.61	0.61	0.77	0.77	0.69	0.61	0.69	0.66	0.72	0.66	0.72	0.80	0.75	0.72	1.00

MCL: mucocutaneous leishmaniasis; DL: disseminated leishmaniasis; ML: mucosal leishmaniasis; N: nasal lesion; O: oral lesion; C: cutaneous lesion; N1 and N2: nasal lesion fragments collected at 2 different times;

C1-C3: cutaneous lesion fragments collected at different times.

6.3 - Artigo 3

Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients

Enviado para a revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene

A associação da infecção por *Leishmania* com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) foi registrada em 35 países. Essa expansão geográfica possivelmente está relacionada com o fenômeno de sobreposição das duas doenças, caracterizada pela disseminação da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) nas áreas rurais e pela urbanização das leishmanioses (CRUZ et al. 2006; ALVAR et al. 2008). A coinfeção *Leishmania*/ HIV revela características peculiares na apresentação e evolução clínica, no perfil de diagnóstico laboratorial e na resposta ao tratamento específico. No Brasil, existem poucos relatos de casos de coinfeção *Leishmania*/ HIV associada à leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (RABELLO et al. 2003). Alguns estudos descreveram as características clínicas e epidemiológicas da coinfeção LTA/ HIV, no entanto, a diversidade genética do parasito nestes pacientes não tem sido investigada no Brasil.

Questionamentos

- Perfis genéticos de *L. (V.) braziliensis* podem ser discriminados em pacientes com LM em estado de imunossupressão por HIV?

Resultados principais

As técnicas de LSSP-PCR e de análise fenética possibilitaram a identificação de perfis genéticos de *L. (V.) braziliensis*, que foram agrupados em distintos grupos, os quais discriminaram as amostras obtidas dos pacientes com coinfeção LTA/ HIV daquelas de pacientes não infectados por HIV.

Manuscript Number: TRSTMH-D-10-00270R1

Title: Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients

Article Type: Full Length Article

Keywords: Mucosal leishmaniasis, *Leishmania*/HIV co-infection, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, PCR, LSSP-PCR

Corresponding Author: Dr. Fernanda Santos Oliveira,

Corresponding Author's Institution: Instituto Oswaldo Cruz

First Author: Fernanda S Oliveira, M.Sc

Order of Authors: Fernanda S Oliveira, M.Sc; Cláudia M Valet-Rosalino, Ph.D; Armando O Schubach, Ph.D; Maria de Fátima Madeira, Ph.D; Raquel S Pacheco, Ph.D

Abstract: The genetic polymorphism of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in cases of mucosal leishmaniasis (ML) from HIV-infected and non-HIV-infected patients was evaluated. Nine samples from three HIV-infected patients and five samples from five non-HIV-infected patients were analysed by polymerase chain reaction (PCR), low-stringency single-specific primer PCR (LSSP-PCR) and phenetic analysis. The presence of *L. (V.) braziliensis* DNA was detected in all samples by specific PCR assay. The intraspecific polymorphism of the variable region of *L. (V.) braziliensis* kDNA minicircles was investigated by LSSP-PCR. Phenetic analysis grouped the genetic profiles into two distinct clusters, which discriminated between samples obtained from HIV-infected and non-HIV-infected patients. In two HIV-infected patients, identical genetic profiles were detected in lesions biopsied at different times after the treatment of the initial lesion. Interestingly, genetically divergent profiles were detected in the cutaneous and mucosal lesions of the same HIV-infected patient collected at the same time. This is the first work comparing genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* in cases of mucosal leishmaniasis from HIV-infected and non-HIV-infected patients.

Suggested Reviewers:

Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients

Fernanda Santos de Oliveira^{a,*}, Cláudia Maria Valete-Rosalino^{b,c}, Armando de Oliveira Schubach^b, Maria de Fátima Madeira^b, Raquel da Silva Pacheco^a

^aLaboratório de Sistemática Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21040-360, Brazil

^bLaboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, IPEC/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^cDepartamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21944-970, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8205 ; fax: +55 21 2590 3495.

E-mail address: fernandac@ioc.fiocruz.br (F.S. Oliveira).

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

Abstract

The genetic polymorphism of *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in cases of mucosal leishmaniasis (ML) from HIV-infected and non-HIV-infected patients was evaluated. Nine samples from three HIV-infected patients and five samples from five non-HIV-infected patients were analysed by polymerase chain reaction (PCR), low-stringency single-specific primer PCR (LSSP-PCR) and phenetic analysis. The presence of *L. (V.) braziliensis* DNA was detected in all samples by specific PCR assay. The intraspecific polymorphism of the variable region of *L. (V.) braziliensis* kDNA minicircles was investigated by LSSP-PCR. Phenetic analysis grouped the genetic profiles into two distinct clusters, which discriminated between samples obtained from HIV-infected and non-HIV-infected patients. In two HIV-infected patients, identical genetic profiles were detected in lesions biopsied at different times after the treatment of the initial lesion. Interestingly, genetically divergent profiles were detected in the cutaneous and mucosal lesions of the same HIV-infected patient collected at the same time. This is the first work comparing genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* in cases of mucosal leishmaniasis from HIV-infected and non-HIV-infected patients.

Keywords: Mucosal leishmaniasis; *Leishmania*/HIV co-infection; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; PCR; LSSP-PCR

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

1. Introduction

The association of *Leishmania* infection with the human immunodeficiency virus (HIV) has been considered an emerging public health problem in four continents of the world (Asia, Africa, Europe, America). A significant increase in the number of cases of *Leishmania*/HIV co-infection has been registered in 35 countries. This increase in co-infection is probably due to the progressive geographical overlap of the two diseases, as acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is increasingly disseminated to rural areas and leishmaniasis is increasingly urbanised.^{1,2}

In South America, Brazil is the country requiring the most attention due to the increased incidence of both diseases. From 2000 to 2008, 238 749 cases of American tegumentary leishmaniasis (ATL) were reported, with an annual mean of 26 528 new cases.³ Between 1980 and 2009, 544 846 cases of AIDS and an annual incidence rate of 33 000 - 35 000 new cases were recorded in Brazil, where it is estimated that 630 000 people are now living with HIV/AIDS. The southeastern region encompassed 59.3% of all notifications, with 323 069 cases.⁴ **Despite the high ATL incidence rates observed in Brazil, the disease has a very heterogeneous geographic distribution and most cases are reported in the Amazon region. In this context, the state of Rio de Janeiro is a low endemic area.**

In Brazil, the first case of ATL associated with HIV infection was reported in 1987 by Coura et al.⁵; furthermore, evidence of infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a HIV-infected patient was reported by Machado et al.⁶ A review of Brazilian *Leishmania*/HIV co-infection cases reported during the period 1987 to 2003 revealed that 63% of the described *Leishmania*/HIV co-

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

infected patients had ATL, and of them, 43% presented mucocutaneous or mucosal forms.⁷ In Brazil, *L. (V.) braziliensis* was also characterised in a few cases of cutaneous/mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection.^{6,8-12} Although some studies on the clinical-epidemiological features of *Leishmania*/HIV co-infection have been performed, neither the genetic profile of *L. (V.) braziliensis* nor the presence of clonal subpopulations of this parasite in co-infection has been investigated in Brazil.

Different polymorphic molecular markers have also been applied to molecular epidemiology and to the study of genetic variability of *Leishmania*. Recently, our group reported the application of the low-stringency single specific primer-PCR (LSSP-PCR) technique towards investigating intraspecific polymorphism of the variable region of kDNA minicircles of *L. (V.) braziliensis* from ATL patients.^{13,14} The aims of the present study were: 1) to diagnose infections directly from patient biopsies, and 2) to assess the genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* detected in cases of mucosal leishmaniasis from HIV-infected and non-HIV-infected patients.

2. Materials and methods

2.1. Study design and sampling

We carried out a prospective study and included all HIV-positive patients (n = 3) who attended the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz (VigiLeish/IPEC/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil, presenting mucosal leishmaniasis from 2005 to 2008. Additionally, we

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

randomly selected HIV-negative patients presenting only mucosal lesions (n = 5) attending the same outpatient clinic during the same period. HIV infection status was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis. Patients' clinical and laboratorial characteristics are presented in Table 1. All patients were submitted to otorhinolaryngologic evaluation and direct examination of the upper aerodigestive tract using an optical fibroscope. A fragment was taken from mucosal and/or cutaneous lesions of the patients and processed for molecular diagnosis and genetic analysis.

2.2. Molecular diagnosis and genetic analysis

Extraction of *Leishmania* DNA, specific PCR assays, LSSP-PCR and phenetic analysis were carried out as previously described.^{14,15} *Leishmania* DNA was detected by specific PCR amplification of a 750 base pair (bp) fragment present in the variable region of kDNA minicircles from *Leishmania* of the *L. braziliensis* complex,¹⁶ using primers B1 (5' GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG 3') and B2 (5' CTAATTGTGCACGGGGAGG 3'). All positive PCR products were subjected to LSSP-PCR assays, consisting of reamplification of the purified PCR products with the single primer B1 (5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3') under low stringency conditions. Amplification products were analysed on 1.8% agarose gels (High Resolution, Sigma). Generated bands ranging in size from 350 to 750 bp were selected for phenetic analysis using the simple matching (Sm) coefficient of similarity to determine the proportion of mismatched bands. **The matrix of similarity was transformed into a dendrogram through the UPGMA algorithm¹⁷, using the**

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

NTSYS software program (version 2.1, Exeter Software). All experiments were conducted under controlled conditions in order to avoid contamination.

3. Results

Eight patients with mucosal leishmaniasis were studied, and three of these patients presented *Leishmania*/HIV co-infection (Table 1). Only one HIV-infected patient (Patient 1) knew that he was HIV-seropositive before the occurrence of ML. For the other two patients (2 and 3), HIV infection was confirmed at the same time as the ML diagnosis. The CD4⁺ T-lymphocyte counts of these patients ranged from 63 - 1350 cells per mm³ (Table 1). Patient 1 presented only nasal mucosa lesions, in three different episodes of ML, within a period of three years. Patient 2 presented cutaneous and mucosal lesions concomitantly at the first examination, but only nasal mucosa lesions in two episodes within a two-year period. Patient 3 presented nasal mucosa lesions on the first examination, and seven months later a cutaneous lesion near the nostril was noted. **Initial lesions in HIV-infected patients were treated, as usually, with meglumine antimoniate – Glucantime® as recommended by the Brazilian Ministry of Health. After relapse of cutaneous lesions patients were treated with Amphotericin B. The last treatment was more effective and clinical cure was achieved. Highly active antiretroviral therapy (HAART) was introduced after first relapse of patient 1 and two months after clinical cure in patient 2.** All five non-HIV-infected patients presented only mucosal lesions, four with nasal mucosa lesions and one with oral mucosa lesions (Table 1). In addition, patients 1 and 2 had suggestive atrophic skin

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

scars, but had not had previous confirmation and/or treatment for cutaneous leishmaniasis.

A total of fourteen samples (nine from HIV-infected patients and five from non-HIV-infected patients) from eight patients produced the expected 750-bp diagnostic bands after PCR with primers B1/B2 (**data not shown**). Leishmaniasis diagnosis was confirmed by positive specific PCR assay in all samples (100%) and also by parasite isolation in ten samples (71.4 %) of six patients (Table 1).

LSSP-PCR analyses showed a genetic profile of *L. (V.) braziliensis* for each patient's sample. **The reproducibility of the method was confirmed when identical genetic profiles were observed in the assays repeated, at least, three times under the same conditions. The total number of bands was 17. However, the number of bands present in each sample ranged from 4 to 12. Band number 1 correspond to 750 bp and the last one (band number 17) to 350 bp. Table 2 shows the shared bands and the correspondent phenetic clusters.**

Phenetic analysis grouped these profiles into two distinct clusters, which discriminated between samples obtained from HIV-infected patients and those from non-HIV-infected patients. The coefficients of similarity diverged from 0.49 to 1.00 (**Figure 1**). In two HIV-infected patients, identical genetic profiles (Sm = 1.00) were observed in samples taken at different times from the same patient (**PT1/SP1-N and PT1/SP2-N; PT3/SP1-N and PT3/SP2-C**); in each of these cases, the second sample was obtained 7-14 months after the first sample (Table 1). Interestingly, divergent genetic profiles were detected in the mucosal and cutaneous lesions (**PT2/SP1-N and PT2/SP1-C**) of the same HIV-infected

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

patient, with each profile being grouped in a distinct cluster. It is important to emphasize that all LSSP-PCR profiles obtained from the non-HIV-infected patients were grouped separately into the second cluster. The *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903), sharing 77% of common characters, was also grouped into the second cluster.

4. Discussion

In the present study, LSSP-PCR and phenetic analysis have allowed the investigation of genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* present in mucosal and cutaneous lesions from both HIV-infected and non-HIV-infected patients. **It is also important to mention that parasites recovered from some patients were prior characterized as *L. (V.) braziliensis* by isoenzyme analysis.**

It has been demonstrated that *Leishmania* parasites circulate in nature as a set of heterogeneous subpopulations. In fact, the demonstration of multiclonal origin of some *Leishmania* strains has already been reported.¹⁸ Oliveira et al.¹⁴ detected similar and divergent genetic profiles in *L. (V.) braziliensis* isolated from mucosal leishmaniasis patients, thereby demonstrating the clonality of the initial inoculum, possibly as a consequence of the clonal population structure of *Leishmania* parasites.¹⁹

In the present study, three HIV-infected patients presented new lesions after initial treatment. In two cases, identical genetic profiles of *L. (V.) braziliensis* were observed in the initial and the second lesions within a period of 14 months. This finding would suggest the possibility of reactivation of the initial inoculum, as previously reported.^{20,21} **Although identical genetic profiles in parasites recovered from primary and recurrent lesions provides evidence of**

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

reactivation, the possibility of reinfection with a parasite' strain showing the same genetic profile cannot be ruled out as patients reside in endemic areas. Interestingly, the two patients who present genetically related parasites had distinct clinical evolution regarding HIV infection. One presented a decrease in CD4⁺ T-lymphocyte count (from 397 to 166 cells/mm³) and the other presented an increase (from 63 to 229 cells/mm³). These changes could not be related to HAART, once the first patient had start HAART and the second did not receive therapy. Nevertheless, both patients were immunodeficient at the time of the collection of the subsequent (second or third) lesion fragment (i.e. CD4⁺ T-lymphocyte count below 350 cells/mm³). On the other hand, our analyses showed distinct genetic profiles in fragments obtained simultaneously from mucosal and cutaneous lesions of the same HIV-positive Patient 2 (PT2/SP1-N and PT2/SP1-C), indicating polyclonality of the initial inoculum. **This patient had an increase in CD4⁺ T-lymphocyte counts ranging from 674 to 1350 cells/mm³ and started HAART after the last ML relapse.**

The overall segregation of the cohort into two clusters, containing either HIV-infected or non-HIV-infected patients, suggests that the immune system plays a role in the clonal structure of parasite populations. Despite one sample obtained from the cutaneous lesion of Patient 2 (PT2/SP1-C) has been grouped separately from the other HIV-associated samples, the segregation into two clustrers was considered to be statistically significant ($p < 0.05$, Fisher exact test, two-tailed), suggesting that the HIV-infection status of a patient could determine the cluster grouping of his/her parasite populations. The observed high rate of positivity in cultures from samples of HIV-positive patients in this

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

study corroborates previous studies in which intense parasite burdens were observed in mucosal lesions.^{9,22-24} The presence of high quantities of amastigote forms in mucosal lesions and the reactivation of *Leishmania* infection in HIV-positive patients have been reported to be associated with immunosuppression. In this context, it has been demonstrated that some patients develop only mucosal lesions⁹ or mucosal lesions that can even precede or be associated with skin lesions,²²⁻²⁴ as observed here.

The possibility that the immune system could select a specific *Leishmania* subpopulation as a way of conferring selective advantage to the parasite was substantiated by the evidence of selection of parasite subpopulations experimentally, in immunosuppressed mice,²⁵ and in cases of Chagas disease-HIV coinfection.²⁶

We agree that differences in the specific immune response against *Leishmania* in HIV-infected and non-HIV-infected patients could influence the selection of distinct parasite clones after initial infection with a polyclonal inoculum, as stressed by Jimenez et al.²⁷ To our knowledge, this is the first work comparing genetic polymorphism of *L. (V.) braziliensis* in cases of mucosal leishmaniasis among HIV-infected and non-HIV-infected patients. The genetic profiles detected by LSSP-PCR can be used as markers for additional comparisons with other *L. (V.) braziliensis* strains from immunosuppressed and immunocompetent patients from the same and other endemic areas.

Authors' contributions: FSO and RSP were responsible for the conception and design of the study; CMVR was responsible for otorhinolaryngologic evaluation and collection of the biological samples. MFM was responsible for

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

the parasitological diagnosis. FSO carried out the PCR assays and the genetic characterization of the parasites. FSO drafted the manuscript; RSP, MFM, CMVR and AOS were responsible for analysis and interpretation of the data; FSO and RSP are guarantors of the study. RSP and AOS are investigators of CNPq, Brazil. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements: The authors acknowledge the Laboratório de Vigilância em Leishmanioses - IPEC/FIOCRUZ for providing biopsies of ML patients. We also thank Dr. Filipe A. Costa for assistance with the statistical analysis and text revision.

Funding: This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and from Instituto Kinder do Brasil (IKB).

Conflict of interest statement: None declared

Ethical approval: The present study was approved by the Research Ethics Committee of IPEC/FIOCRUZ (process 0016.0.009-02), and informed consent was obtained from all patients prior to clinical evaluation.

References

1. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006, **123**: 357-88.
2. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**: 334-59.
3. Ministério da Saúde. Brasil. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública [online]. Brasília, Brasil; 2010. [capturado 19 jul. 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf
4. Ministério da Saúde. Brasil. O mapa da AIDS no Brasil [online]. Brasília, Brasil; 2010. [capturado 19 jul. 2010]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/data/Pages/LUMISE77B47C8ITEMID0863246E010245EDB538EB99511F42B2PTBRIE.htm>
5. Coura JR, Galvão-Castro B, Grimaldi Jr G. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987, **82**: 581-2.
6. Machado ES, Braga MP, Da-Cruz AM, Coutinho SG, Vieira ARM, Rutowitsch MS, et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992, **87**: 487-92.

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

7. Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 2003, **97**: 17-28.

8. Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJS, Pirmez C, Souza CSF, et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998, **10**: 218-25.

9. Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi Jr G, De Luca PM, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999, **94**: 537-42.

10. Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, de Paula CDR. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/AIDS: report of four clinical cases. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002, **35**: 651-4.

11. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Camargo RA, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009, **23**: 1026-34.

12. Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 2009, **160**: 311-18.

13. Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira FS, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary

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

leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol* 2009, **121**: 317-22.

14. Oliveira FS, Valete-Rosalino CM, Schubach AO, Pacheco RS. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010, **66**: 361-5.
15. Oliveira FS, Pirmez C, Pires MQ, Brazil RP, Pacheco RS. PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet Parasitol* 2005, **15**: 219-27.
16. De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992, **52**: 45-58.
17. Sneath PH, Sokal RR. Numerical taxonomy. *Nature* 1962, **193**: 855-60.
18. Pacheco RS, Grimaldi Jr. G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology* 1990, **100**: 393-8.
19. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci* 1990, **87**: 2414-18.

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

20. Saravia NC, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco RS, Labrada LA, et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection – reactivation or reinfection? *Lancet* 1990, **336**: 398-402.

21. Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002, **185**: 1533-7.

22. Sasaki MGM, Carvalho MM, Ferreira MLS, Machado MP. Cutaneous leishmaniasis coinfection in AIDS patients: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 1997, **1**: 142-4.

23. Echevarría J, Campos P, Chang J, Cuéllar L, Gotuzzo E, Paz L, et al. Mucocutaneous leishmaniasis and AIDS: case report. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993, **87**:186.

24. Amato VS, Nicodemo AC, Amato JG, Boulos M, Amato Neto V. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome). *J Antimicrob Chemother* 2000, **46**: 341-2.

25. Brito CMM, Pires MQ, Da-Cruz AM, Pacheco RS. Evidence of selection of subpopulations in *Trypanosoma cruzi* strains isolated from HIV positive patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996, **91**: 278.

26. Pacheco RS, Ferreira MS, Machado MI, Brito CM, Pires MQ, Da-Cruz AM, et al. Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, **93**: 165-9.

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

27. Jiménez M, Ferrer-Dufol M, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Molina R, Laguna F, et al. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiol Lett* 1995, **131**: 197-204.

Table 1

Clinical and epidemiological data of the HIV-infected and non-HIV-infected patients with mucosal leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil.

Patient / Sample	Diagnostic confirmation	Year of diagnosis of leishmaniasis	Number of episodes	Localization of the lesion	Year of diagnosis of HIV	CD4 ⁺ lymphocytes/mm ³ at the time of biopsy
HIV-infected patients						
PT1 / SP1-N	PCR/Culture	2005	Initial lesion	Nasal	1997	397
PT1 / SP2-N	PCR/Culture		14 months after the initial lesion	Nasal		321
PT1 / SP3-N	PCR		19 months after the second lesion	Nasal		166
PT2 / SP1-N	PCR/Culture	2006	Initial lesion	Nasal	2006	674
PT2 / SP1-C	PCR/Culture		Initial lesion	Cutaneous		674
PT2 / SP2-N	PCR/Culture		12 months after the initial lesion	Nasal		1350
PT2 / SP3-N	PCR		11 months after the second lesion	Nasal		759
PT3 / SP1-N	PCR/Culture	2006	Initial lesion	Nasal	2006	63
PT3 / SP2-C	PCR/Culture		7 months after the initial lesion	Cutaneous		229
Non-HIV-infected patients						
PT4 / SP1-N	PCR/Culture	2006	Initial lesion	Nasal	NA	NA
PT5 / SP1-N	PCR	2007	Initial lesion	Nasal	NA	NA
PT6 / SP1-O	PCR/Culture	2005	Initial lesion	Oral	NA	NA
PT7 / SP1-N	PCR	2006	Initial lesion	Nasal	NA	NA
PT8 / SP1-N	PCR/Culture	2007	Initial lesion	Nasal	NA	NA

PT, patients; SP, samples; C, cutaneous; N, nasal; O, oral; NA, not available.

Table 2

Shared bands observed in LSSP-PCR analyses and clusters defined by phenetic analysis.

Patient / Sample	Shared bands	Cluster
PT1 / SP1-N	2,5,7,12,13,14,15,17	1
PT1 / SP2-N	2,5,7,12,13,14,15,17	1
PT1 / SP3-N	2,5,14,15,16	1
PT2 / SP1-N	9,13,14,15	1
PT2 / SP1-C	1,4,5,6,8,9,10,11,12,14,15,17	2
PT2 / SP2-N	2,5,8,14,15,17	1
PT2 / SP3-N	3,5,9,10,12,13,15,17	1
PT3 / SP1-N	2,5,6,12,13,14,15	1
PT3 / SP2-C	2,5,6,12,13,14,15	1
PT4 / SP1-N	1,2,3,5,6,8,11,15,17	2
PT5 / SP1-N	1,2,3,5,6,11,15,17	2
PT6 / SP1-O	1,2,3,5,6,11,14,15,16,17	2
PT7 / SP1-N	2,8,11,15,17	2
PT8 / SP1-N	1,2,3,5,8,9,10,11,15,16,17	2
Lb	1,2,5,7,8,9,11,16,17	2

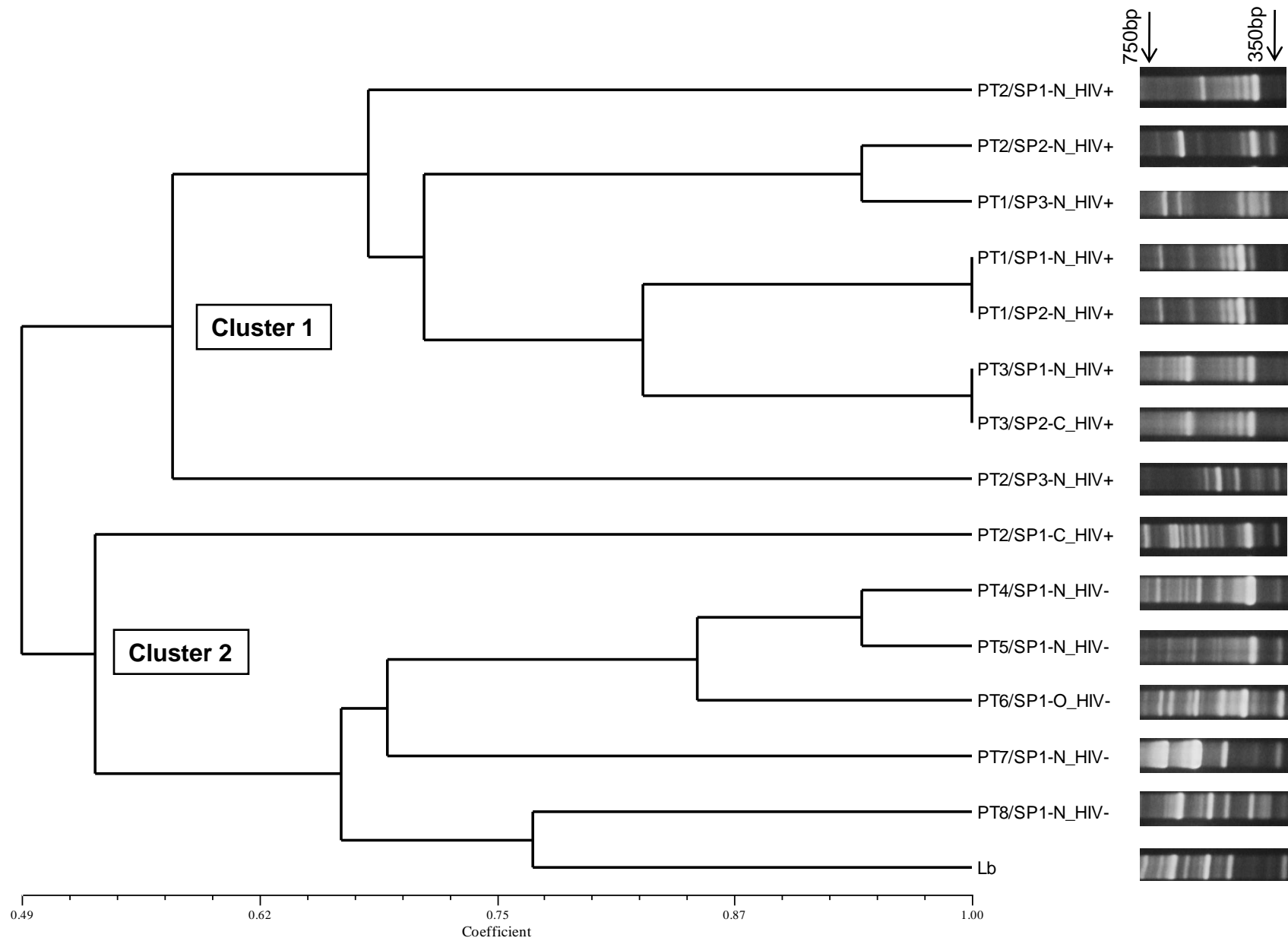
PT, patients; SP, samples; C, cutaneous; N, nasal; O, oral;

Lb, *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903).

Figure legend

Figure 1

UPGMA dendrogram using the simple matching coefficient of similarity based on the genetic profiles obtained from LSSP-PCR. Right side: slices of the gel showing the genetic profiles of each sample. PT, patients; SP, samples; C, cutaneous; N, nasal; O, oral; Lb, *L. (V.) braziliensis* reference strain (MHOM/BR/1975/M2903).



CAPÍTULO 3

7 – DISCUSSÃO

Na população estudada, analisamos aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes que apresentavam distintas formas clínicas da LTA com comprometimento mucoso, sendo classificados em três grupos (**Artigo 2**). No primeiro grupo, os pacientes com leishmaniose mucocutânea (LMC) apresentavam lesões cutâneas e mucosas, onde a maioria desenvolveu a lesão mucosa concomitantemente à lesão cutânea ativa. O segundo grupo foi composto por pacientes com leishmaniose mucosa (LM), sendo a sua maioria da forma mucosa indeterminada. E o terceiro grupo constituiu-se de pacientes com múltiplas lesões cutâneas e acometimento mucoso, caracterizando a leishmaniose disseminada (LD). Ressaltamos que a estratégia de estruturação da população em grupos foi essencial para a investigação da associação das formas clínicas com a variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis*.

Em nossa casuística, predominaram indivíduos do sexo masculino e com idade média de 50 anos. Estudos clínicos e epidemiológicos da LTA, de caráter retrospectivos, realizados em diferentes estados brasileiros, demonstraram a prevalência da doença em homens na faixa etária dos 20 aos 40 anos, considerada economicamente ativa (OLIVEIRA et al. 1995; PASSOS et al. 2001; NAME et al. 2005). No entanto, sabe-se que a população com maior comprometimento mucoso é mais velha. Assim sendo, nossos resultados, relacionados à faixa etária, estão de acordo com dados da literatura (SAMPAIO et al. 1980; AMATO et al. 2009) e são coerentes com a definição dos grupos clínicos. Do mesmo modo, o comprometimento da mucosa nasal como a manifestação mais frequente nos pacientes estudados coincide com diversos estudos quanto ao local de predileção nas diferentes manifestações clínicas da doença (MARSDEN et al. 1984b, OLIVEIRA-NETO et al. 2000; TURETZ et al. 2002; AMATO et al. 2009).

Dos 17 pacientes com LM, 12 não apresentavam história de lesão cutânea primária ou cicatriz sugestiva de leishmaniose, corroborando outros relatos (JONES et al. 1987; OLIVEIRA et al. 1995; SHAREEF et al. 2005). Esta observação tem permitido a especulação de que a infecção inicial, nestes casos, talvez tenha sido subclínica (MARSDEN 1986; JONES et al. 1987). Por outro lado, em alguns pacientes notou-se uma cicatriz, proveniente de lesão, cujo aparecimento foi relatado há mais de 50 anos, porém, sem a confirmação prévia de LC, configurando-se, possivelmente, a forma mucosa tardia.

Em relação à LMC e ao tempo de evolução clínica entre as lesões, em 50% dos pacientes evidenciou-se o aparecimento dos sinais e sintomas da lesão mucosa em um período de seis meses após a manifestação da lesão cutânea. A avaliação otorrinolaringológica sistematizada, adotada pelo VigiLeish/ IPEC, pode ter sido fundamental para o diagnóstico

clínico precoce da forma mucosa, sendo confirmado por exames imunológicos, parasitológicos e moleculares. Os nossos resultados são reforçados pelos reportados por Boaventura et al. (2006).

Apesar de ser considerada uma das formas clínicas da LTA mais rara, a ocorrência de casos de LD, como relatada em nosso estudo, também tem sido citada em trabalhos prévios realizados no estado do Rio de Janeiro (DA-CRUZ et al. 2005; VIEIRA-GONÇALVES et al. 2008). Os dois pacientes representativos deste grupo (LD) apresentaram numerosas lesões cutâneas, em diferentes partes do corpo (face, tronco e membros), que se desenvolveram concomitantemente com a lesão mucosa, observações estas similares em 30% dos pacientes com LD, como reportados por Turetz et al. (2002).

Durante o período definido para o estudo (2005-2009), três pacientes apresentaram coinfeção com o HIV (**Artigo 3**). Todos os pacientes eram do sexo masculino, com idades de 42, 45 e 46 anos. Apenas um destes pacientes já sabia ser soropositivo ao HIV antes da primeira manifestação clínica da LM. Os diagnósticos, sorológico para HIV e parasitológico e/ ou molecular para a LM, foram confirmados ao mesmo tempo nos outros dois pacientes. Nenhum deles possuía diagnóstico prévio de LTA antes da infecção por HIV, embora cicatrizes cutâneas atróficas e hipercrômicas tivessem sido observadas em dois pacientes. Na literatura mundial, a maioria das notificações de casos de coinfeção *Leishmania*/ HIV está associada à forma visceral (leishmaniose visceral). No Brasil, uma revisão dos relatos de casos de coinfeção verificou que 43% dos indivíduos soropositivos ao HIV apresentavam a forma mucocutânea ou mucosa da LTA (RABELLO et al. 2003). O mesmo estudo revelou que a LTA foi diagnosticada antes (18%), ou ao mesmo tempo (36%) que a infecção por HIV. Os nossos resultados corroboram a referida estatística.

Em nosso estudo (**Artigo 3**) é interessante destacar que um paciente HIV teve somente episódios de lesões mucosas isoladas e outro teve episódio de lesão mucosa antecedendo a lesão cutânea, observações estas também relatadas por Da-Cruz et al. (1999). Vale ressaltar que os pacientes se encontravam em situação de imunossupressão moderada (linfócitos T CD4⁺ > 200 células/ mm³) durante os diferentes episódios de ocorrência das lesões cutâneas e mucosas, exceto em dois momentos, com lesões sem características atípicas, corroborando os resultados de Couppié et al. (2004).

Ao nosso conhecimento, os estudos realizados no Brasil, em sua maioria relatos de casos, relacionados à coinfeção LTA/ HIV abrangem informações sobre as características clínicas, epidemiológicas e imunopatológicas, evidenciando lacuna no conhecimento de

particularidades da interação genética da *Leishmania* e a imunossupressão causada por HIV no paciente com LTA, particularmente na infecção por *L. (V.) braziliensis*.

Na atualidade, a técnica de PCR e suas derivações vêm constituindo excelentes ferramentas que permitem a detecção, a genotipagem e o estudo da variabilidade genética em *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, as técnicas de PCR e LSSP-PCR foram empregadas visando o diagnóstico específico e o conhecimento da estrutura genética populacional de *L. (V.) braziliensis*. A análise da variabilidade genética de *Leishmania* vem sendo realizada em diversos estudos com aplicações na epidemiologia molecular, visando a identificação de variantes circulantes em áreas endêmicas e possíveis correlações com as distintas formas de apresentação e evolução clínica da LTA.

Torna-se fundamental que a seleção do alvo molecular seja adequada para fornecer informações necessárias sobre a espécie de *Leishmania* e suas possíveis variações moleculares. Dentro deste contexto, os minicírculos do kDNA são alvos potenciais para a amplificação, devido ao elevado número de cópias presentes em cada parasito e à evidência das regiões conservada e variável. A sensibilidade destas moléculas vem sendo confirmada, em ensaios de PCR, quando comparada com outros alvos moleculares, tais como o ITS do rRNA, os genes de mini-exon e G6PD. Nestes estudos, a sensibilidade do kDNA revelada foi de 98,7% (BENOUSSAN et al. 2006), 100% (TOJAL DA SILVA et al. 2006) e 95,8-97,9% (ROMERO et al. 2009).

Nesta tese, em todas as amostras analisadas (**Artigos 1, 2 e 3**) foi revelada a banda diagnóstica de 750 pb, correspondente à amplificação da região variável do minicírculo do kDNA de *L. (V.) braziliensis*, possibilitando o diagnóstico específico. Os resultados de PCR podem ser considerados confiáveis, já que *L. (V.) braziliensis* é, sabidamente, o agente etiológico responsável pelas formas clínicas de LM, LMC e LD no estado do Rio de Janeiro, local de infecção da maioria dos pacientes (MARZOCHI & MARZOCHI 1994; OLIVEIRA-NETO et al. 2000; VIEIRA-GONÇALVES et al. 2008). Além disso, cabe enfatizar que os iniciadores utilizados na técnica de PCR são específicos para as espécies do complexo *L. braziliensis*, não existindo a possibilidade de resultados cruzados com outra espécie como, por exemplo, *L. (L.) amazonensis*, que foi recentemente incriminada como o agente responsável pelo caso autóctone de leishmaniose cutânea difusa em Paraty, no estado do Rio de Janeiro (AZEREDO-COUTINHO et al. 2007).

Adicionalmente, os nossos resultados vêm reforçar a comprovada eficiência da técnica de PCR aplicada, diretamente em amostras clínicas, no diagnóstico específico da LM (DISCH et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2005; OVALLE-BRACHO et al. 2007), onde nem sempre o

isolamento em meio de cultura e a identificação de *L. (V.) braziliensis* se tornam possíveis, em decorrência da escassez destes parasitos presentes nas lesões (HERWALDT 1999; LAINSON & SHAW 1987).

Somando a essas vantagens, da sensibilidade e especificidade, a existência de heterogeneidade nas sequências de nucleotídeos da região variável do minicírculo de kDNA o torna um alvo ainda mais valioso nas investigações da diversidade genética de *Leishmania*. Estudos anteriores apontaram que as sequências mitocondriais evoluem mais rapidamente do que os genes nucleares, podendo mostrar um nível maior de polimorfismo dentro de uma espécie (AVISE et al. 1979; BROWN et al. 1979).

A análise do polimorfismo genético intrafragmento amplificado (região variável do minicírculo de kDNA) foi realizada pelo marcador molecular LSSP-PCR, que apresenta um alto poder discriminatório (**Artigos 1, 2 e 3**). A técnica de LSSP-PCR tem sido explorada em estudos com distintas abordagens de genotipagem e genética populacional, principalmente em *Trypanosoma cruzi* (VAGO et al. 1996; 2000; BURGOS et al. 2005; LAGES-SILVA et al. 2006; SALAZAR et al. 2006; BRITO et al. 2008; MANOEL-CAETANO et al. 2008; RODRÍGUEZ et al. 2009) e em diferentes microrganismos, tais como *Leptospira* spp. (OLIVEIRA et al. 2003; OOTEMAN et al. 2004), *Entamoeba histolytica* (GOMES et al. 1997), vírus HPV (VAN BELKUM 1995; VILLA et al. 1995) e *L. (V.) braziliensis* (FERREIRA et al. 2007; BAPTISTA et al. 2009).

Na proposta inicial, fez-se o reconhecimento genotípico de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* circulantes em amostras de lesões mucosas de pacientes com LM (**Artigo 1**). O polimorfismo genético intrafragmento foi traduzido como uma assinatura do kDNA do parasito para cada amostra. A alta reprodutibilidade dos perfis genéticos, como destacada no estudo pioneiro de Pena et al. (1994), permite a afirmação de que as variações genotípicas observadas não foram causadas pelo excesso na quantidade de DNA no gel ou por artefatos.

A maioria dos perfis genéticos foi inserida em dois grupos principais. No entanto, não foi evidenciada associação entre o perfil genético e a localização da lesão mucosa (nasal ou oral). Esse resultado é coerente com os obtidos por Baptista et al. (2009) que identificaram nove genótipos, através de LSSP-PCR, em lesões de pacientes com LTA, porém, sem correlação com a condição clínica. Cuervo et al. (2004) não observaram diferenças significativas entre o perfil genético e a apresentação clínica quando avaliaram isolados pareados obtidos das lesões cutânea e mucosa. A ausência de associação entre polimorfismo genético e manifestações clínicas vem sendo também reportada em vários estudos empregando diferentes marcadores moleculares polimórficos, baseados na técnica de PCR,

em isolados de *L. (L.) amazonensis* (DE OLIVEIRA et al. 2007), *L. (L.) donovani* (EL TAI et al. 2001), *L. (L.) infantum* (TOLEDO et al. 2002; BOTILDE et al. 2006), *L. (L.) aethiopica* (SCHÖNIAN et al. 2000) e *L. (L.) tropica* (SCHÖNIAN et al. 2001).

Em nossos resultados, foram reveladas assinaturas de kDNAs similares em amostras de paciente coletadas ao mesmo momento (mucosa oral e nasal), entretanto, nas amostras coletadas em tempos diferentes na mesma localização (mucosa nasal), encontramos divergência em seus perfis genéticos. Tais achados podem ser interpretados dentro do contexto da teoria da propagação clonal de *Leishmania* proposta por Tibayrenc et al. (1990) e revisada por Tibayrenc & Ayala (2002). Desta forma, se *Leishmania* circula na natureza como um conjunto de subpopulações heterogêneas, e a demonstração da policlonalidade de algumas cepas resultante de um inóculo inicial heterogêneo (PACHECO et al. 1990) e/ ou do acúmulo de múltiplas infecções independentes (SARAVIA et al. 1990) como reportado anteriormente, podemos sugerir que a similaridade genética encontrada nas lesões mucosas possa ser resultante da monoclonalidade da lesão primária e que, por outro lado, a divergência genética corroboraria a hipótese de policlonalidade do inóculo inicial.

Além disso, foram detectados em alguns perfis genéticos de kDNA mais polimorfismos, refletida pelo aparecimento de bandas adicionais. Neste caso, nossas observações poderiam ser explicadas conforme evidências reportadas por Pacheco et al. (1995). Os autores detectaram polimorfismo de fragmento de restrição do kDNA entre diferentes clones de *L. (V.) guyanensis*, apoiando a hipótese da geração endógena de novos polimorfismos durante a infecção.

Em resumo, a detecção de assinaturas de kDNAs similares e divergentes pode refletir a clonalidade do inóculo inicial, como consequência da estrutura populacional clonal de *Leishmania*.

Os resultados prévios (**Artigo 1**) serviram de fundamento para aprofundar nossas investigações relacionadas à presença de subpopulações parasitárias, enfocando o estudo da variabilidade genética de *L. (V.) braziliensis* nos níveis intra e interpacientes com distintas manifestações clínicas de LTA (**Artigo 2**). Igualmente reportado no estudo anterior (**Artigo 1**), não houve associação entre os perfis genéticos de *L. (V.) braziliensis* e as formas clínicas da doença, conforme a definição dos grupos (LM, LMC, LD), nem em relação à localização da lesão cutânea ou mucosa (nasal ou oral).

Cabe ressaltar que similaridades genótípicas foram evidenciadas entre as amostras de lesões cutânea e mucosa intrapacientes. O percentual de compartilhamento de caracteres e as médias dos coeficientes de similaridades das amostras intrapacientes foram significativamente

maiores do que entre os pacientes. Desta forma, podemos afirmar que a variabilidade genética intrapacientes é menor do que a observada entre os pacientes.

Perfis genéticos divergentes foram detectados em lesões de mucosa nasal de pacientes com LM. Em estudo realizado por Schriefer et al. (2004), foi constatada uma frequência maior de um determinado genótipo de *L. (V.) braziliensis* em alguns isolados de pacientes com LM procedentes de uma mesma área endêmica no estado da Bahia. Nós evidenciamos diversidade genética significativa nas moléculas de minicírculos nas distintas lesões cutâneas e mucosa de um paciente com LD. Portanto, poderíamos interpretar este fato de igual maneira ao estudo anterior (**Artigo 1**), onde a geração endógena de novos polimorfismos em minicírculos de kDNA não pode ser descartada (PACHECO et al. 1995). Além disso, outra questão a se especular, neste caso, seria considerar os relatos de Lee et al. (1993) que demonstraram mudanças rápidas e reversíveis em diferentes sequências dos minicírculos de kDNA, quando sujeitos à exposição de fármacos *in vitro*.

A interpretação dos nossos resultados foi avaliada sob dois cenários: 1) o indivíduo, por si só, funcionando como um filtro biológico onde populações mais adaptadas seriam selecionadas e 2) as interações ecoepidemiológicas existentes em distintas áreas endêmicas e seu reflexo na dinâmica populacional das populações circulantes de *L. (V.) braziliensis*.

Elegantes estudos têm apontado evidências de que o sistema imune do hospedeiro poderia desempenhar um papel importante na seleção de populações do parasito (JIMÉNEZ et al. 1995; MACEDO & PENA 1998; BRITO et al. 2003). Dentro desse contexto, seria possível que o homem estivesse atuando como um filtro biológico, selecionando subpopulações parasitárias mais adaptadas a se desenvolverem em seu organismo. Isto poderia explicar a similaridade intrapacientes, em que subpopulações parasitárias que disseminam a partir da lesão inicial e causam a lesão mucosa são genotipicamente semelhantes àquelas presentes na lesão cutânea primária.

Por outro lado, a maior variabilidade genética observada entre os diferentes pacientes pode ser o resultado da propagação clonal (TIBAYRENC et al. 1990). Se a entidade biológica que evolui é a linhagem clonal, pode-se imaginar diferentes clones misturando-se e sendo propagados na população natural circulante, compartilhando diferentes fatores de virulência ou competindo por vantagens seletivas, como taxa de crescimento distinta e tropismo diferenciado (AYALA 1993; PACHECO & BRITO 1999).

Além disso, analisando sob o ponto de vista epidemiológico, o complexo ciclo de transmissão em que os indivíduos de regiões endêmicas estão expostos, com a possibilidade de reinfecções pelo acúmulo de múltiplas infecções independentes, poderia desempenhar um

fator importante (SARAVIA et al. 1990; GONTIJO et al. 2002). Estudos realizados com abordagens moleculares revelaram padrões fenotípicos e genotípicos diferenciados de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, em distintas áreas endêmicas onde ocorrem situações epidemiológicas simples ou complexas (PACHECO et al. 1986). Recentemente, Brito et al. (2009) evidenciaram a possibilidade de que a coexistência de espécies de *L. (Viannia)* em áreas com situações epidemiológicas complexas afetam o nível de polimorfismo genético na população natural de *Leishmania*.

A participação de hospedeiros vertebrados (silvestres e domésticos) e flebotomíneos, nos diferentes ciclos de transmissão, seguramente contribui para uma maior diversidade na população natural de *L. (V.) braziliensis* na área estudada. No estado do Rio de Janeiro, a infecção por *L. (V.) braziliensis* em humanos tem sido frequentemente correlacionada com cães e equinos também afetados, cuja transmissão é dependente da adaptação do vetor *Lutzomyia intermedia* ao ambiente domiciliar e peridomiciliar (RANGEL et al. 1990; BARBOSA-SANTOS et al. 1994; MARZOCHI & MARZOCHI 1994). Embora ainda não se tenha identificado o reservatório silvestre, os pacientes residentes em áreas endêmicas têm relatado a presença de preguiças e gambás, próximos à residências, sugerindo a possibilidade de envolvimento de um ciclo silvestre na transmissão da LTA (OLIVEIRA-NETO et al. 2000).

Nos pacientes com coinfeção LTA/ HIV, analisados neste estudo, o polimorfismo genético de *L. (V.) braziliensis* também foi evidenciado (**Artigo 3**). A análise fenética reuniu os perfis genéticos em dois grupos distintos, os quais discriminaram entre as amostras obtidas de pacientes com coinfeção *Leishmania/ HIV* daquelas obtidas de pacientes não infectados. Perfis geneticamente idênticos detectados nas amostras de lesão inicial e recorrente (após o tratamento) de pacientes coinfectados podem sugerir a possibilidade de reativação do inóculo inicial, como previamente evidenciado por Morales et al. (2002).

Polimorfismos genéticos ao nível de kDNA, obtidos por outros marcadores moleculares baseados na PCR, têm também fornecido informações relevantes sob diferentes aspectos, tais como a confirmação da existência de um surto de leishmaniose visceral entre usuários de drogas injetáveis e soropositivos ao HIV, na Espanha (MORALES et al. 2001), a identificação de genótipo associado ao estado imune dos pacientes, coinfectados ou não, em Portugal (CORTES et al. 2006) e, a diferenciação entre reativação e reinfeção em pacientes coinfectados (MORALES et al. 2002; CORTES et al. 2006). Adicionalmente, os nossos resultados vêm reforçar a aplicabilidade da LSSP-PCR na evidênciação de discriminação de perfis genéticos diferenciados de *L. (V.) braziliensis* em pacientes infectados por HIV.

A nítida separação em dois grupos (coinfectedados e não coinfectedados por HIV), como reportado no **Artigo 3**, leva-nos a sugerir que o sistema imunológico possa desempenhar um papel no perfil genético das populações de *Leishmania*. A possibilidade de que o sistema imunológico poderia selecionar uma subpopulação específica de *Leishmania* como forma de conferir vantagem seletiva para o parasito foi fundamentada por meio de evidências de seleção de subpopulações parasitárias em camundongos experimentalmente imunossuprimidos (BRITO et al. 1996) e em casos de coinfeção HIV/ doença de Chagas (PACHECO et al. 1998). Concordamos que as diferenças na resposta imune específica contra *Leishmania* em pacientes coinfectedados e não infectados por HIV poderiam influenciar a seleção de distintos clones do parasito após a infecção inicial, com inóculo policlonal, como mencionado por Jiménez et al. (1995).

Sob o ponto de vista clínico, a imunossupressão associada ao HIV tem profundos efeitos sobre a LTA, tanto em relação à apresentação clínica quanto à espécie de *Leishmania* responsável pela infecção. De fato, são registrados casos de pacientes, com coinfeção LTA/HIV associada à *L. (V.) braziliensis*, apresentando manifestações pouco comuns, como por exemplo, lesões cutâneas disseminadas (COURA et al. 1987; MACHADO et al. 1992; MATTOS et al. 1998; LINDOSO et al. 2009), o acometimento de mucosa genital (LINDOSO et al. 2009) e o envolvimento visceral (HERNÁNDEZ et al. 1993; SILVA et al. 2002). As manifestações atípicas das lesões, segundo Lindoso et al. (2009), podem estar associadas à condição severa da imunossupressão nos indivíduos com coinfeção *Leishmania*/ HIV, fatos estes não observados nos pacientes de nosso estudo, como anteriormente mencionado.

O comprometimento cutâneo e mucoso, as formas clínicas metastáticas e atípicas são situações distintas de um mesmo processo, onde uma série de fatores do meio ambiente, hospedeiro e parasito, está envolvida e, certamente, as interações e influências de cada um deles sofrem modificações no longo caminho da coevolução parasito-hospedeiro. A investigação do DNA parasitário é uma peça significativa dentro deste sistema dinâmico. Além disso, a determinação da expressão dos genes do parasito, a decodificação do seu papel na patogenia da LTA e seu elo na promoção da diversidade seria um avanço, trazendo novas informações complementares aos alcançados neste estudo.

8 – CONCLUSÕES

1. A técnica de PCR específica detectou DNA de *L. (V.) braziliensis* em todas as amostras analisadas, sendo considerada como um método valioso no diagnóstico molecular da LM, diretamente em amostras clínicas.
2. A avaliação do polimorfismo intrafragmento em minicírculos do kDNA amplificados pela técnica de LSSP-PCR, contribui de forma substancial nos estudos de diversidade genética em *L. (V.) braziliensis*.
3. A detecção de assinaturas de kDNAs similares ou divergentes sugere a clonalidade (mono ou policlonalidade) do inóculo inicial, como consequência da estrutura populacional clonal de *Leishmania*.
4. Não houve associação entre um determinado perfil genético e as diferentes manifestações clínicas da doença (LM, LMC, LD), ou mesmo em relação à localização da lesão cutânea e mucosa (nasal ou oral).
5. A diversidade genética de *L. (V.) braziliensis* no nível intrapacientes é menor do que a observada entre os pacientes.
6. A discriminação de perfis genéticos diferenciados de *L. (V.) braziliensis* em pacientes infectados por HIV sugere que a imunossupressão tem impacto na estrutura populacional do parasito.
7. A complexidade genotípica observada em *L. (V.) braziliensis* tem provável reflexo na dinâmica populacional e na plasticidade genética desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MC, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KB. On the origin and spread of cutaneous and mucosal leishmaniasis, based on pre- and post- colombian historical source. *Hist Cienc Saude Manguinhos* 2003; 10: 852-82.
- Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, et al. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 298-319.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, et al. The relationship between Leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 334-59.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Amato Neto V, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* 2008; 105: 1-9.
- Amato VS, Tuon FF, Imamura R, Camargo RA, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009, 23: 1026-34.
- Ampuero J, Rios AP, Carranza-Tamayo CO, Romero GAS. Genus-specific kinetoplast-DNA PCR and parasite culture for the diagnosis of localised cutaneous leishmaniasis: applications for clinical trials under field conditions in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 992-7.
- Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 523-32.
- Ashford RW. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1269-81.
- Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* 1999; 85: 181-7.
- Avisé JC, Lansman RA, Shade RO. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* 1979; 92: 279-95.
- Ayala FJ. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol Res* 1993; 26: 47-63.

Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintela LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 735-7.

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

Barbosa-Santos EGO, Marzochi MCA, Furtado W, Queiros F, Chicarino J, Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) Immunotherapy and chemotherapy assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 217-20.

Barral A, Guerreiro J, Bomfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 256-9.

Belli AA, Miles MA, Kelly JM. A putative *Leishmania panamensis* / *Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology* 1994; 109: 435-42.

Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of New World *Leishmania* in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58: 102-9.

Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1435-9.

Bernier R, Turco SJ, Olivier M, Tremblay M. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoid cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol* 1995; 69: 7282-5.

Berzunza-Cruz M, Bricaire G, Suazo NS, Pérez-Montfort R, Becker I. PCR for identification of species causing American cutaneous leishmaniasis. *Parasitol Res* 2009; 104: 691-9.

Beverley SM, Ismach RB, McMahon-Pratt D. Evolution of the genus *Leishmania* as revealed by comparisons of nuclear DNA restriction fragment patterns. *Proc Natl Acad USA* 1987; 84: 484-8.

Bhattacharya R, Singh R, Hazra TK, Majumder HK. Application of polymerase chain reaction with specific and arbitrary primers to identification and differentiation of *Leishmania* parasites. FEMS Microbiol Lett 1993; 114: 99-104.

Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Bafica A, Rosato A, et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 2006; 75: 267-9.

Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, et al. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. Clin Infect Dis 2010; 50: e1-6.

Borges AS, Machado AA, Ferreira MS, Figueiredo JFC, Silva GF, Cimerman S, et al. Concurrent leishmaniasis and human immunodeficiency virus infection: a study of four cases. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32: 713-9.

Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Cañavate C, Cruz I, et al. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. Infect Genet Evol 2006; 6: 440-6.

Brecelj M, Pikelj F, Gubensek F, Anderluh G. Polymerase chain reaction as a diagnostic tool for detecting *Leishmania*. Infection 2000; 28: 111-3.

Brito CMM, Pires MQ, Da-Cruz AM, Pacheco RS. Evidence of selection of subpopulations in *Trypanosoma cruzi* strains isolated from HIV positive patients. Mem Inst Oswaldo Cruz 1996, 91: 278.

Brito CMM, Pires MQ, Pacheco RS. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. Kinetoplastid Biol Dis 2003; 2: 17-23.

Brito CMM, Lima MM, Sarquis O, Pires MQ, Coutinho CF, Duarte R, et al. Genetic polymorphism in *Trypanosoma cruzi* I isolated from Brazilian Northeast triatomines revealed by low-stringency single specific primer-polymerase chain reaction. Parasitol Res 2008; 103: 1111-7.

Brito ME, Andrade MS, Mendonça MG, Silva CJ, Almeida EL, Lima BS, et al. Species diversity of *Leishmania* (*Viannia*) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Trop Med Int Health 2009; 14: 1278-86.

Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 1967-71.

Burgos JM, Begher SB, Freitas JM, Bisio M, Duffy T, Altcheh J, et al. Molecular diagnosis and typing of *Trypanosoma cruzi* populations and lineages in cerebral Chagas disease in a patient with AIDS. Am J Trop Med Hyg 2005; 73: 1016-8.

Carvalho MLR, Andrade ASR, Fontes CJF, Hueb M, Silva SO, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. Acta Trop 2006; 98: 277-85.

Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. J Clin Microbiol 2003; 41: 540-6.

Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Trop Med Hyg 2008; 78: 122-32.

Castro EA, Luz E, Telles FQ, Pandey A, Biseto A, Dinaiski M et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. Acta Trop 2005; 93: 141-9.

Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1993; 87: 444-8.

Costa JML, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. J Trop Med Hyg 1986; 89: 319-23.

Costa JML, Vale KC, Franca F, Saldanha ACR, Silva JO, Lago EL, et al. [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions]. Rev Soc Bras Med Trop 1990; 23: 205-8.

Costa JML. Epidemiology of the leishmaniasis in Brazil. Gaz Méd Bahia 2005; 75: 3-17.

Cortes S, Mauricio I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP, et al. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. Parasitol Int 2006; 55: 277-83.

- Couppié P, Clyti E, Sobesky M, Bissuel F, Del Giudice P, Sainte-Marie D, et al. Comparative study of cutaneous leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients and non-HIV-infected patients in French Guiana. *Br J Dermatol* 2004; 151: 1165-71.
- Coura JR, Galvão-Castro B, Grimaldi Jr G. Disseminated American cutaneous leishmaniasis in a patient with AIDS. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1987; 82: 581-2.
- Cruz I, Nieto J, Moreno J, Cañavate C, Desjeux P, Alvar J. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res* 2006; 123: 357-88.
- Cuervo P, Cupolillo E, Nehme N, Hernandez V, Saravia N, Fernandes O. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. *Exp Parasitol* 2004; 108: 59-66.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 296-311.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 145-55.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3126-32.
- Da-Cruz AM, Filgueiras DV, Coutinho Z, Mayrink W, Grimaldi Jr G, De Luca PM, et al. Atypical mucocutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in an acquired immunodeficiency syndrome patient: T-cell responses and remission of lesions associated with antigen immunotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 537-42.
- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 2005; 153: 537-43.
- Dávila AMR, Momen H. Internal-transcribed-spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 2000; 94: 651-4.
- De Bruijn MHL, Barker DC. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. *Acta Trop* 1992; 52: 45-58.

- De Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correa T, Freitas LAR, et al. Clinical utility of polymerase chain reaction – based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 2003; 37: e149-53.
- De Oliveira Camera P, Junger J, do Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, et al. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006; 100: 1112-17.
- De Oliveira JP, Fernandes F, Cruz AK, Trombela V, Monteiro E, Camargo AA, et al. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping. *Kinetoplastid Biol Dis* 2007; 6: 1-8.
- Deane LM, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis in Brazil. *In: Chang KP, Bray RS, editors. Leishmania*. Amsterdam: Elsevier; 1985. v. 1, p. 247-81.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 463-9.
- Delgado O, Guevara P, Silva S, Belfort E, Ramirez JL. Follow-up of human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 267-72.
- Desjeux P. The increase in risk factors for the leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 239-43.
- Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27: 305-18.
- Desjeux P, Alvar J. *Leishmania/HIV* co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 3-15.
- Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, et al. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35: 870-72.
- Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, Oliveira MC, Castro M, et al. *Leishmania (Viannia)* subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51: 185-90.

- Echevarría J, Campos P, Chang J, Cuéllar L, Gotuzzo E, Paz L, et al. Mucocutaneous leishmaniasis and AIDS: case report. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:186.
- El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, El Safi SH, et al. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR-based analyses and DNA sequencing. *Exp Parasitol* 2001; 97: 35-44.
- Eresh S, McCallum SM, Barker DC. Identification and diagnosis of *Leishmania mexicana* complex isolates by polymerase chain reaction. *Parasitology* 1994; 109: 423-33.
- Fagundes A, Schubach AO, Paula CC, Bogio A, Antonio LF, Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 109-12.
- Fernandes O, Murthy VK, Kurath U, Degrave W, Campbell DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 66: 261-77.
- Ferreira GA, Soares FC, Vasconcellos SA, Rodrigues EH, Werkhäuser RP, Brito ME, et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signatures produced by LSSP-PCR. *J Parasitol* 2007; 93: 712-4.
- Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, et al. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. *J Infect Dis* 2009; 200:638-46.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Quispe-Tintaya KW, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2294-7.
- Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism. *Infect Genet Evol* 2005; 5: 109-16.
- Garcia AL, Parrado R, De Doncker S, Bermudez H, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101: 368-71.

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

Gomes MA, Silva EF, Macedo AM, Vago AR, Melo MN. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. *Parasitology* 1997; 114: 517-20.

Gomes RF, Macedo AM, Pena SDJ, Melo MN. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. *Exp Parasitol* 1995; 80: 681-7.

Gontijo CM, Silva ES, Fuccio MB, Sousa MC, Pacheco RS, Dias ES, et al. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. *Acta Trop* 2002; 81: 143-50.

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

Grimaldi Jr G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol* 1993; 6: 230-50.

Grimaldi Jr G, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91: 37-42.

Guevara P, Alonso G, Franco da Silveira J, Mello M, Scorza JV, Añez N et al. Identification of New World *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 56: 15-26.

Guevara P, Ramírez JL, Rojas E, Scorza JV, González N, Añez N. *Leishmania braziliensis* in blood 30 years after cure. *Lancet* 1993; 341:1341.

Guevara P, Rojas E, Gonzalez N, Scorza JV, Añez N, Valera M, et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994; 1: 385-9.

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

Hernández D, Rodríguez N, Martínez C, García L, Convit J. *Leishmania braziliensis* causing visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus infection, identified with the aid of the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993; 87: 627-8.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354: 1191-9.

Isaza DM, Arboleda M, Restrepo M, McCann SHE, Barker DC. Validation of the polymerase chain reaction for the diagnosis of human cutaneous leishmaniasis in north-west Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: S165-8.

Ishikawa EA, Silveira FT, Magalhães AL, Guerra júnior RB, Melo MN, Gomes R, et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: S111-21.

Jackson PP, Lawrie JA, Stiteler JM, Hawkinds DN, Wohlieter JA, Rowton ED. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridisation and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet Parasitol* 1986; 20:195-215.

Jiménez M, Ferrer-Dufol M, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Molina R, Laguna F, et al. Variability of *Leishmania (Leishmania) infantum* among stocks from immunocompromised, immunocompetent patients and dogs in Spain. *FEMS Microbiology Letters* 1995; 131: 197-204.

Jones TC, Johnson Jr WD, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis* 1987; 156: 73-83.

Kawa H, Sabroza PC. [Spatial distribution of tegumentary leishmaniasis in the city of Rio de Janeiro]. *Cad Saude Pública* 2002; 18: 853-65.

Kelly JM, Law JM, Chapman CJ, Van Eys GJ, Evans DA. Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 46: 253-63.

Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, Galvão LMC, Pena SDJ, et al. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2167-71.

Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 569-96.

- Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987. v. 1, p. 1-120.*
- Lainson R, Shaw JJ. New World Leishmaniasis – The neotropical *Leishmania* species. *In: Cox FEG, Kreier JP, Wakelin D, editors. Topley & Wilson's microbiology & microbial infections. Arnold, London, United Kingdom; 1998. p. 241-66.*
- Lainson R, Rangel EF. Flebotomíneos do Brasil. Fiocruz: Rio de Janeiro; 2003. pp. 367.
- Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. Detection of cutaneous *Leishmania* infection in paraffin-embedded skin biopsies using the polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995; 89: 273-5.
- Lee ST, Tarn C, Chang KP. Characterization of the switch of kinetoplast DNA minicircle dominance during development and reversion of drug resistance in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 187-204.
- Lindoso JAL, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MIS, Oyafuso LK, Amato VS, et al. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. *Br J Dermatol* 2009; 160: 311-18.
- Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet* 1984; 2: 295.
- Lopes UG, Momen H, Grimaldi Jr G, Marzochi MCA, Pacheco RS, Morel CM. Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol* 1984; 70: 89-98.
- Lopez M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 348-56.
- Macedo AM, Pena SDJ. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol Today* 1998; 14: 119-24.
- Machado ES, Braga MP, Da-Cruz AM, Coutinho SG, Vieira ARM, Rutowitsch MS, et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87: 487-92.

- Machado-Coelho GLL, Caiaffa WT, Genaro O, Magalhães PA, Mayrink W. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99: 55-61.
- Manoel-Caetano FS, Carareto CMA, Borim AA, Miyazaki K, Silva AE. kDNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* in blood and oesophageal mucosa from chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102: 1102-7.
- Marcussi VM, Marcussi LM, Barbosa-Tessmann, Lonardoní MVC, Silveira TGV. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: new primers for identification using polymerase chain reaction. *Exp Parasitol* 2008; 120: 300-5.
- Marques MJ, Volpini AC, Genaro O, Mayrink W, Romanha AJ. Simple form of clinical sample preservation and *Leishmania* DNA extraction from human lesions for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis via polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65: 902-6.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986; 80: 859-76.
- Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1984a; 78: 561-62.
- Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JM. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III Mucosal disease presentation and initial evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 1984b; 17: 179-86.
- Martinez JE, Arias AL, Escobar MA, Saravia NG. Haemoculture of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 392-94.
- Martins L, Alexandrino A, Guimarães G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. *Rev Saúde Pública* 2010; 44: 571-4.
- Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad. Saúde Pública* 1994; 10: 359-75.

Matsumoto T, Hashiguchi Y, Gomez EA, Calvopiña MH, Nonaka S, Saya H. Comparasion of PCR results using scrape/exudate, syringe-sucked fluid and biopsy samples for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999; 93: 606-7.

Mattos M, Caiza A, Fernandes O, Gonçalves AJS, Pirmez C, Souza CSF, et al. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV infection: report of four cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 10: 218-25.

McMahon-Pratt DM, David JR. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. *Nature* 1981; 291: 581-3.

McMahon-Pratt DM, Jaffe CL, Bennett E, David JR, Grimaldi Jr G. Studies employing monoclonal antibodies for the analysis of the genus *Leishmania* Ross, 1903. In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. Taxonomia and phylogeny. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 173-8.

Medeiros ACR, Rodrigues SS, Roselino AMF. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of leishmania for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 421-4.

Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis* 2004; 189: 1018-23.

Mendoza-Leon A, Havercroft JC, Barker DC. The RFLP analysis of the β -tubulin gene region in New World *Leishmania*. *Parasitol* 1995; 111: 1-9.

Mimori T, Sasaki J, Nakata M, Gomez EA, Uezato H, Nonaka S, et al. Rapid identification of *Leishmania* species from formalin-fixed biopsy samples by polymorphism-specific polymerase chain reaction. *Gene* 1998; 210: 179-86.

Mimori T, Matsumoto T, Calvopiña MH, Gomez EA, Saya H, Katakura K, et al. Usefulness of sampling with cotton swab for PCR-diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Acta Trop* 2002; 81: 197-202.

Ministério da Saúde (Brasil). Boletim eletrônico epidemiológico [online]. Brasília, Brasil; 2010a. [capturado 1 jun. 2010]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf

Ministério da Saúde (Brasil). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília, Brasil; 2010b. 2ª ed. pp. 180.

Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 104-7.

Morales MA, Cruz I, Rubio JM, Chicharro C, Cañavate C, Laguna F, et al. Relapses versus reinfections in patients coinfecting with *Leishmania infantum* and human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; 185: 1533-7.

Motazedian H, Karamian M, Noyes HA, Ardehali S. DNA extraction and amplification of *Leishmania* from archived, Giemsa-stained slides, for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. *Ann Trop Med Parasitol* 2002; 96: 31-4.

Motta ACF, Lopes MA, Ito FA, Carlos-Bregni R, Almeida OP, Roselino AM. Oral leishmaniasis: a clinicopathological study of 11 cases. *Oral Dis* 2007; 13: 335-40.

Name RQ, Borges KT, Nogueira LSC, Sampaio JHD, Tauil PL, Sampaio RNR. Clinical, epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brasil. *An Bras Dermatol* 2005; 80: 249-54.

Nolder D, Roncal N, Davies CR, Llanos-Cuentas A, Miles MA. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (viannia)* in a focus of mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2007; 76: 573-8.

Oddone R, Schweynoch C, Schönian G, Sousa CS, Cupolillo E, Espinosa D, Arevalo J, Noyes H, Mauricio I, Kuhls K. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 2818-25.

Oliveira JGS, Novais FO, Oliveira CI, Cruz Junior AC, Campos LF, Rocha AV, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 2005; 94: 55-9.

Oliveira MA, Caballero OL, Vago AR, Harskeerl RA, Romanha AJ, Pena SD, et al. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. *J Med Microbiol* 2003; 52: 127-35.

Oliveira MRF, Macêdo VO, Carvalho EM, Barral A, Marotti JG, Bittencourt A, et al. Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia. *Rev Soc Bra Med Trop* 1995; 28: 325-32.

- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000; 39: 506-14.
- Ooteman MC, Vago AR, Koury MC. Potential application of low-stringency single specific primer-PCR in the identification of *Leptospira* in the serum of patients with suspected leptospirosis. *Can J Microbiol* 2004; 50: 1073-9.
- Ovalle Bracho C, Porras de Quintana L, Muvdi Arenas S, Rios Parra M. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 549-54.
- Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi Jr G, Momen H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. *In: Rioux JA, editor. Leishmania. Taxonomy and phylogeny. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 57-65.*
- Pacheco RS, Grimaldi Jr. G, Momen H, Morel CM. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. *Parasitology* 1990; 100: 393-8.
- Pacheco RS, Martinez JE, Valderama AL, Momen H, Saravia NG. Genotypic polymorphisms in experimental metastatic dermal leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 69: 197-209.
- Pacheco RS, Ferreira MS, Machado MI, Brito CM, Pires MQ, Da-Cruz AM, et al. Chagas' disease and HIV co-infection: genotypic characterization of the *Trypanosoma cruzi* strain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93: 165-9.
- Pacheco RS, Brito CM. Reflections on the population dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 199-201.
- Pacheco RS, Fernandes O, Salinas G, Segura I, Momen H, Degraive W, et al. Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* from Colombia. *J Parasitol* 2000; 86: 1250-3.
- Palmeiro MR, Valete-Rosalino CM, Quintella LP, Morgado FN, Martins ACC, Moreira J, et al. Gingival leishmaniasis in an HIV-negative patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; 104: e12-6.
- Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the predominant species infecting patients with

American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. *Acta Trop* 1999; 72: 251-8.

Passos VMA, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Gontijo CMF, et al. Cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte: clinical, laboratorial, therapeutic and prospective aspects. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34: 5-12.

Pena SD, Barreto G, Vago AR, Marco L, Reinach FC, Dias Neto E, et al. Sequence-specific "gene signatures" can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1946-9.

Pereira EFA, Thomaz-Soccol V, Lima HC, Thomaz-Soccol A, Castro EA, Mulinari-Brenner F, et al. Molecular diagnosis of leishmaniasis in the Paraná state of southern Brazil. *Exp Dermatol* 2008; 17: 1024-30.

Pessoa SB, Barretto MP. *Leishmaniose Tegumentar Americana*. Ministério da Educação e Saúde, Serviço de Documentação, Rio de Janeiro; 1948. pp. 527.

Piñero J, Martínez E, Pacheco R, Aragón Z, De Armas F, Del Castillo A, et al. PCR-ELISA for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 1999; 73: 21-9.

Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Da Cruz AM, Da Costa SCG, Castanho M et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1819-23.

Rabello A, Orsini M, Disch J. *Leishmania*/ HIV co-infection in Brazil: an appraisal. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97: 17-28.

Rangel EF, Azevedo ACR, Andrade CA, Souza NA, Wermelinger ED. Studies on sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) in a foci of cutaneous leishmaniasis in Mesquita, Rio de Janeiro State, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 39-45.

Ray DS. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1365-67.

Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 21-5.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7: 581-96.

- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 1990; 65: 111-25.
- Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 1990; 71: 267-75.
- Rodrigues EH, Brito MEF, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3572-6.
- Rodríguez IB, Botero A, Mejía-Jaramillo AM, Marquez EJ, Ortiz S, Solari A, et al. Transmission dynamics of *Trypanosoma cruzi* determined by low-stringency single primer polymerase chain reaction and southern blot analyses in four indigenous communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 81: 396-403.
- Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Toaldo CB, Macêdo VO, et al. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop* 2001; 79: 225-9.
- Romero GAS, Noronha EF, Pirmez C, Pires FESS, Fernandes O, Nehme NS, et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop* 2009; 109: 74-7.
- Russell R, Iribar MP, Lambson B, Brewster S, Blackwell JM, Dye C, Ajioka JW. Intra and inter-specific microsatellite variation in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 103: 71-7.
- Safaei A, Motazedian MH, Vasei M. Polymerase chain reaction for diagnosis of cutaneous leishmaniasis in histologically positive, suspicious and negative skin biopsies. *Dermatology* 2002; 205: 18-24.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230: 1350-54.
- Salazar A, Schijman AG, Triana-Chávez O. High variability of Colombian *Trypanosoma cruzi* lineage I stocks as revealed by low-stringency single primer-PCR minicircle signature. *Acta Trop* 2006; 100: 110-8.

Sampaio RNR, Rocha RAA, Marsden PC, Cuba CC, Barreto AC. Leishmaniose tegumentar americana – casuística do Hospital Escola da UnB. *An Bras Dermatol* 1980; 55: 69-76.

Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, de Paula CDR. American cutaneous leishmaniasis associated with HIV/ AIDS: report of four clinical cases. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 651-54.

Saravia NC, Weigle K, Segura I, Giannini SH, Pacheco RS, Labrada LA, et al. Recurrent lesions in human *Leishmania braziliensis* infection – reactivation or reinfection? *Lancet* 1990; 336: 398-402.

Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 86-94.

Sasaki MGM, Carvalho MM, Ferreira MLS, Machado MP. Cutaneous leishmaniasis coinfection in AIDS patients: case report and literature review. *Braz J Infect Dis* 1997; 1: 142:44.

Schönian G, Akuffo H, Lewin S, Maasho K, Nylén S, Pratlong F, et al. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 106: 239-48.

Schönian G, Schnur L, el Fari M, Oskam L, Kolesnikov AA, Sokolowska-Köhler W, et al. Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 217-24.

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

Schubach AO, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi Jr G, et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis* 1998; 178: 911-4.

- Shapiro TA & Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49:117-43.
- Shareef MM, Trotter MI, Cullen RJ. Leishmaniasis of the nasal cavity: a case report. *J Laryngol Otol* 2005; 119: 1015-17.
- Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 471-78.
- Shaw JJ, Lainson R, McMahon-Pratt DM, David JR. Serodeme of *Leishmania braziliensis* complex. In: Rioux JA, editor. *Leishmania*. Taxonomy and phyogeny. Montpellier: IMEEE; 1986. p. 179-83.
- Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med* 2004; 4:623-47.
- Silva ES, Pacheco RS, Gontijo CM, Carvalho IR, Brazil RP. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2002; 44: 145-9.
- Silveira FT, Ishikawa EAY, De Souza AAA, Lainson R. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. a new leishmanial parasite of man in the Amazon region. *Parasite* 2002; 9: 43-50.
- Simpson L. The mitochondrial genoma of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann Rev Microbiol* 1987; 41: 363-82.
- Smith HR, Connor MP, Beer TW, Ashton RE. The use of polymerase chain reaction in New World cutaneous leishmaniasis. *Br J Dermatol* 1998; 139: 539-40.
- Souza e Souza I, Naiff RD, Guimarães TC, Naiff MF, Cupolillo E, Rodrigues WA, et al. American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis* as an initial clinical presentation of human immunodeficiency virus infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998; 10:214-17.
- Sturm NR, Simpson L. Kinetoplast DNA minicircles encode guide RNAs for editing of cytochrome oxidase subunit III mRNA. *Cell* 1990; 61:879-84.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: The population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and

Trypanosoma and their medical and taxonomical consequences. Proc Natl Acad Sci 1990; 87: 2414-18.

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

Tibayrenc M, Ayala FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends Parasitol 2002; 18: 405-10.

Tojal da Silva AC, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GAS. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. Trop Med Int Health 2006; 11: 1388-98.

Toledo A, Martín-Sánchez J, Pesson B, Sanchiz-Marín C, Morillas-Márquez F. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. Mol Biochem Parasitol 2002; 119: 257-64.

Tomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux J, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. Ann Parasitol Hum Comp 1993; 68: 107-8.

Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. J Infect Dis 2002; 186: 1829-34.

Uliana SR, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP, Floeter-Winter LM. Discrimination amongst *Leishmania* by polymerase chain reaction and hybridization with small subunit ribosomal DNA derived oligonucleotides. J Eukaryot Microbiol 1994; 41: 324-30.

Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LMC, et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. Am J Pathol 1996; 149: 2153-9.

Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Avila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. Am J Pathol 2000; 156: 1805-9.

van Belkum A. Low-stringency single specific primer PCR, DNA sequencing and single-strand conformation polymorphism of PCR products for identification of genetic variants of human papillomavirus type 16. *J Virol Methods* 1995; 55: 435-43.

van Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 133-42.

Venazzi EAS, Roberto ACBS, Barbosa-Tessmann IP, Zanzarini PD, Lonardoni MVC, Silveira TG. Polymerase chain reaction with lesion scrapping for the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101: 427-30.

Victoir K, Bañuls AL, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Hamers R, Noël S, et al. The gp63 gene locus, a target for genetic characterization of *Leishmania* belonging to subgenus *Viannia*. *Parasitology* 1998; 117: 1-13.

Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJS, Oliveira MP, Rutowitsch MS, et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 2008; 47: 926-32.

Villa LL, Caballero OL, Levi JE, Pena SD, Simpson AJ. An approach to human papillomavirus identification using low stringency single specific primer PCR. *Mol Cell Probes* 1995; 9: 45-8.

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

Volpini AC, Marques MJ, Lopes dos Santos S, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. *Leishmania* identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 815-8.

Walton BC, Chinel LV, Eguia y Eguia O. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg* 1973; 22: 696-8.

Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 601-6.

Wirth DF, McMahon-Pratt D. Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc Natl Acad USA 1982; 79: 6999-7003.

Wolday D, Akuffo H, Fessahaye G, Valantine A, Britton S. Live and killed human immunodeficiency virus type-1 increases the intracellular growth of *Leishmania donovani* in monocyte-derived cells. Scand J Infect Dis 1998; 30: 29-34.

Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. J Clin Microbiol 1999; 37:1656-7.