

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES - IAM
Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Rayana Carla Silva de Moraes

**ENSAIOS DE DUPLEX PCR EM TEMPO REAL (*TAQMAN PROBE*) PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* RELACIONADAS COM A
ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

RECIFE

2019

RAYANA CARLA SILVA DE MORAIS

**ENSAIOS DE DUPLEX PCR EM TEMPO REAL (*TAQMAN PROBE*) PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* RELACIONADAS COM A
ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Tese apresentada ao curso de Doutorado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do Instituto
Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como
requisito para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientadores: Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Dr. Sinval Pinto Brandão Filho

RECIFE

2019

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- M827e Morais, Rayana Carla Silva de.
 Ensaio de duplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de espécies de *Leishmania* relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana / Rayana Carla Silva de Morais.
 - Recife: [s.n.], 2019.
 129 p.: il., graf., tab.; 30 cm
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.
 Orientadores: Milena de Paiva Cavalcanti; Sinval Pinto Brandão Filho.
1. Leishmaniose Cutânea. 2. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 3. Reação em Cadeia da Polimerase duplex. 4. Isoenzimas. 5. Sequenciamento. I. Cavalcanti, Milena de Paiva. II. Brandão Filho, Sinval Pinto. III. Título.

CDU 616.993.161

RAYANA CARLA SILVA DE MORAIS

ENSAIOS DE DUPLEX PCR EM TEMPO REAL (*TAQMAN PROBE*) PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Leishmania* RELACIONADAS COM A ETIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Tese apresentada ao curso de Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data de aprovação: 25/03/2019

Banca examinadora

Dr^a Milena de Paiva Cavalcanti
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr^a Duschinka Ribeiro Duarte Guedes
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr^a Zulma Maria de Medeiros
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr^a Valéria Pereira Hernandes
Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ

Dr^a Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico a todos os pacientes participantes desse estudo.

AGRADECIMENTOS

Expressar em palavras o meu agradecimento é um desafio, pois foram tantos momentos... tantas pessoas...

Inicialmente agradeço a Deus, pela permissão e pela disponibilidade de me capacitar para atingir esse grau de escolaridade. Eu sempre confiei em Seus planos e no doutorado essa fé foi sempre posta a prova. Hoje preciso exercer ainda mais a fé, confiando em um futuro promissor, no qual todo o esforço até aqui não será em vão.

A minha família foi fundamental para início, manutenção e conclusão nesta empreitada que é a vida acadêmica. Minha mãe Cremilda, meu pai Mário, meu ex-padrasto Josival e meu irmão Josival Júnior são um porto seguro para mim e sou imensamente grata por TUDO. Ao meu esposo Maviael nem sei expressar com palavras toda minha gratidão ao seu apoio incondicional, e apesar do título ser intransferível, ele também é de Maviael, por merecimento diante de sua participação em tantas fases difíceis. Agradeço também aos outros membros da minha família, como minha avó Zilda, tia Andréa, madrinha Claudete, padrinho Carlito, sogra Luzinete, pois mesmo indiretamente me incentivaram e ajudaram de alguma forma. Muito obrigada.

A minha orientadora Dra. Milena de Paiva Cavalcanti todo meu afeto e gratidão por tantos ensinamentos, reconhecimentos e apoio. Ser sua orientanda me permitiu crescer muito, e você bem sabe de toda evolução. Obrigada por me conceder a oportunidade de fazer uma ciência tão digna e clara, voltada para melhoria da qualidade de vida dos pacientes. Tenho muito orgulho de ser sua orientanda e me sinto honrada por isso.

A Dra. Edileuza Felinto de Brito e Dr. Sinval Pinto Brandão Filho pelo apoio e parceria de sempre, sem vocês esse trabalho não teria acontecido. Obrigada Dra. Edi por sua dedicação na captação de parte dos pacientes participantes desse estudo, bem como por tantas palavras de força e ânimo.

A Dr. Jorge Guerra (FMT-HDV/AM) e Dra. Graça Barbosa por me receberem em seu departamento, além de deixar ao meu dispôr sua equipe, a qual foi fundamental na minha permanência em Manaus e o sucesso desse trabalho, sem o apoio dessa equipe não existiria esse trabalho tão completo. Vou citar o nome das pessoas que me ajudaram em todos os sentidos (emocional e profissiona): MUITO OBRIGADA: Maria Rita Texeira, Yolanda Naguth, Auxiliadora Chiarion, Rômulo Morais, Ana Paula Duarte e Dayana Lopes. Aqui também gostaria de expressar minha gratidão a duas pessoas que conheci em Manaus, as

doutoras Claudia Conceição e Pilar Parra, as quais me deram muita força quando precisei durante a primeira temporada que passei na cidade de Manaus.

Aos meus amigos de equipe, sim equipe, porque mesmo que alguns não façam mais parte do grupo, para mim nunca deixaremos de ser uma equipe. Com vocês vivi tantos momentos bons e ruins, felizes e tristes, leves e árduos, mas cada um válido para nosso crescimento. Obrigada meus queridos: Rômulo Pessoa, Victor Antão, Suênia da Cunha, Cíntia Nascimento, Lays Trajano e Gilsan Oliveira. Por fim, quero agradecer especialmente a Tayná Goes e Maria Gabriella Melo por, além de fazerem parte da equipe, terem realizado esse trabalho junto comigo e me oportunizar a experiência de ensinar tão de perto, e de aprender a ser o que me tornei hoje. Obrigada, meninas, essa tese também é de vocês, e juntamente com Milena pudemos gerar vários frutos desse trabalho.

Agradeço aos amigos da minha vida: Kamila Sales, Kyldman Silva, Marília Oliveira, Tayza Mirella, Flávia Matos, Liliane Marques, Rosy Silva, Ivson Monte, Josilene Alves, Luciana Maria, Aline Gomes, Ana Carolina Dobbin, Carina Scanoni, Fábria Burgos e Kennya Genne por entenderem minha ausência e sempre prestigiarem e vibrarem as minhas vitórias, além de nunca se esquecerem de mim, sempre perguntando como estou.

Agradeço aos colegas do laboratório de Biologia Celular de Patógenos (depto Microbiologia), Laboratório de Imunoparasitologia (depto. Imunologia) e aos colegas do departamento de parasitologia com os quais compartilhei momentos de dúvidas acadêmicas e assim geraram conhecimento e crescimento. Em especial a Walter Lins, Ana Paula, Camila, Amanda Vasconcelos, Gabriel Gazzoni e Mércia Cristiane.

A CAPES por financiar minha bolsa em meio a tantas dificuldades enfrentadas no nosso país nos últimos anos, e também a FACEPE por financiar os custos do projeto, permitindo a realização de todo esse trabalho. A FIOCRUZ-PE pela infraestrutura e também por todas as oportunidades, sendo a mais especial à participação do programa de mobilidade acadêmica, me permitindo conhecer a FIOCRUZ-RJ.

E por fim, gostaria de terminar agradecendo novamente a Deus, porque Ele foi tão generoso comigo, pois, diante de todas as dificuldades enfrentadas, as quais não valem a pena listar aqui, tenho muito mais pelo que agradecer:

a) Tive projeto financiado; b) Tive bolsa de estudos; c) Fui professora substituta (realização de um sonho); d) Fui bem orientada; e) Obtive muito conhecimento; f) Estou concluindo em tempo regular.

Muitas bênçãos! OBRIGADA Deus.

“As leishmanioses permanecem como uma das doenças parasitárias de grande impacto para humanidade. Podemos afirmar que ainda temos muitas questões não respondidas, e pensar sobre elas, além de ser um bom exercício, é acima de tudo uma necessidade”.

Fátima Conceição Silva e Carlos Roberto Alves (2014)

MORAIS, Rayana Carla Silva. **Ensaio de duplex PCR em tempo real (*TaqMan probe*) para identificação de espécies de *Leishmania* relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana**. 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a aplicabilidade da tecnologia de sondas *TaqMan* para diagnóstico e identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da LTA. Realizou-se alinhamentos múltiplos de *Leishmania* spp. para diferentes alvos. O melhor alvo foi selecionado para desenho de *primers* e sondas capazes discriminarem entre as espécies. Após padronização individual, os sistemas foram combinados para compôr a Duplex-qPCR (DqPCR). A DqPCR foi avaliada em amostras obtidos de pacientes do Amazonas e Pernambuco, e comparada ao conjunto de critérios estabelecido. A capacidade da Duplex-qPCR identificar espécie foi comparada a técnica de isoenzimas e sequenciamento. De acordo com a conveniência, pacientes foram acompanhados através de coleta de sangue antes e após tratamento para correlação da carga parasitária com a evolução clínica e terapêutica. O *Internal Transcribed Spacer 1* foi o alvo selecionado. Dois conjuntos de *primers* e sondas foram desenhados, SVS para subgênero *Viannia* e LaS para *L. amazonensis*. Um total de 236 pacientes participaram da pesquisa (127 AM; 109 PE), e foram obtidas 101, 33 e 147 amostras de sangue, biópsia e *imprint*, respectivamente. A amostra de *imprint* foi mais sensível ao teste. A DqPCR e o conjunto de critérios concordaram em 123 (83,67%) amostras de *imprint*, apresentando 83,06% de sensibilidade, 86,96% de especificidade e concordância moderada. Quanto a identificação da espécie, a DqPCR e o sequenciamento/isoenzimas concordaram em 100%. Foi realizado o acompanhamento de 23 indivíduos (13 AM; 10 PE). Nas amostras de sangue obtidas pré-tratamento, 17 foram positivas, enquanto na coleta pós-tratamento 11. Nos pacientes acompanhados, foi notável falha na eliminação dos parasitos mesmo clinicamente curados, além de não observar cura clínica em pacientes infectados por *L. guyanensis*. Assim, nota-se a relevância do diagnóstico e identificação da espécie em um único momento a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela LTA.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Reação em Cadeia da Polimerase duplex. Isoenzimas. Sequenciamento.

MORAIS, Rayana Carla Silva. **Real-time PCR duplex assays (*TaqMan* probe) for identification of *Leishmania* species related to the etiology of American cutaneous leishmaniasis.** 2019. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2019.

ABSTRACT

The work evaluated the applicability of the TaqMan probe technology for the diagnosis and identification of *Leishmania* spp. related to the ACL etiology. Multiple alignments of *Leishmania* spp. for different targets was carried out. The best target was selected for primer design and probes capable of discriminating between species. After individual standardization, these were combined to compose duplex-qPCR (DqPCR). The DqPCR was evaluated in samples obtained from patients from Amazonas and Pernambuco, and compared to the set of criteria established. The ability to identify the species was compared by isoenzymes method and sequencing analysis. According to the convenience, patients were monitored through blood samples before and after treatment to correlate the parasite load (PL) to the clinic-therapeutic evolution. Internal Transcribed Spacer 1 (rDNA) was the target selected. Two sets of primers and probes were designed, SVS for the subgenus *Viannia* and LaS for *L. amazonensis*. A total of 236 patients participated in the research (127 AM; 109 PE), and they obtained 101, 33 and 147 blood samples, biopsy and imprint, respectively. The imprint sample was the most sensitive to the technique. DqPCR and set of criteria have agreed to 123 (83,67%) imprints, showing 83.06% sensitivity, 86.96% specificity and substantial agreement between the techniques. Regarding the identification of the species, DqPCR and sequencing/isoenzymes have agreed to 100%. We get to monitoring 23 individuals (13 AM; 10 PE). In blood samples obtained before treatment, 17 were positive, while in those after treatment 11. In the patients monitored, it was notable failure in the elimination of parasites in clinically cured patients, besides not observing clinical cure in patients infected with *L. guyanensis*. Thus, we note the relevance of the diagnosis and identification of the species in a single moment in order to improve the quality of life of the patients affected by the LTA.

Key-words: Cutaneous leishmaniasis. Real-time Polymerase Chain Reaction. Duplex Polymerase Chain Reaction. Isoenzymes. Sequencing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Desenho esquemático das formas evolutivas da <i>Leishmania</i> . A: Forma amastigota. B: Forma promastigota.	24
Figura 2-	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .	25
Figura 3-	Paciente com Leishmaniose visceral.	26
Figura 4-	Distribuição mundial e número de casos novos de leishmaniose tegumentar em 2012.	28
Figura 5-	Esculturas artesanais mochicas com mutilações no nariz e lábios semelhantes às causadas pela leishmaniose tegumentar.	29
Figura 6-	Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> no Brasil.	33
Figura 7-	Principais hospedeiros de parasitos causadores da Leishmaniose tegumentar Americana.	36
Quadro 1-	Espécies de <i>Leishmania</i> e seus principais hospedeiros e vetores.	37
Figura 8-	Paciente apresentando lesão de leishmaniose tegumentar localizada.	40
Figura 9-	Paciente apresentando leishmaniose tegumentar disseminada.	40
Figura 10-	Paciente apresentando leishmaniose tegumentar difusa.	41
Figura 11-	Paciente apresentando a forma mucosa da leishmaniose.	41
Quadro 2-	Principais características de diferentes sub-formas clínicas da leishmaniose mucocutânea.	41
Quadro 3-	Isolados de <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i> utilizados para determinação da especificidade dos sistemas de qPCR desenvolvidos para detecção de espécies de <i>Leishmania</i> do subgênero <i>Viannia</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> .	60
Figura 12-	Alinhamento das sequências de <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania shawi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i> utilizados para desenho dos sistemas de qPCR utilizando a tecnologia <i>TaqMan probe</i> .	72
Quadro 4-	Concentrações de uso dos <i>primers</i> e sondas desenhados com o auxílio da ferramenta <i>Primer Blast</i> para identificação de <i>Leishmania</i> spp.	73
Figura 13-	Curva de amplificação da reação qPCR-duplex para os sistemas	74

	SVS e LaS.	
Figura 14-	Eficiência da qPCR-duplex para os sistemas SVS e LaS.	75
Figura 15-	<i>Imprint</i> de lesão em papel de filtro após escarificação.	77
Figura 16-	Amplificação de amostra de <i>imprint</i> de lesão de paciente positivo para o Sistema <i>Leishmania amazonensis</i> (LaS).	79
Figura 17-	Amplificação de amostra de <i>imprint</i> de lesão de paciente positivo para o Sistema Subgênero <i>Viannia</i> (SVS).	79
Figura 18-	Resultado do sequenciamento da PCRC-mini-exon de paciente do Amazonas. A. Resultado do BLASTn. B. Eletroferograma da sequência.	80
Figura 19-	Resultado do sequenciamento da PCRC-HSP70 de paciente de Pernambuco. A. Resultado do BLASTn. B. Eletroferograma da sequência.	83
Quadro 5-	Dados de pacientes com cura clínica (N=13) e resultado do diagnóstico molecular por qPCR-kDNA1.	84
Quadro 6-	Dados de pacientes sem cura clínica (N=10) e resultado do diagnóstico molecular por qPCR-kDNA1.	85
Figura 20-	Lesão de paciente acompanhado do Amazonas infectado por <i>L. (V.) guyanensis</i> sem cura clínica e apresentando aumento da carga parasitária na coleta pós tratamento (3,6 fg/ μ L). A.: Antes do tratamento. B. Pós tratamento.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Cobertura e identidade de <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i> comparadas com sequências de <i>Leishmania braziliensis</i> para diferentes alvos moleculares através do BLASTn.	70
Tabela 2-	Cobertura e identidade de <i>Leishmania</i> spp. comparadas com sequências de <i>Leishmania amazonensis</i> para diferentes alvos moleculares através do BLASTn.	71
Tabela 3-	Resultados dos parâmetros de padronização por sistema (uniplex) diagnóstico desenvolvido.	74
Tabela 4-	Resultados dos parâmetros de padronização da reação qPCR-duplex por espécie.	75
Tabela 5-	Resultados obtidos na qPCR duplex por espécime clínico e estado de origem dos pacientes considerados casos.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6PGDH	6-fosfogluconato desidrogenase
ABI	Applied Biosystems
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucleotídeo</i>
C/G	Citosina/Guanina
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
CPPI	Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiologia
Ct	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme linked immunisorbant assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FMT-HVD	Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado
G6PD	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GP63	Glicoproteína 63
GPI	Glicose fosfato isomerase
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IDHNAPD	Isocitrato Dehidrogenase
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon gama
IL-12	<i>Interleucin 12</i>
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
kDNA	DNA do kinetoplasto
Kg	Quilograma
LaF	<i>Leishmania amazonensis Forward</i>
LaP	<i>Leishmania amazonensis Probe</i>
LaR	<i>Leishmania amazonensis Reverse</i>
LaS	<i>Leishmania amazonensis System</i>
LC	Leishmaniose cutânea

LTDf	Leishmaniose tegumentar difusa
LTDs	Leishmaniose tegumentar disseminada
LTL	Leishmaniose tegumentar localizada
LTRC	Leishmaniose tegumentar recidiva cútis
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
MDH	Malato desidrogenase
ME	Enzima málica
mL	Mililitro
MLEE	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
MLST	<i>Multilocus Sequencing Typing</i>
mm	Milimetro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NH	Nucleotidase
NNN	Neal, Nory e Nicolle
NPT	Núcleo de Plataforma Tecnológica
NTC	<i>Non template control</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Pernambuco
PEP D	Prolina dipeptidase
qPCR	PCR quantitativa
rDNA	DNA ribossômico
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RJ	Rio de Janeiro
Sb⁺³	Antimoniato trivalente
Sb⁺⁵	Antimoniato pentavalente
SRL	Serviço de Referência em Leishmanioses
SSU rDNA	<i>Small Subunit of ribosomal DNA</i>
SVF4	<i>Subgenus Vianna Forward</i>
SVR	<i>Subgenus Vianna Reverse</i>

SVP	<i>Subgenus Vianna Probe</i>
SVS	<i>Subgenus Vianna System</i>
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO/ REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O gênero <i>Leishmania</i>	23
2.2 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	24
2.3 Principais formas clínicas	25
<u>2.3.1 Leishmaniose visceral (LV)</u>	26
<u>2.3.2 Leishmaniose Tegumentar (LT)</u>	27
2.3.2.1 Breve histórico da LT	29
2.4 A Leishmaniose Tegumentar Americana	30
<u>2.4.1 Aspectos Epidemiológicos</u>	31
2.4.1.1 Distribuição geográfica	31
2.4.1.2 Diversidade etiológica	32
2.4.1.3 Diversidade vetorial e de hospedeiros-reservatórios	35
<u>2.4.2 Manifestações clínicas</u>	37
<u>2.4.3 Diagnóstico da LTA</u>	42
<u>2.4.4 Identificação da espécie de <i>Leishmania</i></u>	44
2.4.4.1 <i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i> (MLEE)	44
2.4.4.2 Anticorpos Monoclonais	45
2.4.4.3 <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP)	45
2.4.4.4 Espectrometria de massa	46
2.4.4.5 PCR em tempo real	46
2.4.4.6 Sequenciamento	47
<u>2.4.5 Tratamento</u>	48
2.4.5.1 Medicamentos disponíveis	48
2.4.5.2 Medicamentos Alternativos	50
3 JUSTIFICATIVA	53
4 PERGUNTA CONDUTORA	54
5 HIPÓTESE	55
6 OBJETIVO GERAL	56
6.1 Objetivos específicos	56
7 MATERIAL E MÉTODOS	57

7.1 Tipo de estudo	57
7.2 Desenvolvimento dos sistemas baseados em PCR em tempo real	57
<u>7.2.1 Análise <i>in silico</i> dos alvos</u>	57
<u>7.2.2 Desenho dos <i>primers</i> e sonda</u>	58
<u>7.2.3 Teste para definição da concentração dos <i>primers</i></u>	58
<u>7.2.4 Teste para definição de concentração da sonda</u>	58
<u>7.2.5 Testes individuais para cada sistema (Uniplex)</u>	59
<u>7.2.6 Composição da qPCR-duplex</u>	60
<u>7.2.7 Avaliação da reprodutibilidade</u>	60
7.3 Amostragem	61
7.4 Coleta de material biológico	61
<u>7.4.1 Sangue</u>	61
<u>7.4.2 Coleta da lesão</u>	62
7.5 Extração de DNA e controle endógeno	62
7.6 Testes diagnósticos	63
<u>7.6.1 Diagnóstico parasitológico</u>	63
7.6.1.1 Pesquisa direta	63
7.6.1.2 Isolamento do parasito (cultura)	63
<u>7.6.2 Diagnóstico molecular</u>	63
7.6.2.1 PCR convencional	63
7.6.2.2 qPCR-kDNA	64
<u>7.6.3 Testes diagnósticos realizados pelo SRL</u>	64
<u>7.6.4 Testes diagnósticos realizados pela FMT-HDV</u>	64
<u>7.6.5 Testes diagnósticos realizados pela Secretarias Municipais de Saúde de Igarassu e Cabo de Santo Agostinho</u>	64
7.7 Testes para caracterização de <i>Leishmania</i> spp. das amostras	64
<u>7.7.1 qPCR duplex</u>	65
<u>7.7.2 Caracterização isoenzimática (MLEE)</u>	65
<u>7.7.3 PCR convencional e Sequenciamento</u>	65
7.8 Acompanhamento clínico-terapêutico dos pacientes	66
7.9 Análise dos dados	66
8 ASPECTOS ÉTICOS	68
9 RESULTADOS	69

9.1	Análise <i>in silico</i> dos alvos	69
9.2	Desenho dos <i>primers</i> e sondas	72
9.3	Teste para definição da concentração dos <i>primers</i> e sondas	73
9.4	Testes individuais para cada sistema (Uniplex)	73
9.5	Combinação dos sistemas: qPCR-duplex	74
9.6	Caracterização dos pacientes	76
9.7	Teste da qPCR duplex em amostras	76
	<u>9.7.1 Análise de concordância e acurácia do método diagnóstico desenvolvido: Conjunto de critérios x qPCR duplex</u>	77
	<u>9.7.2 Análise de concordância e acurácia de método diagnóstico desenvolvido: Pesquisa direta x qPCR duplex</u>	78
9.8	Identificação da espécie de <i>Leishmania</i>	78
	<u>9.8.1 qPCR-duplex</u>	78
	<u>9.8.2 MLEE</u>	79
	<u>9.8.3 Sequenciamento mini-éxon</u>	80
	<u>9.8.4 Sequenciamento HSP70</u>	81
	<u>9.8.5 Análise de concordância entre os métodos para identificação de <i>Leishmania</i> spp.</u>	81
	9.8.5.1 MLEE x qPCR-duplex	82
	9.8.5.2 Sequenciamento mini-éxon x qPCR-duplex	82
	9.8.5.3 Sequenciamento HSP70 x qPCR-duplex	82
9.9	Acompanhamento dos pacientes	83
10	DISCUSSÃO	87
11	CONCLUSÕES	96
12	PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A- FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA	115
	APÊNDICE B- TCLE ADULTO IAM	116
	APÊNDICE C- TCLE MENOR IAM	118
	APÊNDICE D- TERMO DE ASSENTIMENTO IAM	120
	APÊNDICE E- TCLE ADULTO FMT-HDV	122
	APÊNDICE F- TCLE MENOR FMT-HDV	124
	APÊNDICE G- ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA	126

ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (INSTITUIÇÃO AGGEU MAGALHÃES)	127
ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DE MANAUS)	128
ANEXO C – SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO (SISGEN)	129

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar (LT), causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, apresenta uma incidência estimada de 0,7 a 1,3 milhões de casos por ano no mundo (ALVAR et al., 2012). No Novo Mundo, onde a doença é denominada leishmaniose tegumentar americana (LTA), há uma grande diversidade de espécies relacionadas com a doença, sendo estas do complexo *Leishmania braziliensis*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) shawi* e *Leishmania (Viannia) peruviana*; bem como as do complexo *Leishmania mexicana*: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*; além das *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012). Esta enfermidade acomete o tecido epitelial de revestimento através de lesões cutâneas, no entanto, dependendo da espécie etiológica, por meio da via hematogênica, pode comprometer as mucosas do trato respiratório superior, como boca, garganta e nariz (BRASIL, 2010).

Diante da heterogeneidade etiológica da LT e sua implicação direta com as apresentações clínicas, além de resistência ao tratamento disponível (CARVALHO, 2012; GIUDICE et al., 2007), a identificação da espécie de *Leishmania* é crucial para um melhor direcionamento da conduta terapêutica e controle da doença. Assim, esta caracterização tem sido feita a partir de várias metodologias, tais como, anticorpos monoclonais e *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE), sendo esta última o padrão-ouro para identificação da espécie parasitária. Estes métodos são laboriosos, pois além de onerosos, necessitam do isolamento do parasito através da cultura, dificultando seu uso na rotina de um laboratório de diagnóstico, e principalmente em amostras obtidas do campo (BEN ABDA et al., 2011; ZAULI et al., 2012).

Neste contexto, estudos utilizando técnicas moleculares demonstram que a identificação do parasito pode ser realizada em associação com o teste diagnóstico (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; MASMOUDÍ et al., 2013). Entre estes métodos, a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) tem sido bastante utilizada e consiste na digestão do produto da *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com enzimas de restrição e visualização através da eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida (EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; VOLPINI et al., 2004). Para tanto, faz-se necessário um padrão de bandeamento pré-estabelecido, sendo fundamental a escolha do alvo da PCR e da enzima

de restrição, pontos decisivos para a obtenção de bom resultado com esta metodologia; além disto, a reprodutibilidade pode variar com cepas de diferentes regiões, requerendo padronização em cada laboratório de diferentes áreas endêmicas (BEN ABDA et al., 2011).

Devido aos avanços tecnológicos da biologia molecular, a PCR vem apresentando inúmeras variações para ampliação de seu uso e versatilidade. Surgindo, então, a PCR quantitativa em tempo real (qPCR), que pode oferecer mais informações para o diagnóstico, como a quantificação da carga parasitária. Utilizando o fluorocromo *Sybr Green*, que se intercala inespecificamente em fita dupla de DNA, é possível avaliar a especificidade da amplificação através da temperatura de fusão ou *melting* (T_m), a qual é capaz de diferenciar amostras pelas variações de temperatura (PAIVA-CAVALCANTI; REGIS-DA-SILVA; GOMES, 2010). Assim, pesquisadores têm utilizado a T_m para identificação de *Leishmania* spp. (KHOSRAVI et al., 2012; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; PITA-PEREIRA et al., 2012).

Além da utilização de *Sybr Green*, a qPCR possibilita a utilização de sondas, através da tecnologia *TaqMan*. Esta tecnologia gera fluorescência através de ligação específica da sonda em uma região interna da sequência a ser amplificada. Durante a amplificação, a Taq polimerase, pela sua atividade exonucleásica, desloca a extremidade 5' da sonda *TaqMan* (contendo o fluorocromo, *reporter*) clivando-a. Assim, pelo fato do *reporter* ser liberado e não permanecer próximo ao *Quencher*, ocorre liberação de fluorescência (MORTARINO et al., 2004; PAIVA-CAVALCANTI, 2008; YANG; ROTHMAN, 2004).

Independente da tecnologia escolhida, o alvo a ser amplificado, varia de acordo com o objetivo final da PCR. Para identificação de espécies de *Leishmania*, seguido por RFLP, os alvos mais utilizados são os derivados do rDNA (ITS) (AZMI et al., 2011; BEN ABDA et al., 2011; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013) e a *Heat Shock Protein 70* (HSP70) (AUWERA et al., 2013; FRAGA et al., 2013). Através da análise destes e de outros alvos, objetiva-se desenvolver ensaios de qPCR duplex, utilizando a tecnologia *TaqMan*, para fins de caracterização de espécies de *Leishmania* envolvidas com a leishmaniose tegumentar americana (LTA), o que poderá trazer grande contribuição no prognóstico e direcionamento terapêutico do paciente.

2 REFERENCIAL TEÓRICO/ REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias e zoonóticas causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Estes protozoários são transmitidos aos seus hospedeiros-reservatórios através da picada de fêmeas de insetos conhecidos como flebotomíneos, mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (dependendo da região) (BRASIL, 2013). No Novo Mundo estes insetos são do gênero *Lutzomyia*, enquanto no Velho Mundo pertencem ao gênero *Phlebotomus* (MAROLI et al., 2012; MORAIS et al., 2013). Além da transmissão pelo vetor biológico, a doença pode ser transmitida por acidentes laboratoriais, uso de agulhas contaminadas por usuários de drogas, por via sexual, transfusão de sangue (BRITO et al., 2012a; CATONE et al., 2003; DELGADO et al., 1996; GUERIN et al., 2002; MURRAY et al., 2005; SYMMERS, 1960).

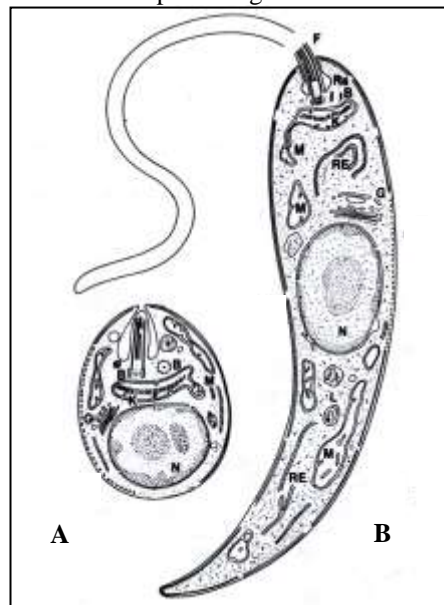
A organização Mundial da Saúde (OMS) revela que as leishmanioses são endêmicas em 98 países, com cerca de 278.000 casos por ano, e baseado nesta estatística, estima-se que diante das subnotificações, a realidade de casos seja 0,2-0,4 milhões para a forma visceral, e 0,7-1,2 milhões para tegumentar (AKHOUNDI et al., 2016; ALVAR et al., 2012). De maneira geral, cerca de 1 bilhão de pessoas estão expostas ao risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a).

2.1 O gênero *Leishmania*

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies de *Leishmania*, os quais são protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, com espécies pertencentes a dois subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*). A localização do parasito no intestino do flebotomíneo é um dado importante para classificação em subgêneros, sendo *Viannia* as espécies de *Leishmania* que ficam localizadas no intestino posterior do inseto, enquanto o subgênero *Leishmania* no intestino médio e anterior (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016; REY, 2008). A Ordem tem uma característica clássica, que é a presença de uma organela especial, o cinetoplasto ou kinetoplasto. O cinetoplasto tem DNA próprio (kDNA) e, portanto, capacidade de auto-replicação, corresponde a 15-35% do DNA total da célula, e é uma rede compacta com dezenas de maxicírculos e milhares de minicírculos (BREWSTER; ASLETT; BARKER, 1998; BREWSTER; BARKER, 2002; LAMBSON; BARKER, 2002; PAIVA-CAVALCANTI, 2008; SIMPSON, 1987).

O parasito se apresenta basicamente sob duas formas evolutivas (amastigota e promastigota) (Figura 1). As amastigotas têm morfologia aproximadamente esférica, ovoide ou fusiforme, ausência de flagelo externo, o núcleo é relativamente grande e redondo, e cinetoplasto bem visível em preparações microscópicas. O diâmetro médio das amastigotas é 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,5 μm . A forma promastigota, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado, é flagelada, corpo lanceolado longo e pavimentoso com presença de cinetossomo (corpo celular), cinetoplasto em forma de bastão localizado na região anterior próximo à saída do flagelo. O diâmetro do corpo é muito variável, sendo 10,0 a 40,0 x 1,5 a 3,0 μm ; com relação ao flagelo, o mesmo tem comprimento igual ou superior ao corpo do parasito (NEVES, 2011; REY, 2008).

Figura 1- Desenho esquemático das formas evolutivas da *Leishmania*. A: Forma amastigota. B: Forma promastigota.



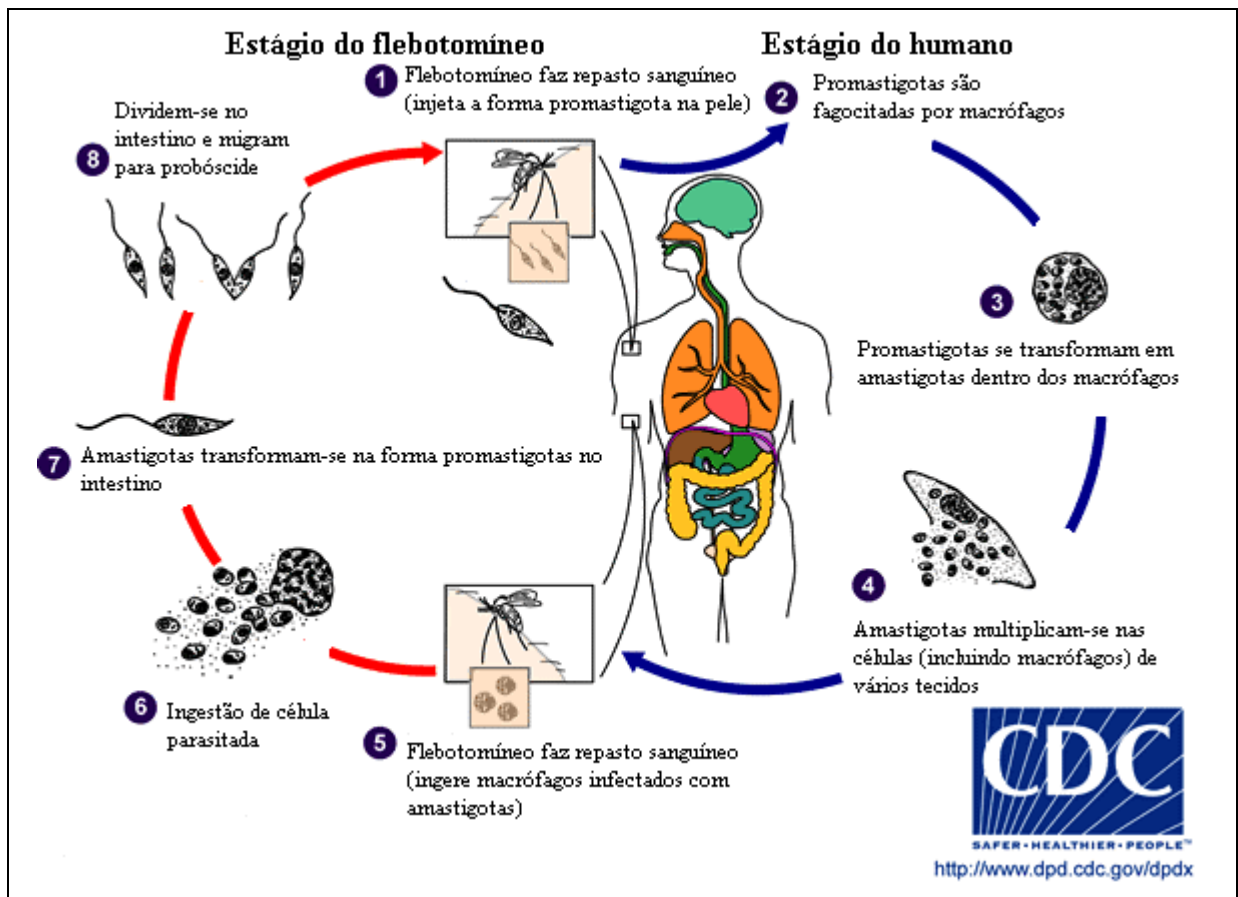
Fonte: Rey (2008).

2.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

A *Leishmania* apresenta ciclo biológico digenético, necessitando de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado para conclusão de seu ciclo. No inseto, os protozoários estão localizados no tubo digestivo, no qual as amastigotas no intestino do flebotomíneo são modificadas em promastigotas, as quais são capazes de realizar divisões celulares (divisão binária) ocorrendo a multiplicação dos parasitos ingeridos. Em grande quantidade, as formas promastigotas chegam ao proventrículo do inseto. Quando a fêmea de flebotomíneo precisa realizar repasto sanguíneo para maturação dos ovos, transmite as promastigotas de

Leishmania para o hospedeiro vertebrado. Nos vertebrados, o nicho preferido da *Leishmania* é o macrófago (ROQUE; JANSEN, 2014). O sistema imune inato logo reconhece à presença do protozoário, assim, as células da primeira linha de defesa do organismo fagocitam os parasitos (especialmente os macrófagos) que, no ambiente intracelular se transformam em amastigotas. A forma amastigota permite que o parasito realize várias divisões binárias, proliferando de maneira significativa, atingindo um extremo capaz de causar a lise celular. Uma vez lisado, o macrófago libera essas amastigotas que são conseqüentemente expostas e fagocitadas por outros macrófagos, continuando a multiplicação do parasito no tecido do vertebrado. Ocasionalmente, outro flebotomíneo pode realizar alimentação hematófaga neste vertebrado e, ser contaminado, reiniciando o ciclo (Figura 2) (NEVES, 2011; REY, 2008).

Figura 2- Ciclo de vida da *Leishmania*.



Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (2016, tradução nossa).

2.3 Principais formas clínicas

De maneira geral, as leishmanioses podem ser divididas em duas formas clínicas básicas: Leishmaniose visceral e tegumentar.

2.3.1 Leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral, é encontrada em áreas tropicais e subtropicais, e muito embora com 300 mil casos estimados por ano e mortalidade de 20.000 pessoas, ainda é classificada como uma doença negligenciada. A LV é uma doença sistêmica e crônica, com quadros irregulares de febre, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia (Figura 3) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a, 2016b). A gravidade pode ser associada à deficiência nutricional e quadros de imunossupressão (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016a), e quando não tratada, a doença pode ser fatal (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016b). Mais de 90% dos casos de LV no mundo são oriundos de Bangladesh, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia e Brasil (ALVAR et al., 2012).

Figura 3- Paciente com leishmaniose visceral.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2016b).

As espécies pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* são as responsáveis por causar a LV. Assim, no Novo Mundo, a *Leishmania (Leishmania) infantum* é a responsável pela doença enquanto, no Velho Mundo, a *Leishmania (Leishmania) donovani* (NEVES, 2011; REY, 2008). O cão é considerado o reservatório mais importante, uma vez que alberga os parasitos em grandes quantidades na pele, tem grande proximidade com o homem, além dos casos humanos serem precedidos por casos caninos, conferindo à presença do animal um fator de risco (DESJEUX, 2001; SANTA ROSA; OLIVEIRA, 1997). Em adição, estudos já mostraram a detecção de DNA de *L. infantum* em pulgas, piolhos e carrapatos (MORAIS et

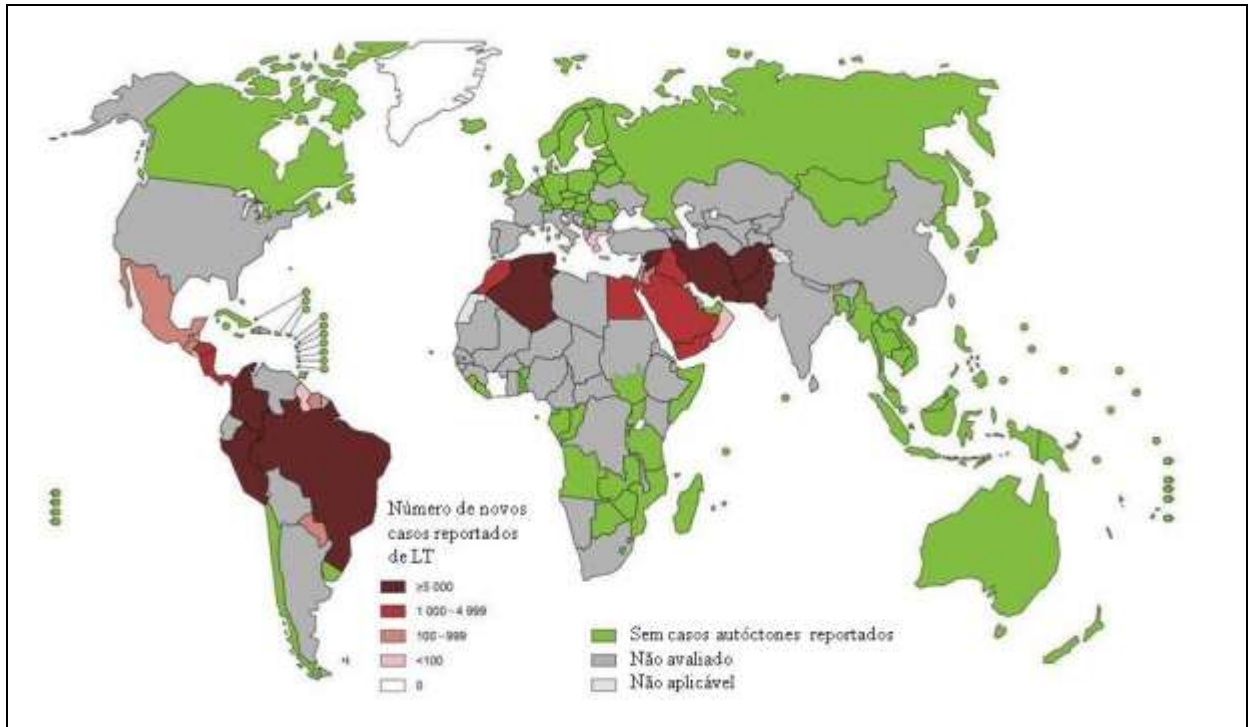
al., 2013), além de fezes caninas (NERY et al., 2015), o que pode colocar o cão em situação ainda mais intrigante na epidemiologia da doença. No entanto, a real importância desses dados ainda é desconhecida, requerendo mais estudos esclarecedores.

2.3.2 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A Leishmaniose Tegumentar é considerada uma das mais importantes doenças infecciosas, após a malária é considerada a segunda enfermidade infecto-parasitária mais frequente e com maior mortalidade no mundo (ALMEIDA; SANTOS, 2011; BRASIL, 2013; SAVOIA, 2015). De maneira geral, a LT é amplamente distribuída, com incidência anual de aproximadamente 1,5 milhões de casos no mundo. Países como Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e a República Árabe da Síria, apresentam a maioria dos casos da doença no mundo. A ocorrência de grandes surtos está relacionada com áreas urbanas e periurbanas densamente povoadas. Em se tratando do Velho Mundo, estes surtos estão especialmente relacionados à local de conflitos, campos de refugiados e migração de pessoas em grande escala (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2016a, 2016b) (Figura 4).

Na Ásia, África e Europa (Velho Mundo), as espécies de *Leishmania* responsáveis por causar a LT são: *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica*, além de alguns zimodemas de *Leishmania infantum* (GOTO; LINDOSO, 2010, 2012; LEISHMANIASIS..., 2009).

Figura 4- Distribuição mundial e número de casos novos de leishmaniose tegumentar em 2012.



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2013, tradução nossa).

Nas Américas (Novo Mundo), a doença é endêmica em 18 países e apresenta uma incidência anual de 187.200 a 307.800 casos com distribuição desde o sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018; SKRABA et al., 2014). As espécies relacionadas com a etiologia da LT Americana (LTA) são pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis*: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensi*, *Leishmania (Viannia) peruviana* e *Leishmania (Viannia) shawi*; bem como ao complexo *Leishmania mexicana*: *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*; além de *Leishmania (Viannia) lainsoni*, *Leishmania (Viannia) naiffi* e *Leishmania (Viannia) lindenbergi* que foram descobertas mais recentemente, mas não estão inclusas em complexos (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVÁ, 2012; REY, 2008).

A classificação em complexos está baseada no tamanho e crescimento do parasito em meio de cultura. As espécies pertencentes ao complexo *Leishmania braziliensis* são parasitos relativamente pequenos com amastigotas medindo de 2-4 μm de diâmetro e tem dificuldade de crescimento em meio de cultura. O complexo *Leishmania mexicana* possui parasitos maiores, com amastigotas medindo 3-6 μm de comprimento e crescem facilmente em meio de cultura (REY, 2008).

No Brasil, também foi identificada *L. (L.) infantum* causando a forma tegumentar (LYRA et al., 2015). Ainda sobre espécies de *Leishmania* no Novo Mundo, Shaw et al. (2015) caracterizaram um novo táxon de *Leishmania*, o qual foi isolado da lesão de um paciente procedente da República Dominicana, denominada *Leishmania (Leishmania) waltoni*, a espécie foi incriminada em casos de leishmaniose tegumentar difusa.

2.3.2.1 Breve histórico da LT

A LT é uma doença com registros de descrição na Ásia Central desde o primeiro século d.C. No início, as lesões eram denominadas de acordo com a região onde os casos eram encontrados assim, ferida de Balkh (cidade do norte do Afeganistão), botão-de-Bagdá (Iraque) e botão-de-Aleppo (Síria); enquanto os viajantes conheciam a doença por Botão-do-Oriente (NEVES, 2011).

No Novo Mundo (Américas), realçando a antiguidade da enfermidade nesta região, no Peru e Equador os relatos são também datados no primeiro século d.C. sendo, possivelmente, representada no período pré-inca por esculturas artesanais mochicas e huaco, as quais apresentam mutilação no nariz e lábios (BARI, 2006; NEVES, 2011; SÁNCHEZ-SALDAÑA et al., 2004) (Figura 5). Escomel, em 1908 foi o responsável por observar a semelhança entre as esculturas e a doença (BARI, 2006; ESCOMEL, 1929).

Figura 5- Esculturas artesanais mochicas com mutilações no nariz e lábios semelhantes às causadas pela leishmaniose tegumentar.



Fonte: A autora a partir do Pinterest (2016).

No século XVI, Fernando Oviedo (1535 apud NEVES, 2011), Pedro Pizarro (1571 apud NEVES, 2011) e Fernando de Santillán (1572 apud NEVES, 2011) realizaram as primeiras descrições clínicas da LTA, referindo-se como uma doença capaz de destruir o nariz e a cavidade bucal dos índios na encosta Cordilheira dos Andes (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2017; NEVES, 2011; SÁNCHEZ-SALDAÑA et al., 2004). Apenas cerca de 200 anos depois, Bueno (1764 apud NEVES, 2011) observou e associou a leishmaniose tegumentar no Peru à picada de insetos conhecidos como flebotomíneos (NEVES, 2011).

Embora as descrições clínicas da doença tenham sido feitas no século XVI, a primeira visualização dos parasitos foi realizada no final do século XIX, quando David Cunningham, um militar, em 1885 observou a presença de *Leishmania* em casos de leishmaniose visceral na Índia (CUNNINGHAM, 1885). No entanto, apenas em 1903, Ross criou o gênero *Leishmania*. No mesmo ano Wright associou o agente etiológico ao Botão-do-Oriente, e o incluiu no gênero *Leishmania*, e epíteto específico *tropica*, logo, a primeira espécie descrita foi a *Leishmania tropica* (NEVES, 2011; WRIGHT, 1903) desta forma, o crédito pela descoberta do agente do botão-do-Oriente é dada a Wright (BARI, 2006).

Cerqueira em 1855 relatou a doença, pela primeira vez, no Brasil ao observar pacientes com lesões muito semelhantes ao botão-do-Oriente. Quando em 1908, a Santa Casa de São Paulo recebeu inúmeros casos de pacientes com lesões associadas à construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil, principalmente da cidade de Bauru, assim, a hoje denominada LTA, ficou conhecida inicialmente como úlcera de Bauru. Em março de 1909, Adolfo Lindenberg anunciou a descoberta do parasito da leishmaniose com um artigo intitulado “A úlcera de Bauru e seu micróbio” (LINDENBERG, 1909).

Em 1911, dois acontecimentos tiveram grande significância para intervenção e organização etiológica da doença. Primeiro, Pedrosa e Silva (1911), conseguiram isolar o parasito da úlcera de Bauru através da cultura em meio Neal, Nory e Nicolle (NNN). Segundo, o parasito no Brasil foi identificado pelo cientista Gaspar Vianna, denominando-o de *Leishmania braziliensis*. Ainda sobre as contribuições de Gaspar, em 1912 o mesmo implantou o Tártaro Emético como agente terapêutico das lesões leishmanióticas (VIANNA, 1912), o qual continua sendo utilizado até os dias de hoje (CARVALHO, 2012).

2.4 A leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A partir de agora, serão abordados aspectos relacionados com a LT nas Américas.

2.4.1 Aspectos Epidemiológicos

A LTA é uma enzootia de animais silvestres, no entanto com os avanços territoriais do homem para as áreas dos animais, através do desmatamento para construção de cidades, rodovias e para fins comerciais, a doença passou a ter caráter zoonótico. A relação do homem com outros hospedeiros o expõe ao risco, estando este risco relacionado com o comportamento social, crenças, hábitos regionais, tradições familiares, atividades profissionais e de lazer e fatores ecológicos (como clima e preservação ambiental); deste modo, as populações desprivilegiadas socioeconomicamente são as mais acometidas pela doença (ÁVILA-PIRES, 1989; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016a). Em geral, a transmissão das espécies de *Leishmania* responsável pela forma tegumentar está intimamente relacionada com a atividade profissional exercida, por isso, homens agricultores são os mais acometidos pela doença (GUERRA et al., 2011; MARINHO-JUNIOR, 2010). Contudo, a distribuição da doença, que tem ciclo heteroxênico, é dependente da presença dos insetos vetores e da movimentação dos mamíferos reservatórios (NEVES, 2011).

2.4.1.1 Distribuição Geográfica

Nas Américas, a epidemiologia da LTA se torna mais complexa, devido à diversidade etiológica, dos hospedeiros-reservatórios, dos flebotomíneos vetores, e das manifestações clínicas e resposta ao tratamento. Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (2018) de 2001-2016 foram notificados 892.846 novos casos, distribuídos em 17 dos 18 países da América (Guiana Francesa reporta à França), sendo observada uma redução dos casos entre 2009 e 2015, entretanto, em 2016 houve um aumento de 6,15% com relação à 2015. Em 2016 a maior representatividade de casos foi registrada por Brasil (12.690), Colômbia (10.966), Nicarágua (5.423) e Peru (7.271), compondo 74,3% do total de casos da América (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018).

No Brasil, analisando a cronologia da doença de 2007 até 2017, é possível observar que atualmente existem 235.301 casos notificados de LTA nas cinco regiões e em todos os estados brasileiros (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES, 2019). As regiões Norte e Nordeste são as mais acometidas pela doença, respectivamente com 101.332 e 72.395 notificações. Os estados do Pará e Amazonas, no norte do país, apresentam 58% (58.761) dos casos da região. No Nordeste, os estados do Maranhão, Ceará, Bahia e

Pernambuco apresentam 95,73% (69.306) dos casos da região (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES, 2019).

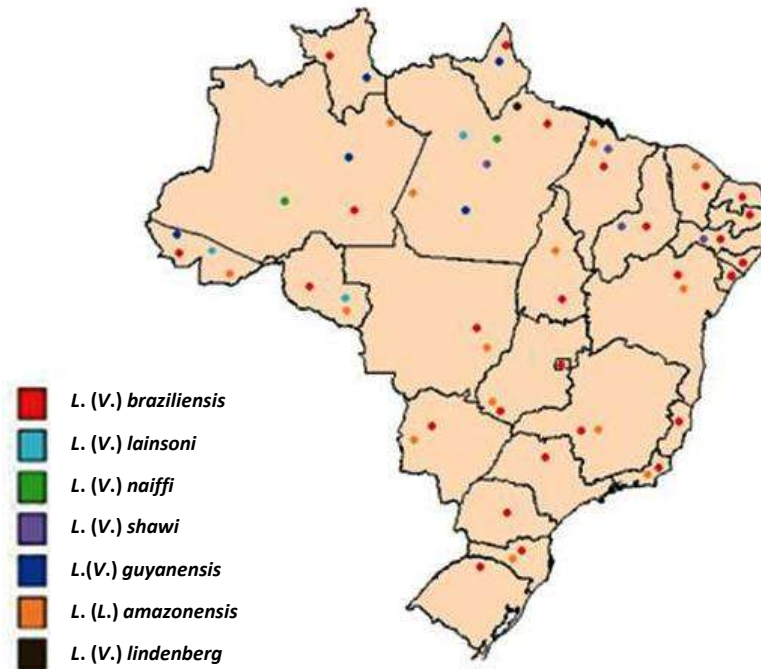
Através de análise separada dos dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificações em 2019, para o estado do Amazonas, é possível observar que a doença apresentou 2.280 notificações no ano de 2007, com decréscimo dos números de casos até 2010, quando em 2011 e 2012 foram registrados 2.384 e 2.372 casos, respectivamente. De 2013 a 2015 houve uma média de 1.727 casos, demonstrando a redução considerável dos números. Em 2016 houve uma diminuição ainda mais expressiva dos casos, com apenas 894 notificações. Porém, em 2017 retornam a 1.908 de casos registrados (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES, 2019).

Os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificações para o estado de Pernambuco, observa-se que a doença tem uma média de aproximadamente 388 casos por ano (2007-2017), exibindo variações no número de casos em 2009, 2013, 2014 e 2016 com 547, 246, 241 e 266 notificações, respectivamente. No estado, a LTA ocorre com predominância na Zona da Mata Atlântica, sendo quase totalmente na forma tegumentar localizada (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRITO et al., 2009; SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÕES, 2019).

2.4.1.2 Diversidade Etiológica

A LTA é uma doença parasitária com complexo ciclo epidemiológico, no qual estão presentes diferentes espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da doença (Figura 6) (BRASIL, 2013). Essa abundância de espécies torna complexa também as manifestações clínicas, resposta imunológica e terapêutica dos pacientes acometidos pela enfermidade. Em ordem decrescente de risco de infectar o homem (SILVEIRA et al., 2008), segue abaixo a descrição das espécies encontradas no Brasil:

Figura 6- Distribuição das espécies de *Leishmania* no Brasil.



Fonte: Brasil (2013).

- a) *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MATTA, 1916; VIANNA, 1911) – No Brasil, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais importante epidemiologicamente por já ter sido identificada em todos os estados (BRASIL, 2013, 2017). Além disso, a espécie possui uma vasta diversidade de vetores e hospedeiros-reservatórios, incluindo ciclo de transmissão associado a animais domésticos (COSTA et al., 2009a; NEVES, 2011). Uma característica relevante na análise epidemiológica desse parasito é sua relação com áreas primariamente de florestas, que foram desmatadas e por tanto, os insetos vetores “invadiram” o ambiente peridomiciliar (NEVES, 2011). Além disso, esta espécie está relacionada com afecções dérmicas que podem evoluir para a forma mucosa, sendo considerada, juntamente com a *L. (L.) amazonensis*, as espécies que apresentam maior potencial patogênico para o homem (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016; SILVEIRA et al., 2008);
- b) *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON; SHAW, 1972) - Os flebotomíneos responsáveis pela transmissão da *L. (L.) amazonensis* tem hábito noturno, voo baixo e pouca antropofilia. Por isso, a doença causada por esta espécie é considerada rara, porém quando estabelecida, tem gravidade significativa por se tratar de uma manifestação anérgica que se inicia de maneira insidiosa. A espécie já identificada nos estados do Acre, Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins (Norte), Bahia, Ceará e

- Maranhão (Nordeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste), Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Centro-Oeste) e Paraná (Sul) (BRASIL, 2013, 2017);
- c) *Leishmania (Viannia) guyanensis* (FLOCH, 1954) - Restrita a Bacia Amazônica (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2016), intrigantemente, a *L. (V.) guyanensis* tem ciclo epidemiológico relacionado com a copa das árvores que albergam os flebotomíneos transmissores da espécie. Enquanto grávidas, as fêmeas de flebotomíneos descem para a base da árvore para ovipor, não necessitando realizar repasto sanguíneo, uma vez que elas já o fazem em animais arborícolas (tamanduá). A picada no homem está mais relacionada a uma defesa do inseto frente às atividades perturbadoras. Quando perturbados, *Lu. umbratilis* e *Lu. anduzei* atacam de forma veemente, motivo pelo qual um único indivíduo pode ter dezenas de lesões (dezenas de picadas) principalmente abaixo da cintura (NEVES, 2011; ROMERO et al, 2001), e os mais acometidos são indivíduos do sexo masculino em fase produtiva (agricultores e militares) (BRASIL, 2013, 2017);
- d) *Leishmania (Viannia) shawi* (LAINSON et al., 1989) – a espécie já foi isolada de macacos e preguiças (NEVES, 2011) o que indica que o ciclo enzoótico seja arbóreo, relacionando-se com o comportamento desses animais (BRASIL, 2013). Embora seus registros sejam maiores nos estados do Pará e Maranhão, Brito et al. (2009) caracterizaram esta espécie no estado de Pernambuco (BRASIL, 2013, 2017);
- e) *Leishmania (Viannia) lainsoni* (SILVEIRA et al., 1987) - Ainda pouco conhecida, a espécie já foi identificada no Pará, Rondônia e Acre (BRASIL, 2013; NEVES, 2011). Uma característica do flebotomíneo incriminado na transmissão (*Lu. ubiquitousalis*) é sua baixa antropofilia, motivo pelo qual poucos casos humanos de LTA são diagnosticados com infecção por *L. (V.) lainsoni* (BRASIL, 2013, 2017; RANGEL; LAINSON, 2009);
- f) *Leishmania (Viannia) naiffi* (LAINSON; SHAW, 1989) - Uma das espécies de *Leishmania* mais recentemente descrita, com alguns casos humanos no Amazonas e Pará. *L. (V.) naiffi* até o momento foi isolado apenas do tatu, o que sugere ter uma distribuição e ciclo mais complexo, se seguir o de seu possível reservatório (BRASIL, 2013, 2017; FAGUNDES-SILVA et al., 2015; NEVES, 2011);

g) *Leishmania (Viannia) lindenberg* (SILVEIRA et al., 2002) - Foi descrita unicamente no Pará, onde oito homens soldados militares em treinamento e uma mulher civil estavam infectados por uma nova espécie, a qual foi denominada *L. (V.) lindenberg* (SILVEIRA et al., 2002). A espécie de flebotomíneo indicada na transmissão é a *Lu. antunesi*, e não há registro de isolamento em outros animais (BRASIL, 2013, 2017; RANGEL; LAINSON, 2009).

2.4.1.3 Diversidade vetorial e de hospedeiros-reservatórios

Além de múltiplas espécies de *Leishmania*, a LTA apresenta uma diversidade de espécies de flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), competentes à transmissão do parasito. Aceita-se que as promastigotas de *Leishmania* são parasitos primitivos de flebotomíneos, e que possivelmente se adaptaram à mudança evolutiva dos hábitos alimentares desses insetos, que passaram a ter fêmeas hematófagas (NEVES, 2011; RANGEL; SHAW, 2018). Em relação aos hospedeiros reservatórios, as *Leishmania* spp. tem uma vasta diversidade genética e biologia eclética, por isso, é capaz de infectar várias espécies de mamíferos, semelhantemente a outros tripanossomatídeos (ROQUE; JANSEN, 2014).

É importante destacar que, reservatório é todo mamífero, no qual o parasito pode multiplicar-se e ser transmitido, sendo responsável por mantê-lo na natureza; enquanto hospedeiro é todo organismo que alberga o parasito permitindo sua subsistência (ASHFORD, 1996; ÁVILA-PIRES, 1989; HAYDON et al., 2002; NEVES, 2011; ROQUE; JANSEN, 2014). Por isso, diz-se que roedores, marsupiais, edentados, procionídeos, canídeos, primatas e ungulados primitivos são denominados hospedeiros-reservatórios da *Leishmania*. No estudo dos hospedeiros-reservatórios existe uma controversa quanto à presença ou não da patogenia nestes animais (ROQUE; JANSEN, 2014). Assim, existe a denominação hospedeiro acidental, uma vez que abriga o parasito, mas também ficam doentes (apresentam sinais e sintomas), demonstrando assim que não há um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro. Cães e humanos são exemplos de hospedeiros acidentais (NEVES, 2011).

No Brasil as principais espécies de reservatórios, vetores e seus respectivos hábitos e espécie de *Leishmania* envolvida no ciclo estão descritos no quadro 1 e figura 7.

Figura 7- Principais hospedeiros de parasitos causadores da leishmaniose tegumentar Americana.



Fonte: A autora a partir do google imagens.

Legenda: A: *Didelphis marsupialis*; B: *Bolomys lasiurus*; C: *Felis catus*; D: *Dasyus novemcinctus*; E: *Canis familiaris*; F: *Choloepus didactylus*; G: *Equus caballus*; H: *Tamandua tetradactyla*; I: *Equus asinus*.

Quadro 1- Espécies de *Leishmania* e seus principais hospedeiros e vetores.

Espécie de <i>Leishmania</i>	Hospedeiro Silvestre	Hospedeiro Urbano	Vetor
<i>Leishmania braziliensis</i>	Roedores <i>Akodon, Proechimys, Cerradomys, Necromys squamipes, Bolomys lasiurus</i>	<i>Canis familiaris</i> (cão), <i>Equus caballus</i> (cavalo), <i>Equus asinus</i> (asno), <i>Rattus rattus</i> (rato), <i>Felis catus</i> (gato)	<i>Lutzomyia intermèdia</i> <i>Lutzomyia pessoai</i> <i>Lutzomyia whitmani</i> <i>Lutzomyia wellcomei</i> <i>Lutzomyia neivai</i> <i>Lutzomyia migonei</i> <i>Lutzomyia complexa</i>
<i>Leishmania amazonensis</i>	Roedores <i>Proechimys, Oryzomys, Cerradomys, Necromys</i> Marsupiais <i>Metachirus</i> (Cuíca-cauda-de-rato), <i>Didelphis</i> (gambá), <i>Marmosa</i> (marmosa murina)	-	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i> <i>Lutzomyia olmeca nociva</i> <i>Lutzomyia reducta</i>
<i>Leishmania guyanensis</i>	Edentados <i>Choloepus didactylus</i> (preguiça), <i>Tamandua tetradactyla</i> (tamanduá-mirim) Marsupiais <i>Didelphis marsupialis</i> (gambá-comum) <i>Didelphis albiventris</i> (timbú)	-	<i>Lutzomyia umbratilis</i> <i>Lutzomyia anduzei</i>
<i>Leishmania shawi</i>	<i>Chiropotes satanas</i> e <i>Cebus apella</i> (macacos), <i>Nasua nasua</i> (quati), e <i>Choloepus didactylus</i> (preguiça)	-	<i>Lutzomyia whitmani</i>
<i>Leishmania lainsoni</i>	<i>Cuniculus paca</i> (paca)		<i>Lutzomyia ubiquitalis</i>
<i>Leishmania naiffi</i>	<i>Dasybus novemcinctus</i> (tatu)	-	<i>Lutzomyia ayrozai</i> <i>Lutzomyia paraensis</i> <i>Lutzomyia squamiventris</i>
<i>Leishmania lindenberg</i>	-	-	<i>Lutzomyia antunesi</i>

Fonte: Adaptado de Neves (2011) e Brasil (2013).

2.4.2 Manifestações Clínicas

Diante da preferência pelo macrófago, Roque e Jansen (2014) citam que em termos ecológicos, o parasito está em busca do nicho capaz de estabelecer a espécie, e não um tropismo pelo tecido especificamente. Como mencionado previamente, existe uma heterogeneidade entre as manifestações clínicas da LTA relacionadas com a espécie do parasito, dos vetores, dos reservatórios e dos ecossistemas, além da associação com a resposta imune do individuo infectado (BRASIL, 2013; COSTA, et al., 2009a).

Embora todas as apresentações tenham origem tegumentar, estas podem acometer também mucosas, provocando lesões mucocutâneas, localizadas, anérgicas e resistentes (BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a; SILVEIRA et al., 2008). Sendo assim, devido a esse pleomorfismo clínico, as apresentações recebem diferentes classificações (BRASIL, 2013); as quais são influenciadas pela introdução dos parasitos através da picada do flebotômíneo,

aparência e local da(s) lesão(ões), além de infecção inaparente e leishmaniose linfonodal (BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a).

A infecção inaparente corresponde aos indivíduos sadios, sem histórico clínico de lesão ou cicatriz, residentes em áreas endêmicas para LTA, porém, diagnosticados positivos para a doença através dos métodos laboratoriais: Intradermorreação de Montenegro, Imunofluorescência indireta e *Enzyme linked immunisorbant assay* - ELISA (BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a). Em se tratando de leishmaniose linfonodal, esta é um tipo de linfadenopatia que por vezes precede o aparecimento da lesão (BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a; MORAES, CORREIA-FILHO, SANTOS, 1993; SANGUEZA; CARDENAS, 1981).

Classicamente a doença é dividida em duas formas: tegumentar (LT) e mucocutânea (LMC) (BRASIL, 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Nas manifestações cutâneas, de maneira geral, é comum o aparecimento de lesão em regiões do corpo expostas a picada do inseto, com período de incubação de 30 dias até anos (BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a; KARIMKHANI et al., 2016). A úlcera é a lesão clássica leishmaniótica, com formato arredondado; bordas bem delimitadas e elevadas; e fundo com aspecto crostoso (granulações grosseiras). Entretanto, existem outros tipos de lesões, menos frequentes, denominadas papulo-tuberosas (aparência papilomatosa parecidas com picadas de inseto), vegetante (pápulas úmidas e moles) e verrucosas (superfície seca e crostosa). Segundo Brasil (2013, 2017) e Costa et al. (2009a), as subformas clínicas dentro das manifestações tegumentar são:

- a) **Leishmaniose tegumentar localizada (LTL)**: refere-se a apresentação de única ou múltiplas lesões do tipo úlcera, localizadas exclusivamente na pele (onde ocorreu picada do flebotomíneo) com frequente cura espontânea, ou resposta satisfatória ao tratamento (Figura 8). A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) é geralmente positiva. As espécies de *Leishmania* incriminadas nesta subforma são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis*;
- b) **Leishmaniose tegumentar disseminada (LTDs)**: manifestação rara, acometendo cerca de 2% dos casos. Caracteriza-se por múltiplas lesões papulares frequentemente no rosto e tronco, iniciadas por uma lesão ulcerada típica da subforma localizada, que se dissemina pelo corpo, provavelmente por via hemática ou linfática. Em análise histológica é possível observar o comprometimento dos folículos pilosos da pele, por este motivo, a inflamação confere a lesão um aspecto acneiforme (Figura 9). A IDRM

é variável, podendo ser positiva ou negativa. As espécies de *Leishmania* incriminadas nesta subforma são: *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*. Segundo Goto e Lindoso (2010) existe grande associação entre a LTDs e presença de lesão mucosa em cerca de 29% dos casos;

- c) **Leishmaniose tegumentar recidiva cútis (LTRC)**: caracterizada pelo reaparecimento da lesão após cura espontânea ou medicamentosa. A reativação da lesão geralmente inicia na borda da cicatriz da lesão anterior. De maneira geral, a IDRm tem resultado positivo. As espécies de *Leishmania* que causam esta subforma são as mesmas que causam a forma localizada (GOTO; LINDOSO, 2010);
- d) **Leishmaniose tegumentar difusa (LTDf)**: nas Américas pode ser causada por *Leishmania (L.) mexicana* e *Leishmania (L.) amazonensis* (GOTO; LINDOSO, 2012; REY, 2008). No Brasil, é causada exclusivamente pela *Leishmania (L.) amazonensis*; rara, porém de gravidade significativa. A lesão geralmente é única, no local da inoculação do parasito pelo vetor, no entanto, é possível ocorrer metástase para outras áreas (REY, 2008). Os nódulos são repletos de macrófagos parasitados, porém com reduzida ou nenhuma reação inflamatória (REY, 2008). O acometimento de pacientes com anergia e deficiência na resposta celular a antígenos de *Leishmania* confere um quadro clínico grave por haver pouca ou nenhuma resposta terapêutica aos medicamentos disponíveis (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2012; REY, 2008). A IDRm em geral se apresenta negativa em pacientes com LTDf. Nas lesões, os parasitos se apresentam em grande quantidade (REY, 2008). Em casos suspeitos de LTDf é indicado o diagnóstico diferencial principalmente com a hanseníase virchowiana (COSTA et al., 2009b), uma vez que a lesão única da LTDf apresenta evolução com desenvolvimento de placas e múltiplas nodulações as quais recobrem uma considerável área cutânea (Figura 10). Em uma análise histórica, uma das primeiras notificações de LTDf foi feita pelo serviço nacional de lepra, e a doença era chamada de “forma lepromatosa da leishmaniose tegumentar” (NERY-GUMARÃES, 1965);
- e) **Leishmaniose mucocutânea ou mucosa (LCM)**, de maneira geral, é consequência de formas cutâneas que evoluem posteriormente ou concomitantemente para lesões destrutivas das mucosas das vias aéreas superiores. Acredita-se que as leishmânias inoculadas sejam disseminadas para mucosas nasal, orofaríngea, palato mole e duro, lábios, língua, laringe e até mesmo, em menor escala, para traqueia e brônquios superiores (DINIZ; COSTA; GONÇAVES, 2011). Estima-se que 3-5% dos casos de

LTA evoluem para uma forma mucosa (BRASIL, 2013; DINIZ; COSTA; GONÇAVES, 2011). Entretanto, apesar da baixa incidência, é a forma clínica mais severa porque se não diagnosticada e tratada pode produzir complicações clínicas, deficiências e mutilações (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2018), assim, os indivíduos acometidos convivem com problemas psicossociais irreparáveis, resultantes das lesões mutilantes, interferindo em aspectos econômicos e sociais (Figura 11) (ALMEIDA; SANTOS, 2011). No Brasil, a *L. braziliensis* é a espécie mais importante associada aos casos de LCM, porém, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*, embora raramente, estão implicadas em comprometimento mucoso (BASANO; CAMARGO, 2004; BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009a; LESSA, 2007; MARZOCHI, 1992). A LMC, assim como a LC, apresenta subformas clínicas, no entanto, está relacionada principalmente com a origem e o período de apresentação da lesão mucosa (Figura 11). No quadro 3 estão descritas estas subformas de maneira simplificada.

Figura 8- Paciente apresentando lesão de leishmaniose cutânea localizada.



Fonte: A autora.

Figura 9- Paciente apresentando leishmaniose cutânea disseminada.



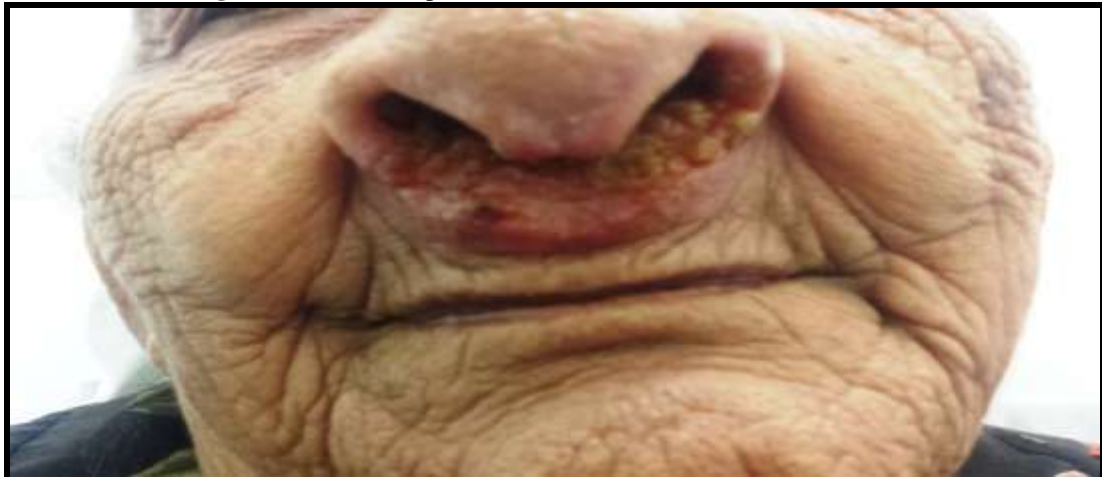
Fonte: Brasil (2010).

Figura 10- Paciente apresentando leishmaniose cutânea difusa.



Fonte: Instituto de Ciências Biológicas (2017).

Figura 11- Paciente apresentando a forma mucosa da leishmaniose.



Fonte: Oliveira, G. (2016).

Quadro 2- Principais características de diferentes sub-formas clínicas da leishmaniose mucocutânea.

SUB-FORMA CLÍNICA	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS
Mucosa tardia	Surgimento de lesão mucosa até muitos anos após cicatrização de lesão cutânea (espontânea ou medicamentosa insuficiente). É a forma mucosa mais frequente.
Mucosa de origem indeterminada	Surgimento de lesão mucosa sem apresentação prévia de lesão cutânea. Acredita-se que esteja associada a infecções subclínicas ou lesões pequenas que foram imperceptíveis.
Mucosa concomitante	Surgimento de lesão cutânea e mucosa concomitantes, porém em regiões distantes do corpo.
Mucosa contígua	Surgimento de lesão mucosa devido à disseminação de uma lesão cutânea próxima a mucosas das vias aerodigestivas.
Mucosa primária	Surgimento de lesão mucosa por picada direta no inseto na mucosa ou semimucosas.

Fonte: Brasil (2013).

2.4.3 Diagnóstico da LTA

Diante da complexidade da LTA, o diagnóstico é feito a partir de um conjunto de critérios, que levam em consideração a epidemiologia, clínica e diagnóstico laboratorial (GOTO; LINDOSO, 2010; SKRABA et al., 2014).

Os dados epidemiológicos fornecem ao médico informações quanto a existência prévia da doença na região, assim como vetores e reservatórios que estando presentes favorecem a manutenção do ciclo da *Leishmania*. Os dados clínicos são obtidos através da anamnese, com a análise da presença de lesão característica da LTA em suas mais diversas manifestações. Entretanto, esta análise clínica não é simples, uma vez que existem diversas doenças que precisam ter o diagnóstico diferencial com LTA, como hanseníase, sífilis, tuberculose cutânea, paracoccidiodomicose, histoplasmose, esporotricose, granuloma facial de linha média, psoríase, picadas de insetos e carcinoma basocelular (ALAM et al. 2016; BRASIL, 2013; COSTA et al., 2009b; GOTO; LINDOSO, 2010; MASMOUDÍ et al., 2013). O diagnóstico laboratorial é feito a partir de exames parasitológicos, sorológicos e moleculares.

Ainda há uma grande discussão quanto aos métodos de diagnósticos laboratoriais. As técnicas parasitológicas clássicas baseiam-se na pesquisa direta do parasito através de observação microscópica da escarificação, impressão ou histopatologia da lesão. O isolamento do parasito por meio de cultivo pode ser realizado a partir de aspirado ou biópsia da lesão inseridos em meio à base de ágar sangue (Meio Novy, Neal and Nicolle), meio Schneider e até mesmo por injeção do material coletado em animais susceptíveis à infecção (ALAM et al., 2016; BART et al., 2013; GOTO; LINDOSO, 2010; KARIMKHANI et al., 2016). Muito embora as duas metodologias (pesquisa direta e cultivo) forneçam alta especificidade, apresentam limitações (MASMOUDÍ et al., 2013; MORAIS, 2015). A pesquisa direta precisa de um profissional experiente com treinamento eficaz na identificação das formas amastigotas, evitando assim, diagnósticos falsos positivos ou negativos. O isolamento do parasito através da cultura é limitado quanto à sensibilidade e tempo de crescimento do parasito (GOTO; LINDOSO, 2010; MASMOUDÍ et al., 2013).

Os testes sorológicos para diagnóstico da LTA são classicamente a pesquisa de anticorpos: Ensaio de Imunoabsorção enzimática (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay-ELISA*) e Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI); no entanto, os testes apresentam baixa sensibilidade em pacientes com a forma cutânea. Uma melhor sensibilidade é observada em pacientes com a forma mucocutânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010). Outra desvantagem significativa no uso destes métodos é a possível reação

cruzada com Leishmaniose Visceral e Doença Chagas (ELMAHALLAWY et al., 2014; GONTIJO; CARVALHO, 2003; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2016c).

A IDRМ trata-se de uma reação de hipersensibilidade retardada a antígenos inativos de *Leishmania*. A avaliação é feita pela análise do processo inflamatório no decorrer dos dias posteriores à injeção desses antígenos (48 e 72h). Entretanto, existem dois principais problemas a serem abordados para essa metodologia. Primeiramente, o teste não diferencia entre infecções recentes e antigas (GOTO; LINDOSO, 2010; 2012), o que seria relevante, uma vez que estes pacientes vivem em áreas endêmicas para LTA e podem ser assintomáticos, ou até mesmo terem sido tratados e ainda apresentarem resultado positivo, restando dúvida se é uma resposta pregressa ou atual (GOTO; LINDOSO, 2010; 2012). O segundo problema relaciona-se a produção dos antígenos pelo Centro de Produção e Pesquisa em Imunobiologia (CPPI - Secretaria Estadual de Saúde, Piraquara, PR, Brasil) a qual está atualmente suspensa, não havendo lotes disponíveis (informação obtida por comunicação pessoal).

Diante das limitações frente aos métodos clássicos, as abordagens moleculares têm sido cada vez mais aprimoradas e utilizadas. Com destaque para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), desenvolvida por Mullis em 1983 (MULLIS, 1990; MULLIS; FALOONA, 1987). A técnica de PCR é uma metodologia baseada na amplificação exponencial *in vitro* de uma sequência de DNA específica a partir da utilização de *primers*, Taq DNA Polimerase e nucleotídeos comerciais, formando uma solução de reagentes necessários para ocorrer a síntese de DNA (PIERCE, 2016).

Nos últimos 15 anos, a PCR convencional vem apresentando refinamentos para o aprimoramento do seu uso e versatilidade, através da exploração da atividade exonucleásica da Taq polimerase e a associação da emissão da fluorescência do brometo de Etídio em diferentes quantidades de DNA, levaram assim ao surgimento da PCR quantitativa em tempo real (qPCR) (HIGUCHI et al., 1992; HOLLAND et al., 1991; PAIVA-CAVALCANTI, 2008). Dentro da versatilidade e sensibilidade da PCR tanto em sua forma convencional (PCR) (YANG; ROTHMAN, 2004), como em sua variação mais especializada (qPCR) têm sido utilizadas no diagnóstico de diferentes doenças, dentre elas a LTA e a LV (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009; 2013; RADOMSKI et al., 2010; YANG; ROTHMAN, 2004).

Os alvos mais utilizados na PCR para diagnóstico das leishmanioses são DNA do cinetoplasto (kDNA) e DNA ribossomal (especialmente, Subunidade menor - SSurDNA) (GOTO; LINDOSO, 2012; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2009, 2013, 2015).

Por ser muito sensível, a reação de PCR e suas variantes podem ser facilmente contaminadas ou inibidas por excesso de reagentes como *Ethylenediamine tetraacetic acid* (EDTA), Heparina, proteinase K, fenol e hemoglobina. Entretanto, muito já se tem avançado com relação ao aprimoramento de extração e purificação de DNA, reduzindo os possíveis problemas de contaminação por reagentes utilizados no processamento da amostra (PAIVA-CAVALCANTI, 2008). Outra limitação explanada por Goto e Lindoso (2012) é a reprodutibilidade da técnica em diferentes laboratórios, sendo necessários experimentos de padronização.

Apesar de algumas limitações, o diagnóstico pela detecção de DNA tem muitas vantagens quando comparado aos testes parasitológicos e imunológicos, como quantificação de carga parasitária, utilização de diferentes espécimes biológicos, resultado rápido, alta sensibilidade e especificidade, detecção de DNA proveniente de amastigotas e promastigotas (GOTO; LINDOSO, 2010).

2.4.4 Identificação da espécie de *Leishmania*

Diante do amplo quadro de manifestações clínicas da LTA e suas associações com as espécies do gênero *Leishmania*, a resposta imune do hospedeiro e a invasividade, tropismo e patogenicidade do parasito, é de fundamental importância a caracterização etiológica para escolha do tratamento mais adequado e determinar o prognóstico clínico do paciente (MOURI et al., 2014; WILSON; PEARSON, 1990). Apesar da relevância, a identificação da espécie do parasito ainda é um desafio, necessitando de um método simples e rápido (GOTO; LINDOSO, 2012; MOURI et al., 2014). A seguir serão discriminados os principais métodos relatados na literatura científica para fins de identificação de espécies de *Leishmania*.

2.4.4.1 *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE)

A MLEE é uma caracterização bioquímica (AUWERA; DUJARDIN, 2015), baseada na separação de enzimas citoplasmáticas (em condições não desnaturantes), através da sua massa molecular, carga elétrica e estrutura por eletroforese em gel de agarose, poliacrilamida ou acetato de celulose visualizadas por coloração específica (BOERLIN, 1997). Através desta metodologia, é possível revelar a atividade metabólica de enzimas da célula após migração; sendo usada há décadas para diferenciar espécies de diversos organismos, como bactérias,

fungos e protozoários (BOERLIN, 1997; BORIOLLO et al., 2005; CAIERÃO et al., 2016; CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994).

Considerada o padrão-ouro para caracterização de espécies de *Leishmania*, a MLEE (AUWERA; DUJARDIN, 2015; BRITO et al., 2009; 2012b; CUPOLILLO et al., 1994; SANTIS et al., 2011) é uma técnica muito utilizada ao longo do tempo, uma vez que é a única avaliada para identificar a maioria das espécies de *Leishmania* no mundo, o que confere a esta técnica grande vantagem e confiabilidade (AUWERA; DUJARDIN, 2015).

A MLEE apresenta desvantagens relacionadas ao tempo de execução e laboriosidade, além da necessidade de laboratório especializado para sua execução, restrita a poucos locais no mundo. No Brasil, por exemplo, é realizada apenas no laboratório da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro (CLIOC-RJ). Esta técnica necessita do isolamento do parasito através da cultura, assim a biópsia ou aspirado de lesão tornam-se indispensáveis (AUWERA; DUJARDIN, 2015; BEN ABDA et al., 2011; MOURI et al., 2014; TSUKAYAMA et al., 2013).

Diante dos avanços biotecnológicos, as ferramentas laboratoriais têm se tornado cada vez menos laboriosas e mais sensíveis, utilizando espécimes biológicos de diversas origens, menos invasivas; o que pode trazer mais conforto para o paciente debilitado.

2.4.4.2 Anticorpos Monoclonais

A identificação de *Leishmania* através da utilização de anticorpos monoclonais é baseada na ligação específica antígeno-anticorpo, capaz de diferenciar espécies à nível de subgênero (*Leishmania* e *Viannia*) (AUWERA; DUJARDIN, 2015; BRITO et al., 2012b; CUBA-CUBA et al., 1996; GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1996; ZAULI et al., 2012). Entretanto, este método apresenta as mesmas limitações que a MLEE, necessitando do isolamento do parasito (AUWERA; DUJARDIN, 2015).

2.4.4.3 *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)

Diversos autores têm utilizado a RFLP para diferenciação de espécies de *Leishmania* e até como teste de referência para comparativo com técnicas mais recentes (AZMI et al., 2011; BENSOUSSAN et al., 2006; EL-BESHBISHY; AL-ALI; EL-BADRY, 2013; EL-TAI et al., 2000; HAJJARAN et al., 2011; HERNANDEZ et al., 2014; SCHONIAN et al., 2003; YEHIA et al., 2012).

Esta metodologia está baseada na análise de polimorfismos presentes entre as espécies para um determinado fragmento de DNA. Inicialmente é realizada uma PCR convencional ou tempo real, onde *amplicons* são posteriormente submetidos à digestão enzimática, e analisados através de eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, sendo necessária comparação com um padrão previamente estabelecido, e esta é a maior desvantagem da tecnologia, uma vez que cepas de diferentes regiões são capazes de alterar o padrão de bandeamento (BEN ABDA et al., 2011; MOURI et al., 2014).

2.4.4.4 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que tem como princípio básico a medição da massa e da caracterização de estruturas química de moléculas (VAN BRAMER, 1998). Pouco laboriosa, a metodologia é considerada simples e rápida na identificação de várias espécies *Leishmania* com alta concordância quando comparada à técnicas mais clássicas (como PCR-RFLP e MLST) (MOURI et al., 2014). Entretanto, além do espectrofotômetro ser um equipamento caro, para sua realização, é necessário promastigotas oriundas de isolados do parasito através da cultura, assim, tem as mesmas limitações de processamento apresentadas pela MLEE e anticorpos monoclonal.

2.4.4.5 PCR em tempo real

Com o grande avanço da biotecnologia, a busca por ferramentas com maior versatilidade, sensibilidade, menor laboriosidade, e que forneça importantes informações complementares, tem se tornado mais evidente. Assim, com a difusão dos equipamentos de PCR em tempo real, os Centros de Pesquisa e Diagnóstico tem usado a metodologia na rotina para diagnóstico e quantificação de DNA presente na amostra, para diversos patógenos (HASSANPOUR et al., 2016; RIAZ et al., 2016; SAMAREH-FEKRI et al., 2016; SROKA-OLEKSIK et al., 2016).

Diante dos parâmetros de análises e variações da PCR em tempo real, a técnica tem sido aplicada para diferentes fins, como diagnóstico, quantificação, análise da expressão gênica e até diferenciação de espécies (COSTA et al., 2015; PAIVA-CAVALCANTI et al 2009; 2013; MORAIS et al. 2015). Para caracterizar espécies, alguns trabalhos utilizaram *Sybr Green*, *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) e até mesmo sondas de hibridização (*TaqMan probe*).

Com a utilização do fluorocromo *Sybr Green*, a análise é feita pela variação da temperatura de fusão (Temperatura de *melting* - *Tm*). Pita-Pereira et al. (2012) conseguiram diferenciar as espécies em nível de subgênero (*Leishmania* e *Viannia*). Morais et al. (2015), considerando espécies do Novo Mundo, enquadraram grupos de espécies de *Leishmania* em intervalos de análise da *Tm*. No Velho Mundo, Toz et al. (2013) e Khosravi et al. (2012) obtiveram bons resultados ao diferenciar as espécies responsáveis pela LT naquelas regiões.

Com resultados prósperos, a *High Resolution Melting* (HRM) tem sido usada por diversos pesquisadores no mundo (HERNANDEZ et al. 2014; TALMI-FRANK et al., 2010; VAN DER AUWERA et al., 2014; ZAMPIERI et al., 2016). A técnica se baseia na análise pós-PCR através de variações na curva de dissociação, com o objetivo de detecção de diferentes variações polimórficas no DNA fita-dupla de diferentes amostras (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016). Entretanto, muitas vezes é necessária a realização de mais de uma PCR (ZAMPIERI et al., 2016).

Utilizando sondas de hibridização (*TaqMan probe*) e *Sybr Green*, Weiranther et al. (2011) padronizaram ensaios seriados de PCR em tempo real para diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania*. Os testes foram realizados com DNA de cepas de referência e biópsia de lesão (pacientes com LT) e, soro de pacientes com LV. As espécies foram identificadas, entretanto, é necessária a realização de uma série de reações, o que aumenta o custo do resultado e o tempo de consumo, tornando a metodologia laboriosa.

2.4.4.6 Sequenciamento

A utilização de moléculas de DNA tem tido aplicações cada vez mais promissoras devido a sua alta estabilidade e possibilidade de obtenção por diferentes amostras biológicas. Apesar de ser citada entre as ferramentas que requerem padronização em cada laboratório, tornando isto uma desvantagem (MOURI et al., 2014), o uso do sequenciamento como metodologia para identificar diferentes espécies de *Leishmania* está se tornando cada vez mais difundida, principalmente quando é inviável a aplicabilidade da MLEE/anticorpos monoclonais.

No Novo Mundo Zampieri et al. (2016) usaram o sequenciamento como padrão-ouro para identificação de diversas espécies de *Leishmania*. Talmi-Frank et al. (2010) e Toz et al. (2013), no Velho Mundo, também usaram sequenciamento como teste de referência.

A *Multilocus Sequencing Typing* (MLST) é uma técnica utilizada como teste de referência por muitos autores (MOURI et al., 2014; TSUKAYAMA et al., 2013; VAN DER

AUWERA et al., 2014; ZHANG et al., 2013), a MLST é uma técnica de biologia molecular baseada na análise de sequências de genes constitutivos da célula (*housekeeping*). Através do sequenciamento do DNA da amostra, uma série de genes são analisados, onde as mutações apresentadas são usadas para tipagem. De acordo com Mouri et al. (2014), uma desvantagem MLST é a necessidade de padronização em cada laboratório, e de acordo com Auwera e Dujardin (2015), a realização de vários sequenciamentos paralelos de uma mesma amostra torna a tecnologia longa e dispendiosa.

2.4.5 Tratamento

Por se tratar de uma doença negligenciada, os tratamentos para LTA não apresentam inovações significativas.

2.4.5.1 Medicamentos Disponíveis

O **antimonial** foi a primeira droga leishmaniótica (VIANNA, 1912), e continua a ser usada como primeira escolha para tratamento da LTA até os dias atuais (ALMEIDA; SANTOS, 2011; CARVALHO, 2012). No entanto, houve mudança quanto à valência do antimonial, que primeiramente era trivalente, e atualmente é pentavalente. Existem duas variantes do antimonial de meglumina: antimoniato de N-metilglucamina e estibogluconato de sódio, sendo apenas o primeiro comercializado no Brasil (BRASIL, 2013).

As recomendações do protocolo terapêutico da LTA passaram recentemente por algumas alterações quanto ao medicamento de primeira escolha. Anteriormente, todos os pacientes eram tratados com o Sb^{+5} (antimoniato de N-metilglucamina) existindo variação na concentração e tempo de tratamento de acordo com o quadro clínico apresentado pelo paciente. Entretanto, no “Manual de Vigilância Epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar Americana” publicado em 2017, manteve-se as recomendações para paciente com LTL (15mg/ Sb^{+5} /Kg por 20 dias; não havendo cura clínica, o tratamento é prolongado por mais 30 dias), LCM e LTDs (20mg/ Sb^{+5} /Kg por 30 dias) (BRASIL, 2013, 2017). Pacientes com LTL causada por *L. (V.) guyanensis* e LTDf devem ser tratados primeiramente com o Isiotionato de Pentamidina, uma vez que foi observada resistência ao antimoniato por estas espécies (BRASIL, 2017).

O mecanismo de ação do Sb^{+5} interfere na produção bioenergética das amastigotas de *Leishmania*, inibindo a glicólise e oxidação de ácidos graxos (BRASIL, 2013). As principais

desvantagens da utilização do Sb^{+5} ocorrem pela resistência da *L. (L.) amazonensis* ao tratamento, efeitos adversos como náuseas, vômitos, dores musculares e articulares, além de possíveis alterações eletrocardiográfica, hepática e renal, portanto, existe contra-indicação para pessoas com idade superior a 50 anos, com disfunção cardíaca, renal, hepática e pancreática (ALMEIDA; SANTOS, 2011; BRASIL, 2013, 2017; SANTOS et al., 2008).

Diante da toxicidade da droga, tratamento prolongado e restrições para determinados pacientes, maneiras alternativas da administração do Sb^{+5} são utilizadas, como infiltração local (intralesional) do medicamento, doses muito baixas ou muito altas (AMATO et al., 1998; BRASIL, 2013; LIMA et al., 2007). Duque et al. (2016) padronizaram o uso do Sb^{+5} (antimoniato de metilglucamina) para infiltração local, sendo 1-5 infiltrações intradérmicas de 1-5 mL do antimoniató a cada 3-7 dias. Interessantemente, um estudo feito por Wortmann et al. (2002) mostrou que dosagens convencionais do Estibogluconato de sódio durante dez dias apresentaram eficácia igual, porém com menos efeitos colaterais quando comparado com a posologia por 20 dias.

A **Anfotericina B** é um antibiótico, utilizado como primeira escolha para o tratamento da LTA em gestantes, e de segunda escolha quando não houver sucesso na resposta ao Sb^{+5} , por exemplo, na forma disseminada que responde pobremente ao antimoniató (CARVALHO, 2012) e difusa que apresenta resistência ao tratamento. A droga atua com toxicidade seletiva na membrana citoplasmática da *Leishmania*, por interferência no esterol ergosterol (BRASIL, 2013). Segundo Almeida e Santos (2011), apesar da Anfotericina B ser a segunda opção para tratamento da LTA, estudos randomizados para diferentes protocolos terapêuticos com a droga, são necessários.

As **Pentaminas** são diamidinas aromáticas, usadas nas formulações Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroximetil-Sulfonato) para tratamento de segunda escolha na LT na América, Ásia e África (BRASIL, 2013). Devido à ação da droga estar relacionada com o metabolismo da glicose, com citólise das células Beta, das ilhotas de Langerhans no pâncreas responsáveis pela produção de insulina; o paciente precisa ser bem orientado quanto à alimentação durante o período de tratamento, uma vez que o mecanismo de ação da droga pode favorecer o surgimento de *diabetes* insulino-dependente (BRASIL, 2013).

Apesar dos riscos inerentes ao tratamento com as Pentamidinas, no estado do Amazonas, pacientes com LTA associada a *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* tem apresentado cura clínica através do uso da droga, uma vez que os insucessos do tratamento de primeira escolha para estas espécies são frequentes (COSTA et al., 2009a). No Suriname,

onde a *L. (V.) guyanensis* é a principal espécie, a Isotionato de Pentamidina é a droga de primeira escolha (MANS et al., 2016). Meide et al. (2009) avaliaram o uso do Isotionato de Pentamidina em pacientes do Suriname, e concluíram que é necessária reformulação no esquema de administração para conseguir um maior número de pacientes que concluam o tratamento, uma vez que a duração prolongada da conduta terapêutica atual e o desconforto da via de administração são os principais motivos de descontinuação ou desistência ao tratamento.

A subforma recidiva cútis responde pouco ou não responde ao tratamento com Sb^{+5} e até mesmo com a Anfotericina B e Pentamidinas (COSTA et al., 2009a).

2.4.5.2 Medicamentos Alternativos

Diante do exposto, claramente nota-se a necessidade de desenvolvimento e avaliações de novas drogas para a LT, uma vez que existem muitas complicações com a administração dos medicamentos disponíveis (resistência por algumas espécies, efeitos adversos, alto custo e longo período de tratamento). Embora a doença esteja em situação desprivilegiada, negligenciada, predominante em países em desenvolvimento, os quais não apresentam recursos suficientes para investimento, enfatizando o desenvolvimento de novas drogas ou melhoramento das convencionais, muitos pesquisadores estão na busca por drogas mais eficazes, com baixo custo e que causem menos reações desconfortantes ao paciente.

Compostos alternativos vêm sendo usados para o tratamento da LTA, dentre eles estão associações do antimoniato com a pentoxifilina, alopurinol, sulfato de aminiosidina, sulfato de paramomicina ou imunoterápicos. No entanto, tais associações ocorrem dentro da prática médica, não havendo documentação de ensaios clínicos controlados (BRASIL, 2013).

Pentoxifilina tem ação vasodilatadora e inibitória sobre o TNF. Na pesquisa realizada por Machado et al. (2007) em pacientes com LM tratados com a Pentoxifilina, observou-se maior eficácia na cicatrização das lesões em comparação com o Sb^{+5} isoladamente. Os efeitos colaterais foram náuseas, artralgia, tontura, dor abdominal e diarreia (ALMEIDA; SANTO, 2011; MACHADO et al., 2007). A Organização Pan-Americana de Saúde recomenda o uso da Pentoxifilina (comprimido) como coadjuvante no tratamento da LTA em associação com o Sb^{+5} , mas não como tratamento isolado (BRASIL, 2017).

A **Paromomicina**, um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas da bactéria *Streptomyces rimosus*, foi avaliada por Santos et al. (2008) em solução hidrofílica para uso tópico em 15 pacientes com a forma cutânea localizada, e mostrou-se eficiente quando

comparado ao uso do Sb^{+5} , principalmente em relação aos efeitos adversos. No entanto, os autores incentivam novos estudos, principalmente, relacionados com as diferentes espécies, uma vez que o estudo foi realizado com indivíduos infectados por *L. (V.) braziliensis*.

O **Alopurinol** é oficialmente usado para prevenir crises de gota e outras condições associadas com o excesso de ácido úrico no corpo, por ser um inibidor enzimático (ALOPURINOL, 2014). A droga se mostrou eficaz na inibição do crescimento de *Leishmania* spp. *in vitro* (MARTINEZ; MARR, 1992). Em pacientes humanos Saenz et al. (1989) conseguiram resultados satisfatórios na administração da droga. Entretanto, Amato et al. (1998) relataram um caso de paciente cardiopata e com indicativo de *Diabetes mellitus* tratado com o Alopurinol, no entanto, não foi obtida cura, mesmo com administração por longo período.

Outra droga que tem apresentado bons resultados, especialmente para a espécie *L. (V.) guyanensis*, é a **Miltefosine**, um alquil-fosfolípido utilizado como medicamento antineoplásico. Embora seja muito tóxica às formas promastigotas da *Leishmania*, sua ação sobre as amastigotas está relacionada com seus efeitos sobre os macrófagos e linfócitos T (ALMEIDA; SANTOS, 2011). O principal estudo sobre essa droga foi realizado por Soto et al. (2004), utilizando a droga por via oral obtendo maior taxa de cura (91%) em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*; para pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) mexicana* a taxa de cura foi baixa (54%). Com relação a efeitos adversos, o medicamento causa náuseas, vômitos e aumento dos níveis de creatinina (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

Um estudo apresentado por Machado-Pinto et al. (2002) com 102 pacientes, utilizou combinações de baixas dosagens do Sb^{+5} (8,5mg/Kg) com extrato de promastigotas mortas de *L. (L.) amazonensis* como o **imunoterápico** durante dez dias, intercalados com dez dias de descanso, durante três a quatro semanas. Os autores relatam 100% de cura clínica para os pacientes tratados por quatro semanas, enquanto o grupo placebo demonstrou 8,2% de cura clínica. A única reação adversa observada foi a dor no local da aplicação.

Imiquimod, medicamento usado para tratamento de verrugas genitais (BULA IMIQUIMOD) que estimula a resposta Th1, aumentando a produção de TNF- α , IFN- γ e IL-12, apresenta atividade leishmanicida por estimular o macrófago a produzir óxido nítrico (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999; KAPSENBERG, 2003). Em uso tópico, a Imiquimod em conjunto com o Sb^{+5} promoveu cura clínica em 50%, 61% e 72% dos pacientes tratados durante um, dois e três meses, respectivamente (MIRANDA-VERÁSTEGUI et al., 2005), sendo estes resultados superiores quando comparado ao Sb^{+5} isoladamente com 15%, 25% e

35%, respectivamente. Os efeitos adversos relatados foram edema, prurido, queimadura, eritema e dor.

Alguns azóis antifúngicos como o cetoconazol, fluconazol e itraconazol já estão sendo utilizados para tratamento de LV e LT, no entanto com resultados controversos (LIMA et al., 2007; MASMOUDÍ et al., 2011;).

3 JUSTIFICATIVA

Diante da relevância da identificação da espécie de *Leishmania* para escolha do tratamento adequado e determinar o prognóstico do paciente, bem como em continuidade a linha de pesquisa iniciada durante o curso de mestrado, na qual os resultados obtidos demonstraram que a qPCR, por meio da análise da T_m dos produtos amplificados, é uma ferramenta útil para o direcionamento da espécie do parasito presente na amostra em análise, foi proposto a verificação do uso da tecnologia *TaqMan probe* através de um sistema de qPCR duplex para diferenciar *Leishmania* spp. envolvidas com diferentes formas clínicas da LTA; utilizando diferentes sistemas de *primers* e sondas específicas para cada espécie alvo.

As três espécies mais prevalentes no Brasil (COUTINHO; PRIMEZ; DA-CRUZ, 2002) foram também as de interesse para este estudo. *L. (V.) braziliensis*, por ser a espécie de maior importância epidemiológica, devido sua ampla distribuição em todas as áreas onde a LTA é endêmica, além de sua importância clínica, uma vez que esta é responsável pelos casos de leishmaniose mucocutânea. *L. (V.) guyanensis*, também incriminada na forma mucocutânea, mas principalmente na LTL, tendo grande importância no Norte do país. *L. (L.) amazonensis*, responsável pela leishmaniose difusa, forma grave e rara da LTA, apresentando resistência a terapia convencional. Em 2015, ano em que a proposta de estudo foi iniciada, a espécie *L. (V.) shawi* havia sido reportada no estado de Pernambuco e, por isso, foi também analisada.

A perspectiva de utilização de qPCR duplex em serviços considerados de referência, pode superar as expectativas de um diagnóstico, que além de seguro, rápido, sensível, específico, com habilidade quantitativa, ainda será capaz de caracterizar a espécie existente na amostra, o que pode ser fundamental para tratamento eficaz realizado de maneira imediata, com consequente redução de custo para saúde pública. A análise de acompanhamento, através da informação de carga parasitária e correlação com a evolução clínica em resposta ao tratamento dos pacientes, irá fornecer dados científicos que demonstrem a necessidade de realização de estudos futuros para o desenvolvimento de novos fármacos

4 PERGUNTA CONDUTORA

A utilização de ensaios de qPCR duplex, com base na tecnologia *TaqMan probe*, são aplicáveis ao diagnóstico, identificação de espécies de *Leishmania* e acompanhamento clínico-terapêutico de pacientes com LTA?

5 HIPÓTESE

A versatilidade da técnica de qPCR permite sua aplicação para o diagnóstico, identificação de espécies e acompanhamento de pacientes com LTA.

6 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade da tecnologia *TaqMan probe* para identificação de *Leishmania* spp. e correlacionar esta identificação com a evolução clínica e terapêutica dos pacientes, em áreas endêmicas para a LTA.

6.1 Objetivos específicos

- a) Desenvolver e otimizar um sistema de diagnóstico e identificação de *Leishmania* spp.
- b) Efetuar análise de concordância do sistema qPCR duplex desenvolvido com as técnicas clássicas para caracterização de espécies;
- c) Realizar caracterização do perfil dos pacientes acometidos com a LTA nas áreas estudadas;
- d) Relacionar o quadro clínico e evolução terapêutica com a espécie identificada em pacientes de áreas endêmicas para LTA.

7 MATERIAL E MÉTODOS

Serão abordados os aspectos metodológicos para realização da pesquisa.

7.1 Tipo de estudo

O estudo apresenta-se em duas etapas. Primeiro, trata-se de um estudo de avaliação de métodos diagnósticos, baseado em etapas sugeridas por Sackett e Haynes (2002), consistindo em três fases: I- Análise da reprodutibilidade do novo teste em amostras sabidamente positivas e negativas; II- Análise da sensibilidade e especificidade clínicas e analíticas do novo teste; III- Análise estatística da concordância dos resultados do novo teste com resultados de testes consagrados pela literatura em amostras de campo.

Segundo, o estudo se caracteriza como observacional analítico (ROUQUAYROL; ALMEIDA-FILHO, 2003), onde foram relacionadas variáveis de identificação etiológica com a evolução clínica-terapêutica em pacientes diagnosticados positivos para LTA.

7.2 Desenvolvimento dos sistemas baseados em PCR em tempo real

Neste tópico será descrito o desenvolvimento dos sistemas de PCR em tempo real nos seus aspectos de análise *in silico*, desenho de *primers* e sondas e definição da concentração de uso.

7.2.1 Análise *in silico* dos alvos

Com o auxílio do *software* Mega (versão 6.0), através da ferramenta ClustalW foi efetuado alinhamento múltiplo de diferentes alvos para várias espécies de *Leishmania* disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os alvos analisados foram Heat shock protein 70 – HSP70, Citocromo B, Internal Transcribed Space 1- ITS1, DNA do Kinetoplasto - kDNA, DNA ribossomal da subunidade menor - SSU rDNA, Glicose-6-Fosfato Desidrogenase - G6PD, mini-éxon, e Glicoproteína 63 - GP63. Todos os alvos foram avaliados através do *Basic Local Alignment Search Tool nucleotídeo* (BLASTn) para análise de cobertura e identidade com outros organismos.

7.2.2 Desenho dos primers e sonda

Com base nas sequências de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* foi definida a região alvo. Com o auxílio da ferramenta primer BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foram desenhados sistemas de primers e sondas capazes de diferenciar as espécies de interesse para o estudo. O desenho foi baseado na tecnologia *TaqMan probe*, de acordo com os critérios estabelecidos pelo protocolo *TaqMan Universal PCR Master Mix* (APPLIED BIOSYSTEMS, 2010). Após os desenhos dos sistemas, foi realizada a análise de similaridade dos produtos gerados através do BLASTn.

O termociclador ABI Prism 7500 (AppliedBiosystems®, CA, USA) foi utilizado para os experimentos de padronização (determinação das concentrações de uso dos primers, sondas, parâmetros de limite de detecção, eficiência e especificidade dos sistemas), em condições padrões (recomendadas pelo fabricante): desnaturação inicial (95°C / 10 minutos), 40 ciclos de anelamento e extensão (95°C / 15 segundos; 60°C / 1 minuto).

7.2.3 Teste para definição da concentração dos primers

Para definição das concentrações de uso dos primers foi utilizado como padrão 2 µl de DNA genômico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH 8), de acordo com a especificidade do sistema, contendo 50 pg/µL, 5 pg/µL e 0,5 pg/µL e, controle negativo (amostra sem DNA). Os primers foram testados nas concentrações de 2, 3 e 5 pmol/µl. O volume final da reação foi de 50 µl contendo 1 µl de cada primer, 25 µl de SYBR Green® *Universal Master Mix* (Applied Biosystems® CA, USA) e 21 µl água tipo I. Todas as amostras foram produzidas em duplicata.

A análise dos resultados deste experimento foi feita com o software ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4). Foram analisados os valores mínimos de ciclo *threshold* (Ct), para definição das concentrações de primers na reação.

7.2.4 Teste para definição de concentração da sonda

Após definição da melhor concentração de primers para uso (item 7.2.2), foi realizado experimento para definição da concentração da sonda utilizando como padrão 2 µl de DNA genômico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH 8), de acordo com a especificidade do sistema, contendo 50 pg/µL, 5 pg/µL e 0,5 pg/µL e,

controle negativo (amostra sem DNA). As sondas foram testadas nas concentrações de 0,5, 1, 1,5, 2 e 5 pmol/μl. O volume final da reação foi de 50 μl contendo 1 μl de cada *primer* na concentração previamente definida, 1 μl de sonda, 25 μl de *TaqMan*[®] *Universal Master Mix* (Applied Biosystems[®] CA, USA) e 20 μl de água tipo I. Todas as amostras foram produzidas em duplicata.

A análise dos resultados deste experimento foi feita com o *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4). Basicamente, foram efetuadas três análises: 1) Curva de amplificação, 2) Espectro e 3) Componente. Foram analisados os valores mínimos de *Ct*, para definição da melhor concentração de uso das sondas na reação.

7.2.5 Testes individuais para cada sistema (Uniplex)

Após a escolha das melhores concentrações de *primers* e sondas, foram realizados testes para determinação do limite de detecção (sensibilidade analítica), eficiência e especificidade dos sistemas selecionados. As condições experimentais foram às mesmas definidas após realização dos itens 7.2.3 e 7.2.4.

Os parâmetros foram determinados para cada sistema individualmente.

Para determinação do limite de detecção foram efetuadas diluições seriadas (fator 10) de DNA genômico de cepas de referência de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) shawi* nas concentrações de 5 ng/μl a 0,5 fg/μl. O limite de detecção dos ensaios foi definida pela amplificação da mais alta diluição do DNA alvo quando comparado à formação de dímeros de *primers* em amostras sem DNA (PAIVA-CAVALCANTI et al. 2013; TOO, 2003).

A eficiência de cada ensaio foi determinada por meio da fórmula: $\varepsilon = (10^{1/\text{slope}}) - 1$ (TOO, 2003). Onde ε significa eficiência, e *slope* o declive que mede a inclinação de uma reta face ao eixo das abcissas.

Para avaliação da especificidade foi utilizado DNA genômico de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) (Quadro 3), as quais foram cedidas pelos Serviço de Referência em Leishmaniose (SRL) e Serviço de Referência em Doença de Chagas do Laboratório de Imunoparasitologia da Fundação Oswaldo Cruz/Pernambuco (FIOCRUZ-PE). A especificidade (σ) foi definida pela equação $\sigma = (1 + \varepsilon)^{\Delta Ct}$, onde ε significa a eficiência da amplificação e ΔCt a diferença dos valores dos *Ct*s das amostras definidas como alvo e das amostras em teste (PAIVA-CAVALCANTI et al. 2013; TOO, 2003).

Quadro 3- Isolados de *Leishmania* spp. e *T. cruzi* utilizados para determinação da especificidade dos sistemas de qPCR desenvolvidos para detecção de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e *L. (L.) amazonensis*.

Espécies	Código OMS
<i>L. donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
<i>L. infantum</i>	MHOM/TN/1980/IPT1
<i>L. amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH 8
<i>L. mexicana</i>	MHOM/BZ/1982/BEL 21
<i>L. guyanensis</i>	MHOM/BR/1975/M4147
<i>L. braziliensis</i>	MHOM/BR/1975/M2903
<i>L. shawi</i>	IWHI/BR/1999/M17904
<i>T. cruzi</i>	Cepa Y

Fonte: A autora.

7.2.6 Composição da qPCR-duplex

Após a padronização individual de cada conjunto de *primers* e sondas, ambos foram combinados para confecção da reação em duplex. Foram mantidas as condições definidas para os sistemas individualmente, sendo 50 µl de volume final contendo, 2 µL de cada DNA alvo (ou 4 µL de DNA da amostra), 1 µL de cada *primer* e sonda na concentração previamente definida, 25 µl de *TaqMan*[®] *Universal Master Mix* (Applied Biosystems[®] CA, USA) e 15 µl água tipo I.

As condições de ciclagem não foram alteradas. O limite de detecção, especificidade e eficiência do ensaio duplex foram determinadas de acordo com o item 7.2.4. Em todos os experimentos foram incluídos controle negativo (amostras sem DNA) e amostras em duplicatas.

7.2.7 Avaliação da reprodutibilidade

Para avaliação da reprodutibilidade do sistema qPCR duplex, foi efetuada a análise intra e inter-ensaio de acordo com Pessoa-e-Silva et al. (2016). Para tanto, após a padronização, as amostras sabidamente positivas e negativas foram processadas em duplicata em cada experimento. O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi calculado por sistema, a partir dos valores de Ct de cada duplicata em quatro concentrações da curva de amplificação (50fg/µL, 0,5 pg/µL, 5 pg/µL e 50 pg/µL). Para o CV inter-ensaio foi calculado por sistema, através da média dos valores de Ct obtidos entre as duplicatas nas mesmas quatro concentrações da curva de amplificação comparados em três experimentos independentes. O CV é a razão do desvio-padrão pela média dos Cts das amostras testadas, sendo convertido

para percentual. Estes cálculos foram realizados com o auxílio da calculadora estatística (<https://pt.numberempire.com/statisticscalculator.php>).

7.3 Amostragem

Foi adotada uma amostragem de conveniência (REIS, 2003) de acordo com as atividades da Fundação de Medicina Tropical - Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), no estado do Amazonas, e SRL-FIOCRUZ Pernambuco, além de busca ativa através de parcerias realizadas com a Secretaria de Saúde dos municípios pernambucanos de Igarassu e Cabo de Santo Agostinho.

Todos os pacientes, após explicação e esclarecimentos sobre a pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, bem como tiveram seus registros de dados clínicos na ficha individual (APÊNDICE A), bem como a conduta terapêutica estabelecida e sua evolução. Foram considerados casos e inclusos no estudo, pacientes que apresentaram histórico clínico e epidemiológico compatíveis com LTA e um ou mais testes diagnósticos positivos, os quais foram realizados de acordo com a rotina da FMT-HVD e SRL-FIOCRUZ/PE. Não foram considerados casos, pacientes que apresentaram histórico clínico e epidemiológico compatível com LTA e todos os exames negativos.

7.4 Coleta de material biológico

Foram obtidas amostras de sangue, biópsia e *imprint* de lesão para diagnóstico molecular, e amostras de biópsia ou aspirado de lesão para isolamento do parasito para diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* pelo padrão-ouro (MLEE).

7.4.1 Sangue

Após antissepsia com algodão embebido em álcool etílico 70%, foram coletados de 2 - 5 mL de sangue periférico, com auxílio de uma seringa estéril de 5 mL acoplada a uma agulha hipodérmica descartável estéril 25x7 mm. O material foi armazenado em tubo contendo solução anticoagulante (EDTA 0,009 g/5 mL de sangue) e estocado em freezer a -20°C para posterior extração de DNA.

7.4.2 Coleta da lesão

Antes de qualquer procedimento foi realizada a limpeza da lesão com soro fisiológico (0,9%) e gases estéreis.

Com o auxílio de uma lanceta descartável, foi realizada a escarificação da borda da lesão. Com o material obtido foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro. Antes do curativo, foi colocado sobre a região escarificada um papel de filtro esterilizado, o qual absorvia o exsudato da lesão. Para extração de DNA do papel de filtro foi padronizado o recorte de 1 cm², o qual era retalhado em tamanhos menores e estocado em tubos microcentrífugos à -20°C para posterior extração de DNA.

Após anestesia local utilizando 0,3 mL de cloridrato de lidocaína (2%), foi realizada biópsia de lesão com auxílio de Punch 4 mm e o fragmento de tecido foi colocado em soro fisiológico contendo gentamicina 10% por no mínimo 3 horas e no máximo 24 horas; em seguida uma fração foi direcionada ao cultivo e outra à extração de DNA.

Nos casos de impossibilidade da realização de biópsia, foi realizado aspirado da lesão. Inicialmente, com o auxílio de uma seringa de 60mL, o ar do tubo de ensaio (contendo meio de cultura NNN e antibiótico gentamicina 1%) foi retirado para formação de vácuo. Utilizando suporte para coleta à vácuo e agulha 25x7 mm, a mesma era inserida na lesão e o tubo de ensaio contendo vácuo, foi acoplado ao suporte, realizando a aspiração da lesão.

7.5 Extração de DNA e controle endógeno

Para extração de DNA das amostras de sangue, *imprint* e biópsia foi utilizado o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi mantido em freezer à -20°C para posterior análise molecular (PCRc, PCR em tempo real e sequenciamento).

Para controle endógeno das amostras, foi realizada PCR convencional utilizando o alvo G3PD, conforme desenvolvido por Gonçalves et al. (2012). A amplificação do produto foi visualizada por eletroforese em gel de agarose corada com brometo de etídio.

7.6 Testes diagnósticos

Como mencionado anteriormente, os testes diagnósticos foram realizados através da rotina do serviço de saúde, no qual o paciente foi atendido.

7.6.1 Diagnóstico parasitológico

Abaixo estão descritos os exames parasitológicos realizados nesta pesquisa.

7.6.1.1 Pesquisa direta

As lâminas de vidro preparadas com o material obtido na escarificação (item 7.4.2), foram coradas utilizando o Panótico (kit Instant-Prov) de acordo com as instruções do fabricante (NEWPROV, 2017), no qual a lâmina com o material é imersa no fixador por um minuto, solução reveladora por um minuto e em seguida no corante por dois minutos. Após lavagem com água corrente, óleo de imersão é colocado sobre o material, o qual é analisado através da objetiva de 100x em microscópio óptico. A visualização de formas amastigotas determina a positividade da amostra (BRASIL, 2013).

7.6.1.2 Isolamento do parasito (cultura)

O material obtido a partir da biópsia e aspirado de lesão foi inserido em tubo de ensaio contendo 2,5 mL de meio NNN ágar-sangue e 0,3 mL de soro fisiológico (0,9%) contendo gentamicina à 1%; e armazenados à 25°C em estufa incubadora. Com o auxílio do microscópio invertido, a cultura foi analisada em dias alternados por até quatro semanas (BRASIL, 2013).

7.6.2 Diagnóstico molecular

Abaixo estão descritos os testes moleculares realizados nesta pesquisa.

7.6.2.1 PCR convencional

O DNA extraído da biópsia foi testado na PCR convencional através dos *primers* desenvolvido por Bruijn e Backer (1992). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 1,5% e corado com brometo de etídio.

7.6.2.2 qPCR-kDNA

O DNA extraído de sangue e *imprint* foi testado na qPCR através do sistema kDNA1 desenvolvido por Paiva-Cavalcanti et al. (2013) para diagnóstico complementar e quantificação da carga parasitária, tendo em vista a capacidade de detecção de até 0,1 fg de DNA do parasito.

7.6.3 Testes diagnósticos realizados pelo SRL

O SRL obtém o diagnóstico de suas amostras através de testes parasitológicos, como a pesquisa direta (item 7.6.1.1), e isolamento do parasito através da cultura (item 7.6.1.2); além da realização de testes moleculares (PCR convencional e qPCR) (itens 7.6.2.1 e 7.6.2.2).

7.6.4 Testes diagnósticos realizados pela FMT-HDV

A FMT-HDV utiliza a pesquisa direta (item 7.6.1.1), como teste diagnóstico de rotina; entretanto, à critério médico é feito o isolamento do parasito através da cultura (item 7.6.1.2).

7.6.5 Testes diagnósticos realizados pelas Secretarias Municipais de Saúde de Igarassu e Cabo de Santo Agostinho

As Secretarias Municipais de Saúde de Igarassu e Cabo de Santo Agostinho utilizam a pesquisa direta (item 7.6.1.1), como teste diagnóstico de rotina.

7.7 Testes para caracterização de *Leishmania* spp. das amostras

Abaixo segue as técnicas utilizadas nesta pesquisa para identificar a espécie de *Leishmania* presente nas amostras biológicas.

7.7.1 qPCR duplex

As amostras de DNA oriundas de sangue, biópsia e *imprint* de lesão foram submetidos a identificação da espécie parasitária conforme a padronização do sistema qPCR duplex desenvolvida (item 7.2).

7.7.2 Caracterização isoenzimática (MLEE)

Isolados parasitários viáveis em cultura primária, obtidos a partir das amostras de biópsias ou aspirados de lesão, foram repicados para novos tubos individuais com meio NNN ágar-sangue e posteriormente encaminhados para caracterização isoenzimática na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC-RJ).

Os isolados obtidos foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% para dois locus enzimáticos: Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). Os isolados foram comparados com cepas de referência como descrito por Cupolillo et al. (1995), Cupolillo; Grimaldi; Momen (1994) e Brito et al. (2009).

7.7.3 PCR convencional e Sequenciamento

As amostras que apresentaram impossibilidade de realizar a caracterização pelo método de isoenzimas (MLEE) foram sequenciadas.

Para obtenção de sequência viáveis, foi realizada uma PCR convencional (PCRc) utilizando os *primers* Fme e Rme desenvolvido por Marfurt et al. (2003), cujo o alvo é o mini-exon de espécies de *Leishmania*. A reação teve volume final de 25µL, composta por 15,75 µL de água tipo I, 2,5 µL PCR Buffer 10x, 0,75 µL MgCl (50mM), 0,15 µL de cada *primer* (50pmol/µL), 0,5 µL dNTPs (2mM), 0,2 µL Taq DNA polimerase e 5 µL de DNA da amostra. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 94°C 5 min; 35 ciclos de desnaturação 94°C 30s, anelamento 55°C 15s e extensão 72°C 10s; extensão final 72°C 5min. A amplificação do produto foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio/*Sybr safe*.

Para identificação da espécie de amostras positivas para o LaS, foi uma PCRc com o alvo HSP70, utilizando o sistema de *primers* Hsp70C desenvolvidos por Graça et al. (2012). A reação teve volume final de 50µL, composta por 24,7 µL de água tipo I, 10 µL PCR Buffer 10x, 5 µL MgCl (50mM), 1 µL de cada *primer* (10pmol/µL), 5 µL dNTPs (2mM), 0,3 µL Taq

DNA polimerase e 3 µL de DNA da amostra. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 94°C 5 min; 35 ciclos de desnaturação 94°C 30s, anelamento 62°C 30s e extensão 72°C 1 min; extensão final 72°C 10 min. A amplificação do produto foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio/*Sybr safe*.

Os *amplicons* obtidos após as PCRc foram purificados usando o PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo kit (Invitrogen, Life Technologies) seguindo as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram encaminhados ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães (NPT-IAM) para realização do sequenciamento, utilizando BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (versão 3.1) (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (ABI 3500xL Genetic Analyzer). As sequências foram determinadas em ambas as direções, utilizando o *primer forward* e *reverse*. A edição das sequências e formação dos contigs foram realizados através do Programa BioEdit Sequence Alignment Editor, em seguida foram submetidas ao NCBI - BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para análise de similaridade.

7.8 Acompanhamento clínico-terapêutico dos pacientes

Os pacientes definidos como “casos” (item 7.3) tiveram uma amostra de sangue coletada antes do início do tratamento. Dos pacientes que deram seguimento ao tratamento, durante o acompanhamento pelo médico assistente foi efetuada nova avaliação e coleta de sangue para determinação da carga parasitária e associação da evolução clínico-terapêutica com a espécie de *Leishmania* identificada. O tempo de retorno para avaliação do tratamento foi estabelecido conforme a rotina de cada Serviço de Saúde.

De acordo com o Ministério da Saúde, critério de cura é definido pela epitelação das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema, até três meses após a conclusão do esquema terapêutico (BRASIL, 2017).

7.9 Análise dos dados

A análise, interpretação e registro dos resultados dos experimentos para avaliação dos sistemas foram efetuados com o auxílio do *software* ABI PRISM 7500 SDS (versão 1.4). Os resultados obtidos com o sistema qPCR duplex foram comparados com os testes de referência para diagnóstico e caracterização de espécies (MLEE e/ou Sequenciamento).

A sensibilidade, especificidade e eficiência dos novos ensaios foram calculadas em tabelas de contingência 2x2 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A análise estatística foi efetuada por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais. Com o auxílio do programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007), a sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia foi determinada, bem como a medida da concordância entre os novos ensaios e os testes de referência foi determinada através de ensaios duplo-cegos, sendo calculado o indicador de Kappa (k), classificando os resultados de acordo com a interpretação sugerida por Landis e Koch (1977), no qual $k = 0.0$, sem concordância; $0.0 \leq k \leq 0.20$, concordância ruim; $0.21 \leq k \leq 0.40$, concordância razoável; $0.41 \leq k \leq 0.60$, concordância moderada; $0.61 \leq k \leq 0.80$, boa concordância; and $0.81 \leq k \leq 1.00$, ótima concordância entre os testes. Os resultados foram analisados a um índice de confiabilidade de 95% ($p < 0,05$).

8 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Aggeu Magalhães e Fundação de Medicina Tropical de Manaus, parecer número 1.137.492 (Anexo A) e 1.759.541 (Anexo B), respectivamente. Todos os pacientes foram convidados a participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice C ao G).

9 RESULTADOS

Nesse tópico serão apresentados os resultados da tese.

9.1 Análise *in silico* dos alvos

A partir da análise do alinhamento múltiplo de espécies de *Leishmania* observou-se que as sequências para os alvos HSP70, Citocromo b, kDNA, e GP63, apesar de conservadas dentro de uma mesma espécie, não foram específicas para as espécies em estudo. A análise por meio do BLAST de sequências de *L. braziliensis* (Tabela 1) e *L. amazonensis* (Tabela 2) para estes alvos revelou alta cobertura e identidade com diversas espécies de *Leishmania*, inclusive as que causam a forma visceral da doença (*L. donovani* e *L. infantum*). O mini-éxon, apresentou especificidade frente a espécie *L. amazonensis*, assemelhando-se com outros alvos, entanto, quando a espécie de referência é *L. braziliensis*, é observada cobertura e identidade para *L. donovani*, *L. infantum* e *L. mexicana*, sendo capazes de comprometer o resultado.

O alvo SSU rDNA não apresentou sequência para *L. shawi*, e assim como é observado com o G6PD, ambos não apresentaram especificidade para os subgêneros e alta cobertura e identidade para espécies relacionadas com a etiologia da LV.

O alvo ITS1 apresentou sequências mais conservadas entre as espécies em estudo e também dentro das sequências disponíveis para cada espécie, com maior especificidade *in silico* para *L. braziliensis* (Tabela 1) e *L. amazonensis* (Tabela 2). Ao realizar o BLAST da sequência HG512966 de *L. braziliensis*, observou-se que houve alta cobertura e identidade com as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*; baixa cobertura com algumas espécies do subgênero *Leishmania*; e ausência de similaridade com as espécies *L. amazonensis*, *L. major* e *T. cruzi* (Tabela 1). O BLAST da sequência HG512933 de *L. amazonensis* demonstrou alta cobertura e identidade com espécies do subgênero *Leishmania*; e similaridade inexistente, com espécies do subgênero *Viannia*, o que tornou o alvo promissor para o objetivo do estudo. Sendo assim, o alvo ITS1 apresenta a possibilidade de distinção entre o subgênero *Viannia* (*L. braziliensis* e *L. guyanensis*) e a espécie *L. (L.) amazonensis* (Tabela 2). Por estes motivos o ITS1 foi o alvo escolhido para desenvolvimento dos sistemas.

Tabela 1- Cobertura e Identidade de *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* comparadas com sequências de *Leishmania braziliensis* para diferentes alvos moleculares através do BLASTn.

ESPÉCIE	ALVO							
	ITS1	Citocromo b	Hsp70	G6PD	GP63	kDNA	SSU rDNA	Mini-éxon
	HG512966*	EF579910*	AF291716*	EU053097*	AJ8510178*	U19809*	AB434682*	MG010484.1*
	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade
<i>Leishmania braziliensis</i>	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100%/100%
<i>Leishmania guyanensis</i>	100% / 99%	100% / 89%	53% / 94%	100% / 99%	100% / 92%	100% / 99%	-	100%/97%
<i>Leishmania shawi</i>	98% / 98%	100% / 90%	-	40% / 99%	-	100% / 99%	-	-
<i>Leishmania panamensis</i>	100% / 99%	100% / 89%	77% / 93%	40% / 98%	100% / 90%	100% / 99%	98% / 99%	100%/96%
<i>Leishmania naïffi</i>	100% / 95%	92% / 89%	53% / 94%	99% / 99%	-	75% / 98%	-	96%/89%
<i>Leishmania peruviana</i>	100% / 99%	92% / 89%	53% / 94%	99% / 99%	99% / 94%	75% / 99%	-	100%/99%
<i>Leishmania lainsoni</i>	100% / 95%	92% / 88%	53% / 94%	100% / 98%	-	75% / 97%	-	-
<i>Leishmania mexicana</i>	29% / 99%	99% / 96%	77% / 92%	96% / 86%	100% / 80%	99% / 90%	98% / 85%	55%/95%
<i>Leishmania infantum</i>	29% / 99%	100% / 92%	77% / 97%	99% / 86%	100% / 81%	-	-	60%/92%
<i>Leishmania donovani</i>	29% / 99%	100% / 92%	77% / 92%	93% / 87%	100% / 80%	-	98% / 85%	60%/92%
<i>Leishmania tropica</i>	29% / 99%	100% / 99%	77% / 92%	99% / 86%	100% / 80%	99% / 90%	-	-
<i>Leishmania amazonensis</i>	-	100% / 91%	75% / 92%	96% / 86%	100% / 79%	99% / 90%	85% / 86%	-
<i>Leishmania major</i>	-	100% / 94%	77% / 93%	99% / 86%	100% / 81%	99% / 89%	98% / 83%	60%/89%
<i>Trypanosoma cruzi</i>	-	99% / 84%	73% / 87%	-	-	100% / 83%	-	-

Fonte: A autora a partir do *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*.

Legenda: *Sequência de *Leishmania braziliensis* disponível no GenBank utilizada como parâmetro no BLASTn.

Tabela 2- Cobertura e Identidade de *Leishmania* spp. comparadas com sequências de *Leishmania amazonensis* para diferentes alvos moleculares através do BLASTn.

ESPÉCIE	ALVO						
	ITS1	Citocromo b	Hsp70	GP63	kDNA	SSU rDNA	Mini-éxon
	HG512933*	EF579909*	HF586354*	L46798*	AB095964*	HQ895862*	L05395.1*
	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade	cobertura / identidade
<i>Leishmania amazonensis</i>	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100% / 100%	100%/100%
<i>Leishmania mexicana</i>	100% / 99%	100% / 99%	100% / 99%	99% / 95%	100% / 99%	100% / 100%	100%/84%
<i>Leishmania donovani</i>	100% / 83%	100% / 90%	100% / 98%	95% / 87%	100% / 91%	100% / 99%	85%/94%
<i>Leishmania tropica</i>	100% / 82%	100% / 91%	100% / 97%	83% / 85%	100% / 91%	100% / 99%	-
<i>Leishmania infantum</i>	100% / 82%	100% / 90%	100% / 97%	96% / 87%	100% / 91%	100% / 99%	61%/92%
<i>Leishmania major</i>	-	99% / 90%	100% / 97%	99% / 87%	100% / 91%	100% / 99%	39%/86%
<i>Leishmania guyanensis</i>	-	-	-	72% / 82%	99% / 90%	100% / 100%	-
<i>Leishmania braziliensis</i>	-	-	-	92% / 82%	99% / 90%	100% / 99%	-
<i>Leishmania panamensis</i>	-	-	-	72% / 82%	99% / 90%	100%/99%	-

Fonte: A autora a partir do *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*.

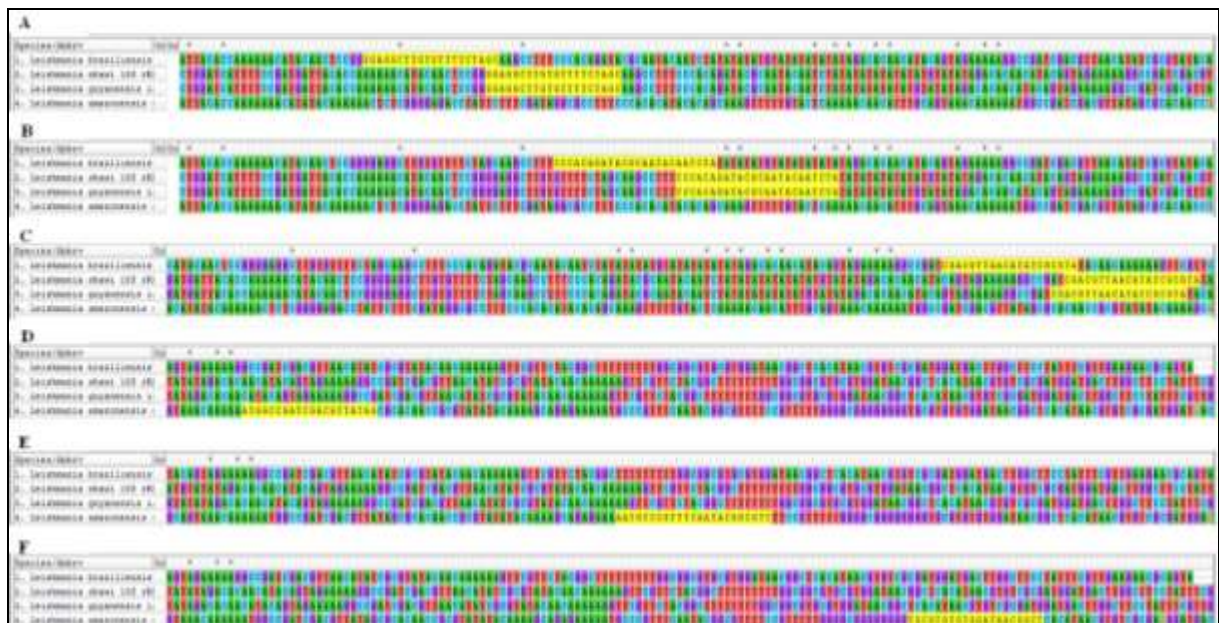
Legenda: *Sequência de *Leishmania amazonensis* disponível no GenBank utilizada como parâmetro no BLASTn.

9.2 Desenho dos *primers* e sondas

Para formação do Sistema Subgênero *Viannia* (SVS) foram desenhados quatro *primers forward* (SVF1, SVF2, SVF3 e SVF4), um *primer reverse* (SVR) e uma sonda (SVP). Também foram desenhados um conjunto de *primers* (LaF e LaR) e uma sonda (LaP) específicos para a espécie *L. amazonensis*, compondo assim, o Sistema *Leishmania amazonensis* (LaS).

Os produtos resultantes da análise *in silico* demonstraram número de pares de bases (pb), distintos para as espécies. *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi* e *L. amazonensis* obtendo 117, 119, 121 e 116 pb, respectivamente. Ainda nesta análise, os produtos não apresentaram similaridade com outros organismos. Assim, os *primers* e as sondas foram encaminhados para síntese (Figura 12).

Figura 12- Alinhamento das sequências de *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania shawi* e *Leishmania amazonensis* utilizados para desenho dos sistemas de qPCR utilizando a tecnologia *TaqMan probe*.



Fonte: A autora.

Legenda: Em destaque Sistema Subgênero *Viannia* e Sistema *Leishmania amazonensis*. A: *Primer Forward* SVF4 posicionado da base 28-47 de *L. braziliensis* (HG512966), 46-65 de *L. shawi* (FN398328.1) e 46-65 de *L. guyanensis* (FJ753387.1). B: Sonda PSV posicionada da base 56-79 de *L. braziliensis* (HG512966), 74-97 de *L. shawi* (FN398328.1) e 74-97 de *L. guyanensis* (FJ753387.1); C: *Primer Reverse* SVR posicionado da base 129-148 de *L. braziliensis* (HG512966), 147-166 de *L. shawi* (FN398328.1) e 145-164 de *L. guyanensis* (FJ753387.1); D: *Primer Forward* LaF posicionado da base 123-142 de *L. amazonensis* (HG512933); E: Sonda LaP posicionada da base 175-197 de *L. amazonensis* (HG512933); F: *Primer Reverse* LaR posicionado da base 221-240 de *L. amazonensis* (HG512933);. Roxo: Guanina (G). Verde: Adenina (A). Azul: Citosina (C). Vermelho: Timina (T).

9.3 Teste para definição da concentração dos *primers* e sondas

Por apresentar melhor reprodutibilidade e *Ct* reduzido quando comparado às outras concentrações testadas, foram definidas para o sistema SVS 5,0 pmol/μL para os *primers* e sonda; e 2,0 pmol/μL para os *primers* e sonda do sistema LaS. O *primer* SVF4 foi escolhido para o estudo, devido à amplificação com *Ct* mais baixo em relação aos demais (Quadro 4).

Quadro 4- Concentrações de uso dos *primers* e sondas desenhados com o auxílio da ferramenta *Primer Blast* para identificação de *Leishmania* spp.

Sistema	<i>Primers</i> e Sondas	C/G*	T _m **	[]*** pmol/μl
Subgênero <i>Viannia</i> (SVS)	SVF4 5' GGAGGCTTGTGTTTTCTAGC 3'	50%	60°C	5,0
	SVR 5' CGACGTTAACATATCGCGTA 3'	45%	58°C	5,0
	PSV FAM [∞] 5' CCCACAGATACGCAATACAATCTA 3'	42%	68°C	5,0
<i>Leishmania amazonensis</i> (LaS)	LaF 5' ATGGCCGATCGACGTTATAG 3'	50%	60°C	2,0
	LaR 5' TGCGTGTGTGGATAACGGCT 3'	55%	62°C	2,0
	PLa VIC [∞] 5' AATGCCCGTTTCAATACGGCGTT 3'	48%	68°C	2,0

Fonte: A autora.

Legenda: *Porcentagem de Citosina/Guanina; **Temperatura de *Melting*; ***Concentração; [∞]Fluoróforos.

9.4 Testes individuais para cada sistema (Uniplex)

O limite de detecção foi definido individualmente para as espécies, sendo detectável até 50 fg/μL, para as espécies do SVS e 5 fg/μL para o LaS. Observando o parâmetro de curva padrão obtivemos as eficiências dos sistemas por espécie (Tabela 3).

Quanto à especificidade, o SVS apresentou 100% de especificidade, como já foi observado na abordagem *in silico*. Enquanto o LaS, obteve cruzamento com as espécies *L. (L.) mexicana* em concentrações de até 50 pg/μL e *T. cruzi* na concentração de 5 ng/μL. Desta forma, foi aplicado o cálculo de especificidade (TOO, 2003). Os resultados obtidos demonstraram que o sistema LaS é 10^{3,5} vezes mais específico para a espécie *L. amazonensis* do que para a espécie *L. mexicana*, e 10⁵ vezes mais específico para a espécie *L. amazonensis* do que para *T. cruzi* (Tabela 3). Em nenhum dos sistemas ocorreu amplificação do controle negativo (NTC).

Tabela 3- Resultados dos parâmetros de padronização por sistema (uniplex) diagnóstico desenvolvido.

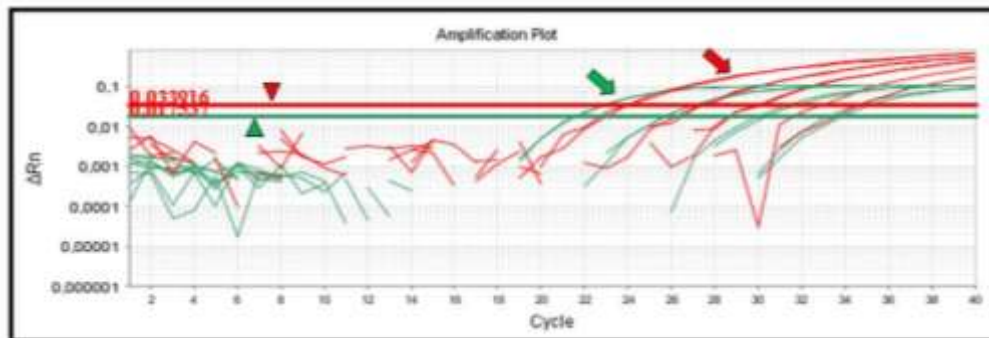
Sistema	Espécie	Limite de detecção	Eficiência (ϵ)	Especificidade ($\log \sigma$)
Subgênero Viannia (SVS)	<i>Leishmania braziliensis</i>	50 fg/ μ L	91,2%	-
	<i>Leishmania guyanensis</i>	0,5 pg/ μ L	89,8%	-
	<i>Leishmania shawi</i>	5 pg/ μ L	90,6%	-
Leishmania amazonensis (LaS)	<i>Leishmania amazonensis</i>	5,0 fg/ μ L	97,43%	-
	<i>Leishmania mexicana</i>	50 pg/ μ L	-	3,5
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	5,0 ng/ μ L	-	5

Fonte: A autora.

9.5 Combinação dos sistemas: qPCR-duplex

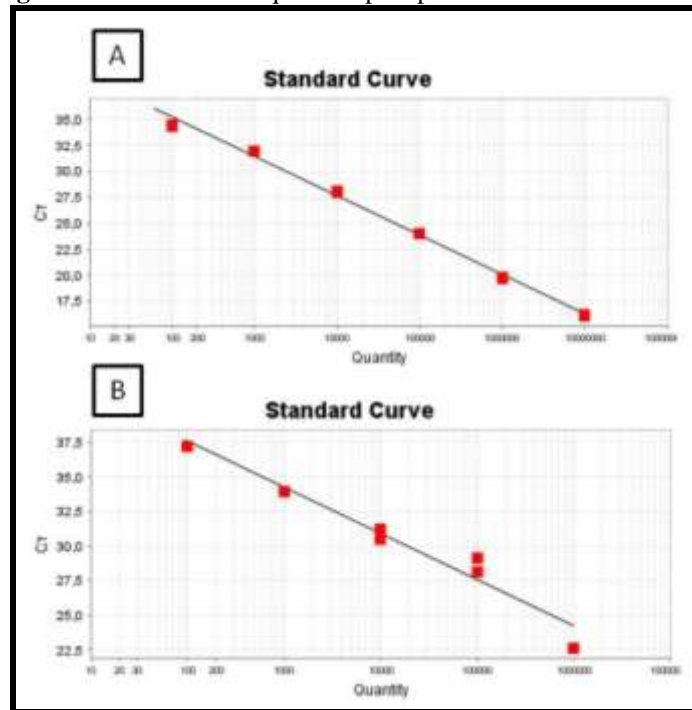
A qPCR duplex foi formada a partir da combinação dos sistemas SVS e LaS nas mesmas condições produzidas para cada sistema individualmente. Os limites de detecção e eficiência por espécie na reação duplex são apresentados na Tabela 4, Figuras 13 e 14.

A reação duplex não apresentou reação cruzada para as espécies testadas.

Figura 13- Curva de amplificação da reação qPCR-duplex para os sistemas SVS e LaS.

Fonte: A autora a partir do software ABI Prism 7500 (Applied Biosystems®, CA, USA).

Legenda: SVS – Sistema Subgênero *Viannia*; LaS – Sistema *Leishmania amazonensis*. Seta vermelha – amplificação de DNA genômico de *Leishmania amazonensis* nas concentrações de 0,5 ng/ μ L a 0,5 pg/ μ L; Seta verde – amplificação de DNA genômico de *Leishmania braziliensis*; nas concentrações de 0,5 ng/ μ L a 0,5 pg/ μ L; Cabeça de seta vermelha- *Threshold* do SVS; Cabeça de seta verde- *Threshold* do LaS.

Figura 14- Eficiência da qPCR-duplex para os sistemas SVS e LaS.

Fonte: A autora a partir do software ABI Prism 7500 (Applied Biosystems®, CA, USA).

Legenda: A: *Leishmania braziliensis* (eficiência 93,24%) B: *Leishmania amazonensis* (eficiência 89,30%).

Tabela 4- Resultados dos parâmetros de padronização da reação qPCR-duplex por espécie.

Método diagnóstico	Espécie	Limite de detecção	Eficiência média (ε)	Condições de ciclagem
qPCR-duplex (SVS/LaS)	<i>Leishmania braziliensis</i>	50 fg/μL	93,24%	95°C / 10 min 40 ciclos: 95°C / 15s 60°C / 1 min
	<i>Leishmania guyanensis</i>	0,5 pg/μL	93,61%	
	<i>Leishmania shawi</i>	5 pg/μL	89,69%	
	<i>Leishmania amazonensis</i>	5,0 fg/μL	89,30%	

Fonte: A autora.

Legenda: SVS – Sistema Subgênero *Viannia*; LaS – Sistema *Leishmania amazonensis*.

A análise de reprodutibilidade através do CV intra-ensaio para o SVS foi de 0,04% (50fg/μL), 0,43% (0,5 pg/μL), 0,07% (5 pg/μL) e 0,39% (50 pg/μL). Para o LaS o CV foi de 2,48% (50fg/μL), 0,20% (0,5 pg/μL), 1,38% (5 pg/μL) e 0,08% (50 pg/μL). O CV inter-ensaio obtido foi de 1,32% (50fg/μL), 0,38% (0,5 pg/μL), 0,54% (5 pg/μL) e 1,42% (50 pg/μL). Para o LaS o CV foi de 0,99% (50fg/μL), 0,45% (0,5 pg/μL), 0,37% (5 pg/μL) e 1,35% (50 pg/μL). Diante dos valores expostos, os dados apresentaram uma baixa dispersão (homogêneos).

9.6 Caracterização dos pacientes

Um total de 236 pacientes participou do estudo, sendo 127 do Amazonas (AM) e 109 de Pernambuco (PE). Do AM 31 eram do sexo feminino e 96 do sexo masculino. De PE 41 e 68 eram do sexo feminino e masculino, respectivamente. Os pacientes que informaram a idade tinham faixa etária entre 11 e 72 anos de idade, com média de 39 anos (n=210). A atividade laboral foi reportada por 205 pacientes, sendo agricultura a atividade predominante (26,34%) (54/205), seguida de trabalhos na construção civil (9,76%) (20/205) e estudantes (8,78%) (18/205). Dos 182 pacientes que informaram o grau de instrução, a maioria (62,62%) (114/182) possuía ensino fundamental, em ambos os estados (36/57 PE; 78/125 AM). O tempo para procura pelo serviço médico após aparecimento da lesão foi de 8-300 dias em PE e 7-180 dias no AM, com média de 62 e 37 dias, respectivamente. Em 215 pacientes foi possível determinar o número de lesões, destes, em 157 os locais do corpo acometidos foram registrados. A maioria possuía lesão única (54,42%) (117/215), sendo os membros inferiores (pernas/pés) os locais do corpo mais acometidos (55%) (88/157).

9.7 Teste da qPCR duplex em amostras

Dos 236 pacientes, 213 (92 PE; 121 AM) foram considerados casos e 23 (17 PE; 6 AM) não casos a partir do conjunto de critérios estabelecido neste estudo. Desses últimos, foram obtidas apenas amostras de *imprint* de lesão. Dos pacientes casos foram obtidas 101 (50 PE; 51 AM) amostras de sangue, 33 de biópsia (33 PE) e 124 de *imprint* de lesão (44 PE; 80 AM). Das 101 amostras de sangue, 12 foram positivas na qPCR-duplex (6 positivas para o SVS, 3 positivas LaS e 3 positivas para SVS e LaS), representando 11,88% das amostras. Das 33 amostras de biópsias, 24 foram positivas na qPCR-duplex (21 positivas para o SVS, 3 positivas para SVS e LaS), sendo 72,72% das amostras. Das 124 amostras de *imprint* obteve-se positividade em 103 (26 PE; 77 AM) para a qPCR-duplex (99 positivas para o SVS, 2 positivas LaS e 2 positivas para SVS e LaS), totalizando 83,06% das amostras. Para detalhes dos resultados obtidos, vide tabela 5.

Tabela 5- Resultados obtidos na qPCR duplex por espécime clínico e estado de origem dos pacientes considerados casos.

ESPÉCIME CLÍNICO	RESULTADOS qPCR – DUPLEX ITS						TOTAL de positivos (N/%)
	SVS		LaS		SVS e LaS		
	PE	AM	PE	AM	PE	AM	
Sangue (N=101)	6	-	3	-	3	-	12 / 11,88%
Biópsia (N= 33)	21	-	-	-	3	-	24 / 72,72%
<i>Imprint</i> (N=124)	23	76	1	1	2	-	103 / 83,06%

Fonte: A Autora.

Legenda: qPCR- PCR quantitativa em tempo real. ITS- Internal Transcribed Spacer. SVS- *Subgenus Vianna System*. LaS- *Leishmania amazonensis System*. PE- Pernambuco. AM- Amazonas. N- Número de amostras.

Diante disto, o *imprint* de lesão pós-escarificação em papel de filtro foi o espécime clínico recomendado para este estudo, uma vez que foi mais sensível na técnica desenvolvida, é uma amostra menos invasiva quando comparada a biópsia, além de ser de fácil obtenção e manuseio técnico (Figura 15).

Figura 15- *Imprint* de lesão em papel de filtro após escarificação.



Fonte: A autora.

9.7.1 Análise de concordância e acurácia do método diagnóstico desenvolvido: Conjunto de critérios x qPCR duplex

Um total de 147 pacientes com amostras de *imprint* foram classificados conforme o conjunto de critérios, sendo 124 definidos como casos e 23 não casos. A análise do conjunto de critérios e o resultado da qPCR duplex mostraram concordância para 123 (83,67%) pacientes (103 positivos e 20 negativos), apresentando 83,06% de sensibilidade, 86,96% de especificidade e uma moderada concordância entre as técnicas ($K=0,531$; $p < 0,001$). A

acurácia do teste foi de 83,67%. Os valores preditivos do teste positivo e negativo foram 97,17% e 48,78%, respectivamente.

9.7.2 Análise de concordância e acurácia de método diagnóstico desenvolvido: Pesquisa direta x qPCR duplex

Considerando apenas o resultado da Pesquisa Direta (padrão-ouro estabelecido pelo Ministério da Saúde) como critério para inclusão dos pacientes em casos ou não casos, obteve-se 143 pacientes com amostras de *imprint* (105 casos e 38 não casos), a qPCR-duplex desenvolvida concordou em 121 destes (84,62%) (94 positivos e 27 negativos), apresentando 89,52% de sensibilidade, 71,05% de especificidade e uma boa concordância entre as técnicas ($K= 0,8462$, $p < 0,001$). A acurácia do teste foi de 84,62%. Os valores preditivos do teste positivo e negativo foram 89,52% e 71,05%, respectivamente.

9.8 Identificação da espécie de *Leishmania*

Abaixo serão expostos os resultados de identificação da espécie de *Leishmania* presente nas amostras biológica por técnica realizada.

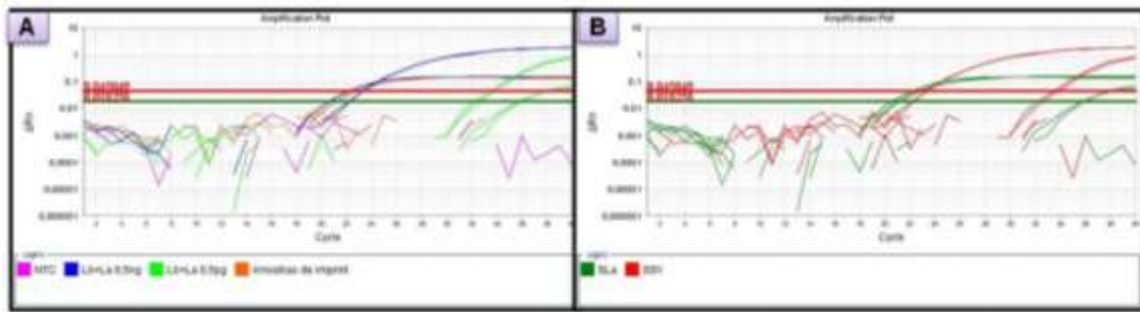
9.8.1 qPCR-duplex

Para esta análise, levando-se em consideração os 213 pacientes, independente do espécime clínico utilizado, 63,38% (135/213) foram positivas para qPCR-duplex, sendo 56,81% (121/213) para o SVS, 2,35% (5/213) para o SLa, e 4,23% (9/213) para ambos os sistemas. Com destaque para a positividade de seis amostras de sangue provenientes de Pernambuco para o LaS, com carga parasitária média de 224,54 fg/ μ L.

Considerando a técnica proposta com o *imprint* da lesão, das 124 amostras obtidas 99 foram positivas apenas para o SVS, duas apenas para o SLa e duas para o SVS e LaS.

Oriundas do estado do Amazonas, apenas uma amostra de *imprint* foi positiva para o LaS (*L. amazonensis*) com carga parasitária média de 172.861fg/ μ L (~1728 parasitos), as demais 76 amostras foram positivas para o SVS com carga parasitária média de 300.621,98 fg/ μ L (Figura 16) (Tabela 5).

Figura 16- Amplificação de amostra de *imprint* de lesão de paciente positivo para o Sistema *Leishmania amazonensis* (LaS).

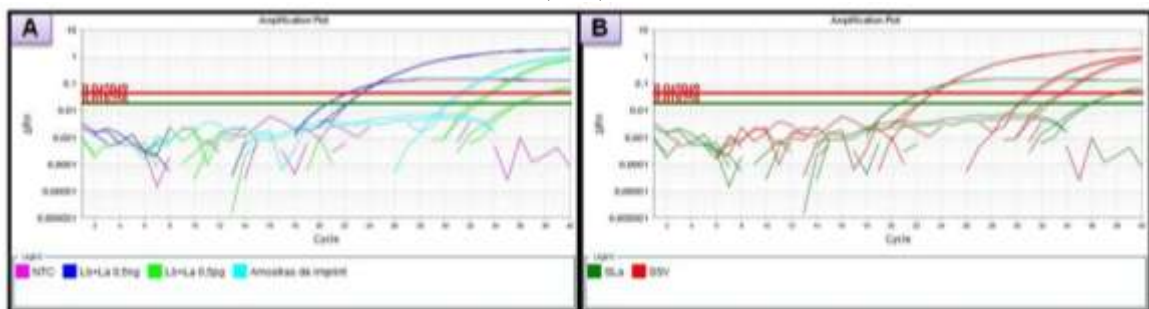


Fonte: A autora a partir do softwareABI Prism 7500 (AppliedBiosystems®, CA, USA).

Legenda: A. Identificação das amostras. Azul escuro: 0,5ng/μL de DNA de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Rosa: Controle negativo. Laranja: DNA de *imprint* de paciente positivo para o LaS. Verde: 0,5pg/μL de DNA de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* B: Identificação dos alvos. Vermelho: Sistema Subgênero *Viannia* (SVS). Verde escuro: Sistema *L. amazonensis* (LaS).

No estado de Pernambuco, obteve-se uma amostra de *imprint* positiva apenas para o LaS e duas co-infectadas (positivas LaS e SVS), sendo as demais 23 amostras positivas apenas para o SVS (carga parasitária média de 198.220,46 fg/μL) (Figura 17) (Tabela 5).

Figura 17- Amplificação de amostra de *imprint* de lesão de paciente positivo para o Sistema Subgênero *Viannia* (SVS).



Fonte: A autora a partir do softwareABI Prism 7500 (AppliedBiosystems®, CA, USA).

Legenda: A. Identificação das amostras. Azul escuro: 0,5ng/μL de DNA de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. Rosa: Controle negativo. Azul claro: DNA de *imprint* de paciente positivo para o SVS. Verde: 0,5pg/μL de DNA de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* B: Identificação dos alvos. Vermelho: Sistema Subgênero *Viannia* (SVS). Verde escuro: Sistema *L. amazonensis* (LaS).

9.8.2 MLEE

Embora tenham sido cultivadas 59 amostras (uma/paciente) (22 PE; 37 AM), a caracterização da espécie de *Leishmania* por MLEE foi realizada em apenas 31 destas (22 PE; 9 AM). *L. braziliensis* foi identificada em 23 amostras (22 PE; 1 AM) e *L. guyanensis* em 8 (8 AM).

acaso com uma pontuação específica ou melhor. Ident: Identidade, sendo o número de bases similares identificados no alinhamento a partir da comparação com o comprimento deste alinhamento.

Apesar da positividade para o controle endógeno, das quatro amostras de *imprints* positivas para o LaS, uma não amplificou na PCRC-mini-éxon; duas não apresentaram eletroferograma passível de análise após sequenciamento; e uma obteve positividade para 100% de cobertura e 89-94% de identidade para *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*.

9.8.4 Sequenciamento HSP70

Em virtude dos resultados inconclusivos para o Mini-éxon, todas as amostras de *imprint* (3 PE; 1 AM), biópsia (3 PE) e de sangue (6 PE) positivas para o LaS (unicamente ou em co-infecção) foram sequenciadas a partir da PCRC-HSP70, a fim de obter confirmação dos dados.

As amostras de *imprint* foram testadas, porém apenas duas (1 PE; 1 AM) apresentaram positividade para o controle endógeno e sequências viáveis para análise na PCRC-HSP70. Após análise das primeiras sequências obtidas no BLASTn para cada amostra, a amostra do Amazonas foi identificada como *L. (L.) amazonensis* com 99% de cobertura e 98% de identidade, enquanto a amostra de Pernambuco foi identificada como *L. (V.) braziliensis* com 100% de cobertura e 91-92% de identidade. Vale ressaltar que todas a amostra de Pernambuco apresentava co-infecção para a qPCR-duplex.

Para as amostras de biópsias, apenas duas apresentaram viabilidade de análise, assim, nas primeiras sequências obtidas no BLASTn houve cobertura (100%) e identidade (99-100%) compatíveis com *L. (V.) braziliensis*. Todas estas amostras apresentavam co-infecção para a qPCR-duplex.

Das seis amostras de sangue, apenas uma (PE) apresentou positividade na PCRC-HSP70, e no sequenciamento houve 100% de cobertura e 98% de identidade para *L. (L.) amazonensis*.

9.8.5 Análise de concordância entre os métodos para identificação de *Leishmania* spp.

Abaixo serão comparados os resultados das técnicas de identificação de espécie de *Leishmania*.

9.8.5.1 MLEE x qPCR-duplex

Dos 31 pacientes com caracterização da espécie de *Leishmania* por MLEE (item 9.8.1), amostras de *imprint* não foram obtidas, devido a impossibilidade de realização do isolamento ou inviabilidade da amostra. Entretanto, DNA de 19 amostras de biópsia (19 PE) e 31 de sangue (22 PE; 9 AM) foram oriundos de pacientes com caracterização da espécie por MLEE. Das amostras de biópsias, quatro foram negativas na qPCR-duplex, duas (PE) foram positivas para o SVS e LaS, e 13 foram positivas para apenas para o SVS. Das amostras de sangue, 24 foram negativas na qPCR-duplex, duas foram positivas para o SVS e LaS, e cinco foram positivas apenas para o SVS. Com exceção das co-infecções, houve concordância de 100% entre as técnicas, visto que todas as amostras foram identificadas como espécies do subgênero *Viannia* através da MLEE.

9.8.5.2 Sequenciamento mini-éxon x qPCR-duplex

Através da amostra de *imprint*, todos os 83 pacientes com identificação da espécie de *Leishmania* por sequenciamento da PCRc mini-éxon, foram identificados como espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* (75 *L. guyanensis*, 07 *L. braziliensis* e 01 *L. naiffi*), concordando em 100% com os resultados obtidos na qPCR duplex. Entretanto, é preciso esclarecer que uma amostra positiva para o *L. braziliensis*, também foi positiva para o LaS, portanto infectada por ambas espécies, mas no sequenciamento apenas uma das espécies é destacada na análise sequenciamento.

9.8.5.3 Sequenciamento HSP70 x qPCR-duplex

Como mencionado anteriormente (item 9.8.4), apenas amostras de pacientes positivos para o LaS (n=13) foram testados na PCRc-HSP70.

Do total de amostras analisadas 08 foram negativas para este alvo, assim foi possível realizar análise comparativa em cinco amostras, sendo um sangue (PE), dois *imprint* (1 PE; 1 AM) e duas biópsias (PE). Uma amostra de *imprint* e duas de biópsias apresentaram co-infecção na qPCR-duplex, assim, não houve total concordância entre as técnicas, pois apenas a espécie *L. (V.) braziliensis* é apresentada na análise do BLASTn. A amostra de sangue (PE) e a outra de *imprint* (AM), positivas unicamente para *L. (L.) amazonensis* na qPCR-duplex (LaS), concordaram 100% com o sequenciamento da PCRc-HSP70 (Figura 19).

Figura 19- Resultado do sequenciamento da PCRc-HSP70 de paciente de Pernambuco. A. Resultado do BLASTn. B. Eletroferograma da sequência.



Fonte: A autora a partir do BioEdit e *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*.

Legenda: C: Citosina. G: Guanina. T: Timina. A: Adenina. Max score: A maior pontuação de alinhamento de um conjunto de segmentos alinhados da mesma sequência de assunto (banco de dados). Total score: A soma dos escores de alinhamento de todos os segmentos da mesma sequência de assunto. Query cover: A porcentagem do comprimento da consulta incluída nos segmentos alinhados. E value: O número de alinhamentos esperados ao acaso com uma pontuação específica ou melhor. Ident: Identidade, sendo o número de bases similares identificados no alinhamento a partir da comparação com o comprimento deste alinhamento.

9.9 Acompanhamento dos pacientes

Um total de 23 indivíduos foram acompanhados nesta pesquisa (coleta de sangue pré e pós-tratamento), sendo 13 do AM e 10 de PE. Com exceção de um paciente (AM) tratado com Isetionato de Pentamidina, todos receberam a terapia convencional (antimoniato de meglumina por 20 dias). Nas amostras obtidas pré-tratamento, 17 (10 PE; 7 AM) foram positivas com carga parasitária (CP) média de 38,33 fg/ μ L, enquanto na coleta pós-tratamento 11 (3 PE; 8 AM) foram positivas com CP média de 11,81 fg/ μ L. Em ambas coletas apenas 8 amostras (3 PE; 5 AM) foram positivas.

Dos pacientes acompanhados, 13 (56,52%) obtiveram cura clínica (cicatrização da lesão), sendo nove de Pernambuco e quatro do Amazonas. Sete indivíduos (6 PE; 1 AM) curados clinicamente tiveram CP negativa pós-tratamento; dois (2 PE) aumentaram a CP pós-tratamento (CP média 52,50 fg/ μ L); dois (2 AM) tiveram CP apenas pós-tratamento (CP média 2,02 fg/ μ L); um (1 AM) não apresentou CP em ambas coletas, e um (1 PE) diminuiu a CP após tratamento (Quadro 5).

Quadro 5- Dados de pacientes com cura clínica (N=13) e resultado do diagnóstico molecular por qPCR-kDNA1.

Pacientes com cura clínica	Procedência	CP Pré-tratamento (fg/ μ L)	CP Pós-tratamento (fg/ μ L)	Avaliação diagnóstica	<i>Leishmania</i> sp**.
1	PE	64,94	Neg	Cura parasitológica	<i>Leishmania amazonensis</i>
2	PE	8,58	9,17	Possível recidiva, reinfecção ou manutenção da parasitemia	<i>Leishmania braziliensis</i>
3	PE	2,27	Neg	Cura parasitológica	X
4	PE	24,96	95,84	Possível recidiva ou reinfecção	<i>Leishmania braziliensis</i>
5	PE	461,51	Neg	Cura parasitológica	<i>Leishmania braziliensis</i>
6	PE	1,2	Neg	Cura parasitológica	<i>Leishmania braziliensis</i>
7	PE	53,01	6,88	Manutenção da parasitemia	X
8	PE	5,4	Neg	Cura parasitológica	X
9	PE	2,9	Neg	Cura parasitológica	<i>Leishmania braziliensis</i>
10*	AM	Neg	Neg	-	X
11	AM	Neg	1,02	Possível resquício de DNA	X
12	AM	1,33	Neg	Cura parasitológica	X
13	AM	Neg	3,03	Possível recidiva ou reinfecção	X

Fonte: A autora.

Legenda: CP: Carga Parasitária. Neg: Resultado Negativo

*Tratamento com Pentamidina (Paciente HIV positivo)

-: Sem inferências por qPCR.

** Identificação por MLEE e/ou sequenciamento

X: Sem resultado

PE: Pernambuco. AM: Amazonas

Nota: O tempo médio entre as coletas pré e pós-tratamento foi de aproximadamente 227 dias em PE e 65 dias no AM.

Em 10 (43,47%) (1 PE; 9 AM) pacientes não foi verificada a cura clínica no momento do retorno estabelecido pelo médico. Destes, apesar da presença de lesão, dois (1 PE; 1 AM)

não exibiram CP na coleta pós-tratamento, três (AM) aumentaram esta CP, três (AM) reduziram a CP e dois (AM) não exibiram CP nas duas coletas (Quadro 6).

Quadro 6- Dados de pacientes sem cura clínica (N=10) e resultado do diagnóstico molecular por qPCR-kDNA1.

Pacientes com cura clínica	Procedência	CP Pré-tratamento	CP Pós-tratamento	Avaliação diagnóstica	<i>Leishmania sp.</i>
14	PE	4,31	Neg	Cura parasitológica	X
15	AM	9,45	Neg	Cura parasitológica	<i>Leishmania guyanensis</i>
16	AM	1,23	3,6	Falha terapêutica	<i>Leishmania braziliensis</i>
17	AM	0,7	4,34	Falha terapêutica	<i>Leishmania guyanensis</i>
18	AM	0,52	0,45	Manutenção da parasitemia	X
19	AM	1,96	0,68	Manutenção da parasitemia	X
20	AM	Neg	0,91	Falha terapêutica	X
21	AM	Neg	Neg	-	X
22	AM	Neg	Neg	-	X
23	AM	7,33	3,95	Manutenção da parasitemia	X

Fonte: A autora.

Legenda: CP: Carga Parasitária. Neg : Resultado Negativo

*Tratamento com Pentamidina (Paciente HIV positivo)

-: Sem inferências por qPCR.

** Identificação por MLEE e/ou sequenciamento

X: Sem resultado

PE: Pernambuco. AM: Amazonas

Nota: O tempo médio entre as coletas pré e pós-tratamento foi de 653 dias em PE e aproximadamente 45 dias no AM.

Entre os 23 pacientes acompanhados, realizou-se a caracterização da espécie de *Leishmania* em nove (6 PE; 3 AM), sendo seis (5 PE; 1 AM) identificados como *L. (V.) braziliensis*, dois (AM) como *L. (V.) guyanensis* e um (1 PE) identificado como *L. (L.) amazonensis*. Entre os seis (5 PE; 1 AM) pacientes parasitados por *L. (V.) braziliensis*, 5 (PE) apresentaram cura clínica, dos quais três também apresentaram cura parasitológica com negatividade da CP após o tratamento, e dois pacientes, apesar de cicatrização da lesão, apresentaram aumento da CP na amostra pós-tratamento; um paciente (AM), não apresentou cura clínica, com aumento da CP na coleta pós-tratamento. Nos pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* (AM), não foi evidenciada cura clínica, sendo um paciente com cura parasitológica e o outro com aumento da CP (Figura 20). O paciente de PE infectado com *L. (L.) amazonensis* apresentou cura clínica e parasitológica com negatividade da CP após o tratamento.

Figura 20- Lesão de paciente acompanhado do Amazonas infectado por *L (V.) guyanensis* sem cura clínica e apresentando aumento da carga parasitária na coleta pós tratamento (3,6 fg/ μ L).



Fonte: A autora.

Legenda A.: Antes do tratamento. B. Pós tratamento.

10 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo desenvolver uma nova qPCR duplex para diagnóstico, quantificação e identificação de espécies de *Leishmania* responsáveis pela etiologia da LTA. Após análise *in silico* de diferentes alvos moleculares, os quais já são utilizados para diagnóstico (kDNA, SSU rDNA) e identificação de *Leishmania* spp. (HSP70, ITS1, CYT B, mini-éxon) (BENÍCIO et al., 2011; GRAÇA et al., 2012; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013; MIRAHMADI et al., 2018; PITA-PEREIRA et al., 2012; ZAMPIERE et al., 2016) foram avaliados. O ITS1 foi selecionado por atender as necessidades previstas no estudo. Embora com melhores características quanto à disponibilidade e conservação de sequências cadastradas no GenBank, não foi possível diferenciar *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) guyanensis*. Uma vez que ambas as espécies apresentam alta similaridade entre si, apresentando diferenças em poucas bases, impossibilitando o desenho de uma sonda espécie específica.

A importância de identificação da espécie de *Leishmania* já é conhecida, uma vez que esta informação pode determinar o prognóstico clínico e a escolha da terapia mais apropriada. No entanto, existe um consenso que conseguir um método simples, rápido e capaz de ser aplicado na rotina diagnóstica ainda é um desafio (ALMEIDA et al., 2017; AUWERA; DUJARDIN, 2015; BEN ABDA et al., 2011; HANDLER et al., 2015; SAGI et al., 2017; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2017; MOURI et al., 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2017; WILSON; PEARSON, 1990).

Embora seja uma metodologia muito eficaz e confiável, a MLEE apresenta algumas limitações em virtude de dificuldade de isolamento viável do parasito, além de problemas de contaminação, custo e laboriosidade (REITHINGER et al., 2007; SAGI et al., 2017). Em nosso estudo, apenas 31 amostras foram caracterizadas pela MLEE, embora o cultivo tenha sido realizado em 59 amostras (37 AM; 22 PE).

Nos estudos de Morais et al. (2016) e Pita-Pereira et al. (2012), a qPCR-kDNA foi avaliada para diferenciar espécies de *Leishmania* através da Temperatura de *melting* (*T_m*). Por não apresentar *T_m* com diferenças significativas, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* ficaram combinadas no mesmo intervalo de análise. Schonian et al. (2003) demonstraram o padrão de bandeamento por PCR-RFLP ITS e não foram capazes de diferenciar as espécies acima mencionadas. No estudo de Zampiere et al. (2016), utilizando HRM HSP70 também é possível perceber a proximidade entre as espécies, sendo necessário dois ensaios e análises comparativas para diferenciá-las. Em Israel, Sagi et al. (2017) desenvolveram duas qPCR

multiplex, utilizando a tecnologia TaqMan *probe*, para detectar e identificar *Leishmania* spp. Os sistemas foram desenhados para detectar *Leishmania* spp. (LS), *L. major* (LM), *L. tropica* (LT) e o gene humano PHP (controle endógeno) (Sistema I). Se as amostras apresentassem positividade apenas para LS, era necessário realizar o ensaio com o sistema II, o qual inclui uma qPCR multiplex para detectar *L. braziliensis*, *L. infantum/donovani* e PHP. Corroborando com o presente estudo, Sagi et al. (2017) também deram foco a espécies de *Leishmania* local, por outro lado, os autores incluíram na multiplex um controle endógeno, enquanto neste estudo foi realizado PCRc isoladamente para controle de qualidade amostral.

A qPCR-duplex desenvolvida neste estudo, é uma reação em duplex com os sistemas: SVS responsável por amplificar espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, e o LaS amplificando *L. (L.) amazonensis*. A existência e aplicação de um método com capacidade de detectar especificamente *L. (L.) amazonensis* é de suma importância, tendo em vista que esta espécie apresenta resistência ao tratamento de primeira escolha, podendo evoluir de lesões simples e localizadas à forma extensa/difusa (LTDF). Em adição, o comportamento da infecção está atrelado também a questões inerentes ao próprio indivíduo, como é o caso de pacientes co-infectados com o HIV, o que torna a LTDF ainda mais grave pela deficiência imunológica. Esses fatores somados às características territoriais e ecológicas do Brasil demonstram que a técnica apresenta elevada relevância, principalmente no Norte do país onde a espécie tem maior prevalência (BRASIL, 2017).

Dentre os pacientes do Amazonas, foi identificado apenas um infectado por *L. (L.) amazonensis*, sem co-infecção por espécies do subgênero *Viannia*. No Amazonas, Camara-Coelho et al. (2011) encontraram *L. (L.) amazonensis* em 8,1% (17/209) das amostras analisadas, destas, três estavam co-infectadas por *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*; uma por *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*; uma por *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*; e uma por *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi* e *L. (L.) amazonensis*. Os flebotomíneos vetores desta espécie são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*, sendo estes pouco antropofílicos, o que explica uma menor frequência de infecção humana por esta *Leishmania* (BRASIL, 2017).

Baseado nas informações contidas no trabalho de Silveira et al. (2009), e ainda sobre as espécies de *Leishmania*, especialmente *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, é necessário considerar o estímulo imunológico particular gerado por cada uma delas. Mesmo dentro da leishmaniose tegumentar, existe uma dicotomia de respostas influenciadas, sobretudo, pela espécie. Apenas *Leishmania* spp. pertencentes ao subgênero *Viannia*, principalmente *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis*, podem estimular fortemente o polo

de hipersensibilidade da resposta mediada por células T associada a Th1, comprometendo as mucosas. Por outro lado, espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*, principalmente *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana*, podem estimular o polo de hiposensibilidade da resposta mediada por células T associada a Th2, resultando em inativação funcional dessas células (anergia celular), determinando o quadro clínico típico da LTDf. Entretanto, mesmo infectado por essas espécies, o indivíduo pode desenvolver uma resposta central, entre hiper e hiposensibilidade, resultando na forma localizada da doença. Pacientes com a forma localizada causada por *L. (L.) amazonensis* apresentam muitos infiltrados na borda da lesão, sendo esta a maneira pela qual é possível distingui-la da causada por *L. (V.) braziliensis*.

Um dado muito intrigante, e de indispensável divulgação, encontrado nesse estudo foi o primeiro relato de *L. (L.) amazonensis* no estado de Pernambuco em diferentes espécimes clínicos oriundos de pacientes humanos. Infelizmente, a confirmação deste resultado foi possível em apenas um paciente, através do sequenciamento. As demais amostras não amplificaram na PCR ou estavam co-infectadas e apenas a espécie *L. (V.) braziliensis* se destacou no sequenciamento. É importante deixar explicado que com esses resultados, abre-se uma nova investigação local para mais esclarecimentos e também novos estudos de caracterização de espécie, uma vez que a presença desta *Leishmania* sp. pode gerar impactos muito maiores para a saúde pública local. Embora a história epidemiológica não valorize o achado, existem dados que reforçam a existência de relação entre a espécie e o ambiente favorável. Primeiro, segundo Alvar et al. (2012) *Lu. Longipalpis* também é vetor de *L. (L.) amazonensis*, sendo este flebotomíneo o vetor de *L. (L.) infantum*, causadora da LV que também é endêmica no estado de Pernambuco. Segundo, Rangel e Shaw (2018) *Lu. flaviscutellata*, um dos principais vectores desta espécie na região amazônica (BRASIL, 2017), também é encontrado no estado de Pernambuco. Terceiro, roedores são comuns em ambas as localidades (MARINHO-JUNIOR, 2015), além disso, em 2010 foi relatado a primeira detecção de anti-*Leishmania (L.) amazonensis* em gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) em Pernambuco (MONTEIRO, 2010). E por fim, outros estados do Nordeste, tais como Bahia e Ceará, possuem registros desta espécie (BARRAL et al., 1991; BRASIL, 2017; CALDART et al., 2017). Em adição, é necessário notar que não existe reação cruzada entre os sistemas desenvolvidos neste estudo, e que apesar de novo, os dados de padronização demonstram sua confiabilidade.

Neste estudo, para a qPCR-duplex, as amostras de *imprint* superaram as de biópsias em sensibilidade, com 83,06% e 72,72%, respectivamente. Acredita-se que o número de amostras pode ter interferido neste resultado. Apesar da alta qualidade da amostra de biópsia

para diagnósticos de LT, sua invasividade ainda é uma preocupação para muitos pesquisadores. Assim, a busca por um espécime clínico simples, rápido, de baixo custo, menos ou não invasivo é o foco de algumas pesquisas. Sagi et al (2017) usaram *swab* da borda da lesão para extração de DNA e teste na qPCR multiplex. No nosso estudo foi utilizado papel de filtro estéril para realizar impressão sobre a lesão após a escarificação. Ambas as coletas de material biológico (*imprint* e *swab*) apresentam baixa invasividade e representam um avanço na obtenção de uma amostra de qualidade com menos desconforto para o paciente. A mesma abordagem é observada nos estudos de Boggild et al. (2010; 2011), nos quais foram usados papel de filtro estéril para impressão na lesão e Taslimi et al. (2017) usaram tira de fita adesiva comercializada especificamente para fins de impressão na lesão.

No estudo apresentado por Sousa et al. (2014), foi testada biópsia espremida e espalhada entre duas lâminas de vidro para ser analisada ao microscópio; e Romero et al. (2009) realizou uma PCR usando DNA proveniente de impressão de biópsia. No entanto, todos os estudos utilizando biópsia são muito invasivos, causando assim mais desconforto e pouca tolerância (resistência) ao paciente.

A amostra de sangue foi a primeira a ser utilizada neste estudo, entretanto, foi demonstrado que esta não é o tipo adequado de amostragem para o diagnóstico da LT. Embora menos invasiva, quando comparada à biópsia, o sangue apresenta reduzida sensibilidade devido à baixa parasitemia, além disso, ainda existe dificuldade de obtenção desse tipo amostral, seja pela resistência do paciente ou pela gestão do serviço de saúde. Dados semelhantes foram obtidos por Venazzi et al. (2007), os quais encontraram apenas 3,4% de positividade na PCR em amostras de *Buffy coats* de pacientes com LT.

Os valores preditivos negativos da qPCR-duplex utilizando como teste padrão a PD foram superiores quando comparados a utilização do conjunto de critérios como teste de referência. Esses dados são compreensíveis, uma vez que existe uma maior probabilidade de inclusão de um paciente no grupo caso através do conjunto de critérios devido à realização de mais que um teste com a mesma ou diferentes amostras, aumentando ainda mais a chance de positividade. Além disso, o teste de qPCR-kDNA1 (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2013) foi realizado dentro do conjunto de critérios, aumentando ainda mais a chance de detecção, uma vez que sua sensibilidade é alta. O diagnóstico da leishmaniose é baseado em um conjunto de critérios que envolve uma análise clínica, epidemiológica e laboratorial, este último para confirmação do diagnóstico. Embora a PD exija um profissional bem treinado para reconhecimento do parasito e apresente baixa sensibilidade (SAGI et al., 2017), esta é a técnica mais comumente utilizada para o diagnóstico da LT, além de ser o método

recomendado pelo Ministério da Saúde como padrão-ouro (BRASIL, 2017; SAGI et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017; SOUSA et al., 2014).

O estudo de Antinori et al. (2009) corrobora com os resultados apresentados neste trabalho, comprovando que a qPCR é um método acurado na quantificação do parasito quando comparada a PCR convencional semiquantitativa; além disso, o risco de contaminação da reação se torna menor pelo tempo de realização da técnica (cerca de 2h30 min), entre outros motivos. Antinori et al (2009) também demonstraram que apesar de tantos benefícios, a qPCR é uma metodologia que pode até triplicar os custos por reação. Diante disso, é possível concluir que deve ser feita uma análise da real necessidade de cada paciente para definir o método a ser utilizado, levando em consideração, por exemplo, se a CP é relevante naquele momento e se a identificação da espécie terá alguma influência no tratamento.

O sequenciamento mini-éxon mostrou-se com alta qualidade na maior parte das amostras testadas, entretanto, foi possível perceber que este alvo não é indicado para amostras infectadas por *L. amazonensis*, embora seja utilizado em estudos realizados no Amazonas (BENÍCIO et al., 2011). Em relação a técnica de sequenciamento em geral (mini-éxon e HSP70), apesar de positividade para o controle endógeno, encontramos dificuldade de amplificação de algumas amostras, muito possivelmente pela maior degradação do DNA do parasito. Quando comparado ao controle endógeno, o DNA parasitário se apresenta em menor quantidade, e sua degradação pode interferir diretamente na amplificação do DNA parasitário, embora apresente qualidade no DNA amostral total. Perdas parciais do produto de PCR após a purificação podem ter ocorrido em amostras que, apesar de amplificação na PCR, não apresentaram eletroferograma viável para análise.

Apenas 10,8% (23/213) dos pacientes participantes considerados casos foram acompanhados através de nova coleta de sangue pós-tratamento para verificação da carga parasitária. Muitos motivos podem justificar o paciente não retornar ao médico para nova avaliação clínica, tais como: cura clínica medicamentosa, não seguimento do tratamento, cura espontânea e fatores socioeconômicos, como dificuldade de locomoção e baixa renda. O fator socioeconômico está sempre vinculado à leishmaniose por se tratar de uma doença negligenciada e que diversos fatores, tal como nutrição deficiente, podem ser determinantes na evolução clínica e sucesso do tratamento (OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA; COELHO; MELO, 2016). No Irã, Mashayekhi-Ghoyonlo et al. (2015), embora não mencionado o período de tempo para obtenção dos pacientes, conseguiram acompanhar 140 indivíduos com LT para realização de um estudo de correlação entre o *status* socioeconômico e curso clínico.

Assim, 43,6% dos pacientes foram classificados como baixa classe socioeconômica, dos quais, 57,8% eram pacientes considerados crônicos (doença prolongada por mais de um ano). Os autores acreditam que, embora os indivíduos menos favorecidos socioeconomicamente estejam mais propensos a doença e demorem na busca por atendimento à saúde, fatores de evolução clínica estão muito mais associados a imunodeficiência por carências nutricionais.

O antimoniato de meglumina é a droga convencional para o tratamento de leishmaniose, e vem sendo utilizado desde sua descoberta por Vianna (1912), entretanto com modificação na valência do antimonial (ALMEIDA; SANTOS, 2011; BRASIL, 2013; CARVALHO, 2012). Ainda assim, há aproximadamente 60 anos o antimoniato pentavalente é a medicação de primeira linha (LLANOS-CUENTAS et al., 2008), embora já tenha sido apresentado ineficácia contra algumas espécies de *Leishmania* (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2012; REY, 2008; ROMERO et al., 2001). Com exceção de uma paciente do Amazonas, todos os outros pacientes acompanhados no presente estudo foram tratados com o Antimoniato de meglumina, mas apenas 13 apresentaram cura clínica. Segundo Llanos-Cuentas et al. (2008), alguns fatores podem influenciar e ser determinantes para o sucesso do tratamento, tais como aspectos do hospedeiro, característica do parasito, variação na qualidade e concentração da droga, além do desenho do estudo; uma vez que existe uma variação muito grande entre a eficiência das drogas dentro de um mesmo país.

Entre os 23 pacientes acompanhados, nove tiveram a identificação da espécie de *Leishmania*, destes, todos que estavam infectados por *L. (V.) guyanensis* e um por *L. (V.) braziliensis* não apresentaram cura clínica medicamentosa através do antimoniato de meglumina. Romero et al. (2001) demonstraram precária resposta de *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* ao antimoniato, sendo esta última uma situação ainda mais grave, sugerindo assim a administração da Pentamidina em pacientes acometidos por esta espécie. De semelhante modo, a pesquisa desenvolvida por Mans et al. (2016) confirma a eficácia da terapia com isetionato de Pentamidina em pacientes com *L. (V.) guyanensis*.

Com base nas evidências sobre eficácia e segurança constantes no guia “*Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento*” e em outros estudos do Brasil publicados depois de 2013, além das experiências clínicas de especialistas de diferentes regiões do País na consideração da espécie de *Leishmania* e resposta ao tratamento e na disponibilidade do medicamento a ser utilizado nos diferentes níveis de atenção à saúde; o Ministério da Saúde decidiu atualizar as recomendações sobre gestão dos pacientes com LT para a realidade brasileira. Assim, pacientes com LTL oriundos de áreas onde a *L. (V.)*

guyanensis é endêmica devem ser receber como droga de primeira escolha a Pentamidina ou Anfotericina B lipossomal.

Segundo Conceição-Silva e Alves (2014) seria conveniente surgir um equilíbrio dinâmico entre o parasito e o sistema imune nos pacientes pós-tratamento, com baixo nível de CP, uma vez que até o momento não há comprovação de cura parasitológica nesta doença. No entanto, a interação de alguns fatores pode influenciar na evolução da LTA, tanto para cicatrização quanto para manutenção da doença no indivíduo, tais como doenças simultâneas, idade, moradia em área endêmica, número e tempo de evolução das lesões (BAPTISTA et al., 2009). Delgado et al. (1996) apresentaram o acompanhamento de uma paciente com LTA infectada acidentalmente por *L. (V.) braziliensis*. A partir do DNA de amostra de sangue, foram realizadas PCRc para o alvo kDNA e ITS antes e durante o tratamento com antimoniato de meglumina, oito, 12 e 24 meses após o tratamento. Diferentemente do presente estudo, por se tratar de uma metodologia qualitativa, os resultados da PCRc foram apresentados apenas como positivo e negativo, entretanto, foi observada variação na intensidade da banda antes e durante o tratamento, estando esta última menos intensa. Oito meses após o tratamento, a PCR foi negativa, porém na análise de 12 e 24 meses os resultados foram positivos. O trabalho conclui que a paciente estava com uma boa saúde e por isso alcançou um equilíbrio com o parasito, não apresentando mais sintomas. Esses dados indicam que fatores socioeconômicos e genéticos dos hospedeiros podem influenciar a manifestação da doença.

Para acompanhamento parasitológico de paciente com LT, Coutinho, Primez e Da-Cruz (2002) utilizaram a PCR com o alvo kDNA em 300 indivíduos, dentre esses estão inclusos pacientes com lesões localizadas/mucosas ativas, com até 20 anos após cura clínica medicamentosa, assintomáticos (moradores de área endêmica sem sintomas com IDRM positiva) e negativos (moradores de área endêmica sem sintomas com IDRM negativa). Apenas 25% dos pacientes com lesão ativa apresentaram PCR positiva em sangue, em nosso estudo a parasitemia foi ainda mais baixa (11,88%) para esse tipo de amostra quando o alvo foi o ITS1. Ainda sobre o estudo de Coutinho, Primez e Da-Cruz (2002), um dos resultados mais relevantes mostra que 25% dos pacientes com cura clínica medicamentosa apresentaram PCR positiva, sugerindo fortemente que os parasitos se disseminam por via sanguínea (BRASIL, 2017; GUEVARA et al., 1994; NICHOLIS et al., 1999) e demonstrando que a parasitemia persiste ao longo do tempo (DELGADO et al., 1996). Em nossos resultados, 48% (11/23) dos pacientes com cura clínica apresentaram carga parasitária pela qPCR-kDNA1 após tratamento.

Na Colômbia, Martínéz-Valencia et al. (2017), realizaram acompanhamento de 70 pacientes com LTA. Fazendo associação com o presente estudo os pacientes eram predominantemente do sexo masculino e apresentando lesão única. Os pacientes foram acompanhados antes e depois do tratamento (n=70), e 13 semanas posteriores ao início do tratamento. Foi realizado PCR/RT-qPCR através de DNA/RNA obtidos de amostras de aspirado, escarificação, *swab* de lesão e *swab* de mucosa. Embora curados clinicamente, 60% dos pacientes depois do tratamento e 30% na 13ª semana apresentaram DNA/RNA do parasito. A presença do RNA, considerando assim a viabilidade do parasito por se tratar de uma molécula de rápida degradação, foi detectada em 51% das amostras depois da terapia e 13% 13 semanas após o início da terapia. Os autores concluem que os medicamentos disponíveis não eliminam a *Leishmania*; e apesar da incerteza sobre a capacidade de transmissão antroponótica da doença, é importante perceber a crescente transmissão doméstica da mesma; além disso, a manutenção do parasito em indivíduos com cura medicamentosa/espontânea e assintomáticos gera o risco de reativação da lesão. Segundo Coutinho, Primez e Da-Cruz (2002), o aparecimento de novas lesões nos pacientes pode ser devido à reinfecção ou reativação dos parasitos persistentes na corrente sanguínea mesmo após cura clínica medicamentosa.

Por fim, com relação à caracterização dos pacientes, a idade média apresenta-se na faixa etária produtiva, ou seja, indivíduos economicamente ativos. Houve um maior número de indivíduos do sexo masculino, com atividade laboral voltada para agricultura e construção civil, corroborando com os estudos de Brandão-filho et al. (1999) e Brito et al. (2012b), além dos dados relatados no “Informe Epidemiológico das Américas” através do SisLeish, no qual registrou-se que 67,2% dos pacientes com LTA são do sexo masculino. Além disso, o local do corpo mais acometido por lesões foram os membros inferiores principalmente, seguido dos membros superiores, essa distribuição está associada às áreas do corpo mais expostas à picada do inseto vetor.

Os resultados obtidos demonstram a acurácia da técnica desenvolvida. Os dados de acompanhamento dos pacientes e a relação da evolução clínica com a espécie infectante demonstram a necessidade de se relacionar a etiologia para a definição do protocolo terapêutico eficaz. Além disso, o monitoramento da carga parasitária de pacientes pode auxiliar para evitar o uso de tratamentos desnecessários ou ineficazes (MANS et al., 2016). Assim, os diversos cenários apresentados, tais como, cura parasitológica e permanência da lesão; cura clínica com aumento de CP; permanência da lesão com diminuição ou aumento da CP, reforçam a necessidade de uma avaliação particular antes da definição da continuidade do

tratamento. Estes dados reforçam a necessidade da busca por terapias que relacionem a complexidade da LT bem como, a resposta imune dos pacientes.

11 CONCLUSÕES

- a) A pesquisa mostrou que é possível utilizar a tecnologia *TaqMan probe* para identificação de *Leishmania* spp. e correlacionar esta identificação com a evolução clínica e terapêutica dos pacientes, em áreas endêmicas para a LTA;
- b) Através de análise *in silico*, foi observada algumas limitações de similaridade genética entre as espécies de *Leishmania*, as quais influenciaram diretamente no desenvolvimento da técnica;
- c) O alvo ITS1 foi o melhor alvo e atendeu as exigências de diferenciar espécies de importância significativa para epidemiologia e terapia da doença, tais como *L. (L.) amazonensis*;
- d) A qPCR-duplex desenvolvida foi capaz de diferenciar espécies do subgênero *Vianna* de *L. (L.) amazonensis*. Após otimização e avaliação em diferentes espécimes clínicos, a qPCR-duplex apresentou indicadores de validade clínica satisfatórios. O espécime clínico escolhido foi o *imprint* de lesão em papel de filtro após escarificação, o qual representa avanço expressivo em sensibilidade, qualidade amostral, simplificação, viabilidade e conforto do paciente;
- e) A caracterização do perfil dos pacientes mostrou que a maioria é do sexo masculino, trabalhadores da agricultura, apresentando lesão única e as pernas/pés são os locais do corpo mais acometidos;
- f) Através do acompanhamento dos pacientes pode-se perceber a ineficácia terapêutica do antimoníaco de meglumina para a espécie *L. (V.) guyanensis*, bem como a falha na eliminação dos parasitos em pacientes clinicamente curados (cicatrização da lesão);
- g) Por fim, confirmou-se ainda mais a importância de realizar diagnóstico e identificação da espécie em um único momento a fim de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela LTA.

12 PERSPECTIVAS

Diante dos dados alcançados nesta tese, em pacientes com LT procedentes de áreas endêmicas do Amazonas (AM) e Pernambuco (PE), constatou-se que apenas 59% dos pacientes tratados com o fármaco convencional apresentaram cura clínica (cicatrização da lesão) e, mesmo naqueles com remissão dos sintomas, pode-se observar permanência e até o aumento da carga parasitária após a terapia. Nos pacientes em que não houve a cura clínica, ou seja, permanência da lesão, diferentes cenários foram observados, entre os quais, a cura parasitológica, demonstrando a necessidade de modulação da resposta imune.

Assim, tem-se a perspectiva de realizar estudos *in vitro* (cultivo celular), para avaliar novos compostos quanto ao seu potencial imunomodulador em pacientes humanos em terapia contra as leishmanioses (formas tegumentar e/ou visceral), visando gerar subsídios que propiciem a utilização destes novos compostos de forma aditiva ou substituta à terapia atualmente usada, levando-se em consideração que, além da atividade sobre o parasito, um novo medicamento contra as leishmanioses precisa modular a resposta imune.

REFERÊNCIAS

- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004349>>. Acesso em: 22 jan. 2018.
- ALAM, E. et al. Cutaneous Leishmaniasis: an overlooked etiology of midfacial destructive lesions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, São Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004426, 2016.
- ALMEIDA, M. E. et al. Detection and differentiation of *Leishmania* spp. in clinical specimens by use of a SYBR Green-based Real-Time PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 55, n. 1, p. 281-290, 2017.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 497-506, 2011.
- ALOPURINOL. São Paulo: Medley, 2014. Bula de remédio. Disponível em: <<file:///C:/Users/rm/Downloads/Bula%20Alopurinol%20Medley.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2017.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, e35671, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0035671>>. Acesso em: 11 set. 2015.
- AMATO, V. et al. Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, Paris, v. 125, p. 492-495, 1998.
- ANTINORI, S. et al. Is Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) More Useful Than a Conventional PCR for the Clinical Management of Leishmaniasis? **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 81, n. 1, p. 46-51, 2009.
- APPLIED BIOSYSTEMS. *TaqMan* Universal PCR Master Mix. In: _____. **Amplifying custom target sequences for quantification**. 2010. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_042996.pdf>. Acesso em: 11 set. 2014.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **As Leishmanioses**. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/classifica__o_das_esp_cies.htm>. Acesso em: 20 set. 2016.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **As Leishmanioses**. Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/hist_rico.htm>. Acesso em: 2 mar. 2017.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clinics in Dermatology**, New York, v. 14, n. 5, p. 523-532, 1996.

AUWERA, G. V. et al. Heat-shock protein 70 gene sequencing for *Leishmania* species typing in European tropical infectious disease clinics. **Euro Surveillance**, Saint Maurice, v. 18, n. 30, p. 20543, 2013.

AUWERA, G. V.; DUJARDIN, J. C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 28, n. 2, p. 265-294, 2015.

ÁVILA-PIRES, F. D. Zoonoses: Hospedeiros e Reservatórios. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 82-97, 1989. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X1989000100007>. Acesso em: 11 set. 2011.

AYRES, M. et al. **BIOESTAT**: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém: ONG Mamiraua, 2007. Disponível em: <<https://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads>>. Acesso em: 13 maio 2015.

AZMI, K. et al. Methods incorporating a polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and their use as a 'gold standard' in diagnosing Old World cutaneous leishmaniasis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 71, p. 151-155, 2011.

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**, New York, v. 121, n. 4, p. 317-322, 2009.

BARI, A. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, Karachi, v. 16, p. 24-27, 2006.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Baltimore, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.

BART, A. et al. Imported leishmaniasis in the Netherlands from 2005 to 2012: epidemiology, diagnostic techniques and sequence-based species typing from 195 patients. **Euro Surveillance**, Saint-Maurice, v. 18, n. 30, p. 20544, 2013. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20544>>. Acesso em: 22 fev. 2019.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BEN ABDA, I. et al. Advantages and limits of real-time PCR assay and PCR-restriction fragment length polymorphism for the identification of cutaneous *Leishmania* species in Tunisia. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**, London, v. 105, n. 1, p.17-22, 2011.

BENICIO, E. A. et al. Combining diagnostic procedures for the management of leishmaniasis in areas with high prevalence of *Leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p.1141-1144, 2011.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, 2006.

BOERLIN, P. Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 28, p. 221-231, 1997.

BOGGILD, A. K. et al. Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with american cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 50, n. 1, p. 1-6, 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/648730>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

BOGGILD, A. K. et al. Diagnostic performance of filter paper lesion impression PCR for secondarily infected ulcers and nonulcerative lesions caused by cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 3, p. 1097-1100, 2011.

BORIOLO, M. F. G. et al. Multilocus enzyme electrophoresis typing of *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 51-66, 2005.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological Surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 93, p. 488-494, 1999.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. rev. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2013.

BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 3. ed. rev. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.

BREWSTER, S.; ASLETT, M.; BARKER, D.C. Kinetoplast DNA minicircle database. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 14, p. 437-438, 1998.

BREWSTER, S.; BARKER, D. C. Analysis of minicircle classes in *Leishmania (Viannia)* species. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, London, v. 96, p. 55-63, 2002.

BRITO, M. E. F. et al. Occupationally Acquired American Cutaneous Leishmaniasis. Case **Reports in Dermatological Medicine**, New York, v. 2012, p. 1-4, 2012a. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/cridm/2012/279517/>>. Acesso em: 23 fev. 2019.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, p. 425-429, 2012b.

BRITO, M. E. F. 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 and International Health**, Oxford, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

BRUJIN, M.; BARKER, D.C. Diagnosis of New World leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. **Acta Tropica**, Basel, v. 52, p. 45-58, 1992.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 179, p. 1485-1494, 1999.

CAIERÃO, J. et al. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of rapidly-growing mycobacteria: an alternative tool for identification and typing. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 42, p. 11-16, 2016.

CALDART, E. T. et al. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 17-27, 6 fev. 2017.

CAMARA-COELHO, L. I. et al. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology research**, Berlin, v. 108, p. 671-677, 2011.

CARVALHO, E. M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.

CARVALHO, E. M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 4, p. 423-424, 2012.

CATONE, G. et al. Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*. **Veterinary Research Communications**, Dordrecht, v.27, p.549–553, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/>>. Acesso em: 27 maio 2016.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. Leishmanioses do continente americano. Rio de Janeiro: **Ed. Fundação Oswaldo Cruz**, 2014, p. 18-38.

COSTA, J. M. L. et al. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, p. 16-24, 2009b.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades, Diagnóstico e Terapêutica da LT no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, p. 70-83, 2009a.

COSTA, T. B. et al. Relation between neonatal malnutrition and gene expression: inflammasome function in infections caused by *Candida Albicans*. **European Journal of Nutrition**, Darmstadt, v. 56, n. 2, p. 693-704, 2015.

COUTINHO, S. G.; PRIMEZ, C.; DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, p. 173-178, 2002.

CUBA-CUBA, C. A. et al. Human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Santiago Del Estero, Argentina: Identification of parasites by monoclonal antibodies and isoenzymes. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 38, n. 6, p. 413-421, 1996.

CUNNINGHAM, D. D. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil. **Medical Journal Armed Forces India**, New Delhi, v. 1, p. 21-31, 1885.

CUPOLILLO, E. et al. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 73, p. 145-155, 1995.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 296-311, 1994.

DELGADO, O. et al. Follow-up of a human accidental infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 55, n. 3, p. 267-272, 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, n. 3, p. 239-243, 2001.

DINIZ, J. L. C. P.; COSTA, M. O. R.; GONÇAVES, D. U. Mucocutaneous Leishmaniasis: clinical markers in presumptive diagnosis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 380-384, 2011.

DUQUE, M. C. O. et al. Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 49, n. 6, p. 774-776, 2016.

EL TAI, N. O. et al. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 94, n. 5, p. 575-579, 2000.

EL-BESHBISHY, H. A.; AL-ALI, K. H.; EL-BADRY, A. A. Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 17, p. e334-e338, 2013.

ELMAHALLAWY et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, v.8, n.8, p. 961-972, 2014.

ESCOMEL, E. La leishmaniose américaine et les leishmanioses en amériques. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, Paris, v. 22, p. 35-46, 1929.

FAGUNDES-SILVA, G. A. et al. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 6, p. 797-800, 2015.

FLOCH, H. *Leishmania tropica guyanensis* n.ssp., agent de La leishmaniose tégumentaire des Guyanas et de l'Amérique Centrale. **Archives de Institut Pasteur de La Guyane Française**, Cahors, v. 15, p. 1-4, 1954.

FRAGA, J. et al. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20. **Infection, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p. 229-237, 2013.

GIUDICE, A. et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC infectious diseases**, London, v. 7, p. 7, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1810296/pdf/1471-2334-7-7.pdf>>. Acesso em: 13 maio 2015.

GONÇALVES, S. C. et al. Application of the mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene for sample quality control in multiplex PCR for diagnosis of Leishmaniasis. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 8, p. 188-197, 2012

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, p. 293-307, 2012.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 664-674, 2012.

GRIMALDI, G.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 37-42, 1996.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v.2, n.8, p.494-501, 2002.

GUERRA, J. A. et al. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 5, n. 3, p. e980, 2011. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000980>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

GUEVARA, P. et al. Presence of *Leishmania braziliensis* in blood samples from cured patients or at different stages of immunotherapy. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 1, n. 4, p. 385-389, 1994.

HAJJARAN, H. et al. Direct Diagnosis of *Leishmania* species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, New York, v. 25, p. 20-24, 2011.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical Perspective. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 73, n. 6, p. 911-926, 2015.

HASSANPOUR, G. et al. Simplified Pan-species Real-time PCR-based Detection of *Plasmodium* spp. in Blood Smear. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 11, n. 4, p. 463-470, 2016.

HAYDON, D. T. et al. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v, 8, p. 1468-1473, 2002.

HERNÁNDEZ, C. et al. Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites & Vectors**, London, v. 7, p. 501, 2014.

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/Technology**, New York, v. 10, n. 4, p. 413-417, 1992.

HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 88, p. 7276-7280, 1991.

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. **Leishmaniose**. Disponível em: <<http://www.icb.usp.br/~livropar/img/capitulo5/18e.jpg>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

KAPSENBERG, M. L. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. **Nature Reviews Immunology**, London, v. 3, p. 984-993, 2003.

KARIMKHANI, C. et al. Global burden of cutaneous leishmaniasis: a cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 5, p. 584-591, 2016.

KHOSRAVI, S. et al. Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: Real-time PCR based on trypanothione peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania* spp. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 49, p.15-18, 2012.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVÁ, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, San Francisco, v. 19, p. 1443-1474, 2012.

LAINSON, R. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* n.sp., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64, p. 200-207, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World, taxonomic problems. **British Medical Bulletin**, London, v. 28, p. 44-48, 1972.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. *Leishmania (Viannia) naiffi* sp.n., a parasite of the armadillo, *Dasyurus novemcinctus* (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, Paris, v. 64, p. 3-9, 1989.

LAMBSON, B.; BARKER, D. C. Homologous minicircles in *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 96, n. 1, p. 75-80, 2002.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, Washington, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LEISHMANIASIS: Cutaneous and Visceral. 2009. Disponível em:
<<http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php>>. Acesso em: 28 maio 2014.

LESSA, M. M. et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de otorrinolaringologia**, São Paulo, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LIMA, E. B. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasília, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LINDENBERG, A. A úlcera de bauru e seu micróbio. Comunicação preventiva. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 12, p. 116-120, 1909.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n. 2, p.223-231, 2008.

LYRA, M.R. et al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 57, n. 5, p. 451-454, 2015.

MACHADO, P. R. et al. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 44, p. 788-793, 2007.

MACHADO-PINTO, J. et al. Immunochemotherapy for cutaneous leishmaniasis: a controlled trial using killed *Leishmania (Leishmania) amazonensis* vaccine plus antimonial. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 41, n. 2, p.73-78, 2002.

MANS, D. R. A. et al. Monitoring the response of patients with cutaneous leishmaniasis to treatment with pentamidine isethionate by quantitative real-time PCR, and identification of *Leishmania* parasites not responding to therapy. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 41, n. 6, p. 610-615, 2016.

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 46, n. 2, p. 115-124, 2003.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. **Caracterização da infeciosidade de roedores silvestres e sinantrópicos como hospedeiros reservatórios envolvidos no ciclo zoonótico da Leishmaniose Tegumentar Americana associada à *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2015. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MARINHO-JÚNIOR, J. F. **Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da zona da mata norte de Pernambuco, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2012.

MARTINEZ, S.; MARR, J. J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 326, p. 741-744, 1992.

MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J. et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0005713, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526576/pdf/pntd.0005713.pdf>>. Acesso em: 22 nov. 2019.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 82-104, 1992.

MASHAYEKHI-GHOYONLO, V. et al. Correlation between Socioeconomic Status and Clinical Course in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Cutaneous Medicine And Surgery**, New York, v. 19, n. 1, p. 40-44, 2015.

MASMOUDÍ, A. et al. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**, Warsaw, v. 2, p. 31-41, 2013.

MATTA, A. Sur les leishmanioses tégumentaires. Classification générale des leishmanioses. **Bulletin de La Société de Pathologie Exotique**, Paris, v. 9, p. 494-503, 1916.

MEIDE, W. F. et al. Evaluation of treatment with pentamidine for cutaneous leishmaniasis in Suriname. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia v. 48, p. 52–58, 2009.

MIRAHMADI, H. et al. Detection of species and molecular typing of *Leishmania* in suspected patients by targeting cytochrome b gene in Zahedan, southeast of Iran. **Veterinary World**, Dist. Morbi, v. 11, n. 5, p.700-705, 2018.

MIRANDA-VERÁSTEGUI, C. et al. Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimoniate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, p. 1395-1403, 2005.

MONTEIRO, S. R. D. **Participação dos gambás na epidemiologia da leishmaniose na mata atlântica do estado de Pernambuco, Brasil**. 2010. Tese (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MORAES, M. A. P.; CORREIA-FILHO, D.; SANTOS, J. B. Linfadenopatias na leishmaniose tegumentar americana: considerações sobre dois casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 26, n. 3, p. 181-185, 1993.

MORAIS, R. C. et al. Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques. **Experimental Parasitology**, New York, v. 165, p. 43-50, 2016.

MORAIS, R. C. S. **Aplicabilidade da técnica de PCR em tempo real para caracterização de espécies de *Leishmania***. 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

MORAIS, R. C. S. et al. Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v. 59, n. 4, p. 473-81, 2013.

MOREIRA, O. C.; YADON, Z. E.; CUPOLILLO, E. The applicability of real-time PCR in the diagnostic of cutaneous leishmaniasis and parasite quantification for clinical management: Current status and perspectives. **Acta Tropica**, Amsterdam, v. 184, p. 29-37, 2017.

MORTARINO, M. et al. Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*. **Parassitologia**, Roma, v. 46, n. 1-2, p.163-167, 2004.

MOURI, O. et al. Easy Identification of *Leishmania* Species by Mass Spectrometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 6, p. e2841, 2014. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002841>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific american**, New York, v. 262, p. 56-65, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polimerasecatalyzed reation. **Methods in enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v.366, p.1561–1577, 2005.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic Local Alignment Search Tool – BLAST**. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 8 jun. 2015.

NERY GUIMARÃES, F. Estado atual dos conhecimentos da “forma lepromatosa” da leishmaniose tegumentar (L.T.). **Hospital**, [S.l.], v. 67, n. 1, p. 71-92, 1965.

NERY, G. et al. Ocorrência de *Leishmania infantum* em fezes de cão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 5, p. 1249-1253, 2015.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

NEWPROV. **Instant prov**. Disponível em: <<http://www.newprov.com.br/uploads/bula/Instant%20Prov.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

NICHOLLS, R. S. et al. Hallazgo de AND de leishmaniasis en monocitos de sangre periférica de pacientes y de personas sanas prodedentes de zonas endémicas de leishmaniasis mediante la reacción em cadena de polimerasa. **Biomedica Revista del Instituto Nacional de Salud**, Bogotá, v. 19, n. 1, p. 157-158, 1999.

OLIVEIRA, A. G. L. et al. Influence of the nutritional status in the clinical and therapeutical evolution in adults and elderly with American Tegumentary Leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v.128, p. 36–40, 2013.

OLIVEIRA, G. A. [**Paciente com leishmaniose mucosa**]. Maceió, 2016, 1 fotografia, color.

OLIVEIRA, L. M. L.; COELHO, K. C.; MELO, P. G. Diagnóstico nutricional em doenças tropicais na Amazônia brasileira. **Saúde em Revista**, Piracicaba, v. 16, n. 44, p. 43-53, 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global Health Observatory Map Gallery**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 3 dez. 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis: Epidemiological situation**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 1 ago. 2016a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Clinical forms of the leishmaniases. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniases/en/index2.html>. Acesso em: 10 out. 2016b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Diagnosis, detection and surveillance. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/en/>>. Acesso em: 30 set. 2016c.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Informe epidemiológico das Américas: Leishmanioses**. Washington, 2018. Disponível em:

<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5>. Acesso em: 21 dez. 2018.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis**. Disponível em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417&Itemid=39345&lang=en>. Acesso em: 1 ago. 2016a.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Visceral Leishmaniasis**. Disponível em:

<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420&Itemid=39347&lang=en>. Acesso em: 10 out. 2016b.

PAIVA-CAVALCANTI, M. **Desenvolvimento e avaliação de um sistema baseado em PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum* em cães**. 2008. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, London, v. 5, p. 31, 2015.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 27, p. 122-128, 2013.

PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. The development of a real-time PCR assay for the quantification of *Leishmania infantum* DNA in canine blood. **Veterinary Journal**, London, v. 182, n. 2, p.356-358, 2009.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; REGIS-DA-SILVA, C. G.; GOMES, Y. M. Comparison of real-time PCR and conventional PCR for detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection: a mini-review. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Singapore, v. 16, p. 537-542, 2010.

PEDROSO, A. E.; SILVA, P. D. Botão do oriente (leishmaniose ulcerosa). Cultura da *Leishmania tropica (Leishmania wrightii)*. **Arquivo da Sociedade Médica e Cirúrgica de São Paulo**, São Paulo, v. 1, p. 305-14, 1911.

PESSOA-E-SILVA, R. et al. Evaluation of urine for *Leishmania infantum* DNA Detection by Real-Time Quantitative PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 131, p. 34-41, 2016.

PIERCE, B. A. Análise da genética molecular e biotecnologia. In: _____. **Genética: Um enfoque conceitual**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2016. p. 491-492.

PINTEREST. **Leishmaniasis moche**. Disponível em:

<<https://www.pinterest.com/search/pins/?q=leishmaniasis%20moche&rs=typed&0=leishmaniasis%7Ctyped&1=moche%7Ctyped>>. Acesso em: 22 jul. 2016.

PITA-PEREIRA, D. et al. SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 12, p. 5-1, 2012. Disponível em:

<<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-5-15>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

RADOMSKI, N. et al. Development of a Real-Time qPCR Method for Detection and Enumeration of *Mycobacterium* spp. in Surface Water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 21, p. 7348–7351, 2010.

RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p. 937-954, 2009.

RANGEL, F. R.; SHAW, J. J. **Brazilian Sand Flies: Biology, Taxonomy, Medical Importance and Control**. São Paulo: Spring, 2018.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. 1. ed. Olinda: J. C. R., 2003.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, n. 9, p.581-596, 2007.

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIAZ, F. et al. DNA Amplification Techniques for the Detection of *Toxoplasma gondii* Tissue Cysts in Meat Producing Animals: A Narrative Review Article. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 11, n. 4, p. 432-440, 2016.

ROMERO, G. A. S. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 65, n. 5, p. 456-465, 2001.

ROMERO, G. A. S. et al. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. **Acta Tropica**, Basel, v. 109, n. 1, p.74-77, 2009.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, Oxford, v. 3, p. 251–262, 2014.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. p. 499-513.

SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. **British Medical Association**, London, v. 2, n. 7336, p. 539-541, 2002.

SAENZ, R. E. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with orally administered allopurinol riboside. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 160, n. 1, p. 153-158, 1989.

SAGI, O. et al. Sensitive Molecular Diagnostics for Cutaneous Leishmaniasis. **Open Forum Infectious Diseases**, Cary, v. 4, n. 2, p. ofx037, 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ofid/article/4/2/ofx037/3051829>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

SAMAREH-FEKRI, M. et al. Detection of *Helicobacter pylori* in the Bronchoalveolar Lavage of Patients with Lung Cancer Using Real-Time PCR. **Jundishapur Journal of Microbiology**, Avaz, v. 9, n. 11, p. e32144, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28138371/>>. Acesso em: 20 set. 2018.

SÁNCHEZ-SALDAÑA, L. et al. Leishmaniasis. **Dermatología Peruana**, Lima, v. 14, n. 2, p. 82-98, 2004.

SANGÜEZA, P.; CARDENAS, P. Leishmaniasis cutânea y cutáneo-mucosa; nuevos aportes sobre el tema. **Medicina Cutânea Ibero-Latino-Americana**, Lisboa, v. 9, p. 25- 34, 1981.

SANTA ROSA, I. C. A.; OLIVEIRA, C. S. O. Leishmaniose visceral: breve revisão sobre uma zoonose reemergente. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 2, n. 11, p. 24-28, 1997.

SANTIS, B. et al. Characterization of *Leishmania infantum* species in dogs from the urban area of Cuiabá, State of Mato Grosso, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 44, n. 6, p. 771-773, 2011.

SANTOS, A. M. et al. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 444-448, 2008.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developed Countries**, Viale San Pietro, v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHONIAN, G. et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 47, p. 349-358, 2003.

SHAW, J. et al. Characterization of *Leishmania (Leishmania) waltoni* n.sp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), the Parasite Responsible for Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in the Dominican Republic. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 93, n. 3, p. 552-558, 2015.

SILVEIRA, F. T. et al. Dermal leishmaniasis in the Amazon Region of Brazil, *Leishmania (Viannaia) lainsoni* sp.n., a new parasite from the State of Pará. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 289-292, 1987.

- SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.
- SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da leishmnirose tegumentar americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, Belém, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.
- SILVEIRA, F.T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* in.sp. A new leishmanial parasite of man in the Amazon region. **Parasite**, Paris, v. 9, p. 43-50, 2002.
- SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual review of microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 363–382, 1987.
- SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). **Leishmaniose Tegumentar Americana**: Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>>. Acesso em: 6 jan. 2019.
- SKRABA, C. M. et al. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 78, n. 4, p. 411-417, 2014.
- SOTO, J. et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 38, p. 1266-1272, 2004.
- SOUSA, A. Q. et al. Press Imprint Smear: A Rapid, Simple, and Cheap Method for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, Baltimore, v. 91, n. 5, p. 905-907, 2014.
- SROKA-OLEKSIK, A. et al. Nested-PCR real time as alternative molecular tool for detection of *Borrelia burgdorferi* compared to the classical serological diagnosis of the blood. **Medycyna doswiadczalna i mikrobiologia**, Warszawa, v. 68, n. 1, p. 47-56, 2016.
- SYMMERS, W. S. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **Lancet**, London, v.1, p.127-132, 1960.
- TALMI-FRANK D, et al. *Leishmania tropica* in rock hyraxes (*Procavia capensis*) in a focus of human cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 82, p. 814-818, 2010.
- TASLIMI, Y. et al. A novel non-invasive diagnostic sampling technique for cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 11, n. 7, p. e0005750, 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005750>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **High Resolution Melting**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-applications/genetic-variation-analysis-using-real-time/high-resolution-melting-hrm.html>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- TOO, H. P. Real time PCR quantification of GFR-2 alternatively spliced isoforms in murine brain and peripheral tissues. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v.114, p.146–154, 2003.
- TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review. **F1000research**, London, v. 6, p.750-755, 2017.
- TOZ, S. O. et al. A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of Leishmania Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e2205, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002205>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- TSUKAYAMA P, et al. A FRET-based real-time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 1, p. e1956, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001956>>. Acesso em: 11 mar. 2016.
- VAN BRAMER, S. E. An Introduction to Mass Spectrometry. **Widener University**, Chester, p. 1-37, 1998. Disponível em: <<http://www.cerm.unifi.it/static/piccioli/MS1.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2017.
- VAN DER AUWERA, G. et al. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 52, p. 1098–1104, 2014.
- VENAZZI, E. A. S. et al. Detection of *Leishmania (Viannia)* DNA in blood from patients with American cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 115, n. 4, p.399-402, 2007.
- VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Brasil Medico**, Rio de Janeiro, v. 25, p. 411, 1911.
- VIANNA, G. Tratamento de leishmaniose tegumentar por infecções intravenosas de tártaro emético. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA E CIRURGIA, 7., 1912, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: editora, 1912. v. 4, p. 426- 428.
- VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, Basel, v. 90, p. 31-37, 2004.
- WEIRATHER, J. L. et al. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, p. 3892-3904, 2011.

WILSON, M. E.; PEARSON, R.D. Immunology of leishmaniasis. In: WYLER, D. J. (Ed). **Modern parasite biology**: cellular, immunological aspects. New York: WH Freeman, 1990. p. 200-221.

WORTMANN, G. et al. A randomized, double-blind study of the efficacy of a 10- or 20-day course of sodium stibogluconate for treatment of cutaneous leishmaniasis in United States military personnel. **Clinical Infection Diseases**, Chicago, v. 35, p. 261-7, 2002.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a case of tropical ulcer. **Journal of Medical Internet Research**, Pittsburgh, v. 10, p. 472-82, 1903.

YANG, S.; ROTHMAN, R. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations and future applications in acute-care settings. **The Lancet**, London, v. 4, p. 337-348, 2004.

YEHIA, L. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. **Journal of Cutaneous Pathology**, Copenhagen, 2012, n. 39, p. 347-355, 2012.

ZAMPIERI, R. A. et al. High Resolution Melting Analysis Targeting hsp70 as a Fast and Efficient Method for the Discrimination of *Leishmania* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 2, p. e0004485, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4771719/pdf/pntd.0004485.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2018.

ZAULI, R. C. et al. A dysflagellar mutant of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolated from a cutaneous leishmaniasis patient. **Parasites & Vectors**, London, v. 5, p. 11, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271977/pdf/1756-3305-5-11.pdf>>. Acesso em: 3 dez. 2018.

ZHANG, C. Y. et al. Phylogenetic and evolutionary analysis of Chinese *Leishmania* isolates based on multilocus sequence typing. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, p. e63124, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0063124>>. Acesso em: 9 set. 2018.

APÊNDICE A - FICHA DE AVALIAÇÃO CLÍNICA

Data:	Município/UF:	Localidade:
1. DADOS DO PACIENTE		
Nome:		
Data Nasc:	Local Nasc:	Sexo: M () F ()
Endereço atual (Região casa):		Quanto tempo?
Endereço anterior:		Razão da mudança:
Grau de instrução: Analfabeto () Ens. Fundamental () Ens. Médio () Ens. Superior ()		
Atividade laboral: Não exerce () Agricultor () Doméstica () Outros: _____		
2. DADOS CLÍNICOS		
Lesão ativa: Sim () Não ()	Nº de lesões: 1 () entre 1 e 10 () acima de 10 ()	Diâmetro (mm):
Forma clínica: LTL () LTDf () LMC () LTDs ()		Quanto tempo (meses)?
Tratamento: Sim () Não ()	Nº ampolas:	Data início tratamento:
Cicatriz: Sim () Não ()	Nº de cicatrizes:	Localização: Tronco () Braços / mãos () Pernas / pés () Cabeça / Face ()
3. INTRADERMO REAÇÃO DE MONTENEGRO		
Aplicação antebraço: Esq. () Dir. ()	Resultado: Pos () Neg () Não lido ()	Medida da reação (mm):

Cód. Amostra _____

4. ESPÉCIMES COLETADOS		
Sangue EDTA () Soro () Raspado lesão () FTA DNA () FTA ELISA () Heparinizado PBMC ()		
5. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA		
qPCR	Isoenzimas	
6. CARGA PARASITÁRIA (fg/uL)		
Antes do tratamento: _____ Data coleta: _____ Espécime coletado: _____		
Durante o tratamento: _____ Data coleta: _____ Espécime coletado: _____		
Durante o tratamento: _____ Data coleta: _____ Espécime coletado: _____		
Durante o tratamento: _____ Data coleta: _____ Espécime coletado: _____		
Após o tratamento: _____ Data coleta: _____ Espécime coletado: _____		

APÊNDICE B- TCLE ADULTO IAM

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a.) para participar da Pesquisa ‘**Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.**’, sob a responsabilidade da pesquisadora **Rayana Carla Silva de Moraes**, cujo objetivo é descobrir a espécie do micróbio causador da leishmaniose tegumentar Americana (LTA) em pacientes, com o intuito de um melhor direcionamento no tratamento da doença, além de fornecer informações sobre os fatores que estão relacionados com a leishmaniose no Brasil.

Se o (a) Sr. (a.) concordar em participar deste estudo, nós utilizaremos a mesma amostra (sangue e *imprint* ou biópsia de lesão ou aspirado de lesão) que já foi solicitada e coletada conforme a indicação médica e encaminhada para o diagnóstico de LTA. A partir dos procedimentos rotineiros que já serão realizados com sua amostra, se o (a) Sr. (a.) tiver diagnóstico positivo para LTA, nós usaremos para o nosso estudo uma parte do material tirado da sua amostra já coletada, com o intuito de pesquisar o tipo do micróbio causador da LTA, podendo através disso saber qual é a espécie que está causando a doença, ou pelo menos direcioná-la.

Se o seu diagnóstico for positivo para LTA, como segunda etapa deste estudo, enquanto o (a) Sr. (a.) estiver em tratamento, serão feitas de 3 a 4 coletas de sangue em veia periférica para medir a quantidade de DNA do parasito presente no seu sangue, e seguinte a conclusão do tratamento será feita mais uma coleta. As coletas serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e, poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, sendo retirado de 2 a 5 mL de sangue, o equivalente a duas colheres de chá, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias.

Os resultados dos testes moleculares feitos nesse estudo serão entregues ao Sr. (a.) e ao seu médico assistente. Essa pesquisa será importante para o tratamento do (a) Sr. (a.), pois dependendo da espécie do micróbio, a melhor forma de tratamento será avaliada pelo médico.

Se depois de consentir na sua participação o (a) Sr. (a.) desistir de participar, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico. O (a) Sr. (a.) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração.

Informamos que, caso haja interesse do DNA que será extraído da amostra, a qual foi definida e solicitada pelo médico assistente, ser utilizado em outra pesquisa, o (a) Sr. (a.) será contatado (a) novamente, conforme sua autorização (observação abaixo). A amostra a ser armazenada será uma parte do DNA da amostra biológica que o médico pediu para fazer o exame.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a.) poderá entrar em contato com a pesquisadora Rayana Carla Silva de Moraes no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a minha participação no projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Observação:

- Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente.
- Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

_____, ____ de _____ de 20____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____



Impressão do dedo polegar
do paciente (Caso não saiba

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Endereço - Rua (participante) e Telefone

Contatos:

Pesquisadora responsável: Rayana Carla Silva de Moraes

E-mail: rayanacarla_m@hotmail.com

Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE C- TCLE MENOR IAM

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENOR DE IDADE

Convidamos o (a) Menor sob a responsabilidade do (a) Sr. (a.) para participar da Pesquisa **Pesquisa ‘Ensaio de multiplex PCR em tempo real (*TaqMan probe*) para identificação de *Leishmania spp.* relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.’**, sob a responsabilidade da pesquisadora **Rayana Carla Silva de Moraes**, cujo objetivo é descobrir a espécie do micróbio causador da leishmaniose tegumentar Americana (LTA) em pacientes, com o intuito de um melhor direcionamento do tratamento da doença, além de fornecer informações os fatores que estão relacionados com a leishmaniose no Brasil.

Se o (a) Sr. (a.) concordar com a participação do Menor neste estudo, nós utilizaremos a mesma amostra (sangue e *imprint* ou biópsia de lesão ou aspirado de lesão) que já foi solicitada e coletada conforme a indicação médica e encaminhada para o diagnóstico de LTA. A partir dos procedimentos rotineiros que já serão realizados com a amostra do Menor, se o resultado dele for um diagnóstico positivo para LTA, nós usaremos para o nosso estudo uma parte do material tirado da mesma amostra já coletada, com o intuito de pesquisar o tipo do micróbio causador da LTA, podendo através disso saber qual é a espécie que está causando a doença, ou pelo menos direcioná-la.

Se o (a) Menor tiver diagnóstico positivo para LTA, como segunda etapa deste estudo, enquanto o mesmo estiver em tratamento, serão feitas de 3 a 4 coletas de sangue em veia periférica para medir a quantidade de DNA do parasito presente no sangue do Menor, e seguinte a conclusão do tratamento será feita mais uma coleta. As coletas serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e, o Menor poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, sendo retirado de 2 a 5 mL de sangue, o equivalente a duas colheres de chá, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias.

Os resultados dos testes moleculares feitos nesse estudo serão entregues ao Sr. (a.) e ao médico que solicitou o exame do Menor. Essa pesquisa será importante para o tratamento do Menor, pois dependendo da espécie do micróbio, a melhor forma de tratamento será avaliada pelo médico.

Se depois de consentir na participação do Menor, o (a) Sr. (a.) desistir de participar, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao acompanhamento clínico e terapêutico do Menor. O (a) Sr. (a.) e o Menor não terão nenhuma despesa e também não receberão nenhuma remuneração.

Informamos que, caso haja interesse do DNA que será extraído da amostra, a qual foi definida e solicitada pelo médico assistente do Menor, ser utilizado em outra pesquisa, o (a) Sr. (a.) será contatado (a) novamente, conforme sua autorização (observação abaixo). A amostra a ser armazenada será uma parte do DNA da amostra biológica que o médico pediu para fazer o exame.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a.) poderá entrar em contato com a pesquisadora Rayana Carla Silva de Moraes no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a participação do (a) Menor _____ no projeto, sabendo que nem eu e nem o (a) Menor não vamos ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

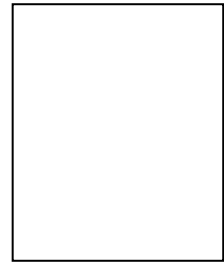
Observação:

- Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente.
- Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

_____, ____ de _____ de 20____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____



Impressão do dedo polegar
do paciente (Caso não saiba
assinar)

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Endereço - Rua (participante) e Telefone

Contatos:

Pesquisadora responsável: Rayana Carla Silva de Morais
E-mail: rayanacarla_m@hotmail.com

Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE D- TERMO DE ASSENTIMENTO IAM

INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES DEPARTAMENTO DE IMUNOLOGIA TERMO DE ASSENTIMENTO

Convidamos você para participar da Pesquisa Pesquisa ‘**Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.**’, sob a responsabilidade da pesquisadora **Rayana Carla Silva de Moraes**, cujo objetivo é descobrir a espécie do micróbio causador da leishmaniose tegumentar Americana (LTA) em pacientes, com o intuito de um melhor direcionamento do tratamento da doença, além de fornecer informações sobre os fatores que estão relacionados com a leishmaniose no Brasil.

Se você e o seu responsável concordarem em participar deste estudo, nós utilizaremos a mesma amostra (sangue e *imprint* ou biópsia de lesão ou aspirado de lesão) que já foi solicitada e coletada conforme a indicação médica e encaminhada para o diagnóstico de LTA. A partir dos procedimentos rotineiros que já serão realizados com sua amostra, se você tiver diagnóstico positivo para LTA, nós usaremos para o nosso estudo uma parte do material tirado da sua amostra já coletada, com o intuito de pesquisar o tipo do micróbio causador da LTA, podendo através disso saber qual é a espécie que está causando a doença, ou pelo menos direcioná-la.

Se o seu diagnóstico for positivo para LTA, como segunda etapa deste estudo, enquanto o (a) Sr. (a.) estiver em tratamento, serão feitas de 3 a 4 coletas de sangue em veia periférica para medir a quantidade de DNA do parasito presente no seu sangue, e seguinte a conclusão do tratamento será feita mais uma coleta. As coletas serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e, poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, sendo retirado de 2 a 5 mL de sangue, o equivalente a duas colheres de chá, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias.

Os resultados dos testes moleculares feitos nesse estudo serão entregues ao seu responsável e ao seu médico assistente. Essa pesquisa será importante para saber qual é o remédio que o médico vai passar para você, pois dependendo da espécie do micróbio, a melhor forma de tratamento será avaliada pelo médico.

Se depois de consentir na sua participação você desistir de participar, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e de tratamento. Você ou o seu responsável não terão nenhuma despesa e também não receberão dinheiro.

Informamos que, caso haja interesse do DNA que será extraído da amostra, a qual foi definida e solicitada pelo médico assistente, ser utilizado em outra pesquisa, você e o seu responsável serão contatados novamente, conforme a observação e autorização abaixo. A amostra a ser armazenada será uma parte do DNA da amostra biológica que o médico pediu para fazer o exame.

A Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) irá conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Os dados fornecidos, coletados e obtidos a partir desta pesquisa poderão ser utilizados nas pesquisas futuras.

Para qualquer outra informação, você ou o seu responsável poderão entrar em contato com a pesquisadora Rayana Carla Silva de Moraes no endereço Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil, pelo telefone (81) 2101-2679.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a minha participação no projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pela pesquisadora, ficando uma via com cada um de nós.

Observação:

- Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente.
- Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

_____, ____ de _____ de 20____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____



Impressão do dedo polegar
do paciente (Caso não saiba
assinar)

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Endereço - Rua (participante) e Telefone

Contatos:

Pesquisadora responsável: Rayana Carla Silva de Morais

E-mail: rayanacarla_m@hotmail.com

Conselho de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

APÊNDICE E- TCLE ADULTO FMT-HDV

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL HEITOR VIEIRA DOURADO GERÊNCIA DE LEISHMANIOSE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o (a) Sr. (a.) para participar da Pesquisa ‘Ensaio de multiplex PCR em tempo real (*TaqMan probe*) para identificação de espécies de *Leishmania* relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.’, sob a responsabilidade do pesquisador Jorge Augusto de Oliveira Guerra, cujo objetivo é descobrir a espécie do micróbio causador da leishmaniose tegumentar Americana (Leche) em pacientes, com o intuito de um melhor direcionar o tratamento da doença, além de fornecer informações sobre as causas que estão relacionadas com a leishmaniose no Brasil.

A sua participação será voluntária e se você concordar em participar no estudo, será preenchida uma ficha individual onde registraremos os dados sobre a sua doença e serão feitos os exames. Os exames serão coletados, através de raspado e *imprint*, aspirado ou biópsia – que é a retirada de um pequeno pedaço da pele que tem a ferida), dois pequenos fragmentos de pele da ferida ou lesão, com “punch”- um instrumento que corta a pele fazendo um pequeno círculo – após ter sido aplicada anestesia local), ou uso de uma agulha debaixo da pele que vai aspirar o material em uma seringa/ou lancetas descartáveis estéreis coletada conforme a indicação médica e encaminhada para o diagnóstico de Leche e nós usaremos para o nosso estudo uma parte do material tirado da sua amostra, com o intuito de pesquisar o tipo do micróbio causador da Leche, procurando saber através disso qual é a espécie que está causando a doença, ou pelo menos direcioná-la.

Como segunda etapa deste estudo, enquanto o (a) Sr. (a.) estiver em tratamento, serão feitas duas a coletas de sangue da veia do braço para medir a quantidade de substâncias (DNA) do parasito presente no seu sangue, e seguinte ao termino de seu tratamento conclusão do tratamento será feita mais uma coleta de sangue de 5ml. As coletas serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e, poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, sendo retirado de 5 mL de sangue, o equivalente a duas colheres de sopa, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias, mas caso haja algum problema relativo a isso você poderá me contactar pelo numero de Celular 999883215 que eu poderei orienta-talo e atende-lo se for necessário.

Os resultados dos testes moleculares feitos nesse estudo serão entregues ao Sr. (a.) e ao seu médico assistente. Essa pesquisa será importante para o tratamento do (a) Sr. (a.), pois dependendo da espécie do micróbio, a melhor forma de tratamento será avaliada pelo médico.

Se depois de consentir na sua participação o (a) Sr. (a.) desistir de participar, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico.

“No caso em que ocorra algum prejuízo decorrente de sua participação neste estudo você terá direito a indenizações, pagamentos ou ressarcimento de gastos relacionados com a pesquisa. O ressarcimento de gastos é a compensação financeira, exclusivamente de despesas devido a sua participação na pesquisa, inclusive de seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação. Considerando que o número de consultas que serão feitas durante a pesquisa correspondem ao mesmo número de consultas realizadas na rotina de atendimento de pacientes com leishmaniose, o presente projeto não prevê ressarcimento de gastos com alimentação e transporte. A indenização é a compensação devida a anular ou reduzir um dano, originado por decorrência de sua participação no estudo. O presente estudo não contempla a contratação de seguro para indenização de participantes da pesquisa, no entanto, o seu direito a indenização, lhe é garantido por lei e a instituição se compromete a lhe oferecer todos os meios nela disponíveis para corrigir os problemas que possam aparecer.

“A Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMTHVD) irá enviar as amostras de sangue material coletado de suas feridas para a FIOCRUZ em Recife PE para que sejam feitos os testes necessários e conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

No caso em que haja necessidade de utilizar o material armazenado o material excedente (pele, ou sangue), que ficará devidamente protegido por um código para evitar que você seja identificado, em lugar específico chamado de Biorrepositório, você será contatado novamente para dar autorização a uma nova pesquisa que será submetida ao comitê de Ética em pesquisas da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado e ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisas, quando for o caso. A qualquer momento você tem o direito de pedir esse material excedente de volta, ou retirar seu consentimento para seu uso quando bem quiser. Você será comunicado caso esse material excedente, que vai ficar estocado, venha a ser descartado ou perdido.”

Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a.) poderá entrar em contato com a pesquisadora Jorge Augusto de Oliveira Guerra no endereço Av. Pedro Teixeira 25, FMTHVD Bairro D. Pedro em Manaus AM, pelo celular que lhe foi indicado a qualquer hora ou pelo telefone (92) 2127-3525 no horário comercial. Ou caso

tenha duvidas ou queixas devido sua participação neste estudo poderá entrar em contato com o Comite de Ética médica da FMTHVD no horário de 8:00 às 14:00h

Consentimento

pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a minha participação no projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós. Observação: Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente. Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

Observação:

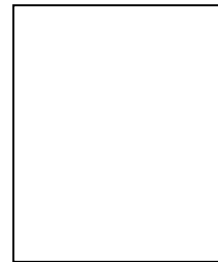
- Autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente.

- Não autorizo que minha amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

_____, ____ de _____ de 20 ____

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____



Impressão do dedo polegar do paciente (Caso não saiba assinar)

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Endereço - Rua (participante) e Telefone

Contatos:

Jorge Augusto de Oliveira Guerra Pesquisador responsável 92 999 88 32 15

Comite de Ética em Pesquisa da FMTHVD Telefone: (92) 2127-3572

e-mail: cep@fmt.am.gov.br

APÊNDICE F- TCLE MENOR FMT-HDV

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL HEITOR VIEIRA DOURADO GERÊNCIA DE LEISHMANIOSE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - MENORES

Convidamos o (a) Menor sob a responsabilidade do (a) Sr. (a.) para participar da Pesquisa **‘Ensaio de multiplex PCR em tempo real (*TaqMan probe*) para identificação de espécies de *Leishmania* relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana**, sob a responsabilidade do pesquisador **Jorge Augusto de Oliveira Guerra**, cujo objetivo é descobrir a espécie do micróbio causador da leishmaniose tegumentar Americana (Leche) em pacientes, com o intuito de um melhor direcionar o tratamento da doença, além de fornecer informações sobre as causas que estão relacionadas com a leishmaniose no Brasil.

A participação do menor será voluntária e se ele e o Sr. concordar em que ele participe no estudo, será preenchida uma ficha individual onde registraremos os dados sobre a doença e serão feitos os exames. Os exames serão coletados, através de raspado e *imprint*, aspirado ou biópsia – que é a retirada de um pequeno pedaço da pele que tem a ferida), dois pequenos fragmentos de pele da ferida ou da lesão de mucosa, ou lesão, com “punch”- um instrumento que corta a pele fazendo um pequeno círculo – após ter sido aplicada anestesia local), ou uso de uma agulha debaixo da pele que vai aspirar o material em uma seringa/ou lancetas descartáveis estéreis coletada conforme a indicação médica e encaminhada para o diagnóstico de Leche e nós usaremos para o nosso estudo uma parte do material tirado da sua amostra, com o intuito de pesquisar o tipo do micróbio causador da Leche, procurando saber através disso qual é a espécie que está causando a doença, ou pelo menos direcioná-la.

Como segunda etapa deste estudo, enquanto o menor estiver em tratamento, serão feitas duas coletas de sangue da veia do braço para medir a quantidade de substâncias (DNA) do parasito presente no seu sangue, e seguinte ao término de seu tratamento (conclusão do tratamento) será feita mais uma coleta de sangue de 2,5ml. As coletas serão realizadas com uso de agulha e seringa estéreis e descartáveis e, poderá sentir um desconforto no momento em que a agulha for introduzida na sua pele, sendo retirado de 2,5 mL de sangue, o equivalente a uma colher de sopa, este processo também poderá causar uma mancha roxa no local que, desaparecerá com o tempo de, aproximadamente, sete dias, mas caso haja algum problema relativo a isso você poderá me contactar pelo numero de Celular 999883215 que eu poderei orienta-lo e atender o menor se for necessário.

Os resultados dos testes moleculares feitos nesse estudo serão entregues ao Sr. (a.) pelo seu médico assistente, no caso o pesquisador. Essa pesquisa será importante para o tratamento do menor, pois dependendo da espécie do micróbio, a melhor forma de tratamento será avaliada pelo médico.

Se depois de consentir na participação do menor o (a) Sr. (a.) ou ele desistirem de participar, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhuma forma de prejuízo ao seu acompanhamento clínico e terapêutico.

“No caso em que ocorra algum prejuízo decorrente de sua participação do menor neste estudo você e/ou ele terão direito a indenizações, pagamentos ou ressarcimento de gastos relacionados com a pesquisa. O ressarcimento de gastos é a compensação financeira, exclusivamente de despesas devido a sua participação na pesquisa, inclusive de seus acompanhantes, quando necessário, tais como transporte e alimentação. Considerando que o número de consultas que serão feitas durante a pesquisa correspondem ao mesmo número de consultas realizadas na rotina de atendimento de pacientes com leishmaniose, o presente projeto não prevê ressarcimento de gastos com alimentação e transporte. A indenização é a compensação devida a anular ou reduzir um dano, originado por decorrência de sua participação no estudo. O presente estudo não contempla a contratação de seguro para indenização de participantes da pesquisa, no entanto, o seu direito a indenização, lhe é garantido por lei e a instituição se compromete a lhe oferecer todos os meios nela disponíveis para corrigir os problemas que possam aparecer.

Informamos que, caso haja interesse do material (DNA) que será extraído da amostra, a qual foi definida e solicitada pelo médico assistente, ser utilizado em outra pesquisa, o (a) Sr. (a.) será contatado (a) novamente, conforme sua autorização (observação abaixo), assim como a do menor participante. A amostra a ser armazenada será uma parte do DNA da amostra biológica que o médico pediu para fazer o exame.

“A Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMTHVD) irá enviar as amostras de sangue material coletado de suas feridas para a FIOCRUZ em Recife PE para que sejam feitos os testes necessários e conservar, sob sua guarda, qualquer amostra de DNA até que esta pesquisa seja concluída. Os resultados dos exames, assim como os da pesquisa serão analisados e publicados, mas a identidade do menor não será divulgada, sendo guardada em sigilo.

No caso em que haja necessidade de utilizar o material armazenado o material excedente (pele, ou sangue), que ficará devidamente protegido por um código para evitar que você seja identificado, em lugar específico chamado de Biorrepositório, você e o menor serão contatados novamente para dar autorização a uma nova pesquisa que será submetida ao comitê de Ética em pesquisas da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor

Vieira Dourado e ao Comitê Nacional de Ética em Pesquisas, quando for o caso. A qualquer momento você tem o direito de pedir esse material excedente de volta, ou retirar seu consentimento para seu uso quando bem quiser. Você será comunicado caso esse material excedente, que vai ficar estocado, venha a ser descartado ou perdido.”

Para qualquer outra informação, o (a) Sr. (a.) poderá entrar em contato com a pesquisadora **Jorge Augusto de Oliveira Guerra** no endereço Av. Pedro Teixeira 25, FMTHVD Bairro D. Pedro em Manaus AM, pelo celular que lhe foi indicado a qualquer hora ou pelo telefone (92) 2127-3525 no horário comercial. Ou caso tenha dúvidas ou queixas devido sua participação neste estudo poderá entrar em contato com o Comitê de Ética médica da FMTHVD no horário de 8:00 às 14:00h

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da colaboração do menor _____, sob minha responsabilidade e entendi a explicação. Por isso, eu concordo com a minha participação mesmo no projeto, sabendo que ele pode sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

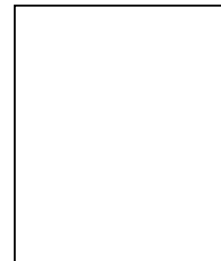
Observação:

- Autorizo que a amostra seja guardada após conclusão do estudo e caso haja interesse da amostra ser utilizada em outra pesquisa autorizo que me contatem novamente.
- Não autorizo que a amostra seja guardada após conclusão deste estudo.

_____, ____ de _____ de 20_____

Nome do responsável pelo paciente: _____

Assinatura do responsável pelo paciente: _____



Impressão do dedo polegar
do paciente (Caso não saiba

Nome do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Assinatura do Membro da Equipe de Pesquisa: _____

Nome da Testemunha: _____

Assinatura da Testemunha: _____

Endereço - Rua (participante) e Telefone

Contatos:

Jorge Augusto de Oliveira Guerra
Pesquisador responsável 92 999 88 32 15
Comite de Ética em Pesquisa da FMTHVD
Telefone: (92) 2127-3572
e-mail: cep@fmt.am.gov.br

APÊNDICE G- ARTIGO RELACIONADO PUBLICADO EM REVISTA

Experimental Parasitology 165 (2016) 43–50



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr



Full length article

Real-time PCR for *Leishmania* species identification: Evaluation and comparison with classical techniques



Rayana Carla Silva de Moraes ^a, Cintia Nascimento da Costa Oliveira ^a,
Suênia da Cunha Gonçalves de Albuquerque ^a, Lays Adrienne Mendonça Trajano Silva ^a,
Rômulo Pessoa-e-Silva ^a, Heidi Lacerda Alves da Cruz ^b, Maria Edileuza Felinto de Brito ^a,
Milena de Paiva Cavalcanti ^{a,*}

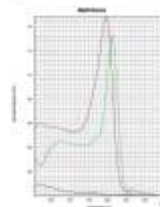
^a Aggeu Magalhães Research Centre, Cidade Universitária, Av. Moraes Rego, CEP 50670-420, Recife-PE, Brazil

^b Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Av. Moraes Rego s/n, CEP 50670-420, Recife-PE, Brazil

HIGHLIGHTS

- We standardized of melting temperature for *Leishmania* spp. identification.
- Two ranges were created for analysis.
- The created ranges separated the species with clinical importance.
- qPCR can be used as a method for indicate *Leishmania* species present in the sample.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 January 2016

Received in revised form

1 March 2016

Accepted 4 March 2016

Available online 9 March 2016

Keywords:

Real time PCR

Melting temperature

ABSTRACT

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is a parasitic disease caused by various *Leishmania* species. Several studies have shown that real time quantitative PCR (qPCR) can be used for *Leishmania* spp. identification by analyzing the melting temperature (T_m). Thus, the aim of this study was to evaluate the viability of qPCR for differentiating eight closely related *Leishmania* species that cause the same clinical form of the disease and to compare the results with classical techniques.

Methods: qPCR assays for standardizing the T_m using reference strains were performed. After the CL diagnosis on blood samples of domestic animals, positive samples were analyzed by their T_m and qPCR products were purified and sequenced. Ten human samples previously characterized by Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) were also analyzed by T_m. A Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) assay, a reference test, was also standardized, by using the reference strains.

Abbreviations: BLASTn, Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool; CL, cutaneous leishmaniasis; FIOCRUZ, Oswaldo Cruz Foundation Institute; IOC, Oswaldo Cruz Institute; kDNA, kinetoplast DNA; MLEE, Multilocus Enzyme Electrophoresis; PE, Pernambuco; qPCR, quantitative real time PCR; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; RJ, Rio de Janeiro; SSrDNA, Smaller Subunit ribosomal DNA; T_m, Temperature of melting.

* Corresponding author.

E-mail addresses: rayanacarla_m@hotmail.com (R.C.S. de Moraes), cintiancosta_81@hotmail.com (C.N. da Costa Oliveira), sueniaaa@hotmail.com (S.C.G. de Albuquerque), laysrajano@gmail.com (L.A. Mendonça Trajano Silva), romulo72@gmail.com (R. Pessoa-e-Silva), heidi.alves@gmail.com (H.L. Alves da Cruz), brilho@cpqam.fiocruz.br (M.E.F. de Brito), mp@cpqam.fiocruz.br (M. de Paiva Cavalcanti).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.005>
0014-4894/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

**ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
(IAM)**



Comitê de Ética
em Pesquisa

Título do Projeto: "Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de Leishmania spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana".

Pesquisador responsável: Rayana Carla Silva de Moraes

Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz

Data de apresentação ao CEP: 04/03/2015

Registro no CAAE: 42479515.8.0000.5190

Número do Parecer PlatBr: 1.137.492

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 466/12, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 23 de julho de 2015.

Vice - Coordenador do CEP/CPqAM

Paul Hindenburg Hebra de V. Silva
Análise de Gestão em Saúde
Vice-Coordenador
Mat. SIAPE 1558806
CEP/CPqAM/Fiocruz



Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
CEP 50.670-420 Fone: (81) 2101.2639
Fax: (81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife - PE - Brasil
comitedestica@cpqam.fiocruz.br



ANEXO B- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (FMT)

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana

Pesquisador: Jorge Augusto de Oliveira Guerra

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 58130616.0.1001.0005

Instituição Proponente: Diretoria de Ensino e Pesquisa - DENPE

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À CIÊNCIA E TECNOLOGIA - FACEPE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.759.541

Apresentação do Projeto:

Intitulado: Ensaio de multiplex PCR em tempo real (TaqMan probe) para identificação de *Leishmania* spp. relacionadas com a etiologia da leishmaniose tegumentar Americana.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a aplicabilidade da tecnologia TaqMan probe para identificação de *Leishmania* spp. e correlacionar esta identificação com a evolução clínica e terapêutica dos pacientes, em área endêmica para a LTA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Riscos Baixos, inclui apenas coleta de sangue periférico e Biópsia;

Benefícios: A aplicabilidade do método pra caracterização de casos de LTA com vistas ao prognóstico baseado na espécie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto multicêntrico. Instituições participantes Fiocruz/PE e FMT-HVD.

Em continuidade a linha de pesquisa iniciada durante o curso de mestrado; onde os resultados

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_750223.pdf	21/09/2016 11:05:27		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CartaanuenciFMTJG.pdf	16/09/2016 09:33:37	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Avaliação	TCLFMTmenoresRAYANAcomgtdc.pdf	07/09/2016 12:43:27	Rayana Moraes	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ANUENCIAINSTITUCIONALaes.pdf	26/07/2016 11:48:35	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderostoRAYANA.pdf	26/07/2016 11:45:48	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Avaliação	TCLFMTRAYAN.pdf	21/07/2016 17:39:57	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
Outros	FICHACLINICAprjRayane.pdf	19/07/2016 18:12:30	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Avaliação	TCLFMTmenoresRAYANA.pdf	19/07/2016 18:09:52	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoRAYANE2016FMT-HVDCPAM.pdf	19/07/2016 18:09:24	Jorge Augusto de Oliveira Guerra	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

ANEXO C – SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A26B8A0

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A26B8A0
Usuário:	Fiocruz
CPF/CNPJ:	33.781.055/0001-35
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Leishmania spp

Leishmania sp

Titulo da Atividade: **Inovações para o controle de patógenos**

Equipe

MILENA DE PAIVA CAVALCANTI

Fiocruz

Data do Cadastro: **18/05/2018 10:43:24**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **9:54 de 25/07/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**