

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Juliana Bezerra Medeiros Viana

ANÁLISE DE ASSINATURAS DE MINICÍRCULOS DO kDNA DE *Leishmania* spp.  
PRESENTES EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO

RECIFE  
2015

Juliana Bezerra Medeiros Viana

ANÁLISE DE ASSINATURAS DE MINICÍRCULOS DO kDNA DE *Leishmania* spp.  
PRESENTES EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Dr. Sinval Pinto Brandão Filho.

**Coorientador:** Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues.

RECIFE

2015

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- V614a Viana, Juliana Bezerra Medeiros.  
Análise de assinaturas de minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana de Pernambuco / Juliana Bezerra Medeiros Viana. - Recife: [s.n.], 2016.  
61 p. : ilus.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2016.  
Orientador: Sinval Pinto Brandão Filho.
1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Reação em Cadeia da Polimerase. 3. Técnicas de Genotipagem. 4. *Leishmania*. Brasil. 1. Brandão Filho, Sinval Pinto. II. Título.

JULIANA BEZERRA MEDEIROS VIANA

ANÁLISE DE ASSINATURAS DE MINICÍRCULOS DO kDNA DE *Leishmania* spp.  
PRESENTES EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data de Aprovada: 28/10/2015

BANCA EXAMINADORA

---

**Dr. Sinval Pinto Brandão Filho**

Departamento de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ

---

**Dra. Milena de Paiva Cavalcanti**

Departamento de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ

---

**Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Junior**

Departamento de Imunologia - CPqAM/FIOCRUZ

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e abençoar meu caminho.

Ao meu pai pelo empenho de sempre me proporcionar tudo de melhor, com muito amor, dedicação, apoio e compreensão.

A minha mãe (*in memoriam*) que amo incondicionalmente. Mulher maravilhosa, guerreira, um exemplo para a minha vida.

Ao meu irmão pelo amor incomparável e fiel companheirismo.

A minha avó Iracema pelo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu namorado, Bruno Fidelis, pelo carinho, compreensão e cumplicidade em todos os momentos.

Ao meu orientador, Dr. Sinval Pinto Brandão Filho por proporcionar e incentivar o trabalho.

Ao meu coorientador, Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues, pela amizade, oportunidade e confiança.

Ao Msc. Roberto Werkhäuser, por toda a dedicação, solicitude e apoio prestados para o desenvolvimento desse estudo. E principalmente pela amizade e ensinamentos para a vida.

À Dr. Maria Edileuza pelo incentivo, motivação e dedicação ao desenvolvimento deste estudo.

A Msc. Joanna Lúcia Alexandre, pela amizade, companheirismo e apoio ao longo dos trabalhos desenvolvidos em parceria.

Aos meus colegas e amigos de laboratório pelo convívio diário e alegrias compartilhadas.

Aos meus amigos de faculdade Patrícia, Amanda, Camila, Matheus, Renata por toda amizade e companheirismo.

A todos os órgãos de fomento (Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM) pelo apoio financeiro de projetos, tornando possível a realização do trabalho e ao pela concessão da bolsa de mestrado e por todo suporte em infraestrutura.

Enfim, a todos que me ajudaram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

“Se o Senhor não guardar a cidade, em  
vão vigia a sentinela.”

Salmo 127:1

VIANA, J.B.M. **Análise de assinaturas de minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana de Pernambuco.** 2015. -Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença que apresenta características clínicas e epidemiológicas complexas, mediante a diversidade de espécies envolvidas na sua transmissão. Métodos de biologia molecular, baseados em análise dos ácidos nucleicos, são aplicados na realização de estudos sobre a variabilidade genética dos parasitos, contudo a escolha do método e do marcador a ser utilizado continua sendo um desafio. Os métodos convencionalmente utilizados para estudos da variabilidade genética de *Leishmania* dependem do isolamento prévio de parasitos em meios de cultura, o qual pode sofrer interferências de acordo com as condições de coleta e armazenamento do material biológico, além de ser passível de contaminações. Além disso, essas técnicas demandam o uso de reagentes e equipamentos adicionais que aumentam a complexidade e o custo do processo. Nesse contexto, a técnica molecular de LSSP-PCR (*Low-Stringency Single Primer-Polimerase Chain Reaction*) produz perfis genéticos que refletem as classes de minicírculos predominantes, sendo utilizada em estudos que visam discriminar genótipos de espécies de *Leishmania*. Diante disso, o propósito do estudo foi a identificação de variantes genéticas de *Leishmania* presentes em pacientes com diferentes manifestações clínicas da LTA. Foram incluídos no estudo pacientes que apresentaram diagnósticos clínicos positivos para LTA. O diagnóstico laboratorial envolveu a abordagem molecular por meio da extração do DNA das amostras de aspirado de lesão e sangue, seguidas da PCR convencional. 71 pacientes foram analisados, havendo ocorrência de DNA do parasito em 18 amostras de aspirado de lesão e nenhuma positividade através das amostras de sangue. O resultado da LSSP-PCR gerou perfis de assinaturas de kDNA, mostrando, porém, que manifestações clínicas de LTA, descritas de uma maneira abrangente, aparentemente não podem ser diferenciadas através de padrões de assinaturas de kDNA de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

**Palavras-chave:** Leishmaniose Tegumentar Americana, Reação em cadeia da polimerase, Técnicas de genotipagem, *Leishmania*.

VIANA, J.B.M. **Minicircle signature kDNA analysis of *Leishmania* spp. present in clinical samples from patients with cutaneous leishmaniasis American Pernambuco.** 2015. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

### ABSTRACT

The American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) is a disease with complex clinical and epidemiological characteristics, by the diversity of species involved in the transmission. Molecular biology methods, based on analysis of nucleic acids, are applied in studies of the genetic variability of parasites, but the choice of method and the marker to be used remains a challenge. The methods conventionally used for studies of genetic variability of *Leishmania* depend on prior isolation of parasites in culture media which can be influenced according to the conditions of collection and storage of biological material, and is subject to contamination. Moreover, these techniques require the use of additional reagents and equipment which increase the complexity and cost of the process. In this context, LSSP-PCR (*Low-stringency Single Primer Polymerase Chain Reaction*) molecular technique produces genetic profiles that reflect the predominant minicircle classes being used in studies aimed discriminate genotypes *Leishmania* species. Thus, the purpose of the study was the identification of genetic variants of *Leishmania* present in patients with different clinical manifestations of LTA. The study included patients with positive clinical diagnosis for LTA. Laboratory diagnosis involving molecular approach by DNA extraction from samples drawn from injury and blood, followed by conventional PCR. 71 patients were analyzed, with occurrence of parasite DNA in samples 18 to aspirate the lesion and no positive through blood samples. The result of LSSP-PCR generated kDNA signature profiles showing, however, that clinical manifestations of ACL described in a comprehensive manner, apparently cannot be differentiated by standard kDNA signatures *Leishmania (V.) braziliensis*.

**Keywords:** American Cutaneous Leishmaniasis, Polymerase chain reaction, Genotyping techniques, *Leishmania*.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar no mundo, 2013.	15
<b>Figura 2</b>	Formas amastigotas e promastigotas de <i>Leishmania</i> spp.	17
<b>Figura 3</b>	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .	18
<b>Figura 4</b>	Lesão ulcerada única de LTA.	19
<b>Figura 5</b>	Forma cutânea difusa de LTA.	20
<b>Figura 6</b>	Forma cutânea disseminada de LTA.	20
<b>Figura 7</b>	Forma mucosa de LTA.	21
<b>Figura 8</b>	Forma recidiva cútis de LTA.	21
<b>Figura 9</b>	Micrografia eletrônica do kDNA de <i>Leishmania</i> spp., composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos	25
<b>Figura 10</b>	Fluxograma esquemático das etapas do estudo.	29
<b>Figura 11</b>	Procedimento de coleta de aspirado de lesão.	30
<b>Figura 12</b>	Eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 1,8% corado pelo brometo de etídio. Demonstrando o padrão de bandejamento obtido após LSSP-PCR em amostras de DNA positivas provenientes de aspirado de lesão.	39
<b>Figura 13</b>	Eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 1,8% corado pelo brometo de etídio. Demonstrando o padrão de bandejamento obtido após LSSP-PCR em amostras de DNA positivas provenientes de aspirado de lesão.	40
<b>Figura 14</b>	Dendrograma mostrando os perfis genéticos obtidos pelo LSSP-PCR.	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Distribuição das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes selecionados no estudo.	36
<b>Tabela 2</b>	Dosagem de DNA e grau de pureza das amostras de aspirado de lesão, extraídas de acordo com o item 5.5.1.	37
<b>Tabela 3</b>	Dosagem de DNA e grau de pureza das amostras de aspirado de lesão, extraídas de acordo com o item 5.5.4.	38
<b>Tabela 4</b>	Dados das apresentações clínicas e perfil de bandeamento entre cada amostra analisada através da LSSP-PCR.	40
<b>Tabela 5</b>	Dados de presença e ausência de bandas formadas através da LSSP-PCR com amostras de aspirado de lesão.	41
<b>Tabela 6</b>	Matriz de similaridade genética estimada pelo índice de Simple Macthing (1958).	41

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	<i>Deoxuribonucleotide triphosphates</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Imunofluorescência indireta
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
k <sub>3</sub> EDTA	<i>Tripotassium Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
kDNA	<i>Kinetoplast DNA</i>
L.	<i>Leishmania</i>
LSSP-PCR	<i>Low-Stringence Single Primer-Polimerase Chain Reaction</i> or
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LRC	Leishmaniose Recidiva Cútis
MLEE	<i>Multi Locus Enzyme Electrophoresis</i>
M.O.	Microscopia óptica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PD	Pesquisa Direta
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Pernambuco
RMR	Região Metropolitana do Recife
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
sp	Espécie
spp	Espécies
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UPE	Universidade de Pernambuco
V.	<i>Viannia</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>2.1 Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar</b> .....	16
<b>2.2 Etiologia e transmissão leishmaniose tegumentar</b> .....	17
<b>2.3 Apresentações clínicas da LTA</b> .....	19
2.3.1 Forma cutânea localizada .....	20
2.3.2 Forma cutânea difusa .....	20
2.3.3 Forma cutânea disseminada .....	21
2.3.4 Forma mucosa .....	22
2.3.5 Forma recidiva cútis .....	22
<b>2.4 Diagnóstico da leishmaniose</b> .....	23
2.4.1 Diagnóstico parasitológico .....	23
2.4.1.1 Exame parasitológico .....	22
2.4.1.2 Cultivo de <i>Leishmania</i> spp. ....	23
2.4.2 Diagnóstico imunológico e sorológico .....	24
2.4.2.1 Intradermorreação de Montenegro (IDRM) .....	23
2.4.2.2 IFI, ELISA e Western Blot .....	23
2.4.3 Diagnóstico molecular .....	25
<b>2.5 Epidemiologia Molecular</b> .....	25
2.5.1 Identificação de regiões polimórficas .....	25
2.5.2 Alvo para identificação de <i>Leishmania</i> spp. ....	26
2.5.3 LSSP-PCR ( <i>Low-Stringence Single Primer-Polimerase Chain Reaction</i> ). ....	27
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	28
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	29
4.1 Objetivo Geral .....	29
4.2 Objetivos específicos .....	29
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	30
5.1 Desenho experimental .....	30
5.2 Seleção de pacientes .....	30
5.3 Critérios de inclusão .....	31
5.4 Coleta de amostras .....	31

5.4.1 Aspirado de lesão.....	31
5.4.2 Sangue.....	31
<b>5.5 Abordagens moleculares.....</b>	<b>31</b>
5.5.1 Extração e purificação.....	31
5.5.2 PCR convencional.....	32
5.5.3 Análise dos produtos da PCR.....	32
5.5.4 Purificação de DNA.....	33
5.5.5 LSSP-PCR.....	33
5.5.5.1 LSSP-PCR ( <i>OLIVEIRA et al., 2010</i> ).....	32
5.5.5.2 LSSP-PCR ( <i>FERREIRA et al., 2007</i> ).....	32
5.5.6 Análise dos produtos da LSSP-PCR.....	34
<b>5.6 Processamento e análise de dados.....</b>	<b>34</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....</b>	<b>35</b>
<b>7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>7.1 Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes.....</b>	<b>36</b>
<b>7.2 Coleta de amostras.....</b>	<b>37</b>
<b>7.3 Abordagem molecular.....</b>	<b>38</b>
7.3.1 Extração e purificação.....	38
7.3.1 Purificação de DNA.....	39
7.3.3 LSSP-PCR.....	39
7.3.3.1 LSSP-PCR ( <i>Oliveira et al., 2010</i> ).....	39
7.3.3.2 LSSP-PCR ( <i>Ferreira et al., 2007</i> ).....	39
<b>7.4 Processamento e análise de dados.....</b>	<b>42</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>9 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>46</b>
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Paciente).....	56
APÊNDICE B - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.....	58
ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP.....	59

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são enfermidades causadas por várias espécies de protozários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*. São doenças que apresentam características clínicas e epidemiológicas complexas, mediante a diversidade de espécies envolvidas. O gênero *Leishmania* é constituído por aproximadamente 30 espécies, das quais mais de 20 delas são patogênicas para o ser humano.

Nas Américas, são conhecidas onze espécies dermatópicas de *Leishmania*. No Brasil foram identificadas sete dessas espécies, sendo uma do subgênero *Leishmania* e seis do subgênero *Viannia*. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é responsável pela maioria dos casos de leishmaniose tegumentar Americana (LTA) no país, sendo largamente distribuída no território brasileiro e considerada uma das espécies mais importantes para saúde pública. Na região Nordeste, Pernambuco é um dos estados que apresenta o maior número de casos notificados de LTA.

Para o diagnóstico da LTA, o padrão ouro, preconizado pelo Ministério da Saúde, implica na visualização microscópica de formas amastigotas de *Leishmania* spp., em fragmentos de tecido de uma lesão. A probabilidade de encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea, sendo rara após um ano e, além disso, infecções secundárias contribuem para diminuir a sensibilidade do método. O cultivo de parasitos é uma técnica com baixa sensibilidade devido à escassez desses organismos nas amostras clínicas, o que dificulta a identificação de rotina do agente etiológico.

Estudos epidemiológicos têm utilizado métodos moleculares para a investigação das leishmanioses, nos quais uma ampla variedade de ferramentas moleculares está disponível para estas análises, mas a escolha de qual método e/ou marcador a ser utilizado continua sendo um desafio.

Os métodos convencionais desenvolvidos a partir de análise de isoenzimas por eletroforese e imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais dependem do isolamento prévio de parasitos em meios de cultura, que é passível de contaminações. Além disso, essas técnicas requerem o uso de reagentes e equipamentos adicionais que aumentam a complexidade e o custo do processo.

Com o avanço da biotecnologia, as técnicas de biologia molecular podem representar uma alternativa válida para a melhor compreensão da doença. Nesse

quadro, a reação em cadeia da polimerase (PCR) constitui uma poderosa técnica, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, podendo detectar o DNA do parasito antes mesmo de surgirem sintomas ou sinais clínicos.

O uso deste marcador molecular tendo como alvo o minicírculo de kDNA para discriminar diferentes variantes do parasita diretamente de material clínico é uma ferramenta potencial para investigar assinaturas de kDNA das populações de parasitas. Pois o kDNA é organizado em uma rede de milhares de círculos concatenados, que se apresentam de duas formas: os maxicírculos estão presentes em número de 30 a 50 cópias, enquanto que os minicírculos estão presentes em cerca de 10.000 cópias/célula. Vários estudos têm demonstrado a importância do DNA do kinetoplasto (kDNA) como alvo para identificação e caracterização de espécies de *Leishmania*, também como objeto de investigações taxonômicas.

Diferentes marcadores moleculares têm sido aplicados em estudos de variabilidade genética de *Leishmania*. Recentemente, a técnica de LSSP-PCR (*Low-Stringency Single Primer - Polymerase Chain Reaction*) foi aplicada com o intuito de investigar polimorfismo intra-específico da região variável de minicírculos de kDNA de *L. (V.) braziliensis* a partir de pacientes com LTA. Contudo, no presente estudo o objetivo foi avaliar a variabilidade genética de *Leishmania* em amostras de aspirado de lesão e sangue de pacientes com LTA nas diferentes manifestações clínicas.



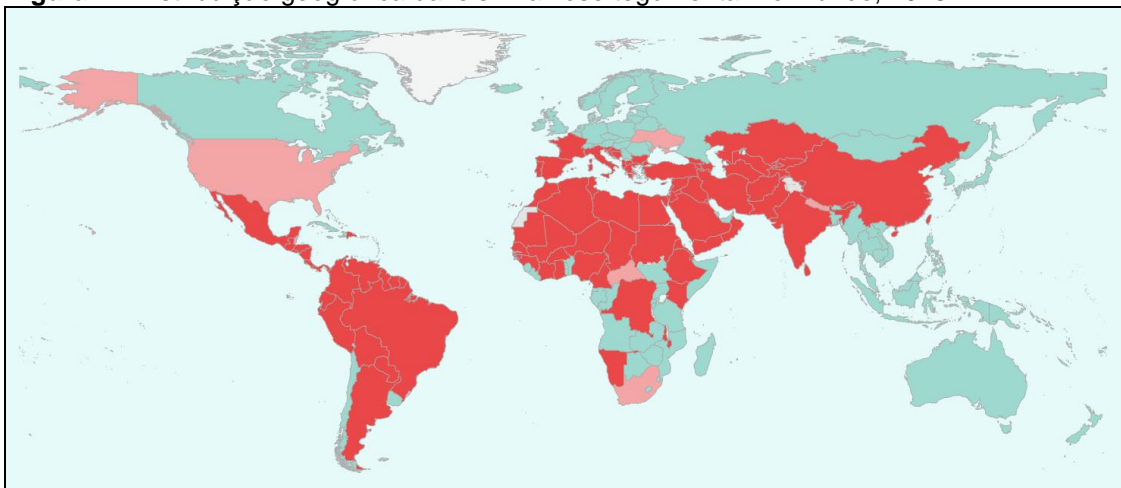
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar

Mais de um milhão de casos de leishmaniose tegumentar (LT) foram relatados entre os anos de 2005 a 2010 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014a). Estima-se que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo (ALVAR et al., 2012). Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Ásia Central e Oriente Médio. (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014c)

Os dez países com a maior estimativa de casos são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos representam 70 a 75% da incidência global estimada (Figura 1) (ALVAR et al., 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b). Alguns países estão listados aqui como endêmicos, apesar da falta de casos humanos relatados, geralmente refletindo uma ausência de vigilância ou de outras investigações (ALVAR et al., 2012; LE FICHOUX et al., 1999).

**Figura 1** - Distribuição geográfica da leishmaniose tegumentar no mundo, 2013.



**Fonte:** Organização Mundial de Saúde (2014d, tradução nossa).

**Legenda:** ■ Endêmico ■ Casos anteriormente relatados ■ Sem casos autóctones relatados ■ Sem casos.

A epidemiologia da leishmaniose tegumentar na região das Américas é complexa, com variação intra e interespecífica, em ciclos de transmissão, hospedeiros, vetores, manifestações clínicas e resposta à terapia, devido à circulação de várias espécies de *Leishmania* na mesma área geográfica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b).

A real prevalência da leishmaniose tegumentar Americana (LTA) não se encontra estabelecida, em virtude de alguns fatores, como: subnotificação de dados; diagnósticos incorretos, infecções inaparentes; variações de resposta do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (ALVAR et al., 2012; COSTA, 2005). Porém, mesmo levando em consideração esses fatores na falha de notificações, o crescimento no número de casos é evidente (MARZOCHI, 1992; NEGRÃO; FERREIRA, 2014).

No Brasil, a LTA representa um importante problema de saúde pública, com cerca de 30 mil novos casos relatados anualmente, o que representa uma incidência de 18,5 casos por 100.000 habitantes (CASTELLUCCI et al., 2014). Sendo considerada uma importante doença dermatológica, devido ao risco de ocorrência de deformidades que pode produzir no ser humano (BRASIL, 2010).

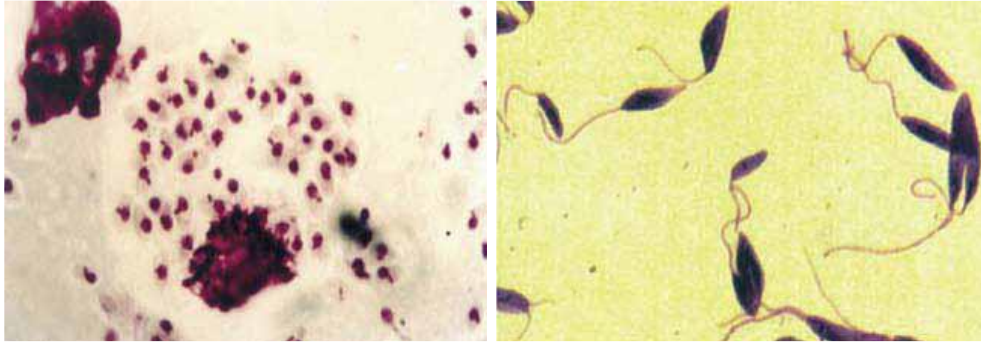
Devido a alterações ecológicas no habitat do vetor, novos focos de leishmaniose vêm surgindo. Esse aumento decorre, principalmente, de processos de desmatamento, práticas agrícolas e urbanização (DESJEUX, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b; REITHINGER et al., 2007).

Apesar da subnotificação, no ano de 2012 no Brasil, foram confirmados 987 casos de LTA e em Pernambuco 284 casos notificados, demonstrando elevada prevalência na região (SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO, 2013). Em todas as regiões do estado de Pernambuco, a LTA está presente, com destaque para a região da Zona da Mata que responde por 60% do total dos casos registrados (ANDRADE, 2005; BRANDÃO-FILHO et al., 1999; BRITO, 2012; PERNAMBUCO, 2006).

## **2.2 Etiologia e transmissão leishmaniose tegumentar**

A LT é uma doença causada por um protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília Phlebotominae pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003; PESSÔA, 1982). Tais parasitos apresentam duas formas principais: amastigota, que é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados, e promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Figura 2) (BRANDÃO-FILHO et al., 2003; BRASIL, 2010).

**Figura 2** - Formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania* spp.



**Fonte:** Brasil (2010).

A doença é causada por uma variedade de espécies de *Leishmania*, responsáveis por um pleomorfismo clínico significativo, com diferentes vetores e reservatórios, além de ampla distribuição geográfica. Essas características dificultam o monitoramento epidemiológico e, eventualmente, a conduta clínica (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; ARÉVALO et al., 2007).

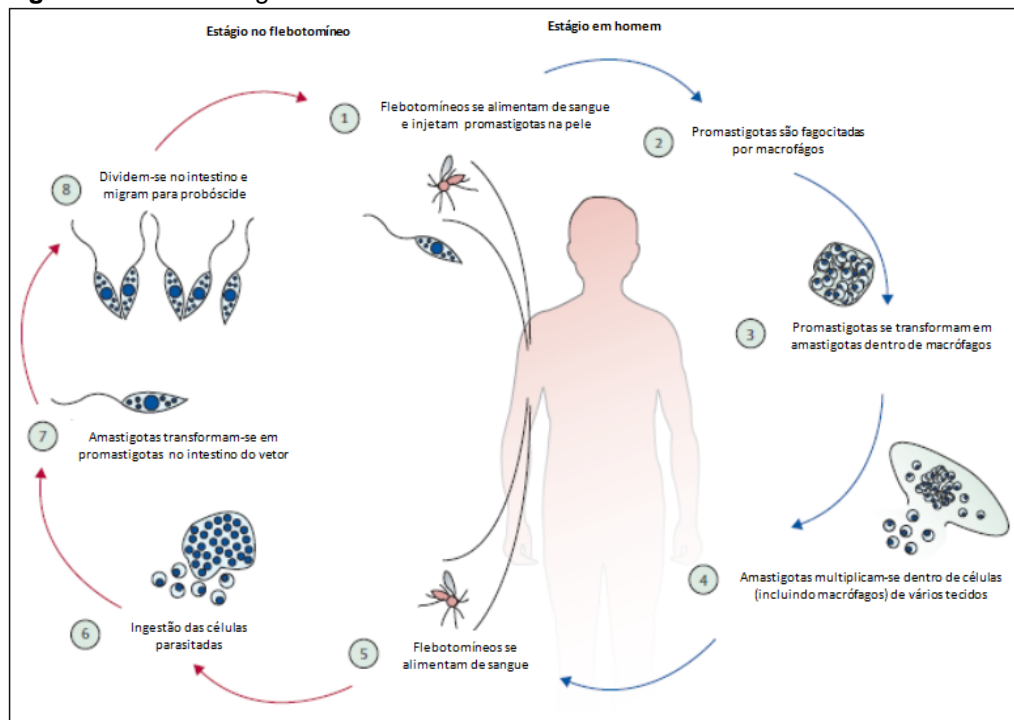
O perfil de transmissão da LT pode ser zoonótica ou antroponótica, a depender do principal reservatório, seja ele animal silvestre/doméstico ou seres humanos, respectivamente (DESJEUX, 1996; READY, 2008). Flebotomíneos, em geral, fazem o repasto sanguíneo em vários hospedeiros, porém, devido à progressiva diminuição do número de reservatórios silvestres e sinantrópicos aumenta a concentração de transmissão de *Leishmania* spp. entre seres humanos, dos quais os insetos passam a se alimentar (CAMPBELL-LENDRUM, 2000; REITHINGER et al., 2007).

O padrão antroponótico, onde os seres humanos são o reservatório primário do parasito, é predominantemente urbano e peri-urbano (DESJEUX, 2001; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014b) e as principais espécies envolvidas nessa transmissão são *Leishmania (Leishmania) tropica* e *L. (L.) donovani* (REITHINGER et al., 2007).

O ciclo de transmissão da doença (Figura 3) tem início quando, durante o repasto sanguíneo, os vetores ingerem as formas amastigotas de um reservatório vertebrado infectado. No intestino do vetor, essas formas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se por divisão simples e assexuada e migram para a proboscíde do inseto. A infecção por *Leishmania* ocorre quando a fêmea infectada, ao realizar o repasto sanguíneo necessário para maturação dos ovos, inocula o

parasito no hospedeiro vertebrado, incluindo o homem (MARZOCHI, 1992; WILSON et al., 2010).

**Figura 3 - Ciclo biológico de *Leishmania*.**



**Fonte:** Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (2012).

**Nota:** Ao picar seus hospedeiros, flebotomíneos infectados regurgitam promastigotas de *Leishmania* na pele (1) que invadem ou são fagocitados, principalmente, por macrófagos (2). Essas formas multiplicam-se e seguem infectando outras células fagocíticas (3). Amastigotas formadas replicam-se e podem infectar outros macrófagos, tanto no mesmo local como em tecidos distantes (4). Quando os flebotomíneos alimentam-se de sangue em um hospedeiro infectado (5), células infectadas com amastigotas (6) são também inoculadas e estas formas se transformam novamente em promastigotas no intestino do vetor e, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida, as diferentes regiões do intestino serão parasitadas (7). Os parasitos migram para as glândulas salivares dos flebotomíneos (8), completando assim o ciclo de vida de *Leishmania* spp.

Onze espécies de *Leishmania* de dois subgêneros diferentes são relatadas como responsáveis por causar LTA em seres humanos no Novo Mundo. *L. (Viannia) braziliensis* é a espécie mais prevalente no Brasil, seguida por *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (GOTO; LINDOSO, 2010; BRASIL, 2010).

### 2.3 Apresentações clínicas da LTA

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* e variações individuais na resposta imunológica do hospedeiro podem ser responsáveis pela ocorrência de diferentes

manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GUERBOUJ et al., 2001; MARTINS et al., 2014; REITHINGER et al., 2007).

A infecção humana por *L. (V.) braziliensis* produz um amplo espectro de manifestações clínicas que podem ser atribuídas à variabilidade intra-específica do parasito. A contribuição do parasito à diversidade das condições clínicas do paciente com LTA tem sido examinada em estudos com o objetivo de investigar se determinadas espécies e/ou populações clonais de *Leishmania* são correlacionados com quaisquer manifestações clínicas da doença (OLIVEIRA, 2013).

No Brasil, essas manifestações clínicas se apresentam sob a forma de lesão de pele e/ou mucosa, única ou múltipla, abrangendo desde formas inaparentes, lesões de pele discreta com evolução para cura espontânea, até formas com ulcerações múltiplas e comprometimento de mucosas, havendo possibilidade de metástase e surgimento de recidiva cútis (COSTA et al., 2009).

### 2.3.1 Forma cutânea localizada

A forma localizada é a manifestação mais prevalente da LTA e apresenta-se por acometimento primário da pele. A lesão se inicia no ponto de inoculação das promastigotas infectantes. Geralmente do tipo úlcera, embora múltiplas picadas do flebotomíneos ou a disseminação local possam gerar um número elevado de lesões (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Todas as espécies de *Leishmania*, relacionadas ao comprometimento tegumentar, podem ocasionar a lesão cutâneo localizada (Figura 4) (AMEEM; 2010; COSTA et al., 2009).

**Figura 4** - Lesão ulcerada única da LTA.



Fonte: Brasil (2010).

### 2.3.2 Forma cutânea difusa

Constitui uma forma rara, porém grave, que ocorre em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Progredir de maneira lenta, com lesões nodulares e infiltrações cutâneas que recobrem grandes extensões do corpo. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e, em geral, as lesões não cicatrizam espontaneamente (Figura 5) (BRASIL, 2010; AMEEN, 2010).

**Figura 5** - Forma cutânea difusa da LTA.



Fonte: Brasil (2010).

### 2.3.3 Forma cutânea disseminada

É uma expressão clínica relativamente rara. Esta forma é caracterizada por aparecimento de múltiplas lesões, geralmente ulceradas, que acometem vários segmentos corporais, distantes do sítio de inoculação primário (Figura 6) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994). O número de lesões é variável, mas também numeroso. Essa forma de lesão responde ao tratamento habitual (CARVALHO et al, 1994; GONTIJO; CARVALHO, 2003)

**Figura 6** - Forma cutânea disseminada da LTA.



Fonte: Brasil (2010).

### 2.3.4 Forma mucosa

A forma acomete as mucosas do nariz, boca e garganta, caracterizando-se por apresentar aspectos de cronicidade, latência e por desenvolver metástases em mucosas causando inflamação com riscos de necrose e destruição da cartilagem (Figura 7). Normalmente está associada ao tratamento inicial inadequado e demora na cicatrização da lesão primária (AMEEN, 2010; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014c).

**Figura 7** - Forma mucosa da LTA.



Fonte: Ameen (2010); Brasil (2010).

### 2.3.5 Forma recidiva cútis

A forma recidiva cútis (LRC) caracteriza-se pelo aparecimento de lesões nodulares em torno ou no interior da cicatriz da ferida curada depois de um período de tempo variável de meses a anos após a cura clínica (Figura 8). É mais frequente em crianças, apresentando focos satélites no centro ou nas margens da área cicatrizada (COSTA, 2009; MAROVICH et al, 2001). No Novo Mundo, a maioria dos parasitos identificados é do subgênero *Viannia* (GOTO; LINDOSO., 2010).

**Figura 8** - Forma recidiva cútis da LTA.



Fonte: Calvopina (2006); Calvopina (2013).

A incidência de LRC em pacientes com LTA permanece desconhecida, os fatores de risco para o seu desenvolvimento também, tornando-se difícil realizar estudos longitudinais, devido à raridade da doença (GOMES et al., 2015; SERAFINELLA et al., 2000).

## 2.4 Diagnóstico da leishmaniose

O diagnóstico da LTA é realizado a partir da associação de três características essenciais: a clínica, a epidemiologia e os testes laboratoriais (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MANSON-BAHR, 1987). Embora o diagnóstico possa, às vezes, ser realizado com base apenas em critérios clínico-epidemiológicos, exames laboratoriais são essenciais para a diferenciação entre LTA e outras dermatoses infecciosas, para assim confirmar o diagnóstico antes que as drogas utilizadas no tratamento (que apresentam efeitos colaterais potenciais) sejam administradas (HEPBURN, 2003; SCHUBACH et al., 2005; MARTINS et al., 2014).

A combinação de diferentes técnicas laboratoriais se faz necessário, a fim de obter resultados com maior precisão. Dentre os testes laboratoriais utilizados pesquisa direta do parasito, culturas *in vitro*, intradermoreação de Montenegro (IDRM), imunofluorescência indireta (IFI), ELISA (ensaio imunoenzimático) e reação em cadeia de polimerase (PCR) (KAR, 1995; REIS et al, 2008; VEGA-LÓPEZ, 2003).

### 2.4.1 Diagnóstico parasitológico

#### 2.4.1.1 Exame parasitológico

A visualização microscópica do parasito *Leishmania* é considerado por muitos autores como o padrão-ouro para diagnóstico em todas as formas de leishmaniose (BRASIL, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003). No entanto, a presença de amastigotas depende da duração das lesões, sendo esta associação inversamente proporcional ao tempo de evolução. Para a forma difusa da doença há exceção, no que diz respeito aos pacientes, pois neste caso os nódulos presentes na pele são



ricos em parasitos (ANDRADE-NARVAEZ et al., 2005; CUBA CUBA et al., 1981; 1986).

#### 2.4.1.2 *Cultivo de Leishmania spp.*

Permite a confirmação etiológica e posterior identificação da espécie de *Leishmania* envolvida (BRASIL, 2010). Contudo, é uma técnica que tende a ser de baixa sensibilidade e pode ser altamente variável devido à escassez desses organismos nas amostras clínicas, o que dificulta a identificação de rotina do agente etiológico (REITHINGER; DUJARDIN, 2007; RODRIGUES et al., 2002).

#### 2.4.2 Diagnóstico imunológico e sorológico

##### 2.4.2.1 *Intradermorreação de Montenegro (IDRM)*

Empregado como método diagnóstico de rotina na confirmação de doença ativa, no diagnóstico retrospectivo e em inquéritos epidemiológicos de LT (MAGALHÃES et al., 1986). A IDRM avalia a reação de hipersensibilidade tardia e consiste tecnicamente na inoculação de *Leishmania* spp. mortas (antígeno padronizado) na face anterior do antebraço, com leitura após 48 horas (MELLO et al., 1997; BRASIL, 2010).

É importante referir à dificuldade de interpretação dos resultados deste método, pois a IDRM não diferencia doença atual de pregressa, visto que em pacientes que já foram diagnosticados e tratados de LT, este teste pode permanecer positivo a vida toda, assim como, em indivíduos sem doença, moradores de áreas endêmicas com exposição ao parasito (LLANOS-CUENTAS et al., 1984; VEGALÓPEZ, 2003).

##### 2.4.2.2 *IFI, ELISA e Western Blot*

Os testes sorológicos apresentam limitações como não correlacionam os níveis de anticorpos circulantes com o estágio da doença e por apresentar limitações no que se refere a reações cruzadas com outros patógenos pertencentes à família Trypanosomatidae (BRITO et al., 2000; ROCHA et al., 2002, 2006). Além de

apresentar sensibilidade e especificidade variável (KAR, 1995; REITHINGER et al, 2007).

#### 2.4.3 Diagnóstico molecular

Com o avanço da biotecnologia, as técnicas de biologia molecular representam uma alternativa válida para a melhor compreensão da doença. Neste quadro, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido bastante utilizada, devido à sua alta sensibilidade e especificidade, e poder de detectar o DNA do parasito antes do aparecimento de sintomas ou sinais clínicos (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; FIGUEROA et al., 2009).

A PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade, oferecendo alternativas para estudos clínicos e epidemiológicos em leishmanioses (DE BRUIJN; BARKER, 1992; RODRIGUES et al., 2002). Seus indicadores de validação diagnóstica variam de 92% a 99% de sensibilidade e 100% de especificidade (AVILES et al., 1999; NEITZKE-ABREU et al., 2013; RODRIGUES et al., 2002; SHAHBAZI et al, 2008).

### 2.5 Epidemiologia Molecular

#### 2.5.1 Identificação de regiões polimórficas

Diferentes marcadores moleculares têm sido aplicados em epidemiologia molecular de doenças infecto parasitárias, além de estudos sobre a variabilidade genética de *Leishmania*, porém ainda não existe consenso sobre qual a técnica mais adequada para estudar as populações genéticas dessas espécies (BAPTISTA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2013; SCHÖNIAN et al., 2008; SCHÖNIAN, KUHLS, MAURICIO, 2011).

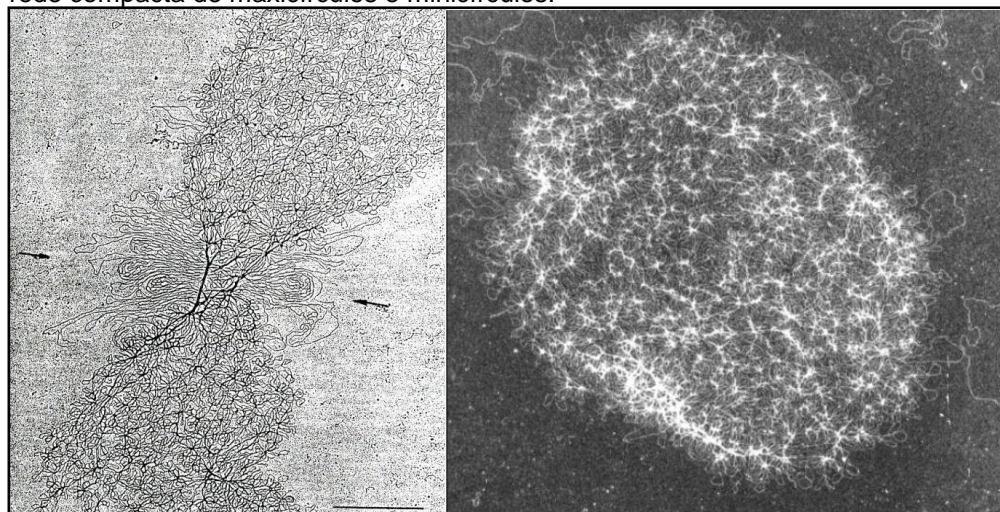
Dois técnicas comumente utilizadas são as Multi Locus Enzyme Electrophoresis (MLEE) e a Restriction Fragment Length Polymorphism - Polymerase Chain Reaction (RFLP-PCR). A primeira é amplamente utilizada para a caracterização taxonômica das espécies de *Leishmania* (CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994; MOMEN et al., 1985), mas é limitado porque além de prescindir de isolamento de parasitos, o qual é passível de contaminações, é uma técnica onerosa

(SCHONIAN et al., 2003). Já a técnica de RFLP-PCR mesmo sendo de simples execução, apresenta a desvantagem de estar relacionada à existência de mutações para o sítio de restrição enzimática. Estas mutações podem levar a obtenção de falsos resultados devido ao ganho ou perda nos fragmentos de restrição (PEREIRA; CARNEIRO; AMORIM, 2008).

### 2.5.2 Alvo para identificação de *Leishmania* spp.

Para a análise molecular da LTA utilizam-se rotineiramente dois alvos, de acordo com os objetivos genômicos: o DNA nuclear e o DNA mitocondrial. Este último, apresentado como DNA do Kinetoplasto (kDNA), comumente conhecido como DNA do cinetoplasto é encontrado em todos os tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* spp., sendo amplamente utilizado como alvo para o diagnóstico das leishmanioses. O kDNA consiste em um tipo incomum de DNA mitocondrial que compreende dois componentes: os maxicírculos e os minicírculos (Figura 9) (POVELONES, 2014; STUART, 1983).

**Figura 9** - Micrografia eletrônica do kDNA de *Leishmania* spp. composto por uma rede compacta de maxicírculos e minicírculos.



**Fonte:** Barker (1989); Borst; Hoeijmakers (1979).

Os maxicírculos têm 20-40 kb, estão presentes em 30-50 cópias no genoma e apresentam genes que codificam enzimas mitocondriais, importantes para a cadeia respiratória do parasito. Os minicírculos podem variar de 650 pb a 900 pb e estão presentes em cerca de 10.000 cópias/célula (BARKER; BUTCHER, 1983; RODRIGUES et al., 2013). Neles, existe uma região de aproximadamente 200 pb

que é conservada, enquanto que a região restante é considerada variável, sendo heterogênea mesmo entre cepas de uma mesma espécie. Os minicírculos totalizam 95% de todo kDNA (FERNANDES et al., 1999, RAY, 1987; RODRIGUES et al., 2013).

### 2.5.3 LSSP-PCR (*Low-Stringence Single Primer-Polimerase Chain Reaction*).

A LSSP-PCR é uma técnica baseada na PCR, utilizada em estudos de epidemiologia molecular e de variabilidade genética. Em que fragmentos de DNA purificados são submetidos a uma PCR utilizando altas concentrações de um único oligonucleotídeo iniciador específico e uma baixa temperatura de anelamento (baixa estringência). Sob estas condições, o iniciador hibridiza especificamente sua região complementar e não especificamente os múltiplos sítios dentro dos fragmentos de DNA de um modo sequência dependente, produzindo um conjunto heterogêneo de produtos de reação que constitui um perfil molecular de assinaturas do kDNA (OLIVEIRA et al., 2010; PENA et al., 1994; SEGATTO et al., 2013).

O grande número de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) presentes na sequência de kDNA, juntamente com a variação observada no número de classes de minicírculos em tripanossomatídeos, são responsáveis por gerar, em cada assinatura de kDNA, fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, que podem ser considerados marcadores de kDNA gerados por LSSP-PCR (FERREIRA, 2007; VAGO et al., 1996; 2000).

Esta técnica tem sido eficientemente aplicada para avaliar a variabilidade genética em protozoários parasitos, tais como *Entamoeba histolytica* (GOMES, 1998), *Trypanosoma cruzi* (ALKMIM-OLIVEIRA et al., 2014; LAGES-SILVA et al., 2006; SEGATTO et al., 2013; VAGO et al., 1996; 2000; ZAFRA et al., 2011), *Trypanosoma rangeli* (MARQUEZ et al., 2007) e *Leishmania* (BAPTISTA et al., 2009; FERREIRA, 2007; OLIVEIRA et al., 2010, 2012, 2013).

### 3 JUSTIFICATIVA

O estudo da evolução de formas clínicas da LTA, principalmente envolvendo a cura espontânea ou terapêutica, suscita questões como a persistência parasitária e a seleção clonal. A técnica de LSSP-PCR apresenta-se como uma ferramenta efetiva para melhor compreensão sobre os fatores que levam à persistência parasitária. Também contribuem para uma melhor elucidação do desenvolvimento de diferentes formas clínicas. Até o momento não se dispõe de informações precisas em relação à natureza composicional nucleotídica de minicírculos obtidos de amostras de LTA.

Essa avaliação contribuirá para conhecer características moleculares de variantes de *Leishmania* spp., principalmente no que se refere à diversidade genética. Também buscará a identificação de possíveis marcadores para estudos clínico-epidemiológicos.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo Geral

Analisar assinaturas dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana de Pernambuco.

### 4.2 Objetivos específicos

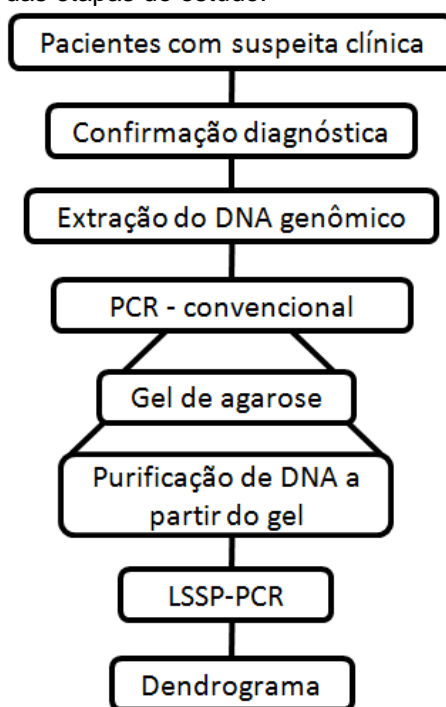
- a) Comparar duas diferentes condições de LSSP-PCR já descritas e testadas para *Leishmania*;
- b) Estabelecer, por meio de LSSP-PCR, um painel de assinaturas do kDNA de minicírculos de *Leishmania* capaz de discriminar amostras oriundas de diversas manifestações clínicas de LTA;
- c) Elaborar um dendrograma a partir de perfis de bandeamento gerados por LSSP-PCR de minicírculos de kDNA obtidos de amostras originárias de diferentes manifestações clínicas da LTA.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Desenho experimental

Foi realizado um estudo descritivo, tipo série de casos, como forma de avaliar o desempenho da LSSP-PCR na descrição da variabilidade genética e de possíveis marcadores para o estudo clínico epidemiológico da LTA. Foram analisados, através de PCR, LSSP-PCR, amostras de aspirado de lesão e sangue, obtidos de pacientes com diagnóstico positivo para a LTA (Figura 10).

**Figura 10** - Fluxograma esquemático das etapas do estudo.



Fonte: A autora; 2015.

### 5.2 Seleção de pacientes

No período entre julho de 2014 e junho de 2015, pacientes atendidos no Setor de Dermatologia do Hospital Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC/UPE) com o diagnóstico clínico-epidemiológico positivo para LTA foram convidados a participar do estudo.

### 5.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo os indivíduos com diagnóstico clínico e epidemiológico para a LTA.

### 5.4 Coleta de amostras

#### 5.4.1 Aspirado de lesão

A aspiração do material foi realizada após inoculação de 3 mL de solução salina estéril na borda da lesão, utilizando-se de uma seringa de 5 mL e agulha 13 x 0,45 mm (Figura 11).

**Figura 11** - Procedimento de coleta de aspirado de lesão.



Fonte: Brito (2014); Viana (2012).

#### 5.4.2 Sangue

Tratou-se assepticamente o local da coleta e, posteriormente, realizou-se a punção de 4 mL de sangue total para cada paciente, em tubo contendo  $k_3$ EDTA, e o material biológico obtido foi armazenado em freezer.

### 5.5 Abordagens moleculares

#### 5.5.1 Extração e purificação

O DNA genômico das amostras de aspirado de lesão e sangue foram extraídos e purificados através do kit Qlamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA),



seguindo as instruções do fornecedor. As amostras purificadas foram quantificadas através de espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific®, modelo 2000 c).

### 5.5.2 PCR convencional

O DNA de *Leishmania* foi detectado pela amplificação de 750 pares de bases presentes na região variável do minicírculos de kDNA de *Leishmania* do complexo *L. brasiliensis*, utilizando os iniciadores B1 (5´GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG3´) E B2 (5´CTAATTGTGCACGGGGAGG 3´). A mistura de PCR foi preparada em 50 µL de uma solução contendo 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L de cada dNTP, 15 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador e 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase recombinante. A essa mistura foi adicionado 1,5 µL com aproximadamente 2,6 a 17,2 ng de DNA extraído. A PCR foi realizada em 35 ciclos (94°C com duração de 30s., 65°C e 72°C com duração de 1 minuto), precedidos de uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94°C e extensão de final de 5 minutos a 72°C.

Além disso, um controle negativo (sem DNA) foi adicionado à reação, juntamente a um controle positivo de 1 µg/µL de DNA genômico de *L. (V.) braziliensis* oriundo da cepa de referência (IOC-L-566-MHOM/BR/75/M2903).

### 5.5.3 Análise dos produtos da PCR

Após a amplificação, 100 µL dos produtos da PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 1,0 % para o alvo de 750 pb e corados pelo brometo de etídeo a 0,05 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As bandas de DNA separadas por eletroforese foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta, sistema Kodak®, modelo Gel Logic 100 Imagem System. As bandas com peso molecular de aproximadamente 750 pb foram recortadas com lâmina de bisturi estéril e acondicionadas em microtubos de 1,5mL.

#### 5.5.4 Purificação de DNA

As bandas de aproximadamente 750 pb foram purificadas com o kit ilustra GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, seguindo as instruções do fabricante.

Ao final da purificação, 20µL do tampão de eluição foi adicionado ao *pellet* e o sobrenadante contendo DNA foi armazenado. 2 µL da amostra purificada foram utilizados para quantificar o DNA. Essa quantificação foi realizada no espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific®, modelo 2000 c).

Em amplificações otimizadas, possivelmente, resultado em banda única, a purificação de banda do gel pode ser omitida e a purificação do DNA ser realizada diretamente da reação de PCR.

#### 5.5.5 LSSP-PCR

Os produtos de PCR positivos foram submetidos a ensaios de LSSP-PCR, consistindo de nova amplificação dos produtos purificados com um único iniciador, o B1 (5´ GGGGTTGGTGTAATATAGTGG 3´).

##### 5.5.5.1 LSSP-PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2010)

Foi realizada, como descrita anteriormente por Oliveira (2010), a reação de 25µL conteve 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 40 pmoles de um dos iniciadores utilizados na amplificação convencional, 4 U de *Taq* DNA polimerase, e 50ng de DNA. Com condições da ciclagem de 95°C durante 5 min, seguido por 45 ciclos (95°C por 1 min., 36°C por 30s e 72°C por 2 minutos), por fim uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

##### 5.5.5.2 LSSP-PCR (FERREIRA *et al.*, 2007)

Segundo as condições descritas em Ferreira (2007) a reação de 25 µL conteve 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 100 pmoles de um dos iniciadores utilizados na amplificação

convencional, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, e 50ng de DNA. A amplificação foi feita de acordo com o sistema proposto em Pena e Simpson (1996) no qual estabelece 95°C durante 5 min, seguido por 40 ciclos (95°C depois 30°C e por fim 72°C todos com duração de 1 minuto), e uma extensão final a 72°C durante 5 minutos.

#### 5.5.6 Análise dos produtos da LSSP-PCR

Após a amplificação, 10 µL dos produtos da LSSP-PCR foram analisados através de eletroforese em gel de agarose (High Resolution, Sigma) a 1,8% e corados pelo brometo de etídeo a 0,05 µg/mL (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

### 5.6 Processamento e análise de dados

Bandas que variam em tamanho de 250 a 700 pb foram selecionados para análise fenética. Os perfis de LSSP-PCR foram comparados por meio do coeficiente de similaridade para determinar a proporção do compartilhamento de banda entre todos os pares possíveis. A matriz de similaridade foi transformada em um dendrograma por meio do algoritmo UPGMA (SOKAL; SNEATH, 1962) presente no software TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis).

## **6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O projeto seguirá os preceitos éticos que norteiam as pesquisas com seres humanos através da sua aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CEP - CPqAM) (Anexo A).

Cada indivíduo portador de LTA participou como voluntário da pesquisa após leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices A e B), segundo resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que apresenta as normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

## 7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Perfil clínico e epidemiológico dos pacientes

Foram selecionados 71 pacientes com características clínicas e epidemiológicas da LTA, sendo a maioria destes (45/63,38%) do sexo masculino. O município de Moreno foi o local onde procedeu a maioria dos pacientes selecionados (44/61,97%). Entretanto, também foram observados pacientes oriundos de outros municípios de Pernambuco: Amaraji, Cabo, Escada, Jaboatão dos Guararapes, Vicência e Vitória de Santo Antão.

A faixa etária entre 15 e 30 anos foi a predominante entre os indivíduos do estudo, com média de idade de 31 anos. Estudos anteriores relatam a maior número de casos da doença em indivíduos do sexo masculino (MARLOW et al., 2013; REIS et al., 2008; VALENCIA et al., 2012), com idade média de idade de 30 anos (BENICIO et al., 2011; BRITO et al., 2008).

O acometimento dos membros inferiores apresentou a maior prevalência no nosso estudo (44/6, 98%), assim como é relatado na literatura (ANDRADE et al., 2005; GOMES et al., 2008; VALENCIA et al., 2012). De acordo com as apresentações clínicas, foi observada predominância das lesões ulceradas em 59 indivíduos. Estudos clínicos e epidemiológicos para LTA demonstraram a prevalência da forma localizada com lesões ulceradas (MARTINS et al., 2014; REIS et al., 2008).

Na população estudada pacientes que residem em área rural foram maioria (53/74,65%). Devido ao fato da LTA ser uma doença com características rurais, o índice de infecção em indivíduos que desempenham atividades agrícolas é predominante (BRACHO et al., 2007; BRANDÃO-FILHO et al., 1999;). Estas características são apresentadas comumente em áreas endêmicas para LTA, onde os indivíduos estão constantemente expostos ao risco de transmissão, sejam pelas atividades que desempenham ou local que residem. Os dados de distribuição das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes selecionados no estudo estão sumarizados na tabela 1.

**Tabela 1** - Distribuição das características clínicas e epidemiológicas dos pacientes selecionados no estudo.

<b>Características</b>	<b>População estudada</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	45	63,38
Feminino	26	36,62
<b>Idade</b>		
≤ 15	4	5,63
16 - 30	35	49,30
31 - 50	22	30,99
51 - 60	7	9,86
≥ 61	3	4,22
<b>Habitação</b>		
Rural	53	74,65
Urbana	18	25,35
<b>Lesões</b>		
<b>Local</b>		
Membros inferiores	44	61,98
Membros superiores	23	32,39
Cabeça	1	1,41
Todo o corpo	3	4,22
<b>Tipo</b>		
Ulcerada	59	83,1
Disseminada	3	4,22
Recidiva cútis	3	4,22
Verrucosa	4	5,64
Crostosa	1	1,41
Mucosa	1	1,41

**Fonte:** A autora

## 7.2 Coleta de amostras

Foram coletadas 71 amostras pareadas de aspirado de lesão e sangue. Porém, apenas 18 amostras de aspirado de lesão foram positivas para LTA e todas negativas em amostras de sangue.

A escolha dos substratos para o estudo se justificam pela característica da forma recidiva cútis da LTA, pois são lesões nodulares, não sendo indicada a coleta de fragmentos por biópsia, cujo substrato é mais frequentemente utilizado. A coleta de sangue foi adicionada a fim de se obter mais uma opção de amostra para análise.

Estudos anteriores têm apresentado o aspirado de lesão como método de coleta alternativo para o diagnóstico da LTA (KASSI; KASI, 2005; KASSI et al., 2004; KHAN; YASMIN, 2007). CALVOPIÑA e colaboradores em 2005 utilizaram o aspirado de lesão para o estudo da forma recidiva cútis.

### 7.3 Abordagem molecular

#### 7.3.1 Extração e purificação

Todas as amostras coletadas foram extraídas e purificadas de acordo com o item 5.5.1. Contudo, apenas as amostras (de aspirado de lesão) positivas pela PCR serão aqui descritas. Foram realizadas quantificações do DNA e avaliações do grau de pureza das 18 amostras positivas de aspirado de lesão (Tabela 2).

**Tabela 2** - Dosagem de DNA e grau de pureza das amostras de aspirado de lesão, extraídas de acordo com o item 5.5.1.

ID da amostra	Concentração de DNA (ng/μl)	260/280
P9 LSSP	9,8	1,7
P16 LSSP	4,6	1,54
P19 LSSP	6	1,77
P20 LSSP	4,7	1,79
P25 LSSP	7,4	1,7
P27 LSSP	8,8	1,71
P35 LSSP	17,2	1,82
P36 LSSP	2,6	1,41
P37 LSSP	5,1	0,54
P38 LSSP	2,6	0,94
P39 LSSP	6	1,53
P42 LSSP	11	1,66
P45 LSSP	3,8	1,73
P48 LSSP	5,5	1,05
P58 LSSP	3,3	1,46
P63 LSSP	7,3	1,9
P64 LSSP	13,5	1,88
P66 LSSP	5,9	1,9

Fonte: Autora

### 7.3.2 Purificação de DNA

As amostras de DNA purificadas a partir do gel de agarose, de acordo com o item 5.5.4 da metodologia foram quantificadas, além de avaliadas o grau de pureza. As concentrações obtidas variaram entre 4,7 a 26,7 ng, de acordo com a tabela 3.

**Tabela 3** - Dosagem de DNA e grau de pureza das amostras de aspirado de lesão, extraídas de acordo com o item 5.5.4.

ID da amostra	Concentração de DNA (ng/μl)	260/280
P9 LSSP	20,8	1,81
P16 LSSP	24,2	1,8
P19 LSSP	10,5	2,38
P20 LSSP	4,7	1,79
P25 LSSP	7,4	1,7
P27 LSSP	8,8	1,71
P35 LSSP	16,2	1,76
P36 LSSP	16,2	1,85
P37 LSSP	16,2	1,81
P38 LSSP	19,4	1,82
P39 LSSP	14,2	1,87
P42 LSSP	26,7	2,01
P45 LSSP	18,3	1,92
P48 LSSP	14,8	1,94
P58 LSSP	10,5	1,94
P63 LSSP	8,6	1,87
P64 LSSP	16,3	1,9
P66 LSSP	15,1	1,88

Fonte: Autora

### 7.3.3 LSSP-PCR

Seguindo as condições descritas nos tópicos 5.5.5.1 e 5.5.5.2 da metodologia, testamos diferentes concentrações (50, 60, 70, 80, 90 e 100ng/μL) do *template* dentro do sistema de reações. Na avaliação dos dois protocolos (FERREIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2010) a concentração que apresentou melhor perfil de assinaturas do kDNA foi 50 ng/μL.

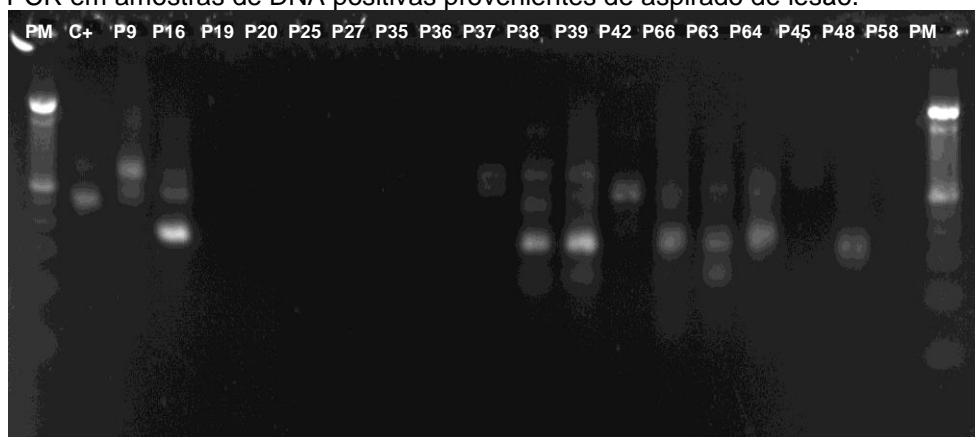


### 7.3.3.1 LSSP-PCR (Oliveira et al., 2010)

As condições de reação e visualização dos produtos foram realizadas tal como descritas por Oliveira (2010) (Figura 12). Embora não se tenha obtido uma boa definição das bandas no gel de agarose, é possível perceber a formação de padrões distintos entre as várias amostras analisadas.

Das 18 amostras, seis não foram amplificadas. Houve divergência dos achados descritos por Oliveira et al. (2010; 2012; 2013), que consistem em perfis de assinaturas de kDNA similares quando comparadas amostras de mesma característica clínica. Todavia, as manifestações clínicas estudadas nesses trabalhos não são exatamente as mesmas avaliadas no presente estudo.

**Figura 12** - Eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 1,8% corado pelo brometo de etídio. Demonstrando o padrão de bandejamento obtido após LSSP-PCR em amostras de DNA positivas provenientes de aspirado de lesão.



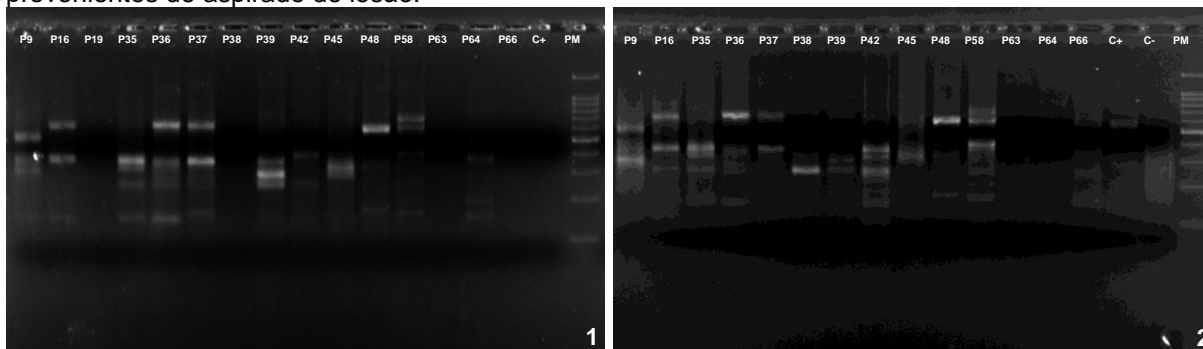
**Fonte:** Autora.

**Nota:** (PM) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb. (C+, P9, P16, P19, P20, P25, P27, P35, P36, P37, P38, P39, P42, P66, P63, P64, P45, P48 e P58).

### 7.2.3.2 LSSP-PCR (FERREIRA et al., 2007)

A técnica escolhida para análise das amostras de aspirado de lesão foi a LSSP-PCR descrita em Ferreira e colaboradores (2007) uma vez que essa formou padrões de bandejamento mais descritivos que aqueles gerados segundo as condições descritas em Oliveira e colaboradores (2010).

**Figura 13** - Eletroforese em gel de agarose de alta resolução a 1,8% corado pelo brometo de etídio. Demonstrando o padrão de bandejamento obtido após LSSP-PCR em amostras de DNA positivas provenientes de aspirado de lesão.



**Fonte:** Autora.

**Nota:** Gel 1 - P9, P16, P19, P35, P36, P37, P38, P39, P42, P45, P48, P58, P63, P64, P66, C+ e PM\*.

Gel 2 - P9, P16, P35, P36, P37, P38, P39, P42, P45, P48, P58, P63, P64, P66, C+, C- e PM\*.

(\*) Marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb - DNA Express Biotecnologia (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 pb).

Das 18 amostras de aspirado positivas, 12 formaram perfil de bandejamento (Figura 13). Um total de nove bandas foi formado, no entanto, o número de bandas presentes em cada amostra variou apenas entre 2 e 4 (Tabela 4). Sendo definido que a banda de número um corresponde a 700 pb e a banda nove a 250 pb.

A banda seis está presente em 87,5% das amostras da forma ulcerada e em 75% de todas as amostras das cinco apresentações clínicas analisadas. As bandas número 1 e 4 aparecem exclusivamente nas amostras representadas pelas formas crostosa e recidiva cútis, respectivamente.

**Tabela 4** - Dados das apresentações clínicas e perfil de bandejamento entre cada amostra analisada através da LSSP-PCR.

Amostras	Apresentação clínica	Bandas por amostra	Bandas compartilhadas	Bandas não compartilhadas
P9	Ulcerada	3,6,7,8	6,7,8	3
P16	Ulcerada	2,6	2,6	-
P35	Ulcerada	6,8,9	6,8,9	-
P36	Ulcerada	2,6	2,6	-
P37	Ulcerada	2,6	2,6	-
P38	Ulcerada	7,8	7,8	-
P39	Ulcerada	6,7,8,9	6,7,8,9	-
P42	Ulcerada	5,6,8	5,6,8	-
P45	Verrucosa	7,8	7,8	-
P48	Disseminada	2,7	2,7	-
P58	Crostosa	1,2,5,6	2,5,6	1
P64	Recidiva cútis	4,6	6	4

**Fonte:** Autora.

A análise através da LSSP-PCR não gerou perfis genéticos capazes de distinguir diferentes manifestações clínicas de LTA.

#### 7.4 Processamento e análise de dados

Os valores da matriz de similaridade foram calculados a partir dos dados de presença e ausência das bandas em cada amostra (Tabela 5) e através do cálculo do coeficiente de similaridade pela técnica *Simple Matching* (SOKAL; MICHENER, 1958). Os perfis de LSSP-PCR de acordo com os seus coeficientes de similaridade (SM) variaram entre 0,22-0,44 gerando uma matriz com apenas 3 valores muito baixos (0,22 – 0,33 – 0,44), o que demonstra uma baixa similaridade entre todos os perfis gerados (Tabela 6).

**Tabela 5** - Dados de presença e ausência de bandas formadas através da LSSP-PCR com amostras de aspirado de lesão.

<b>Bandas</b>	<b>P9</b>	<b>P16</b>	<b>P35</b>	<b>P36</b>	<b>P37</b>	<b>P38</b>	<b>P39</b>	<b>P42</b>	<b>P45</b>	<b>P48</b>	<b>P58</b>	<b>P64</b>
<b>1</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<b>2</b>	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0
<b>3</b>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>4</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<b>5</b>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
<b>6</b>	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1
<b>7</b>	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
<b>8</b>	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
<b>9</b>	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0

**Fonte:** Autora.

**Nota:** (0) Ausência da banda; (1) Presença da banda.

**Tabela 6** - Matriz de similaridade genética estimada pelo índice de Simple Matching (1958).

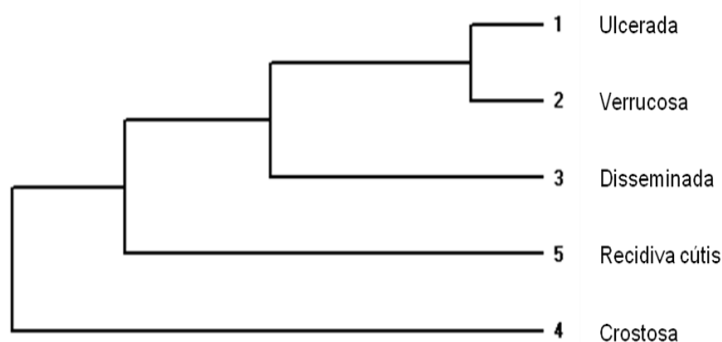
	<b>P9</b>	<b>P16</b>	<b>P35</b>	<b>P36</b>	<b>P37</b>	<b>P38</b>	<b>P39</b>	<b>P42</b>	<b>P45</b>	<b>P48</b>	<b>P58</b>	<b>P64</b>
<b>P9</b>	1											
<b>P16</b>	0,22	1										
<b>P35</b>	0,33	0,33	1									
<b>P36</b>	0,22	0,22	0,22	1								
<b>P37</b>	0,22	0,22	0,22	0,22	1							
<b>P38</b>	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	1						
<b>P39</b>	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	1					
<b>P42</b>	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33	0,22	1				
<b>P45</b>	0,22	0,22	0,22	0,22	0,33	0,22	0,22	0,22	1			
<b>P48</b>	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	1		
<b>P58</b>	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44	1	
<b>P64</b>	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	1

**Fonte:** Autora.

Os resultados de coeficientes de similaridade (SM) tiveram uma variação distinta dos achados na literatura. Em Oliveira et al (2010, 2013) os valores ficaram entre a faixa de 0,53 e 0,94 com 14 diferentes valores de coeficiente, em Baptista et al., (2012) variou entre 0,63-0,91 e entre 0,49-1 em Oliveira (2012).

A partir grau de similaridade entre os diversos padrões gerados por LSSP-PCRs aplicadas ao kDNA de minicírculos, construímos um dendrograma (Figura 14).

**Figura 14** - Dendrograma mostrando os perfis genéticos obtidos pelo LSSP-PCR.



**Fonte:** A autora

**Nota:** Resultados gerados através do algoritmo UPGMA (NEI, 1978).

Sendo assim podemos concluir, por exemplo, as populações que apresentam padrões mais semelhantes em termos de perfil de bandeamento são as de formas ulcerada e verrucosa e as que apresentam padrões mais distintos são as de formas ulcerada e recidiva cútis e ulcerada e crostosa.

## 8 CONCLUSÕES

- a) O protocolo de LSSP-PCR, descrito em Ferreira (2007), associado ao emprego do aspirado de lesão como espécime clínico, foi aquele que apresentou os perfis de bandeamento mais definidos e descritivos;
- b) A partir do uso do protocolo selecionado e da análise das assinaturas de kDNA geradas foi observado um baixo grau de similaridade entre as amostras de portadores de uma mesma forma clínica o que implica na impossibilidade da técnica originar perfis de bandeamento capazes de diferenciar as formas clínicas distintas;
- c) A LSSP pode vir a ser útil para revelar marcadores diagnósticos para algumas manifestações clínicas mais raras da LTA, como é o caso das formas crostosa e recidiva cútis da doença.
- d) O emprego da LSSP-PCR como ferramenta capaz de gerar assinaturas genéticas capazes de distinguir diferentes manifestações clínicas da LTA segue sendo promissor, ainda que isso dependa de uma melhor descrição das formas clínicas investigadas e de um aprimoramento das técnicas de visualização dos padrões de bandeamento gerados.

## **9 PERSPECTIVAS**

As perspectivas desse estudo envolvem aumentar o número de amostras e de melhor se descrever e ordenar as manifestações clínicas da LTA, o que implicaria na coleta de mais dados sobre a localização da lesão, tempo de evolução, concomitância de outras doenças de sintomatologia semelhante e/ou de doenças imunossupressoras como a AIDS. Outra análise importante que irá contribuir para o estudo é a utilização de géis de poliacrilamida corados pela prata, que acreditasse (FERREIRA et al., 2007) aumentar a sensibilidade da visualização das bandas geradas por LSSP-PCR.

## REFERÊNCIAS

- ALKMIM-OLIVEIRA, S. M. et al. High similarity of *Trypanosoma cruzi* kDNA genetic profiles detected by LSSP-PCR within family groups in an endemic area of Chagas disease in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 47, p. 653-656, 2014.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Advances in parasitology**, London, v. 61, p. 223-274, 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloS ONE**, San Francisco, v. 7, p. 1-12, 2012.
- ARÉVALO, J. et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 195, p. 1846-1851, 2007.
- AVILES, H. et al. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, p. 181-187, 1999.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, Oxford, v. 35, p. 699-705, 2010.
- ANDRADE, M. S. et al. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 38, p. 229-233, 2005.
- ANDRADE-NARVAEZ, F. J. et al. The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula, Mexico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 191-194, 2005.
- AOUN, K.; BOURATBINE, A. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. **Parasite**, Paris, v. 21, p. 1-9, 2014.
- 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, p. 317-322, 2009.
- BARKER, D. C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, Cambridge, v. 99, p. 125-146, 1989.

BARKER, D.C.; BUTCHER, J. The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 77, p. 285-297, 1983.

BARRAL-NETO, M.; MACHADO, P.; BARRAL, A. Human cutaneous leishmaniasis advances in physiopathology and treatment. **European Journal of Dermatology**, Mountrouge, v. 5, p. 104-113, 1995.

BOGGILD, A. K. et al. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 79, p. 847-852, 2008.

BRACHO, C. O. et al. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis' diagnosis: a validation study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 549-554, 2007.

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

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London v. 97, p. 291-296, 2003.

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

BRITO, M. E. F. **Procedimento de coleta de aspirado de lesão**. Recife, 2014. 1 fotografia.

BRITO, M. E. F. et al. Identification of potentially diagnostic *Leishmania braziliensis* antigens in human cutaneous leishmaniasis by immunoblot analysis. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, Washington, v. 7, p. 318-321, 2000.

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 & International Health**, Oxford, v. 14, p. 1278-1286, 2009.

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, 2012.

CALVOPIÑA, M. et al. Atypical clinical variants in New World cutaneous leishmaniasis: disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to *Leishmania (V.) panamensis*. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 73, p. 281-284, 2005.



CALVOPIÑA, M. et al. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. **International journal of dermatology**, Philadelphia, v. 45, p. 116-120, 2006.

CALVOPIÑA, M.; KATO, H.; HASHIGUCHI, Y. Leishmaniasis Recidiva Cutis and Its Topical Treatment in Ecuador. **Tropical medicine and international health**, Oxford, v. 41, p. 93-94, 2013.

CAMPBELL-LENDRUM, D. H. et al. Domesticity of *Lutzomyia whitmani* (Diptera: Psychodidae) populations: field experiments indicate behavioural differences. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 90, p. 41-48, 2000.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, Basel, v. 56, p. 315-325, 1994.

CASTELLUCCI, L. C. et al. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: a critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 109, p. 279-288, 2014.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos). **Life Cycle**. Atlanta, 2012. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> Acesso em: 10 dez. 2012.

CONVIT, J.; KERDEL-VEGAS, F.; GORDON, B. Disseminated anergic cutaneous leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, London, v. 74, p. 132-135, 1962.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 75, p. 3-17, 2005.

COSTA, J. M. L. et al. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da leishmaniose tegumentar no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Salvador, v. 79, p. 70-83, 2009.

COUTINHO, S. G. et al. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 214-228, 1987.

CUBA CUBA, C. A. et al. Parasitologic and immunologic diagnosis of American (mucocutaneous) leishmaniasis. **Epidemiological Bulletin of the Pan American Health Organization**, Washington, v. 15, p. 249-259, 1981.

CUBA CUBA, C. A. et al. Cultivation of *Leishmania braziliensis braziliensis* from skin ulcers in man under field conditions. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 456-457, 1986.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H. A General Classification of New World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 50, p. 296-311, 1994.

- DASGUPTA, S. et al. A cloned kinetoplast DNA minicircle fragment from *Leishmania* spp: specific for post kala-azar dermal leishmaniasis strains. **Parasitology**, London, v. 102. p. 187-191, 1991.
- DE BRUIJN, M. H. L. et al. A comparative study of diagnosis by the polymerase chain reaction and by current clinical methods using biopsies from Colombian patients with suspected leishmaniasis. **Tropical Medicine and Parasitology**, Stuttgart, v. 44, p. 201-207, 1993.
- DE BRUIJN, M. H. L.; 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.
- DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 463-469, 1994.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 14, p. 417-423, 1996.
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 95, p. 239-243, 2001.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative, Immunology, Microbiology & Infectious diseases**, Oxford, v. 27, p. 305-318, 2004.
- FERNANDES, O. et al. An oligonucleotide probe derived from kDNA minirepeats is specific for *Leishmania (Viannia)*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 279-284, 1996.
- FERNANDES, O. et al. Minicircle variable region probes for characterization of *Leishmania (Viannia)* species. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 85, p. 563-568, 1999.
- FERREIRA, G. A. et al. Discrimination of *Leishmania braziliensis* variants by kDNA signature produced by LSSP-PCR. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 93, p. 712-714, 2007.
- FIGUEROA, R. A. et al. Detection of *Leishmania* in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)* species. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 200, p. 638-646, 2009.
- GOMES, A. H. S. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Detection by PCR biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 119, p. 319-324, 2008.

- GOMES, C. M. et al. The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 29, p. 109-114, 2015.
- GOMES, M. A. et al. LSSP-PCR for characterization of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in Brazil. **Parasitology**, London, v. 114, p. 517-520, 1998.
- GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. L. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, London, v. 8, p. 419-433, 2010.
- GRAMICCIA, M. et al. A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. **Parasitology**, London, v. 105, p. 29-34, 1992.
- GRIMALDI-JR, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 41, p. 687-725, 1989.
- GUERBOUJ, S. et al. Genomic polymorphism of *Leishmania infantum*: a relationship with clinical pleomorphism? **Infection, genetics and evolution**, Amsterdam, v. 1, p. 49-59, 2001.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, p. 50-54, 2003.
- HERWALDT, B. Leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 354, p. 1191-1199, 1999.
- HONIGBERG, B. M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. **Journal of protozoology**, New York, v. 10, p. 20-63, 1963.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 21, p. 123-152, 1995.
- KASSI, M.; KASI, P. M. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by fine needle aspiration cytology: a report of 66 cases. **Tropical Doctor**, London, v. 35, p. 50-51, 2005
- KASSI, M. et al. Fineneedle aspiration cytology in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Annals of Saudi Medicine**, Riyadh, v. 24, p. 93-97, 2004.
- KHAN, I.; YASMIN, R. Comparison of fine needle aspiration with biopsy in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, Paquistão, v. 17, p. 154-158, 2007.

LAGES-SILVA, E. et al. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 44, p. 2167-2171, 2006.

LE FICHOUX, Y. et al. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1953-1957, 1999.

LLANOS-CUENTAS, E. A. et al. Possible risk factors in development of mucosal lesion in leishmaniasis. **Lancet**, London, v. 4, p. 295, 1984.

LOPES, U. G.; WIRTH, D. F. Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 20, p. 77-84, 1986.

MAGALHÃES, A. V. et al. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. Padrões histológicos e estudo evolutivo das lesões. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, p. 253-262, 1986.

MANSON-BAHR, P. E. Diagnosis. In: PETERS, W.; KILLICK- KENDRICK, R. Ed. **The leishmaniasis in the biology and medicine**. London: Academic Press; 1987. p. 703-728.

MARQUEZ, D. S. et al. *Trypanosoma rangeli*: RAPD-PCR and LSSP-PCR analyses of isolates from southeast Brazil and Colombia and their relation with KPI minicircles. **Experimental parasitology**, New York, v. 117, p. 35-42, 2007.

MARLOW, M. A. et al. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, e56177, 2013.

MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 859-876, 1986.

MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia–Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 27, p. 93-101, 1994.

MARTINS, A. L. G. P. et al. American tegumentary leishmaniasis: correlation among immunological, histopathological and clinical data. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 52-58, 2014.

MARZOCHI, M. C. A. Leishmanioses no Brasil (As Leishmanioses Tegumentares). **Jornal Brasileiro de Medicina**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 81-105, 1992.

MARZOCHI, M. C. A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, p. 359-750, 1994.

MELLO, M. N. et al. Padronização do antígeno de Montenegro. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 19, p. 161-164, 1997.

MOMEN, H. et al. Brazilian Leishmania stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 34, p. 1076-1084, 1985.

MAROVICH, M. A. et al. Leishmaniasis recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 33, p. 1976-1979, 2001.

NAVIN, T. R. Cutaneous leishmaniasis in Guatemala: comparison of diagnostic methods. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 42, p. 36-42, 1990.

NEGRÃO, G. N.; FERREIRA, M. E. M. C. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar Americana e sua expansão no território brasileiro. **Revista Percurso**, Paraná, v. 6, p. 147-168, 2014.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of DNA from *Leishmania (Viannia)*: accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PLOS One**, San Francisco, v. 8, e62473, 2013.

ODDONE, R. et al. Development of a multilocus microsatellite typing approach for discriminating strains of *Leishmania (Viannia)* species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 47, p. 2818-2825, 2009

OLIVEIRA, F. S. et al. kDNA minicircle signatures of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in oral and nasal mucosa from mucosal leishmaniasis patients. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 66, p. 361-365, 2010.

OLIVEIRA, F. S. et al. Genetic polymorphism in *Leishmania (Viannia) braziliensis* detected in mucosal leishmaniasis of HIV-infected and non-HIV-infected patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, p. 683-687, 2012.

OLIVEIRA, F. S. et al. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra-and inter-patient levels. **Parasites & vectors**, London, v. 6, p. 1-8, 2013.

OLIVEIRA, M. A. A. et al. Low-stringency single specific primer PCR for identification of *Leptospira*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 52, p. 127-135, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Cutaneous. Genebra, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/#>>. Acesso em: 30 jun. 2014a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Burden and distribution. Genebra, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 30 jun. 2014b

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Cutaneous leishmaniasis. Genebra, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 30 jun. 2014c

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**: Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, Genebra, 2013. Disponível em: <[http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html)>. Acesso em: 30 jun. 2014d

PENA, S. D. J. et al. Sequence-specific 'gene signatures' can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 91, p. 1946-1949, 1994.

PENA, S. D. J.; SIMPSON, A. J. G. Sequence-specific gene signatures produced by LSSP-PCR. Laboratory Protocols for Mutation Detection. Edited by U. Landegren. **Oxford University Press**, Oxford, p. 42-47, 1996.

PEREIRA, F.; CARNEIRO, J.; AMORIM, A. Identification of species with DNA based technology: current progress and challenges. **Recent patents on DNA and gene sequences**, v. 2, p. 187-199, 2008.

PERNAMBUCO. Secretaria de Vigilância em Saúde de Pernambuco. **Relatório de Situação**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

PESSÔA, S.B. Classificação das leishmanioses e das espécies do gênero *Leishmania*. **Arquivos de higiene e saúde pública**, São Paulo, v. 26, p. 41-50, 1961.

PESSÔA, S.M. **Parasitologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982.

POVELONES, M. L. et al. Beyond replication: Division and segregation of mitochondrial DNA in kinetoplastids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 196, p. 53-60, 2014.

RAY, D. S. Kinetoplast DNA minicircles: high-copy-number mitochondrial plasmids. **Plasmid**, New York, v. 17, p. 177-190, 1987.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. In: S de La Roque, editor. Climate change: the impact on the epidemiology and control of animal diseases. **Revue scientifique et technique**: Office international des epizooties, Paris, v. 27, p. 399-412, 2008.

REIS, L.C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, p. 439-443, 2008.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 45, p. 21-25, 2007.

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

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, R. D. R. et al. Anticorpos antipromastigotas vivas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, detectados pela citometria de fluxo, para identificação da infecção ativa de leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 551-562, 2002.

ROCHA, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active localized cutaneous leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 11, p. 156-166, 2006.

RODRIGUES, E. H. G., et al. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3572-3576, 2002.

RODRIGUES E. H. G. **Análise de sequencias de minicírculos do kDNA obtidos de amostras clínicas (lesões ativas e cicatrizadas) de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Pernambuco, Brasil**. 2006 Tese (Biologia Celular e Molecular). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2006.

RODRIGUES, E. H. et al. The compositional landscape of minicircle sequences isolated from active lesions and scars of American cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, London, v. 6, p. 228, 2013.

RODRIGUEZ, N. et al. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.9, p.2246-2252, 1994.

RODRIGUEZ, N. et al. *Leishmania (Viannia) guyanensis*: a new minicircle class exclusive to this specie isolated from a DNA cosmid library useful for taxonomic purposes. **Experimental parasitology**, New York, v. 94, p. 143-149, 2000.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania's* bodies. **British Medical Journal**, London, v. 11, p. 1401, 1903.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRIETSCH, E. F. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

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.

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

SCHUBACH, A. O. et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, p. 213-217, 2005.

SEGATTO, M.; RODRIGUES, C. M.; MACHADO, C. R. LSSP-PCR of *Trypanosoma cruzi*: how the single primer sequence affects the kDNA signature. **BMC research notes**, London, v. 6, p. 174, 2013.

SERAFINELLA, P. et al. Leishmaniasis recidiva cutis. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 39, p. 205-206, 2000.

SHAHBAZI, F. et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitology Research**, Berlin, v. 103, p. 1159-1162, 2008.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazon Brazil – A Review. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 239-251, 2004.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of Leishmaniasis. **Journal Postgraduate Medicine**, Bombay, v. 49, p. 55-60, 2003.

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://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 8 out. 2012.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. **Principles of numerical taxonomy**, San Francisco, [s.n.], 1963.

SOKAL R. R.; MICHENER, C. D. et al. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Science Bulletin**, v. 38, p. 1409-1438, 1958.



TAMURA, T. et al. A restricted level of PQBP1 is needed for the best longevity of *Drosophila*. **Neurobiology of Aging**, New York, v. 34, 356.e11 - 356.e20, 2013.

VALENCIA, B. M. et al. Non-invasive cytology brush PCR for the diagnosis and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, e49738, 2012.

VAGO, A. R. et al. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **American Journal of Pathology**, New York, v. 149, p. 2153–2159, 1996.

VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **American journal of pathology**, New York, v. 156, p. 1805-1809, 2000.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, London, v. 16, p. 97-101, 2003.

VIANA, J. B. M. **Procedimento de coleta de aspirado de lesão para o diagnóstico da LTA**. Recife, 2012, a. 1 fotografia.

WILSON, S. M. DNA-based methods in the detection of *Leishmania* parasites: field applications and practicalities. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 89, p. 95-100, 1995.

WILSON, R. et al. Stage-Specific Adhesion of *Leishmania* Promastigotes to Sand Fly Midguts Assessed Using an Improved Comparative Binding Assay. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, e816, 2010.

ZAFRA, G. et al. Direct analysis of genetic variability in *Trypanosoma cruzi* populations from tissues of Colombian chagasic patients. **Human pathology**, Philadelphia, v. 42, p. 1159-1168, 2011.

## APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Grupo Paciente)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Grupo Paciente

O (A) Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado "Análise de assinaturas dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana nas formas ativa e recidivante (recidiva cútis) de áreas endêmicas do estado de Pernambuco" que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é contribuir para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana

O (A) Sr. (a) fará parte do grupo de pacientes, que será submetido à coleta de parasitos através da raspagem superficial da borda da lesão, aspirado da borda da lesão e coleta de 4 mL (equivalente a 1 colher de chá) de sangue venoso. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade para executá-lo. Quanto aos riscos, apesar de todas as medidas preventivas e cuidados tomados no sentido de proteger os voluntários, o (a) senhor (a) poderá sentir algum desconforto ou ardência. Sua identidade não será revelada em nenhum momento da pesquisa.

Antes de sua participação no referido projeto, o senhor tem total liberdade de pedir esclarecimentos adicionais que julguem necessários. Tais informações serão prestadas por quaisquer dos responsáveis pelo estudo. O (A) Sr. (a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem prejuízo de qualquer tipo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a sua identidade); e para que possamos estocar a suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, ao (a) senhor (a) será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou de informações adicionais o (a) senhor (a) poderá, a qualquer momento, entrar em contato com a equipe responsável (Edileuza Brito e Juliana Viana – CPqAM-Fiocruz e Ângela Rapela - HUOC-UPE), através dos telefones abaixo. Caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa isso poderá ser feito através do contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (telefone (81) 2101-2639) o qual tomará as medidas cabíveis.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente e endereço

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – HUOC-UPE

\_\_\_\_\_  
data

Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-UPE), Rua Amaldo Marques, s/n - Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ. Tel.: (81) 2101 2641 ou 2101 2566.

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE  
Recife - PE - CEP: 50.670-420  
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911  
www.cpqam.fiocruz.br

## APÊNDICE B - Termo de Assentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Grupo de Paciente Menor de 18 anos

Convidamos o (a) menor, após autorização dos responsáveis legais, para participar do projeto de pesquisa intitulado "Análise de assinaturas dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana nas formas ativa e recidivante (recidiva cútis) de áreas endêmicas do estado de Pernambuco" que será desenvolvido no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ). O objetivo principal desta pesquisa é contribuir para um melhor conhecimento da leishmaniose tegumentar humana.

O (A) menor fará parte do grupo de pacientes, realizaremos a coleta de parasitos, através da raspagem superficial da borda da lesão, aspirado da borda da lesão e coleta de 4 mL (equivalente a 1 colher de chá) de sangue venoso. Todo o procedimento será realizado com material livre de contaminantes, descartável e por profissionais de saúde com capacidade para executá-lo. Quanto aos riscos, apesar de todo cuidado tomado no sentido de protegê-lo, o menor poderá sentir algum desconforto ou ardência. A identidade dele (a) não será revelada em nenhum momento da pesquisa.

Antes de sua participação no projeto citado, o (a) menor, tem total liberdade de pedir esclarecimentos adicionais que julguem necessários. Tais informações serão prestadas por quaisquer dos responsáveis pelo estudo. O (A) menor tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem prejuízo de qualquer tipo.

Solicitamos sua autorização para que a Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) possa utilizar as informações obtidas em reuniões, congressos e publicações científicas (preservando a identidade do voluntário); e para que possamos estocar as suas amostras biológicas, a fim de utilizá-las em estudo posterior. Neste caso, será solicitado um novo consentimento, caso tenhamos que utilizar sua amostra em outra pesquisa.

Este documento será feito em duas vias, ficando uma em posse do participante e a outra com o coordenador da pesquisa.

Em caso de dúvidas ou de outras informações o (a) senhor (a) poderá, a qualquer momento, entrar em contato com a equipe responsável (Edileuza Brito e Juliana Viana - CPqAM e Ângela Rapela - HUOC-UPE), através dos telefones abaixo. Caso exista a necessidade de apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa isso poderá ser feito através do contato com o Comitê de Ética do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (telefone (81) 2101-2639) o qual tomará as medidas cabíveis.

\_\_\_\_\_  
Nome do menor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente e endereço

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura de testemunha

\_\_\_\_\_  
data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do médico responsável – HUOC-UPE

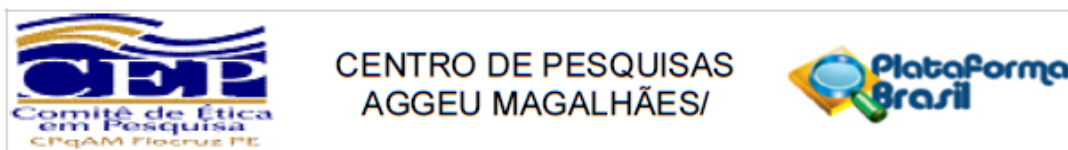
\_\_\_\_\_  
data

Ambulatório de Dermatologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC-UPE), Rua Amaldo Marques, s/n - Santo Amaro, Recife-PE. Fone: (81) 3413-1300.

Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ. Tel.: (81) 2101 2641 ou 2101 2666.

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE  
Recife - PE - CEP: 50.670-420  
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911  
www.cpqam.fiocruz.br

## ANEXO A - Parecer consubstanciado do CEP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Análise de assinaturas dos minicírculos do kDNA de Leishmania spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana nas formas ativa e recidivante (recidiva cútis) de áreas endêmicas do estado de Pernambuco.

**Pesquisador:** Juliana Bezerra Medeiros Viana

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 31324314.0.0000.5190

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FIOCRUZ

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 799.253

**Data da Relatoria:** 17/07/2014

## Apresentação do Projeto:

O projeto está bem escrito, com referências que subsidiam a hipótese e o método. As mesmas também estão atualizadas. Tem linguagem clara, científica e de fácil compreensão.

A pesquisa propõe analisar a assinatura de alvo molecular da Leishmania para identificação de polimorfismos nas diferentes apresentações clínicas da LTA.

## Objetivo da Pesquisa:

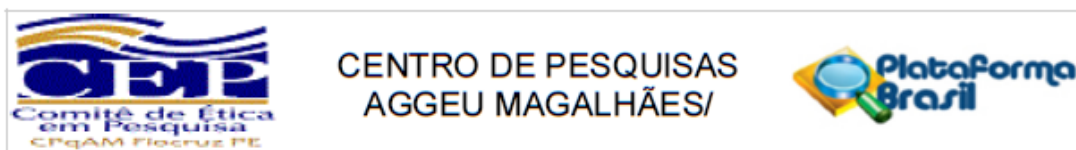
Objetivo Primário:

Analisar assinaturas dos minicírculos do kDNA de Leishmania spp. presentes em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar americana nas formas ativa e recidivante (recidiva cútis).

Objetivo Secundário:

- a) Estabelecer um painel de assinaturas do kDNA de minicírculos através de LSSP-PCR em amostras de lesões ativas e recidiva cútis;
- b) Analisar polimorfismos do kDNA através de sequenciamento de minicírculos;

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 799.253

- c) Fazer alinhamentos múltiplos de sequências;  
 d) Comparar os resultados obtidos pelas técnicas de LSSP-PCR e sequenciamento; e) Elaborar um cladograma de minicírculos obtido das amostras clínicas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

A pesquisadora descreve os riscos e benefícios referentes a pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa tem importância para o melhor conhecimento molecular da LTA, podendo auxiliar no desenvolvimento de novas ferramentas para diagnóstico em anterior

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos adequados.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

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 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 03 de setembro de 2017. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

**Situação do Parecer:**

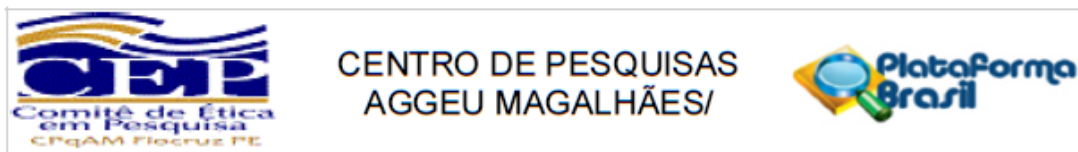
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 799.253

RECIFE, 22 de Setembro de 2014

---

**Assinado por:**  
**Janaina Campos de Miranda**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.670-420  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2101-2639 **Fax:** (81)2101-2639 **E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br