

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

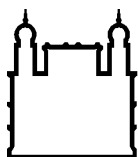
Luana Souza de Aguiar Lourenço

**Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de
pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação
com a forma clínica e resposta à terapêutica**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Medicina Tropical

Orientador (a): Profa. Dra. Márcia Oliveira Pereira Duarte

RIO DE JANEIRO
2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: Luana Souza de Aguiar Lourenço

**Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de
pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação
com a forma clínica e resposta à terapêutica**

ORIENTADOR: Profa. Dra. Márcia Oliveira Pereira Duarte

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr.: Kátia da Silva Calabrese (Presidente)

Prof. Dr.: Karis Maria de Pinho Rodrigues

Prof. Dr.: João Silveira Moledo Gesto

Prof. Dr.: Paula Mello de Luca (Suplente)

Prof. Dr.: Isabella Dib Ferreira Gremião (Suplente)

Rio de Janeiro, 07 de Julho de 2015

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

L892 Lourenço, Luana Souza de Aguiar

Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação com a forma clínica e resposta à terapêutica / Luana Souza de Aguiar Lourenço. – Rio de Janeiro, 2015. xii, 79 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015. Bibliografia: f. 49-67

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Carga parasitária. 3. Fatores de virulência. 4. PCR em tempo real. 5. Resposta à terapêutica. I. Título.

CDD 616.9364

Ao meu companheiro Rafael Lourenço

Agradecimentos

À medicina, caminho que escolhi seguir com suas alegrias e percalços.

À dermatologia, que sempre despertou em mim o desejo de fazer o melhor.

À minha orientadora Márcia Oliveira Pereira Duarte pelo estímulo, ajuda e compreensão.

Ao professor Manoel Paes de Oliveira-Neto idealizador deste projeto e exemplo maior de mestre e médico.

À Luiza de Oliveira pela elaboração do desenho dos experimentos de quantificação da carga parasitária pelo qPCR em tempo real, bem como pela colaboração na discussão dos resultados.

Ao Antônio Gonçalves (Tônico) por toda a ajuda na reta final.

À dra Kátia Calabrese pela revisão da dissertação, com toda paciência e disponibilidade.

Aos mestres Iler Souza, Antônia Franco, Luna Azulay e tantos outros que me fazem querer seguir seus passos.

A todos os alunos que me inspiram e fazem de mim uma médica melhor.

Aos pacientes, que me permitem aprender com suas dores e que são o motivo de todo meu esforço.

Aos colegas do LIPMED: Regina, Rosi e Claude, pela colaboração e carinho.

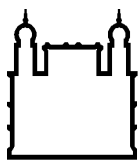
À minha família que sempre me apoiou e incentivou a estudar e aprender coisas novas.

Aos amigos Samantha Talarico, Tania Jaeger, Neide Eisele, Roberta Teles e Steven Bipes pela força e torcida.

Ao dr Decio Tenenbaum por me ajudar nos momentos de aflição e por todos os acolhimentos.

À minha irmã Luciana Souza pelo exemplo e disponibilidade.

Ao meu amor maior que, com sua paciência e bom humor, torna meus dias mais felizes e minhas angústias menores.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

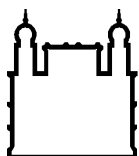
Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação com a forma clínica e resposta à terapêutica

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luana Souza de Aguiar Lourenço

Estudos prévios sobre os aspectos histopatológicos da leishmaniose tegumentar americana (LTA) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* indicam que a carga parasitária, apesar de baixa, variava de acordo não só com a forma clínica, mas também com o tempo de evolução da doença. O insucesso do tratamento e a evolução para formas mais graves dependem de características do parasita e de aspectos da resposta imune do paciente, dentre outros. Os pacientes com a forma cutânea tendem a responder de forma satisfatória, mesmo com protocolo em que se usa baixa dose de antimoniato de meglumina. Entretanto, alguns desses casos demoram mais tempo para atingir a cura clínica ou recidivam ou ainda desenvolvem a forma mucosa. Este projeto teve como meta avaliar a carga parasitária inicial e fatores de virulência em lesões de pacientes com LTA, correlacionando com a forma clínica e resposta à terapêutica. Foram selecionados 82 pacientes com diagnóstico confirmado de LTA. A carga parasitária foi avaliada por PCR quantitativo (qPCR), utilizando-se como alvo genes de subunidade menor de RNA ribossomal (SSR). A análise da expressão gênica de GP63 deu-se pelo uso de RT-PCR e a imunolocalização de GP63 e LPG nas lesões foi conduzida por ensaios de imunoperoxidase. Os dados de quantificação da carga parasitária mostraram parasitismo maior nas lesões que evoluíram com boa resposta ao tratamento, enquanto que a expressão gênica de GP63 e a produção “in situ” de GP63 e LPG foram mais significativas nos casos que evoluíram de forma desfavorável ao tratamento. Com isso podemos concluir que mais que a carga parasitária, a regulação de fatores de virulência no infiltrado inflamatório pode influenciar na evolução clínica da LTA causada por *L.(V.) braziliensis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da carga parasitária e fatores de virulência em lesões de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana: correlação com a forma clínica e resposta à terapêutica

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luana Souza de Aguiar Lourenço

Previous studies on the histopathological aspects of american cutaneous leishmaniasis (ACL) caused by *Leishmania (V.) braziliensis* indicate that the parasite load, although low, varied according not only to the clinical form, but also with the disease progression. Treatment failure and progression to more severe forms depend on parasite characteristics and the aspects of patient immune response, among other factors. Patients with cutaneous form tend to respond satisfactorily, even with protocols that use low-dose meglumine antimoniate. However, some of these cases either take longer to reach clinical cure, relapse or even develop to mucosal form. This project aims to assess the initial parasite load and virulence factors in patients with ACL injuries, correlating with the clinical presentation and response to therapy. We selected 82 patients with confirmed diagnosis of LTA. The parasitic load was measured by quantitative PCR (qPCR), using small subunit ribosomal RNA (SSR) genes as targets. Analysis of GP63 gene expression was done by RT-PCR and immunolocalization of GP63 and LPG lesions was conducted by immunoperoxidase assays. The quantification of the parasite load data showed higher parasitism in lesions that evolved with good response to treatment, whereas gene expression of GP63 and "in situ" production of GP63 and LPG were more significant in cases that evolved unfavorably to treatment. Thus, we concluded that rather than the parasite load, the regulation of virulence factors in the inflammatory infiltrate may be influencing the clinical course of ACL caused by *L. (V.) braziliensis*.

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO.	01
1.1	As Leishmanioses	01
1.2	Formas clínicas	01
1.3	Histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana	03
1.4	Vetores	03
1.5	Agente etiológico e ciclo biológico	04
1.6	Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	05
1.7	Métodos Diagnósticos	06
	1.7.1 Métodos Diagnósticos Convencionais	06
	1.7.2 Métodos de Diagnóstico Molecular	09
1.8	Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana	11
1.9	Aspectos Imunopatogênicos	13
1.10	Fatores de Virulência da Leishmaniose	14
2.0	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos	21
3.0	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Pacientes	22
3.2	Cultura de parasitos	23
3.3	Extração de DNA e qPCR	23
3.4	Isolamento de RNA total	24
3.5	Tratamento com DNase e síntese de cDNA	24
3.6	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)	25
3.7	Imunohistoquímica	25
3.8	Análise da Imunomarcacão	26
3.9	Aspectos éticos	27

3.10	Análise Estatística	27
4.0	RESULTADOS	27
5.0	DISCUSSÃO	41
6.0	CONCLUSÕES	47
7.0	REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

Lista de Abreviaturas

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
GP63: Glicoproteína 63
LPG: Lipofosfoglicana
LCL: Leishmaniose Cutâneo Localizada
LM: Leishmaniose Mucosa
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase
RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa
qPCR: Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
LCM: Leishmaniose Cutâneo Mucosa
LCD: Leishmaniose Cutâneo Difusa
LV: Leishmaniose Visceral
BR: Boa Resposta
MR: Má Resposta
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
RNA: Ácido Ribonucleico
NO: Óxido Nítrico
TNF α : Fator de Necrose Tumoral-alfa
IFN- γ : Interferon-gama
TGF β : Fator estimulador de crescimento de colônias
IL-4: Interleucina-4
IL-10: Interleucina-10
IL-12: Interleucina-12
IL-13: Interleucina-13
Th1 e Th2: Linfócito T auxiliar do tipo 1 e 2
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
MAC: Complexo de Ataque à Membrana
CR3 e CR1: Receptores do Sistema Complemento
GPI: Glicofosfatidilinositol
PKC: Proteína Quinase C
PTK: Proteína Tirosina Quinase
TRL3: Receptor "Toll-like" 3
HE: Hematoxilina e Eosina
IDRM: Intradermorreação de Montenegro

kDNA: Região do mini círculo do cinetoplasto

G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase

SSR: Subunidade menor de RNA ribossomal

ACT: Gene Constitutivo Humano β -actina

INI: Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

Lista de figuras

Figura 01	Úlcera leishmaniótica	01
Figura 02	Leishmaniose mucosa	02
Figura 03	Ciclo evolutivo da <i>Leishmania ssp.</i>	05
Figura 04	Fatores de virulência de <i>Leishmania</i> : LPG, GP63 e outros	15
Figura 05	Estrutura LPG	16
Figura 06	GP63 atuando nas funções de sinalização da célula hospedeira	19
Figura 07	Distribuição dos pacientes com LTA quanto ao sexo e raça ...	28
Figura 08	Distribuição dos pacientes com LTA de acordo com a idade ..	28
Figura 09	Distribuição dos pacientes com LTA de acordo com o tempo de evolução	29
Figura 10	Gráficos da IDRМ em pacientes com LTA	30
Figura 11	Percentual de detecção de DNA de <i>Leishmania</i> tissular por qPCR	31
Figura 12	Quantificação da carga parasitária tissular por qPCR	32
Figura 13	Os gráficos em barra mostram a diferença na frequência de expressão gênica de GP63 em pacientes com LTA	35
Figura 14	Expressão gênica de GP63 em gel de poliacrilamida	36
Figura 15	Imunolocalização de GP63 em lesões de LTA	37
Figura 16	Imunolocalização de LPG em lesões de LTA	38
Figura 17	Imunolocalização de GP63 em lesões de LTA de acordo com a forma clínica e resposta ao tratamento	39
Figura 18	Imunolocalização de LPG em lesões de LTA de acordo com a forma clínica e resposta ao tratamento	40

Lista de tabelas

Tabela 01	Distribuição dos pacientes com LTA (LCL-BR, LCL-MR e LM) de acordo com a positividade da PCR e dos métodos convencionais de diagnóstico parasitológico de LTA	33
Tabela 02	Positividade da PCR e qPCR em tempo real em pacientes com LTA, de acordo com a forma clínica	33
Tabela 03	Positividade da PCR e qPCR em tempo real em pacientes com LTA, de acordo com a resposta ao tratamento	34

1-Introdução

1.1 – As Leishmanioses

As leishmanioses são antropozoonoses, não contagiosas, crônicas, causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas ao homem por fêmeas infectadas de flebotomíneos, dos gêneros *Phlebotomus* do Velho Mundo e *Lutzomyia*, presente no Novo Mundo. São consideradas, pela Organização Mundial de Saúde, como sendo uma das seis mais importantes doenças infecciosas (Ministério da Saúde, 2007).

1.2 – Formas Clínicas

Dentre as manifestações clínicas podemos destacar as formas tegumentares: cutâneo localizada (LCL), cutâneo mucosa (LCM), cutâneo difusa (LCD), mucosa (LM); e a forma visceral (LV). As formas tegumentares apresentam semelhanças entre si. Após um período de incubação que varia de um a três meses, mas que pode durar entre duas semanas e um ano, surge a lesão inicial, caracterizada por pápula eritematosa, única ou múltipla, localizada em área desnuda e que corresponde ao ponto de inoculação. Nesta etapa, é comum observar a presença de adenopatia regional e linfangite (Sousa et al., 1995). Estas lesões tendem a evoluir para úlceras e, num mesmo doente, pode-se observar lesões em diferentes estágios de evolução. Tem especial relevância para este trabalho a forma LCL, causada pela *L (V) braziliensis* e que, em geral, manifesta-se como lesão ulcerada, única ou múltipla, indolor e com bordos bem delimitados (Pessoa & Barreto, 1948) (Figura 01).



Figura 01 - Úlcera Leishmaniótica

Fonte: <http://medfoco.com.br/leishmaniose-tegumentar-americana-ulcera-de-bauru/>

Tal lesão apresenta tendência à cura espontânea, podendo deixar uma cicatriz estrelar e retrátil, atrófica, lisa e brilhante (Costa et al., 1987; Marsden, 1985). Esta pode sofrer reativação, provavelmente associada a persistência do parasita no tecido, levando à recidiva ou evolução para forma mucosa (Schubach et al., 1998). A forma LM é considerada uma forma metastática, por disseminação hematogênica, onde há o surgimento de lesão em mucosa oro-nasal, cerca de 5 anos após a cicatrização (Davies et al., 2000; Marsden, 1986), mas que também pode coexistir com a lesão cutânea (Boaventura et al., 2006). A LM pode determinar a destruição das estruturas do maciço facial, levando a mutilações extensas (Marsden & Nonata, 1975; Marsden, 1986; Rey, 2008) (Figura 02).



Figura 02 – Leishmaniose Mucosa

Fonte: <https://www.ufpe.br/biolmol/PQI-PATOS>

Os sinais e sintomas mais precoces são obstrução nasal, coriza e epistaxe. A pele do nariz torna-se espessada, edemaciada e hiperemiada, culminando com o aumento do volume nasal. Quando ocorre a destruição do septo nasal, o nariz tomba para frente, constituindo o chamado “nariz de tapir” (Lessa et al., 2007; Marsden & Nonata, 1975). Na cavidade oral, principalmente no palato, as lesões são úlcero-vegetantes e apresentam granulações grosseiras, às vezes separadas por sulcos, que podem se entrecruzar formando a chamada “cruz de espondia ou de Escomel”. Pode evoluir com grande acometimento, por vezes com desfecho fatal (Marsden, 1986). No entanto, a frequência desta complicação é baixa e gira em torno de 1% a 10% dos casos nas áreas endêmicas, de acordo com diferentes fontes (Daneshbad et al., 2011; Lessa et al., 2007; Pearson & Sousa, 1996) e, provavelmente, está relacionada ao diagnóstico e tratamento precoces (Reithinger & Dujardin, 2007).

Estudos prévios apontaram como fatores de risco preponderantes para o desenvolvimento da LM a presença de lesões acima da cintura pélvica, úlceras

cutâneas maiores e tratamento inadequado (Llanos-Cuentas, 1984). Também tem sido demonstrada uma maior frequência de LM em pacientes com LCD (Carvalho et al., 1994a).

A razão pela qual indivíduos infectados por *Leishmania* podem apresentar envolvimento mucoso ainda não é totalmente esclarecida. A associação da infecção por *L. (V.) braziliensis* com esta forma da doença sugere que, além do hospedeiro, fatores relacionados ao parasito sejam relevantes (Carvalho et al., 1994b).

1.3 – Histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana

No Brasil, a leishmaniose foi identificada em 1895 por Moreira como “botão da Bahia” ou “botão de Biskra”. Em 1909, Lindenberg encontrou, pela primeira vez, formas amastigotas em úlceras cutâneas de indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamento para construção de rodovias no interior de São Paulo. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e Vianna (1911) deu ao parasito o nome de *Leishmania braziliensis*. Em 1922, Aragão demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da doença e Forattini, em 1958, encontrou roedores silvestres infectados pela *leishmania* no estado de São Paulo. Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em todos os estados do Brasil. Inicialmente, era considerada uma zoonose que acometia animais silvestres e ocasionalmente, e acidentalmente, o homem. No entanto, expandiu-se para zonas rurais desmatadas e regiões periurbanas e urbanas, com adaptação de alguns vetores nestes novos nichos (Falqueto, 1986).

1.4– Vetores

São muitas as espécies implicadas na transmissão da LTA no Brasil. No entanto, somente algumas tem sido consideradas importantes vetores, de acordo com os seguintes critérios: distribuição espacial coincidente com a doença (Rangel & Lainson, 2003), grau de antropofilia e infecção natural por *Leishmania*. São elas: *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* (Lutz & Neiva, 1912); *L. migonei* (França, 1920); *L. (N.) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939); *L. (Pintomyia) fischeri* (Pinto, 1926); *L. (Pintomyia) pessoai* (Coutinho & Barreto, 1941); *L. (N.) umbratilis* (Ward & Fraiha, 1977); *L. (Psychodopygus) wellcomei* (Fraiha, Shaw & Lainson, 1971); *L.*

Trichophoromyia ubiquitalis (Mangabeira, 1942); *L. (Psychodopygus) complexa* (Mangabeira 1941); *L. (Psychodopygus) ayrozai* (Barreto & Coutinho, 1940); *L. (Psychodopygus) paraensis* (Costa Lima, 1941); *L. (N.) flaviscutellata* (Mangabeira, 1942).

1.5 – Agente etiológico e ciclo biológico

Existem várias espécies de *Leishmania* e uma grande parte delas está relacionada ao desenvolvimento de doença no homem (Grimaldi et al., 1989; Lainson et al., 1994). No Brasil, os parasitos que mais frequentemente produzem lesão tegumentar são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Destas, a espécie com maior distribuição é a *L. (V.) braziliensis*, encontrada em todo o território nacional, além de vários países da América Central e do Sul (de Belize até a Argentina). É provável que nem todas correspondam ao mesmo parasito, mas que exista um complexo de subespécies (Souza et al., 2012).

As espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) e apresentam duas formas no seu desenvolvimento: as amastigotas, que são estruturas arredondadas e com flagelo restrito a bolsa flagelar, encontradas parasitando células fagocitárias do homem e de animais; e as promastigotas, formas que possuem flagelo livre, que se desenvolvem no tubo digestivo de insetos e que correspondem à forma infectante (Degraeve et al., 1994; Liew & O'Donnell, 1993; Yurchenko et al., 1999).

A infecção tem início quando, durante o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, a fêmea do flebotomíneo ingere macrófagos com formas amastigotas em seu interior. Estas transformam-se no tubo digestivo do inseto em promastigotas procíclicas com pouca mobilidade e, posteriormente, diferenciam-se em promastigotas nectomonas, iniciando-se a fase de multiplicação logarítmica em que os parasitos não são infectantes. Estas formas migram para o intestino médio aderindo-se às microvilosidades das células, sofrem metaciclogênese e se transformam em promastigotas metacíclicas que, por sua vez, migram para a região do cardia e válvula do estomodeo, onde aderem ao epitélio danificando a válvula. Assim, ao realizar um novo repasto, o vetor regurgita as formas infectantes,

promastigotas metacíclicas, que invadem as células do hospedeiro. Estas formas são interiorizadas pelos macrófagos da pele e transformam-se, rapidamente, em amastigotas. Estas multiplicam-se por divisão binária até ocupar todo o citoplasma celular, formando verdadeiros “ninhos” de amastigotas (Pearson & Sousa, 1996). A dispersão da infecção ocorre quando a célula, densamente parasitada, se rompe e as amastigotas são fagocitadas por novas células, concluindo assim seu ciclo. (Figura 03). (Bates, 2007; Pace, 2014).

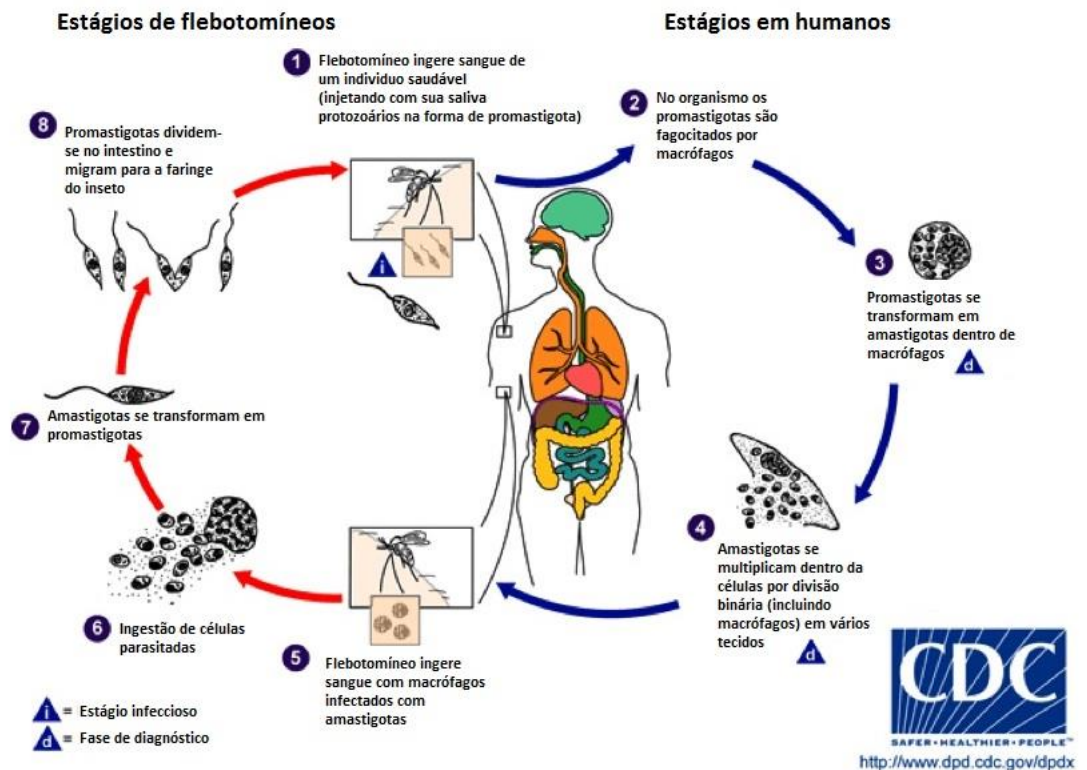


Figura 03 – Ciclo Evolutivo

Fonte: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

1.6- Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

Estima-se que 350 milhões de pessoas em todo o mundo encontrem-se em risco de contrair a doença e que cerca de 2 milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas, ocorram por ano (WHO, 2007). No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é observada em todos os estados brasileiros. Em 2012, foram notificados 23004 novos casos (Ministerio da Saúde, 2012).

A doença apresenta três perfis epidemiológicos: i) silvestre – zoonose de animais silvestres; ii) Ocupacional ou lazer – relacionada com desmatamento, extração de madeira, ecoturismo (antropozoonose); e iii) Rural ou periurbana – em áreas de colonização ou adaptação do vetor ao peridomicílio. Além disso as leishmanioses tem uma diversidade de agentes, reservatórios e vetores (Ministério da saúde, 2007).

1.7 - Métodos Diagnósticos

As ferramentas utilizadas para o diagnóstico de LTA envolvem a demonstração direta de amastigotas em lesões, a cultura do parasito e a identificação de alvos moleculares. Os métodos utilizados podem ser divididos em métodos convencionais (mais frequentemente realizados) e métodos moleculares.

1.7.1 – Métodos Diagnósticos Convencionais

O *imprint* ou aposição em lâmina é um método de demonstração do parasito, considerado de primeira escolha por ser rápido, de fácil execução e baixo custo (Sousa et al., 2014). É feito com material obtido através da escarificação da úlcera ou biopsia com impressão por aposição e, posteriormente, corado pela hematoxilina e eosina (HE) ou Giemsa. É quase sempre positivo em lesões recentes e frequentemente negativo nas tardias. A infecção secundária é um fator que contribui para diminuir a sensibilidade do método, devendo ser tratada previamente. É considerada padrão-ouro, mas tem como inconvenientes a demora na análise de grande número de amostras e o fato de que a quantificação de parasitos pode não refletir a carga parasitária real (Kobets et al., 2012). A sensibilidade desta técnica pode ser aumentada pela repetição do exame.

No exame histopatológico visualiza-se hiperkeratose, parakeratose, degeneração da camada basal, atrofia ou acantose e, por vezes, pode-se visualizar abscessos intraepidérmicos (Grevelink & Lerner, 1996). Pode-se observar, também, focos de necrose associada a infecção bacteriana secundária, acompanhada por infiltrado inflamatório composto, predominantemente, por linfócitos e macrófagos, esboçando ou formando granulomas, que em sua maioria são desorganizados (de Magalhães et al., 1982; de Magalhães et al., 1986). Estudos prévios sobre os

aspectos histopatológicos da LTA, causada por *L. (V.) braziliensis* indicam que a carga parasitária, apesar de baixa, varia de acordo não só com a forma clínica, mas também com o tempo de evolução da doença (de Magalhães et al., 1986). É um método que depende da expertise do patologista e não permite uma quantificação precisa uma vez que a contagem é feita de forma subjetiva, utilizando termos como muitos, poucos, ou classificando em número de cruzes. Outra dificuldade na quantificação por este método se baseia no fato de que em certas amostras os parasitos se distribuem no tecido de forma desigual e heterogênea. (Kobets et al., 2012; Ridley, 1980).

Nos últimos anos, a imunohistoquímica vem sendo apontada como método simples e de baixo custo para a detecção de *Leishmania* em tecidos com baixa carga parasitária, tanto em lesões cutâneas de pacientes como em modelos animais (Alves et al., 2013; Tafuri et al., 2004). O método mostrou-se mais sensível na detecção de amastigotas quando comparado com o exame histopatológico de rotina (Quintella et al., 2009). Isso sugere a importância da validação da imunohistoquímica como um método alternativo para o diagnóstico de LTA (Alves et al., 2013).

A cultura do parasito inclui o isolamento e o cultivo da *Leishmania* a partir de células e tecidos, utilizando fragmentos cutâneos obtidos por biópsia ou punção da úlcera, os quais são inoculados em meios de cultivo Neal, Novy e Nicolle (NNN) (Nicolle, 1908; Novy & MacNeal, 1904) e *Liver Infusion Triptose* (LIT) (Camargo, 1964), em uma temperatura que varia de 24°C a 26°C. Após o quinto dia de cultivo, formas promastigotas já podem ser evidenciadas na cultura, se esta for positiva. No entanto, para que o resultado seja considerado negativo a cultura deve ser mantida até um mês sob observação (Ministério da saúde, 2007). A maioria das técnicas de cultivo utilizam diluições em série para determinar a proporção de células contendo parasitos viáveis, o que as tornam trabalhosas e demoradas. Um método de cultura microcapilar foi desenvolvido para o diagnóstico de leishmaniose cutânea e apresenta, em relação ao método convencional, maior rapidez e sensibilidade para detecção de promastigotas. A alta sensibilidade do método pode ser atribuída ao uso de tubos capilares, que concentram o material da amostra e oferecem microaerofilia com altas concentrações de CO₂, importante no processo de transformação de amastigotas em promastigotas (Boggild et al., 2008). Entretanto, todas as técnicas de cultura são dependentes de condições estéreis e podem demorar dias ou semanas para que se observem parasitos, além do risco de contaminação. Por estes motivos é

difícil a sua utilização como método na rotina diagnóstica. No entanto, Romero et al. (1999) demonstraram que, com a utilização de tubos a vácuo, houve uma redução significativa na contaminação associada a um aumento na sensibilidade. O material da biópsia ou raspado de lesão pode ser triturado em solução salina estéril e inoculado por via intradérmica em hamster (*Mesocricetus auratus*). No hamster, as lesões desenvolvem-se mais tardiamente e os animais devem ser acompanhados por três a seis meses. Além disso, a eficácia do isolamento apresenta variação conforme a espécie de *Leishmania*. Devido à complexidade e alto custo, este método vem sendo pouco utilizado, apesar da elevada sensibilidade entre os métodos parasitológicos (Ministério da Saúde, 2007).

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) consiste na aplicação intradérmica de 0,1-0,3 ml de uma solução de promastigotas e na visualização da resposta de hipersensibilidade celular retardada. Pode manter-se positiva após o tratamento, mesmo nos casos de cura espontânea. Nos indivíduos fraco reatores e nos que foram tratados precocemente pode tornar-se negativa. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser devido a doença prévia, aplicação anterior do antígeno, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças. Nestas áreas a positividade varia entre 20-30%, mesmo na ausência de lesão ativa ou cicatriz. A IDRM pode ser negativa nas primeiras quatro a seis semanas após o surgimento da lesão cutânea e, após a cura clínica, pode permanecer positiva durante vários anos. Isto a torna limitada para diagnóstico de reativação. Pacientes com LM costumam apresentar IDRM exacerbada, com vários centímetros de endureção, podendo apresentar vesiculação, ulceração e até mesmo necrose local. Na forma cutânea difusa a IDRM costuma ser negativa. A leitura é feita 48-72 horas após a aplicação e é considerada positiva quando houver pápula maior que 5 mm de diâmetro. A especificidade e a sensibilidade estão próximas de 100% (Mayrink et al., 1978; Ministério da Saúde, 2007; Montenegro, 1926; Souza et al., 1992).

Reações sorológicas são utilizadas para seguimento pós-tratamento. Pacientes com lesões múltiplas (cutâneas ou mucosas) costumam apresentar títulos mais altos. Já as lesões mucosas tem títulos mais altos e persistentes quando comparadas com as cutâneas. No entanto, são relatados casos de falso negativo, reação cruzada com outras doenças, além de reações falso positivas em indivíduos saudáveis, provenientes ou não de áreas endêmicas, o que limita o uso de reações

sorológicas no diagnóstico de LTA quando não há demonstração do parasito. A imunofluorescência não deve ser utilizada como critério isolado para diagnóstico de LTA, mas pode ser associada à IDRM ou técnicas parasitológicas, no diagnóstico diferencial com outras doenças e nos casos em que a demonstração do agente etiológico não foi possível (Ministério da Saúde, 2007).

1.7.2 – Métodos de Diagnóstico Molecular

O diagnóstico de LTA realizado pelos métodos convencionais pode estar relacionado à baixa sensibilidade, especialmente naqueles casos com reduzido parasitismo tecidual e produção baixa ou ausente de anticorpos no sangue do indivíduo infectado (Singh & Sivakumar, 2003). Embora apresente limitações de seu uso, principalmente em áreas com poucos recursos de assistência em saúde e estrutura laboratorial, o diagnóstico molecular gerou uma grande mudança na prática clínica de várias doenças infecto-parasitárias, onde um diagnóstico preciso é fundamental para se tomar uma decisão terapêutica correta (Yang & Rothman, 2004). Há mais de vinte anos, as plataformas baseadas na PCR vem sendo utilizadas na detecção de DNA genômico ou de cinetoplasto, em diversas amostras clínicas de pacientes com leishmanioses (Brustoloni et al., 2007; Gomes et al., 2014; Rodgers et al., 1990; Romero et al., 2009; Wall et al., 2012;). Em comparação com os métodos convencionais, a PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade e ainda reduz o tempo de liberação do resultado e a subjetividade que envolve a leitura de lâminas de *imprint* ou de histopatologia (Aviles et al., 1999). Em um estudo prévio com pacientes de área endêmica de LTA do Rio de Janeiro, foi observado que, entre os pacientes com LCL, somente 62% eram diagnosticados pelos métodos convencionais. Mas a aplicação da técnica da PCR aumentou o percentual de casos confirmados para 94%. Nas formas mucosas essa diferença foi ainda mais evidente. Do total de pacientes com doença mucosa apenas 17% tiveram seu diagnóstico confirmado pelos métodos convencionais enquanto a PCR foi positiva em 71% das amostras testadas (Pirmez et al., 1999). Dados semelhantes de sensibilidade das diversas técnicas de PCR também foram registrados em estudos com pacientes de outras áreas endêmicas de *L. (V) braziliensis*, inclusive em amostras de sangue (de Paiva et al., 2013; Gomes et al., 2008; Oliveira-Camara et al., 2006). Por outro lado, dependendo do desenho dos

oligonucleotídeos, a amplificação por PCR pode gerar produtos homólogos à sequências de DNA humano (Vergel et al., 2005).

Devido à realização das etapas de amplificação dos ácidos nucleicos e detecção do produto amplificado em um mesmo processo, a PCR em tempo real vem se mostrando mais vantajosa para o diagnóstico clínico-molecular do que a PCR. Sua aplicação varia desde a quantificação de carga viral, da expressão gênica até a detecção de agentes infecciosos. Como grandes vantagens desta ferramenta podemos citar a redução do risco de contaminação cruzada, a coleta dos dados na fase exponencial, além da liberação rápida dos resultados associada a alta sensibilidade e especificidade. A PCR em tempo real foi descrita pela primeira vez por Higuchi et al., em 1993 que acoplaram uma câmara de vídeo para detectar a fluorescência durante todos os ciclos. Por definição, esta técnica associa a metodologia da PCR combinada a um sistema de detecção de fluorescência produzida ao longo de cada ciclo de amplificação. Pode ainda ser aplicada para quantificação (qPCR), pois permite a conversão dos sinais de fluorescência de cada reação em um valor numérico. Para otimizar o processo, o desenho dos primers deve abranger produtos de 100 a 150 pb. O método mais específico de qPCR se baseia no uso de sonda TaqMan®, que apresenta um corante “reporter” na posição 5’ (fluorescente) e um corante “quencher” na posição 3’ (silenciador). No momento em que a reação gera amplicons, a sonda hibridiza-se com esse alvo gerado e fica exposta à atividade de exonuclease da Taq polimerase. Como consequência, essa sonda é degradada e o fluoróforo fica distante do “quencher”, não sendo capaz de absorver a luz emitida. Outro sistema de revelação dos amplicons consiste na utilização do corante SYBR Green® que se liga de maneira inespecífica ao DNA em fita dupla. Este último sistema, comparado ao TaqMan®, tem baixo custo, facilidade de uso e alta sensibilidade (Dorak, 2007).

Estudos que visam a quantificação de *Leishmania* através da qPCR já foram conduzidos para diversas espécies em humanos, em cães e em modelos experimentais (Bretagne et al., 2001; Castilho et al., 2008; Manna et al., 2008; Mary et al., 2004). Regiões dos genes de DNA polimerase, do mini círculo do cinetoplasto (kDNA), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e de RNA ribossomal (SSR) vem sendo utilizados com alvos. O kDNA contém as regiões mais conservadas que são utilizadas para a detecção e quantificação de *Leishmania*. Cada parasito contém várias cópias de minicírculo de cinetoplasto que faz do kDNA um alvo muito importante para PCR (Kobets et al., 2012). Vale destacar que genes de cópia única,

como a DNA polimerase e G6PDH, não são facilmente detectados em comparação aos multi-cópias, como SSR e kDNA. Embora este último seja um ótimo alvo para detecção qualitativa de *Leishmania*, pode não ser um bom alvo para ensaios de quantificação, por apresentar grande variação no número de cópias entre as espécies e entre os isolados de uma mesma espécie (Mary et al., 2004; Weirather et al., 2011). Por ter regiões bastante conservadas, o gene de SSR pode ainda ser utilizado para detecção e identificação de espécies de *Leishmania*, através das diferenças nas curvas de dissociação por qPCR (Talmi-Frank et al., 2010).

A qPCR permite a quantificação de parasitos em diferentes níveis, mesmo quando se apresentam em pequenas quantidades (Bell & Ranford-Cartwright, 2002). Sabe-se que lesões de leishmaniose mucosa, ou formas crônicas de leishmaniose cutânea, normalmente apresentam maior dificuldade na visualização do parasito pela histopatologia, dado o baixo parasitismo tecidual, o que não acontece na doença aguda, que costuma ter uma carga parasitária mais alta. Além de uma importante ferramenta para o diagnóstico, a qPCR poderá tornar-se fundamental para o acompanhamento da carga parasitária durante e após o término do tratamento, no seguimento do doente e para se estabelecer uma correlação com a resposta ao tratamento (Jara et al., 2013).

1.8 – Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

O tratamento de primeira linha utiliza antimoniais pentavalentes, principalmente a N-metil-glucamina (Glucantime® Rhodia Farma/Sanofi-aventis) que, desde sua introdução, persiste como primeira escolha para tratamento da LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* (Blum & Hatz, 2009). Apresenta-se em ampolas de 5ml, contendo 1,5g do sal (425mg de Sb⁺⁵), devendo ser administrado na dose de 20mg/kg/dia, até o limite de 60kg de peso. As aplicações devem ser feitas diariamente, preferencialmente por via intramuscular profunda ou endovenosa, por vezes com o doente internado, por cerca de 20 dias. No entanto, essa opção exige acompanhamento cuidadoso dos doentes, principalmente idosos, gestantes e pacientes com doenças cardíacas e hepáticas, em função do risco de efeitos adversos (Oliveira-Neto et al., 2000), o que dificulta sua utilização em áreas remotas, onde com frequência a doença ocorre. Podem ocorrer náuseas, vômitos, tosse, epigastralgia, pirose, artralgia, mialgia, elevação de transaminases, de uréia e

creatinina, podendo levar à insuficiência renal aguda e pancreatite. Mas o principal efeito adverso está relacionado ao sistema cardiovascular, com inversão e achatamento da onda T e aumento do espaço QT, que são tempo-dose dependentes. Com objetivo de diminuir a exposição do paciente a esses efeitos, estudos com baixas doses de Glucantime® (Oliveira-Neto et al., 1997; Oliveira-Neto et al., 2000), bem como aplicação intralesional de antimoniais (Oliveira-Neto et al., 1997), foram realizados no Rio de Janeiro e obtiveram alto índice de cura clínica. No entanto, o resultado observado não pode ser generalizado, uma vez que a sensibilidade dos parasitos aos fármacos varia de acordo com a localização geográfica das cepas de *Leishmania*. Particularmente, as cepas de *L. (V.) braziliensis* do Rio de Janeiro têm demonstrado boa sensibilidade a esse medicamento (Azeredo-Coutinho et al., 2007), mas esses dados, não necessariamente, demonstram o perfil de sensibilidade de outras cepas. No caso da aplicação intralesional, já foi demonstrado que pode ser um método alternativo, eficaz e menos tóxico, para pacientes com leishmaniose cutânea, que apresentem contra-indicação para a terapia sistêmica (Vasconcellos et al., 2012). No entanto mais estudos são necessários para que seja comprovado que não há comprometimento sobre a progressão para a forma mucosa, em comparação com as doses usuais (David & Craft, 2009; Reithinger & Dujardin, 2007).

Outras opções terapêuticas, como anfotericina B ou isotionato de pentamidina, também apresentam efeitos adversos importantes ou até mais graves, tem administração complexa e alto custo, o que muitas vezes não justifica seu uso como alternativa aos antimoniais. Outros medicamentos que poderiam ser promissores, como a miltefosina, os derivados imidazólicos e a azitromicina, não têm demonstrado resultados satisfatórios com relação ao tratamento de infecções causadas por *L. (V.) braziliensis* (Blum & Hatz, 2009; Toledo et al., 2014).

O insucesso do tratamento ou a evolução para formas mais graves da doença dependem de características do parasito e da resposta imune do paciente. A LTA no Rio de Janeiro tem como agente etiológico principal a *L. (V.) braziliensis* e, pacientes com a forma cutânea, tendem a responder de forma satisfatória, mesmo com protocolo de tratamento em que se usa baixa dose de antimoniato de meglumina. Entretanto, percentuais que variam de 1 a 12% de acordo com diferentes fontes, apresentam resposta insatisfatória após o tratamento ou evoluem para forma mucosa (Oliveira-Neto et al., 1997; Tuon, 2008).

1.9 – Aspectos Imunopatogênicos

A evolução das leishmanioses no hospedeiro é bastante variável (Pessoa & Barreto, 1948) e dentro da complexa rede de interação parasito-hospedeiro que influencia a doença clínica e o prognóstico das leishmanioses humanas, podemos destacar aqueles ligados à espécie ou cepa do parasito envolvido, componentes da saliva do vetor isolados a partir do sobrenadante, resultante da centrifugação da glândula salivar do inseto (SGS) (Weinkopff et al., 2014), bem como os que são próprios do hospedeiro, como idade (Carvalho et al., 2015), status imunológico (Gollob et al., 2014; Maretta-Mira et al., 2012), co-infecção com HIV (Singh, 2014), dentre outros (Rodrigues et al., 2011). Como resultado desta interação parasito-hospedeiro, pode-se observar um espectro de manifestações que vão desde lesões cutâneas até a forma fatal da doença visceral (Alvar et al., 2012; Hartley et al., 2012; Kaye & Scott, 2011).

Quando as formas promastigotas são introduzidas na pele encontram células do sistema imune do hospedeiro (linfócitos T e B, macrófagos, mastócitos e células de Langerhans). O parasito se adere à superfície dos macrófagos, através de um mecanismo não muito esclarecido, e passa para o meio intracelular através de um processo de fagocitose, mediada por receptores. E, apesar dos macrófagos serem células fagocitárias especializadas na destruição de microorganismos, os parasitos internalizados permanecem num fagolisossoma onde obtêm nutrientes, se multiplicam sob a forma de amastigotas e subvertem as vias antimicrobicas, interferindo nos processos de migração e apoptose celulares, modificando o ambiente intracelular (Moradin & Descoteaux, 2012; Olivier et al., 2012; Podinovskaia & Descoteaux, 2015). Durante os estágios iniciais, proteínas do parasito associadas à patogenicidade, como a zinco metaloproteinase GP63, podem degradar reguladores negativos de secreção de TNF- α e IL-6 que de outra forma impediriam o influxo de neutrófilos e monócitos inflamatórios para o local de inoculação. Por este mecanismo o parasito permanece no interior de fagócitos inflamatórios, estabelecendo infecção crônica (Arango Duque & Descoteaux, 2015).

A patogênese das leishmanioses depende de interações entre diversos fatores desencadeados pela resposta do sistema imune do hospedeiro, inata e adquirida, e será determinante no curso da doença. As células T “helper” CD4⁺ têm uma função primordial no sistema imune, promovendo respostas adequadas a patógenos específicos. De acordo com as citocinas que produzem após estimulação antigênica,

estas células podem ser separadas em duas sub- populações: T “helper” 1 (Th 1) e T “helper” 2 (Th 2) (Bittar et al., 2007; Reithinger et al., 2007). A cura clínica resulta quando os macrófagos são ativados para um estado leishmanicida, que é mediado, principalmente, por linfócitos T auxiliares do tipo 1 (resposta celular Th1). Esta resposta é caracterizada pela apresentação do antígeno às células dendríticas, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, IFN- γ e TNF- α . A presença de outras citocinas, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , caracteriza a resposta Th2, que desativa macrófagos e impede uma produção excessiva de citocinas, promovendo o “downregulation”, o que pode demonstrar que a resolução da doença tem relação com a resposta mediada por células, e não com a resposta imune humoral. Além disso, a ativação primária de subpopulações de células T seria importante para o desenvolvimento de respostas Th1 e Th2 e o subsequente curso de infecção. Também já foi observado que, ao contrário dos pacientes com LM, em casos de LCL causada por *L. (V.) braziliensis*, as células T regulatórias produtoras de IL-10 e TGF- β contribuem para um balanço equilibrado da resposta imune celular, o que poderia favorecer a maior resistência à infecção e ao resultado favorável após o tratamento com antimonialo de meglumina (Silveira et al., 2009).

Em estudo com pacientes com LTA, foi verificado que apesar de não haver variação na porcentagem total de células TCD4⁺ produtoras de IFN- γ induzidas por antígenos de *Leishmania*, análise multiparamétrica por citometria de fluxo revelou uma diferença significativa na qualidade da resposta Th1. Entretanto, antígenos de *L. (V.) braziliensis* foram capazes de induzir uma proporção importante de células T CD4⁺ multifuncionais (Macedo et al., 2012). Apesar dos grandes avanços obtidos na área de imunopatologia da LTA, ainda são necessários mais estudos para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na progressão da doença e no controle da infecção.

1.10 - Fatores de Virulência da Leishmaniose

A expressão de fatores de virulência pode influenciar nos mecanismos fisiopatogênicos desta infecção. Moléculas de superfície do parasito como a lipofosfoglicana (LPG) e a metaloproteinase dependente de zinco (GP63) são imprescindíveis neste processo (Figura 04).

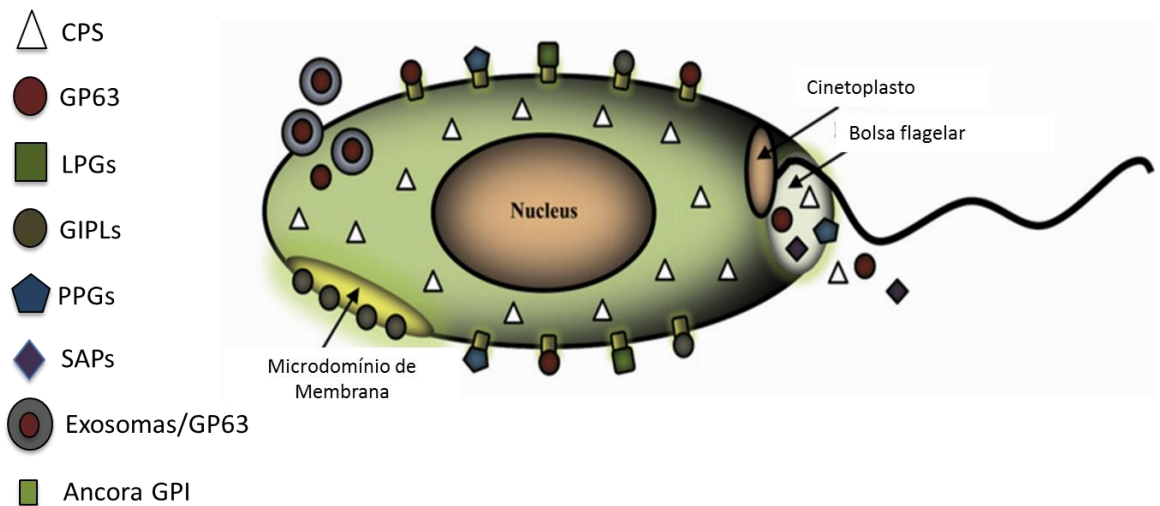


Figura 04 – Fatores de virulência de Leishmania: LPG, GP63 e outros.

Fonte: modificado de Olivier et al, 2012

Os parasitos da família *Trypanosomatidae* apresentam na sua superfície uma capa de glicocálix que exibe significativa diversidade em sua composição. Porém, essas moléculas compartilham uma estrutura comum: uma âncora de glicofosfatidilinositol (GPI) altamente conservada (McConville & Ferguson, 1993). Ao contrário de outros membros desta família de protozoários, o glicocálix de promastigotas de *Leishmania* é composto por glicanas fosfoglicosiladas ancoradas à GPI. A LPG é a molécula mais abundante na superfície com aproximadamente 5×10^6 cópias/célula e que desempenha papel importante na interação com o hospedeiro vertebrado (Guha-Niyogi et al., 2001). É composta por quatro domínios distintos: uma âncora GPI, um núcleo glicana, uma cadeia linear de fosfoglicana e uma capa terminal de oligossacarídeos (Turco & Descoteaux, 1992) (Figura 05).

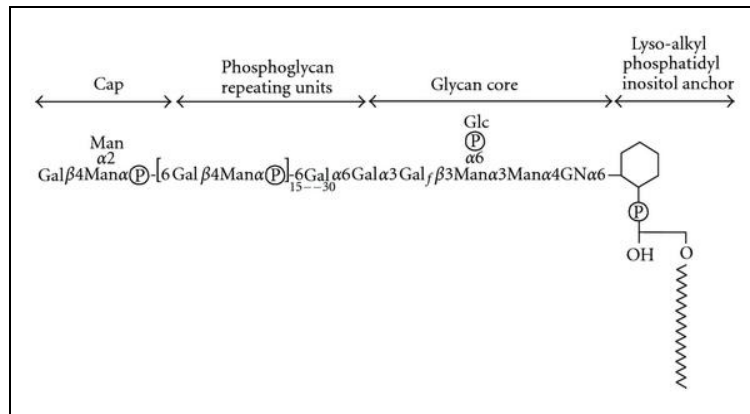


Figura 05: Estrutura de LPG de *Leishmania donovani*, mostrando os quatro domínios: capa, unidades repetidas de fosfoglicana, núcleo glicana e âncora lipídica GPI.

Fonte: modificado de Franco et al., 2012

Algumas análises estruturais da LPG mostraram conservação de grande parte das estruturas que a compõe (Orlandi Jr & Turco, 1987). No entanto, também foram caracterizadas diferenças entre o número e a composição de açúcares entre as diferentes espécies estudadas (Turco & Descoteaux, 1992). Esta variabilidade parece ser importante, pois torna a transmissão do parasito espécie-específica (Pimenta et al., 1994; Sacks, 2001). Diferenças também na estrutura e na distribuição de LPG na superfície são importantes nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito (Olivier et al., 2005). O papel da LPG na virulência de *Leishmania* tem sido confirmado em vários ensaios de infecção e em condições não fisiológicas, com uso de LPG purificada (Forestier et al., 2015).

A LPG representa a primeira etapa de interação do parasito com a célula hospedeira dos mamíferos, o que promove uma ativação do sistema imune. Ao mesmo tempo, esta camada superficial protege o parasito de sua lise por complemento e conseqüente destruição (Franco et al., 2012). Quando a forma promastigota metacíclica infectiva penetra no hospedeiro, esta sofre alterações na membrana. Tais alterações são capazes de impedir a inserção do MAC do sistema complemento e ocorrem, principalmente, através do alongamento na estrutura LPG e podem resultar em diferentes ativações macrofágicas (Ibrahim et al., 2013; Puentes et al., 1988). Na fase inicial de infecção intracelular, a LPG seria responsável por inibir a maturação do fagolisossomo. Isto permitiria às promastigotas sobreviverem dentro do vacúolo até a transformação para amastigotas, estas capazes de se dividirem e

propagarem a infecção (Desjardins et al., 1997). Estudos que utilizaram cepas modificadas, mostraram que esta molécula atua tanto na sobrevivência do parasito, quanto na modulação da resposta imune. Corroborando destes dados, ensaios com *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*, apesar de apresentarem diferenças estruturais na molécula de LPG, evidenciaram uma forte ativação da resposta imune via receptores Toll-like (TRL) (Assis et al., 2012; Ibraim et al., 2013). Por outro lado, em infecções *in vitro* de macrófagos com cepas de *L. (L.) mexicana* mutantes, sem expressão de LPG, observou-se que os parasitos cresciam da mesma forma que cepas selvagens (Ilg, 2001). As variabilidades da LPG intra e interespecíficas foram observadas em diferentes isolados (Coelho-Finamore et al., 2011) e estes polimorfismos são envolvidos na sobrevivência da *Leishmania* no interior do hospedeiro (Dobson et al., 2006 e 2010; Volf et al., 2014). No entanto, ainda não está claro o papel da LPG nas formas amastigotas. Estudos com várias espécies de *Leishmania* mostram uma diminuição importante na expressão desta molécula, o que poderia sugerir seu papel transitório na infecção. Entretanto, há evidências da expressão de glicoconjugados contendo fosfoglicanas em células infectadas. Além disso, a LPG tem sido apontada como um candidato à vacina. Por exemplo, em um modelo animal, a vacina composta por esta molécula foi capaz de proteger os animais após o desafio com cepas altamente virulentas (Franco et al., 2012). Isto mostra que mais estudos são necessários para determinar o papel da LPG na estimulação da resposta imune e sobrevivência do parasito.

A GP63 ou glicoproteína principal de superfície foi descrita pela primeira vez nos anos 80 e seu nome deriva do achado de uma glicoproteína com tamanho de 63kDa, embora várias isoformas de tamanhos diferentes já tenham sido descritas. A GP63 é uma metaloproteinase da classe metizincinas, caracterizada pela sequência motivo HEXXHXXGXXH e um pro-peptídeo N-terminal, removido durante a maturação e ativação da enzima. Estima-se que cada forma promastigota possua 5×10^5 moléculas. Mesmo apresentando diferenças nas sequências gênicas, pelo menos 10 espécies de *Leishmania* codificam sequências de aminoácidos muito similares (Yao et al., 2003). Sua expressão ocorre tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas, sendo capaz de degradar vários substratos incluindo caseína, azocaseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (Bouvier et al., 1990).

Estudos pioneiros em *L. (V.) braziliensis* mostraram que o aumento de sua expressão ocorre durante a transformação de formas logarítmicas em formas estacionárias, o que demonstra o papel crucial da GP63 na virulência do parasito

(Kweider et al., 1987). Dados mais recentes vem corroborando estes achados em outras espécies, mostrando ainda que a GP63 modula os mecanismos de sinalização celular e de resposta imune (Isnard et al., 2012; Olivier et al., 2012).

Nas leishmanioses, o complemento apresenta três importantes papéis: leishmanicida pela fixação dos seus componentes que levam à lise; opsonização pela fixação de C3b, que favorece a ligação e evasão do parasita no macrófago; e a liberação de fragmentos quimiotáticos C3a e C5a que promovem inflamação. A clivagem de C3 e a posterior deposição de seu fragmento C3b na superfície do parasita constituem a etapa crucial da ativação do complemento. A GP63 foi inicialmente descrita como receptor de C3 (Puentes et al., 1988) e após a ativação e geração de C3b, a reação pode seguir dois caminhos: a formação de C5 convertase, com formação do complexo de ataque à membrana C5b-C9 (MAC), que leva à lise do parasito; ou a inativação com geração do fragmento iC3b. Além disso, durante o processo, observa-se uma maior expressão das moléculas de GP63, que são responsáveis por clivar a molécula C3b em iC3b, sua forma inativa, impedindo também a formação do MAC (Da Silva et al., 1989). As moléculas C3b e iC3b atuam, ainda, na opsonização do parasita, facilitando a fagocitose por meio de ligação destas moléculas aos receptores do sistema complemento CR3 e CR1 (Brittingham et al., 1995). A ligação aos receptores do complemento faz com que os mecanismos oxidativos microbicidas do macrófago não sejam ativados e, com isso, facilita a entrada do parasita na célula-alvo (Wright & Siverstein, 1983).

Outro papel descrito da GP63 na infecção por *Leishmania* seria sua capacidade de inativar as enzimas do lisossomo, caso a fusão com o fagolisossomo ocorresse (Seay et al., 1996). Antes de se transformar em amastigostas, as formas promastigotas necessitam da ação da GP63 na inibição da proteína quinase C (PKC) e na diminuição da sua translocação até a membrana (Giorgione et al., 1996; Moore et al., 1993; Olivier et al., 1992). A importância da PKC e das proteínas tirosina quinase (PTK) está relacionada à regulação da ação microbicida dos macrófagos, através da produção de ROS, a partir da ativação destas enzimas (Nathan & Shiloh, 2000) (Figura 06).

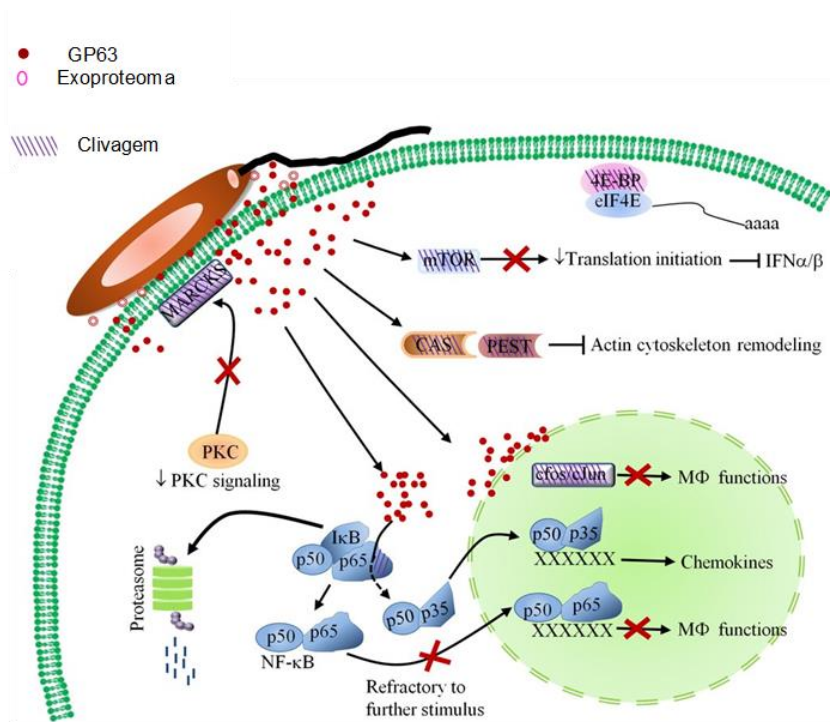


Figura 06 – GP63 atuando nas funções de sinalização da célula hospedeira. Setas indicam os alvos de sinalização da GP63; Cruzes vermelhas indicam alteração na cascata de sinalização; Linhas interrompidas indicam inibição funcional.

Fonte: modificado de Olivier *et al*, 2012.

Outro fator que vem sendo associado à patogenicidade da *Leishmania* é a presença de um vírus RNA, encontrado no subgênero *Viannia* que parece estar relacionado com o mecanismo de metástase para os sítios mucosos. Ele atua como um potente imunógeno, induzindo uma resposta hiperinflamatória através da ligação com receptores Toll-like 3 (TRL3) (Ives et al., 2011). Tal resposta inflamatória seria responsável por aumentar a gravidade da doença, promover a persistência do parasito e até mesmo atribuir resistência aos fármacos anti-*leishmania*. Esses vírus foram encontrados principalmente em isolados humanos e, em modelos animais, mostraram-se propensos à metástase. Aparentemente o vírus interfere na capacidade das células do sistema fagocítico do hospedeiro de eliminar o parasito através do estresse oxidativo. O risco de desenvolvimento da forma mucosa encontra-se, quase exclusivamente, nas infecções pelo subgênero *Viannia*, o que reforça a hipótese de que a metástase na leishmaniose, é provocada, em parte, por características do parasito (Hartley et al., 2012). No entanto, estudo realizado com casos graves e crônicos, em região endêmica do Rio de Janeiro, onde o principal

agente é a *L. (V.) braziliensis*, não observou associação de formas graves de LTA com a presença do vírus RNA. O que se pode concluir é que, embora metástases possam ocorrer na ausência do vírus, as respostas imunes hiperinflamatórias que ele desencadeia através da ligação aos receptores TLR 3, parecem explicar as diferenças observadas entre espécies e/ou cepas distintas (Pereira et al., 2013).

Considerando o papel dos fatores de virulência e sua implicação na evolução clínica da LTA já descritos, bem como a importância da carga parasitária e outros fatores da interação entre os parasitos do gênero *Leishmania* e o hospedeiro é possível que, conhecendo melhor estas informações, no futuro possamos estabelecer correlações úteis para o desenvolvimento de marcadores prognósticos, novos medicamentos ou vacinas.

2 - Objetivos

2.1 - Geral

Este projeto teve como objetivo principal determinar a influência da carga parasitária e de fatores de virulência na evolução da leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) braziliensis*.

2.2 - Específicos

1. Quantificar por qPCR a carga parasitária de lesões cutâneas e mucosas, utilizando-se como alvo a subunidade menor do RNA ribossomal (SSR);
2. Comparar a positividade da qPCR com a PCR convencional nas amostras de lesões cutâneas e mucosas;
3. Quantificar a produção "in situ" de GP63 e de LPG em lesões cutâneas e mucosas por imunohistoquímica;
4. Avaliar a expressão gênica de GP63 em lesões cutâneas e mucosas por RT-PCR;
5. Correlacionar os dados de quantificação de carga parasitária e de expressão de fatores de virulência com a forma clínica e resposta à terapêutica;

3 - Material e Métodos

3.1 – Pacientes

Este estudo foi realizado utilizando-se fragmentos de lesões de pacientes com diagnóstico parasitológico de LTA, comprovado por pelo menos um dos quatro métodos de diagnóstico utilizados na rotina (impressão em lâmina, cultura, histopatologia ou PCR). Também foram considerados aqueles que apresentaram IDRM positiva, além de diagnóstico clínico e história epidemiológica compatíveis com a doença. Os pacientes eram provenientes de áreas endêmicas de *L (V.) braziliensis* do sudeste do Brasil, principalmente do estado do Rio de Janeiro, e foram submetidos, durante a primeira consulta no INI (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas), a uma rotina que consistia na anamnese, exame físico, coleta da história epidemiológica, de material biológico para diagnóstico (amostra de tecido da lesão) e aplicação da IDRM. O material resultante deste processo estava armazenado no Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas do Instituto Oswaldo Cruz (LIPMED/IOC). Os dados clínicos como idade, sexo, forma clínica, resposta ao tratamento, tempo de evolução e IDRM, além do resultado da PCR e dos outros exames de diagnóstico, foram acessados por meio de prontuário ou através de consulta ao banco de dados (LEISH) do LIPMED, que também atua como Serviço de Referência em Diagnóstico Molecular e Histopatológico das Leishmanioses. Foram incluídos no presente estudo 82 pacientes oriundos do INI/LEISH, diagnosticados entre 1985 e 2005. Os ensaios de PCR se basearam na detecção de kDNA de acordo com metodologia previamente estabelecida (Pirmez et al.,1999). Foram excluídos pacientes com comorbidades e gestantes. O tratamento desses pacientes foi feito com antimoniato de meglumina, administrado de acordo com os protocolos estabelecidos pelo Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 1994), bem como com esquema de baixa dose com eficácia previamente comprovada (Oliveira-Neto & Mattos, 2006) o qual só foi administrado nos casos de leishmaniose cutânea. Todos os pacientes foram acompanhados para avaliação da resposta ao tratamento.

Foram incluídos neste estudo casos de LCL (n=62) e casos de LM (n=20). Além da apresentação clínica, a seleção dos casos de LCL deu-se de acordo com a resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina. O critério de cura foi definido como epitelização completa das lesões acompanhada do desaparecimento do eritema, induração ou pápulas até 3 meses após o término do tratamento. Foram

considerados pacientes com boa resposta ao tratamento (BR), aqueles onde se obteve a cura clínica completa (n=27). Pacientes com má resposta ao tratamento (MR) foram definidos como aqueles que apresentaram ausência de cura clínica no mesmo período, recidivas ou aparecimento de lesões novas (n=35). Este critério de BR e MR está de acordo com a recomendação do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (Ministério da Saúde, 2007).

3.2 - Cultura de parasitos

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/2903) foram mantidas no meio Schneider's (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, Brasil) a 28°C por 3-4 dias. Amastigotas axênicas foram obtidas em cultura utilizando-se meio M199 pH 5,5 + 10% de soro fetal bovino (Cultilab) por 48 horas a 34°C. Os parasitos foram lavados em salina estéril e depois mantidos em reagente Trizol® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para extração do RNA total.

3.3 - Extração de DNA e qPCR

Foi utilizado o kit “Ilustra Tissue & Cells GenomicPrep Mini Spin” (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) para obtenção do DNA das amostras de lesões de pacientes. A quantificação absoluta por qPCR foi realizada com “SYBR Green® PCR Master Mix®” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), utilizando 500nM de cada iniciador e volume final de 20µl em termociclador “StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As condições de ciclagem utilizadas foram: 95°C por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 75°C por 30 segundos.

Para a amplificação de regiões do SSR (número de acesso GenBank: M80292) foram utilizados pares de iniciadores específicos (Bezerra-Vasconcelos et al., 2011; Prina et al., 2007). Para normalizar as variações de carregamento de DNA e identificar a presença de inibidores da reação foram utilizados iniciadores para o gene constitutivo humano β-actina (ACT) (número de acesso GenBank: NM001101.3). A sequência dos iniciadores utilizados foram: 5' ACT, TAATGTCACGCACGATTTCCC 3' e 5' TCACCGAGCGCGGCT 3'; SSR, 5' TACTGGGGCGTCAGAG 3' e 5' GGGTGTCATCGTTTGC 3' (Gentile et al., 2006).

3.4 - Isolamento de RNA total

Cerca de 35 a 40 cortes de 5 μ m, obtidos em criostato Leica Jung CM1510 (Leica Biosystems, Nussloch, Alemanha), a partir do fragmento das lesões cutâneas leishmanióticas criopreservadas, foram coletados em tubo de polipropileno de 1,5ml (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) e preservados com 500 μ l de Trizol® (Life Technologies). De acordo com as instruções do fabricante, o tecido foi homogeneizado em vortex por alguns segundos antes de se adicionar 200 μ l de clorofórmio (EDM Millipore Corporation, Bilerica, MA, USA).

Todas as amostras conservadas em Trizol® (Life Technologies) foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000rpm e sua fase aquosa foi então transferida para um novo tubo e misturada a 500 μ l de isopropanol (EDM Millipore). Após 10 minutos seguiu-se uma nova centrifugação a 12.000rpm, com precipitação do RNA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado cuidadosamente com etanol (Merck, Darmstadt, Alemanha) 70% gelado. O sedimento final foi diluído em água deionizada (Promega Corporation, Madison, WI, USA) para o posterior tratamento com a DNase.

3.5 - Tratamento com DNase e Síntese de cDNA

Este tratamento visou eliminar qualquer molécula de DNA que pudesse contaminar as amostras. Em uma primeira etapa, todas as amostras foram submetidas à quantificação de RNA total por espectrometria (Nanodrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

De acordo com as recomendações do fabricante, foi utilizada 1 unidade de RQ1 DNase livre de RNase para cada micrograma de RNA. Resumidamente, foi acrescentado a cada 8 μ l da amostra de RNA 1 μ l de tampão RQ1 de DNase livre de RNase (10x), 1U/ μ g de RNA de RQ1 DNase livre de RNase (Promega Corporation). A digestão foi realizada em banho seco a temperatura de 37 °C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado em cada amostra 1 μ l de RQ1 DNase Stop Solution (Promega Corporation) a 65 °C por 10 minutos.

A síntese de cDNA foi conduzida utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). O cDNA de todas as amostras utilizadas foi mantido em freezer -20 °C até o momento do uso.

3.6 – Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada utilizando-se pares de iniciadores específicos (Exxtend Biotecnologia, Campinas, São Paulo, Brasil) para sequências codificantes de GP63 de *Leishmania braziliensis* (número de acesso GenBank: AJ851017.1). Estes oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio da ferramenta Primer Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). As sequências do conjunto de iniciadores usados foram: 5' GGATCGCCTGCTTTAATGG 3' e 5' CTCAAGGTGGCCAGGTCAAT 3'.

As amplificações foram conduzidas em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). As temperaturas usadas foram: desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos, e extensão final a 72 °C por 5 minutos. A visualização do produto amplificado com 218 pb foi realizada após eletroforese em gel de poliacrilamida 10,5% (Sigma- Aldrich) e coloração com nitrato de prata (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK).

Como controle negativo foi utilizada amostra de material de cicatriz proveniente do LIPMED.

3.7 – Imunohistoquímica

Os ensaios de imunohistoquímica foram realizados (de acordo com o protocolo da Sociedade Americana de Histoquímica), em cortes parafinados de biopsia dos pacientes com o intuito de detectar antígenos de *Leishmania* no infiltrado inflamatório das lesões de LTA. Para esta finalidade, foram utilizadas amostras de casos de pacientes com BR (n=5), MR (n=6), LM (n=4) e um caso controle de outra dermatopatia.

Para identificação de fatores de virulência em lesões ativas de LTA optou-se pelo ensaio de imunoperoxidase com o uso dos anticorpos monoclonais de camundongo anti-proteína principal de superfície/GP63 (clone 96-126) e anti-LPG (clone CA7AE) de *Leishmania* (Abcam, Cambridge, UK).

Cortes parafinados de 4µm de espessura foram colocados em lâminas filmadas com silano 4% ([4-[1,2-bis(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1,2-phenylene]bis(oxy)]bis (Sigma- Aldrich). Após 2 banhos sucessivos em xileno (Alkimia, Campinas, SP,

Brasil), com duração de 2 minutos cada, os cortes foram incubados em etanol absoluto (Alkimia) em dois ciclos de 2 minutos cada e, em etanol a 95% e 80%, por dois minutos cada. A seguir foram hidratados em água deionizada e a recuperação antigênica foi conduzida mantendo os cortes em tampão citrato pH 6,0 constituído de ácido cítrico 10mM e detergente Tween 20 a 0,05% (ambos Sigma-Aldrich) por 30 minutos a 95°C.

Após a etapa de recuperação antigênica, os cortes foram lavados em PBS + Tween 20 a 0,05% por 3 vezes durante 2 minutos cada. Em seguida, foram realizados os bloqueios de interações inespecíficas incubando-se as amostras em solução de H₂O₂ 0,3% (Proquimios, Rio de Janeiro, Brasil) e em albumina de soro bovino 2% (Sigma- Aldrich), durante 10 e 30 minutos, respectivamente. As incubações com os anticorpos primários anti- LPG na concentração de 1:200 e anti-GP63 na concentração de 1:300 foram realizadas por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. As concentrações ótimas de cada um dos anticorpos primários foram definidas em ensaios de padronização piloto utilizando-se três amostras de lesão cutânea de LTA. As incubações com o anticorpo secundário biotilado anti IgG de camundongo diluído a 1:100 foram realizadas por 30 minutos, seguidas por incubação com estreptoavidina peroxidase na concentração de 1:100 (GE Healthcare), por 30 minutos. A revelação com o 3'3 diaminobenzidina/DAB (Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA) por 10 minutos foi seguida da contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) por 2 minutos. As lâminas foram submetidas a desidratação em álcool (Alkimia), clarificadas em xileno (Alkimia) e montadas com lamínula em meio Entellan (Sigma-Aldrich) para análise em microscópio de luz Nikon Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão).

3.8 - Análise da Imunomarcação

Para a análise dos resultados de imunohistoquímica foram quantificados focos ou células isoladas expressando o marcador específico estudado. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio de luz NiKon Eclipse E600 (Nikon) por dois observadores independentes. A área de cada amostra foi medida por meio de papel milimetrado e os resultados foram expressos como número de células positivas/mm² de tecido (protocolo segundo a Sociedade Americana de Histoquímica).

3.9 - Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da FIOCRUZ, protocolo 0033.0.011.346-11.

3.10 - Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizando o programa Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Para verificação de diferença entre os grupos foram aplicados o teste de Mann-Whitney, o teste de Fisher e a análise de variância Kruskal-Wallis. Para análise de diferenças amostrais de mulheres e de homens, utilizou-se o Teste Binomial, considerando que a proporção de sexos na população é de aproximadamente 1:1. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4 – Resultados

Oitenta e dois pacientes com diagnóstico confirmado de LTA foram incluídos neste estudo e classificados de acordo com os critérios clínicos descritos na metodologia. A casuística foi dividida em casos de LCL (62/82; 75,6%) e LM (20/82; 24,4%). Os pacientes com lesão cutânea ainda foram divididos de acordo com a resposta ao tratamento LCL-BR (27/62; 43,5%) e LCL-MR (35/62; 56,5%).

Distribuição dos Pacientes de acordo com Sexo, Raça e Faixa Etária

A maioria era do sexo masculino (55/82; 67%), sendo esta diferença considerada estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Em relação à raça, a distribuição dos pacientes mostrou prevalência maior de brancos (31/82; 37,8%) e pardos (27/82; 32,9%), seguida de negros (16/82; 19,5%). Para um pequeno número de pacientes (8/82; 9,8%) não havia descrição de raça no prontuário. Estes dados estão apresentados na figura 07.

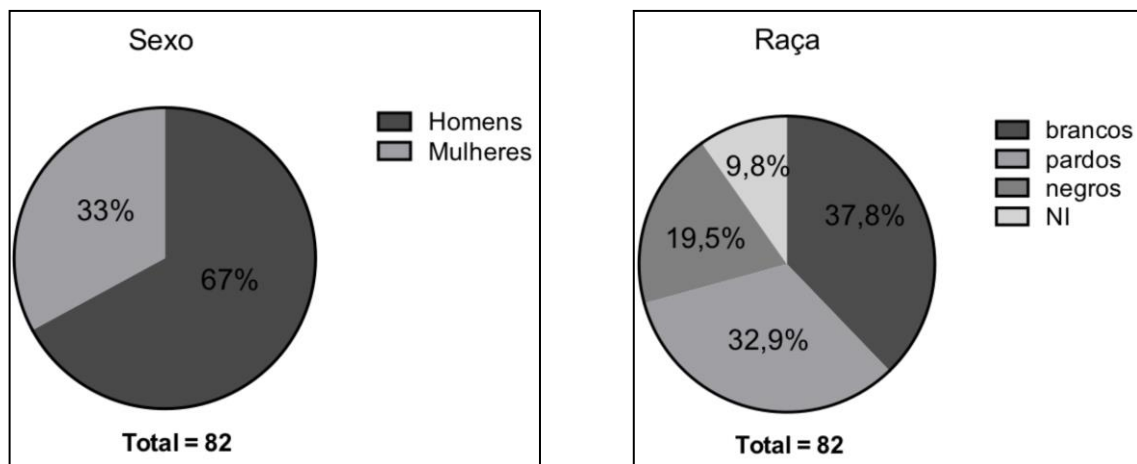


Figura 07. Distribuição dos pacientes diagnosticados com LTA (LCL + LM) quanto ao sexo e à raça.

A figura 08 mostra que a média de idade dos pacientes com a forma mucosa era significativamente maior ($p < 0,001$), quando relacionados aos pacientes com lesão cutânea (média \pm erro padrão de $55,4 \pm 3,9$ anos e $37,9 \pm 2,5$ anos, respectivamente). Quando avaliados em relação à resposta terapêutica, os grupos de LCL foram semelhantes.

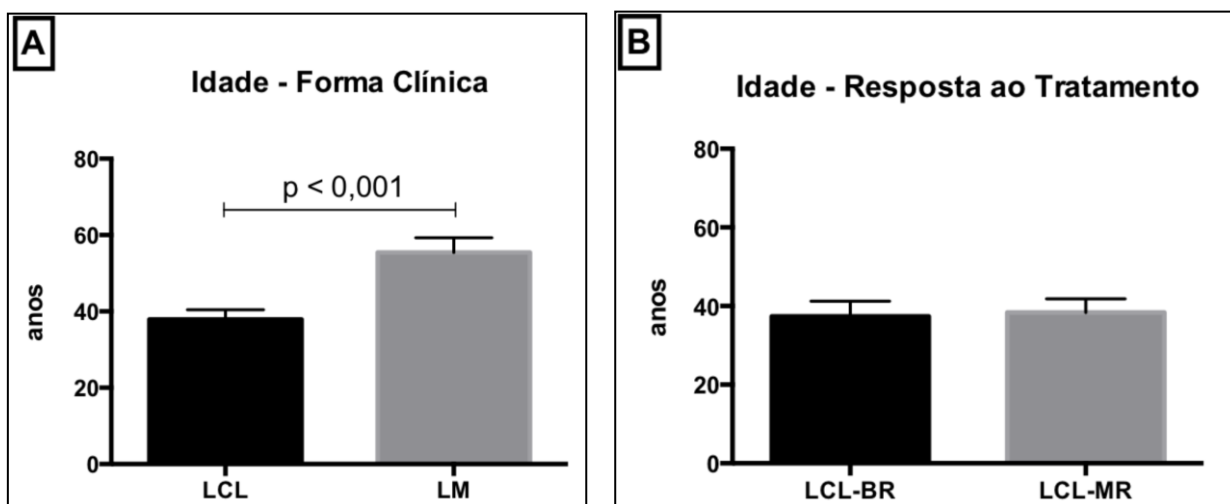


Figura 08: Distribuição dos pacientes diagnosticados com LTA classificados de acordo com a forma clínica (A) e resposta ao tratamento (B) quanto à idade. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Distribuição dos Pacientes de Acordo com Tempo de Evolução e IDRM

Em relação ao tempo de evolução da doença, os pacientes com LM exibiam maior cronicidade (média \pm erro padrão de $73,3 \pm 17,7$ meses) quando comparados com os casos de LCL (média \pm erro padrão de $5,5 \pm 1,7$ meses). A diferença observada entre estes dois grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Figura 09).

A análise deste parâmetro não mostrou diferença significativa nos pacientes com LCL agrupados de acordo com a resposta ao tratamento ($p = 0,3$). Dado semelhante foi verificado neste grupo em relação ao número ($p = 0,3$) e localização das lesões ($p = 0,5$).

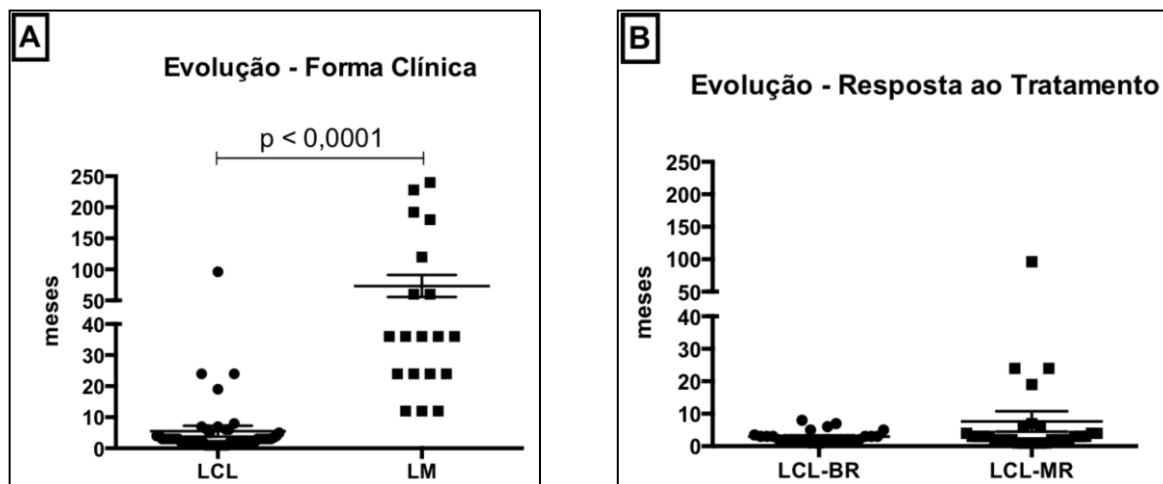


Figura 09: Distribuição dos pacientes diagnosticados com LTA classificados de acordo com a forma clínica (A) e resposta ao tratamento (B) quanto ao tempo de evolução. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney.

A análise da IDRM mostrou que a maioria dos casos estudados apresentavam reatividade positiva (70/82; 85%), variando de 6 a 80 mm de diâmetro, quando utilizado o “cut-off” de 5mm para separar os casos negativos e positivos. Uma pequena parte dos pacientes não tinha registro do resultado da IDRM (09/82; 10,9%) ou tiveram resposta negativa ao teste (03/82; 3,6%). Os pacientes com LM apresentaram maior diâmetro de induração (média \pm erro padrão de $42,6 \pm 5,7$ mm), quando comparados com os pacientes com LCL (média \pm erro padrão de $22,5 \pm 1,7$ mm). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$). Entretanto, entre os casos cutâneos de BR (média \pm erro padrão de $26,5 \pm 2,3$ mm) e de MR (média \pm erro padrão de $20,8 \pm 2,1$ mm), a reatividade à IDRM foi similar ($p=0,07$). Todos estes dados estão representados na figura 10.

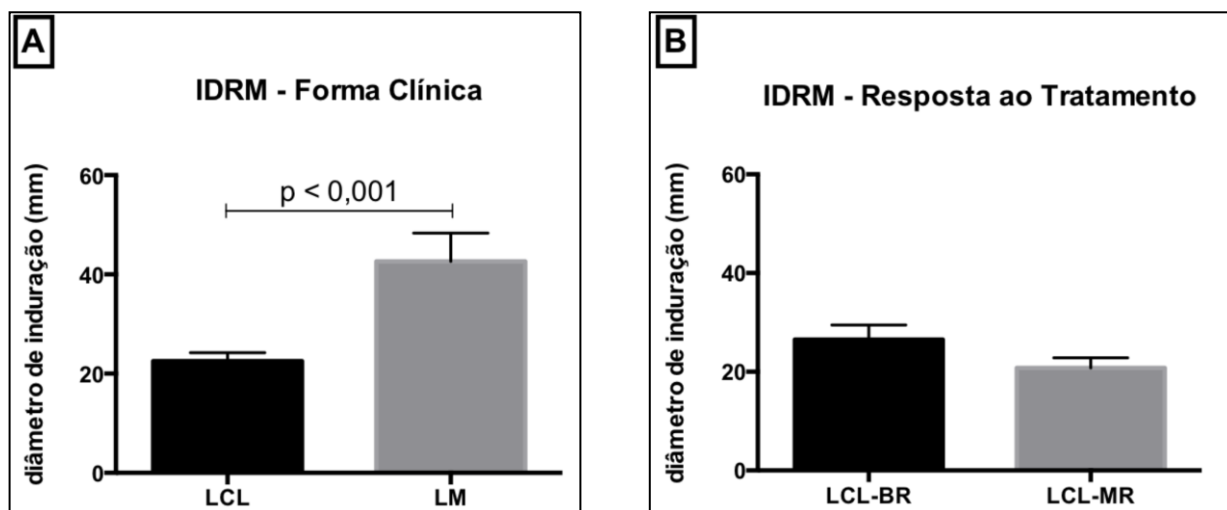


Figura 10: Gráficos em barra mostram o resultado da IDRM em pacientes com diagnóstico confirmado de LTA, classificados de acordo com a forma clínica (A) e resposta ao tratamento (B). Os resultados estão expressos em diâmetro de induração (mm). A significância estatística foi estimada pelo uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney.

Análise da carga parasitária por qPCR evidenciou um maior parasitismo em lesões de pacientes com evolução favorável após o tratamento.

A quantificação absoluta da carga parasitária foi avaliada utilizando-se técnica de qPCR em sistema SYBR Green®, a partir de amostras de DNA extraído de fragmentos de lesões de pacientes com LTA. As amostras foram classificadas de acordo com a forma clínica em LCL (n=53) e LM (n=19). No grupo cutâneo, as amostras foram classificadas de acordo com a resposta ao tratamento em BR (n=22) e MR (n=31).

A presença de DNA de *Leishmania* foi detectada na maioria absoluta dos pacientes com LCL (32/38; 84,2%) e com LM (17/19; 89,5%), não havendo diferença estatística entre os dois grupos (p=0,46). Quando comparado com os casos de BR, a proporção de amostras positivas no grupo de pacientes com MR era significativamente menor (p<0,01). Dados representados na figura 11.

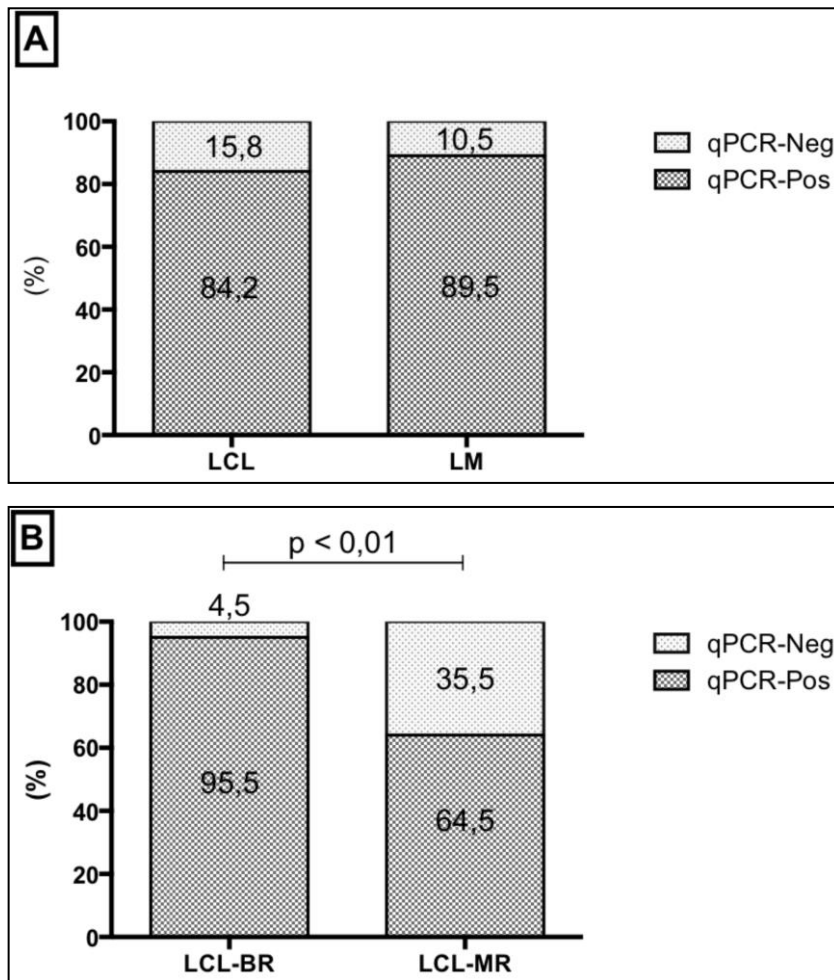


Figura 11: Os gráficos em barra mostram o percentual de detecção de DNA de *Leishmania* tissular por qPCR em sistema SYBR Green®. Amostras de fragmento de lesão foram classificadas de acordo com a forma clínica (A) e a resposta ao tratamento (B). Para amplificação do DNA dos parasitos foram utilizados oligonucleotídeos para SSR. Oligonucleotídeos para β -actina humana foram usados como normalizador da reação. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste exato de Fisher.

O parasitismo tissular dos casos de LCL (média \pm erro padrão de 260843 ± 85163) era significativamente maior ($p < 0,05$), quando comparado ao dos casos de LM (média \pm erro padrão de 67327 ± 56695). Além disso, a carga parasitária tissular era significativamente mais elevada ($p < 0,01$) nos casos de BR (média \pm erro padrão de 275759 ± 120369) do que nas lesões de pacientes com MR (média \pm erro padrão de 144823 ± 67250). Estes dados estão representados na figura 12.

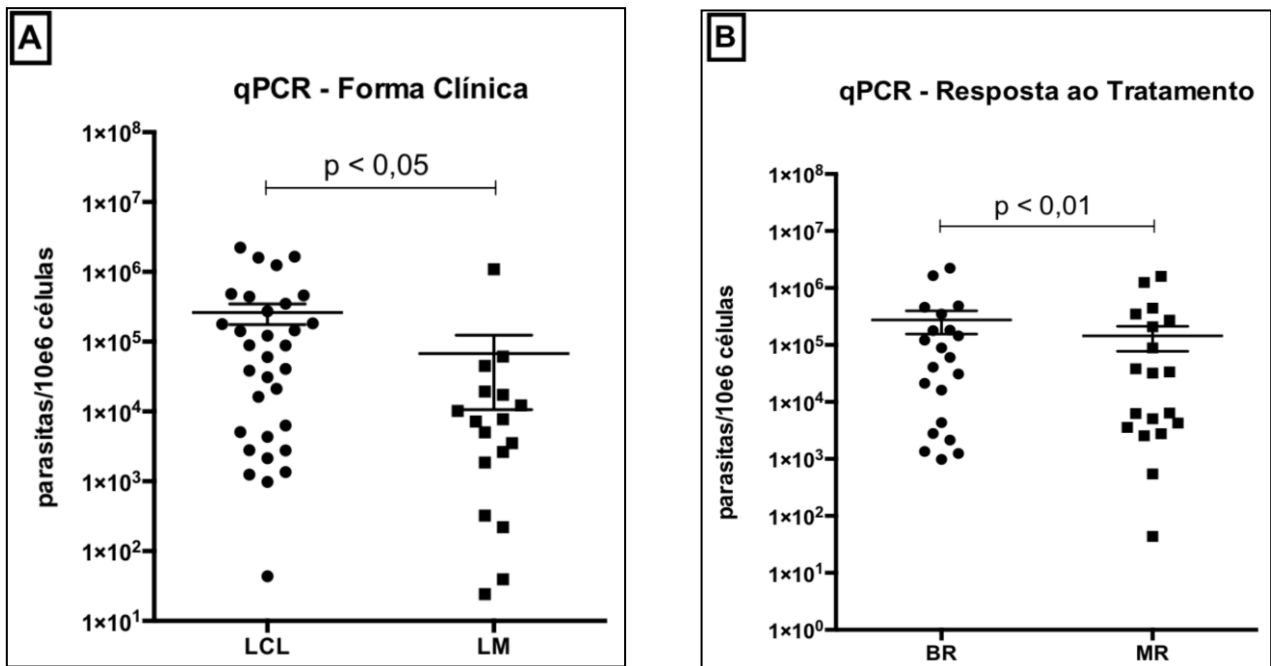


Figura 12: Quantificação da carga parasitária tissular por qPCR utilizando o sistema SYBR Green®. Amostras de fragmento de lesão foram classificadas de acordo com a forma clínica (A) e a resposta ao tratamento (B). Para amplificação do DNA dos parasitos foram utilizados oligonucleotídeos para SSR. Oligonucleotídeos para β -actina humana foram usados como normalizador da reação. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste não-paramétrico Mann-Whitney.

A qPCR (alvo o SSR) mostrou-se mais eficaz na identificação do parasito nas lesões do que a PCR (alvo kDNA).

O diagnóstico parasitológico positivo foi detectado na maioria dos casos de LCL (59/62; 95%) e de LM (13/20; 65%). Dentre os métodos utilizados, a PCR demonstrou ser a ferramenta com maior eficácia na detecção dos parasitos teciduais, não havendo diferença na positividade entre os grupos de LCL e de LM ($p=0,08$). No entanto, em uma análise isolada dos casos de LM, a PCR foi ainda mais relevante uma vez que em apenas um dos casos (1/13; 7,7%) houve positividade por pelo menos um dos métodos convencionais (imprint, histopatológico e cultura), enquanto pela PCR a detecção ocorreu na quase totalidade dos casos (12/13; 92,3%). Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p<0,01$) e os dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Distribuição dos pacientes com LTA (LCL-BR, LCL-MR e LM) de acordo com a positividade da PCR e dos métodos convencionais de diagnóstico parasitológico de LTA.

Diagnóstico Parasitológico	LCL		LM
	BR N (%)	MR N (%)	
Somente PCR ⁺	8 (34,8)	17 (47,2)	12 (92,3)*
PCR ⁺ e Convencional ⁺	6 (26,1)	11 (30,6)	1 (7,7)
Somente Convencional ⁺	9 (39,1)	08 (22,2)	0 (0)
Total	23 (100)	36 (100)	13 (100)

+ resultado positivo; * $p < 0,01$ quando comparada a positividade entre PCR (kDNA) e métodos convencionais nos casos de LM. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste de Fisher.

Além da quantificação da carga parasitária, a *qPCR* que utilizou o alvo SSR mostrou-se uma excelente ferramenta para o diagnóstico molecular de LTA.

Em relação à resposta ao tratamento foi observada uma maior positividade de *qPCR* nos casos cutâneos de BR, quando comparada com a PCR ($p < 0,001$). No entanto, não houve variação na positividade entre os dois métodos quando utilizadas amostras de pacientes com MR ($p = 0,32$). Todos estes dados estão descritos nas tabelas 02 e 03.

Tabela 02: Positividade de PCR e *qPCR* em pacientes com LTA, de acordo com a forma clínica

Diagnóstico Molecular	LCL (%)	LM (%)
PCR ⁺ (kDNA)	42/64 (65,6)	13/21 (61,9)
<i>qPCR</i> em tempo real ⁺ (SSR)	42/53 (79,2)*	17/19 (89,5)**

+ resultado positivo; $p < 0,05$ quando comparada a positividade entre PCR (kDNA) e *qPCR* (SSR) nos casos de LCL* e LM**. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste de Fisher.

Tabela 03: Positividade de PCR e qPCR em pacientes com LCL, de acordo com a resposta ao tratamento

	LCL-BR (%)	LCL-MR (%)
Diagnóstico Molecular		
PCR ⁺ (kDNA)	14/27 (51,8)	28/37 (75,7)
qPCR em tempo real ⁺ (SSR)	21/22 (95,5) ^{***}	21/31 (67,7)

+ resultado positivo; $p < 0,001$ quando comparada a positividade entre PCR (kDNA) e qPCR (SSR) nos casos de LCL-BR^{***}. A significância estatística foi estimada pelo uso do teste de Fisher.

A frequência de expressão gênica de GP63 nas lesões varia de acordo com a resposta ao tratamento.

A análise da expressão gênica de GP63 foi conduzida por meio de ensaio de RT-PCR, utilizando-se amostras de cDNA de lesões ativas de pacientes com LTA. Foram estudados um total de 18 pacientes, sendo sete casos de BR, oito de MR e três pacientes com LM. Em ensaios piloto utilizando amostras de cDNA de formas promastigotas ou amastigotas axênicas de *Leishmania (V.) braziliensis* (cepa MHOM/BR/1975/M2903), foi evidenciada a presença de banda de 218pb correspondente ao tamanho esperado utilizando-se as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores pelo programa do NCBI Primer Blast. Estas amostras foram utilizadas em ensaios posteriores como controle positivo da amplificação. Como controle negativo das amostras, foi incluído um caso de outra dermatopatia.

A expressão de GP63 foi observada nos grupos de LCL (09/15; 60%) e de LM (06/06; 100%). A análise desses casos mostrou que as amostras de mucosa apresentavam uma frequência relativamente maior na expressão quando comparados com as amostras cutâneas ($p=0,09$). Além disso, foi observado que a frequência de expressão gênica de GP63 era significativamente mais elevada ($p < 0,0001$) no grupo cutâneo de MR (06/08; 75%), em relação ao de BR (03/07; 42,8%). Estes resultados estão apresentados nas figuras 13 e 14.

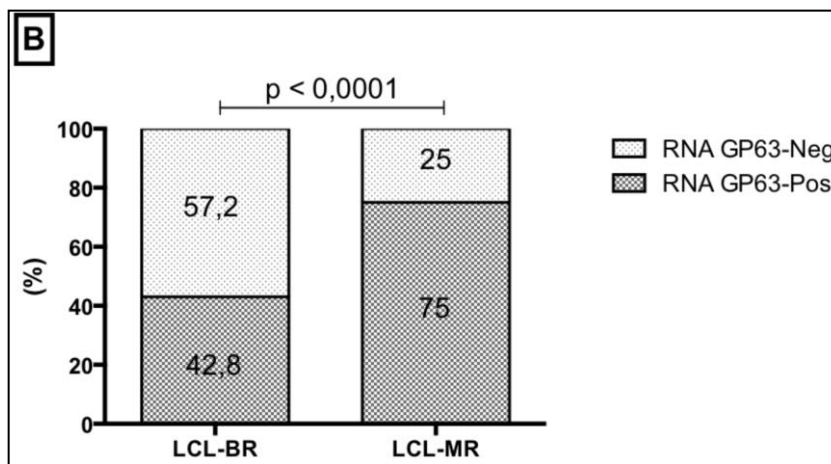
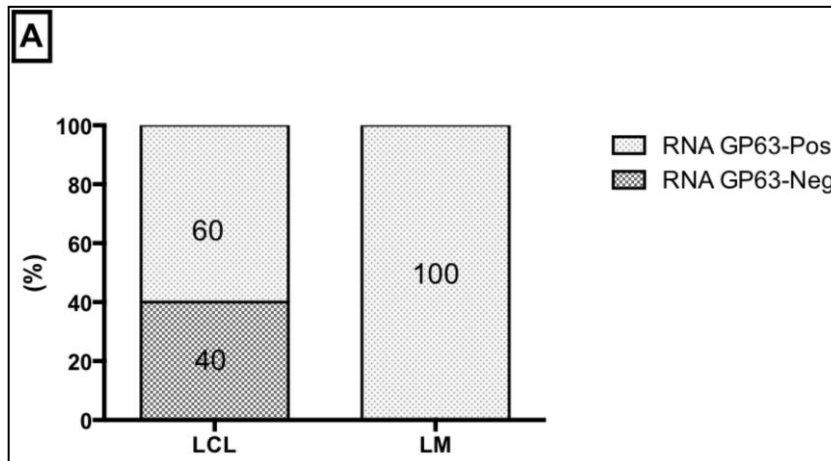


Figura 13: Os gráficos em barra mostram a diferença na frequência de expressão gênica de GP63 em pacientes com LTA. Amostras de fragmento de lesão foram classificadas de acordo com a forma clínica (A) e a resposta ao tratamento (B). A significância estatística foi estimada pelo uso do teste exato de Fisher.

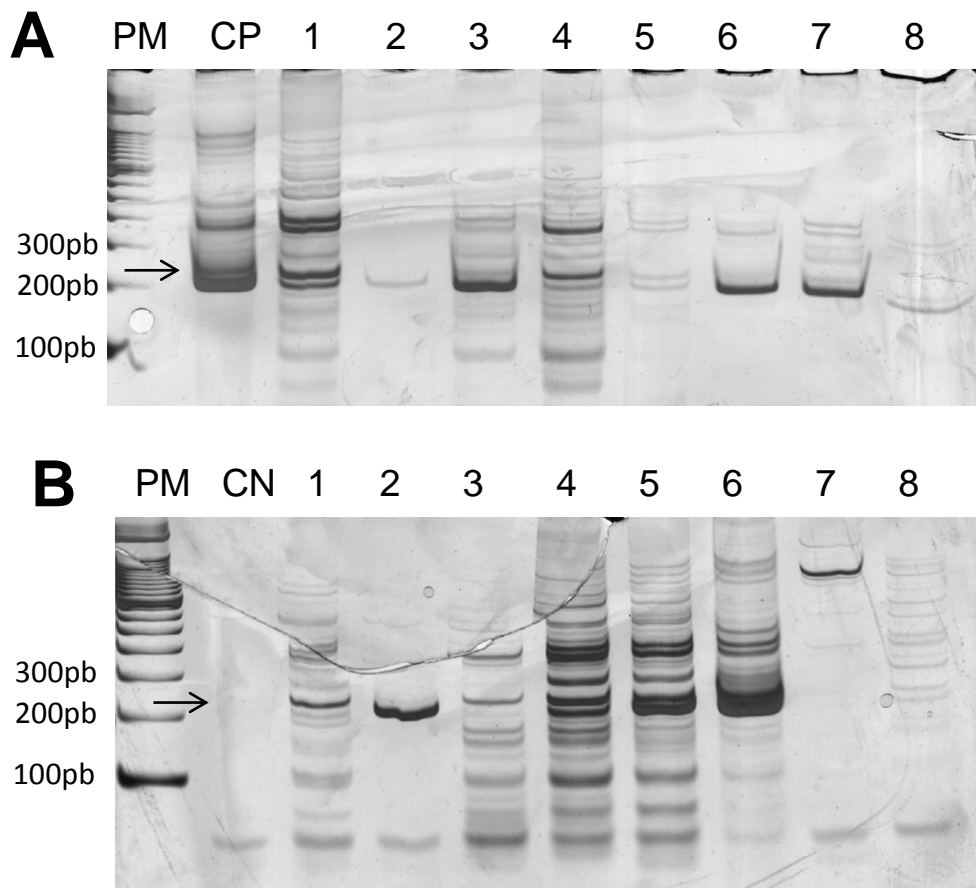


Figura 14: Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata mostrando as bandas correspondentes a GP63 em lesões de LTA. Em (A) linhas 1-4 lesões de pacientes de MR e linhas 5-8 lesões de pacientes de BR cutâneas. Em (B) linhas 1-6: lesões mucosas; linha 7: amostra de outra dermatopatia; CN: amostra sem cDNA; linha 8: amostra de cicatriz de LTA. PM de 100pb. Setas indicam fragmentos com tamanho de 218pb.

A produção *in situ* de GP63 e LPG está associada à má resposta ao tratamento

A produção *in situ* de GP63 e LPG foi determinada utilizando-se imunohistoquímica em cortes de lesão ativa processadas em parafina. Para estes ensaios, foram utilizados casos de LCL (n=12) e casos de LM (n=5). Os casos cutâneos foram classificados em BR (n=5) e MR (n=6). Além disso, foi utilizado como controle negativo um caso de outra dermatopatia.

Observou-se que as células positivas estavam presentes no infiltrado inflamatório de todas as amostras de LTA testadas. Nenhum tipo de imunomarcacão foi detectada na amostra de controle negativo (outra dermatopatia). O padrão mais frequente era constituído de marcação perinuclear. Em alguns casos observou-se

marcação em todo o citoplasma. As imagens representativas da imunolocalização dos fatores de virulência GP63 e LPG nas lesões estão mostradas nas figuras 15 e 16, respectivamente.

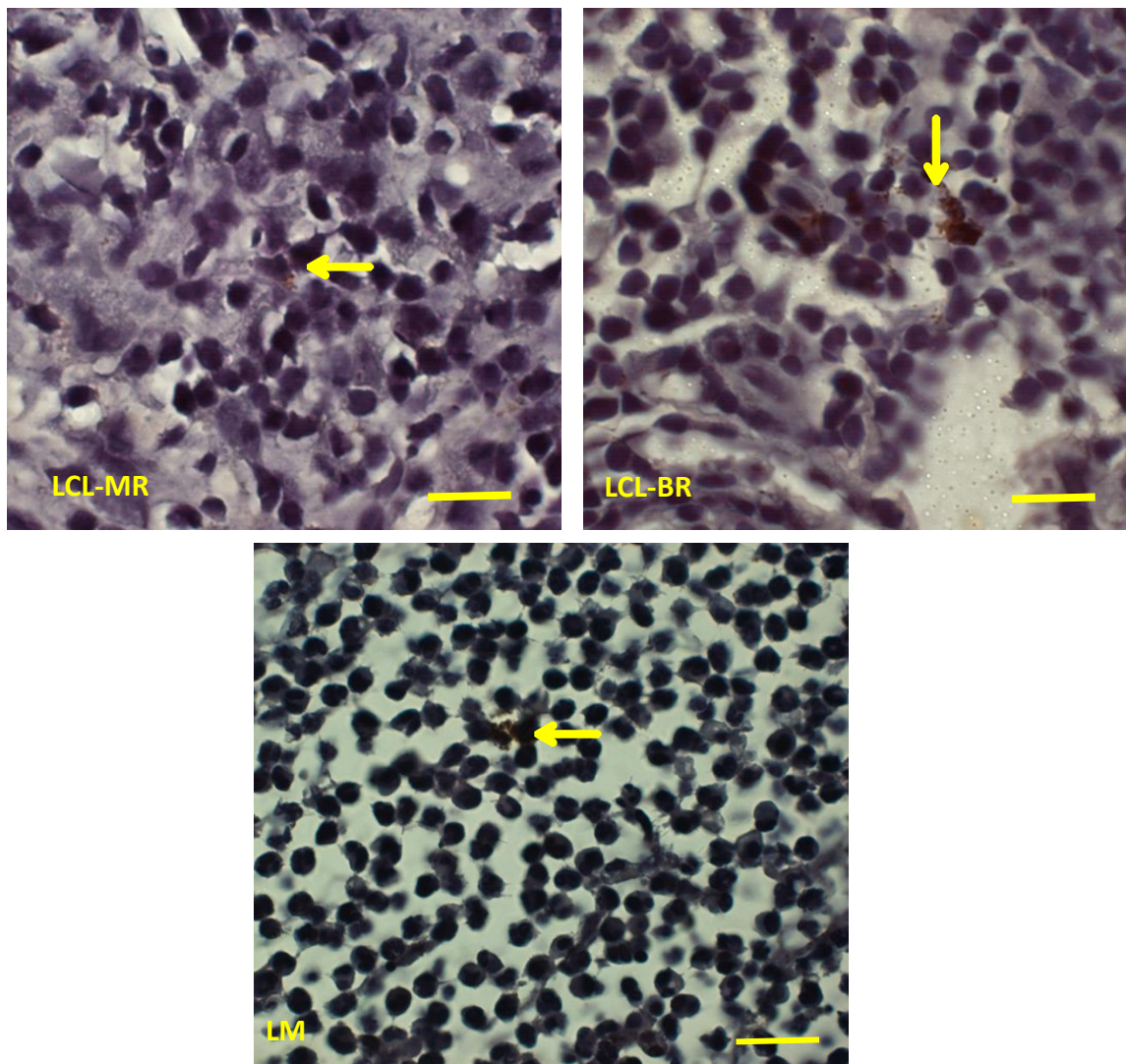


Figura 15: Imunolocalização de GP63 em lesões cutâneas e mucosas de LTA. Imagens representativas de cortes parafinados incubados com anticorpo monoclonal anti-GP63, evidenciando a marcação em amastigotas no infiltrado inflamatório (setas). Os pacientes foram classificados de acordo com a forma clínica (LCL e LM) e com a resposta ao tratamento (LCL-BR e LCL-MR). Microscópio de luz, aumento 100x. As barras representam 0,32 μ m.

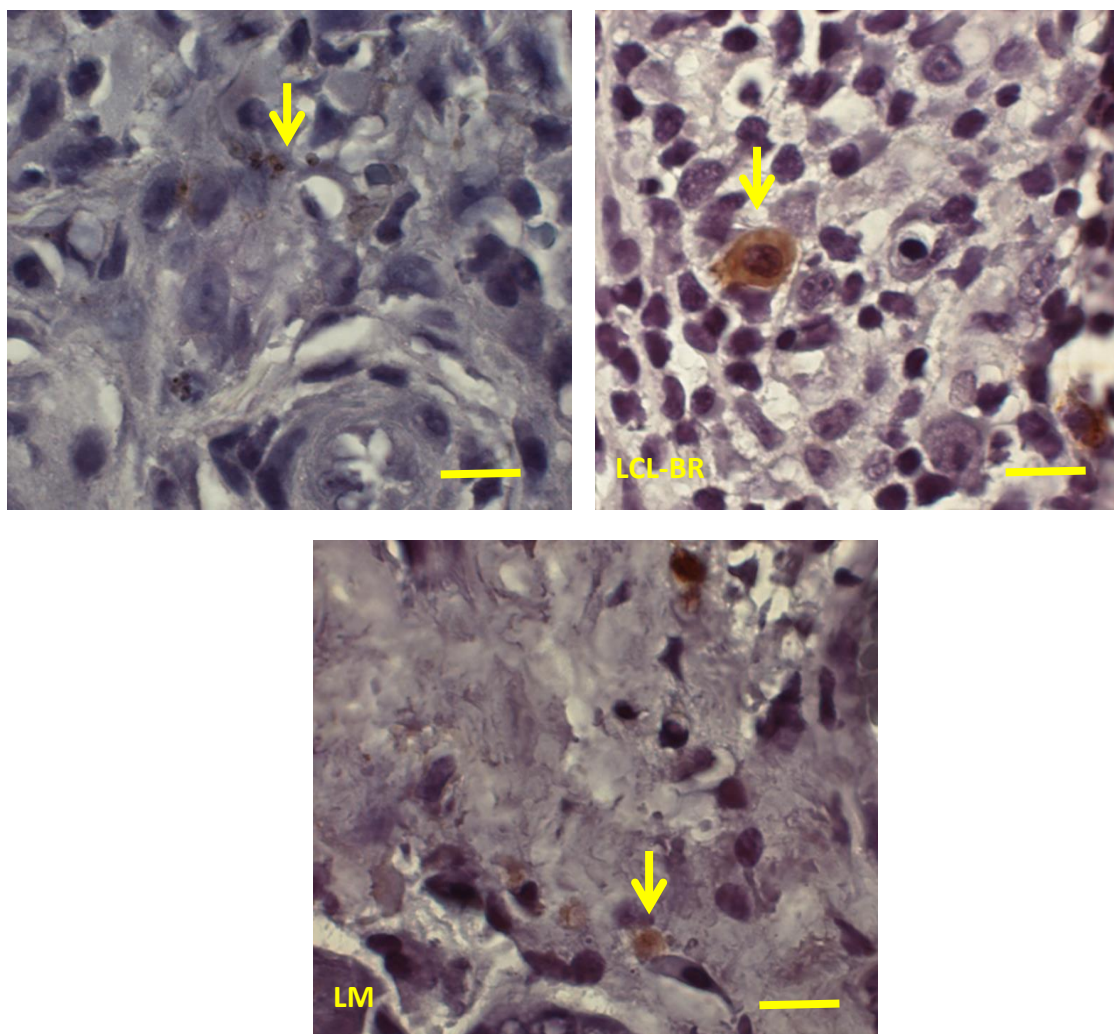


Figura 16: Imunolocalização de LPG em lesões cutâneas e mucosas de LTA. Imagens representativas de cortes parafinados incubados com anticorpo monoclonal anti-LPG, evidenciando a marcação em amastigotas no infiltrado inflamatório (setas). Os pacientes foram classificados de acordo com a forma clínica (LCL e LM) e com a resposta ao tratamento (LCL-BR e LCL-MR). Microscópio de luz, aumento 100x. As barras representam 0,32 μ m.

Em relação à forma clínica não houve diferença estatisticamente significativa. Quanto aos casos cutâneos, a análise feita de acordo com a resposta ao tratamento mostrou que pacientes de MR apresentaram um número significativamente maior de células expressando GP63 no infiltrado inflamatório (média \pm erro padrão de 1,69 \pm 0,62), quando comparados aos casos de BR (média \pm erro padrão de 0,20 \pm 0,10) ($p < 0,01$). Estes dados estão representados na figura 17.

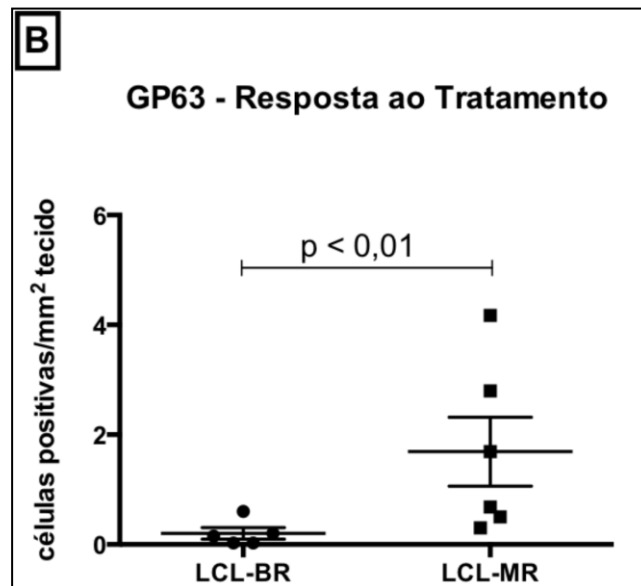
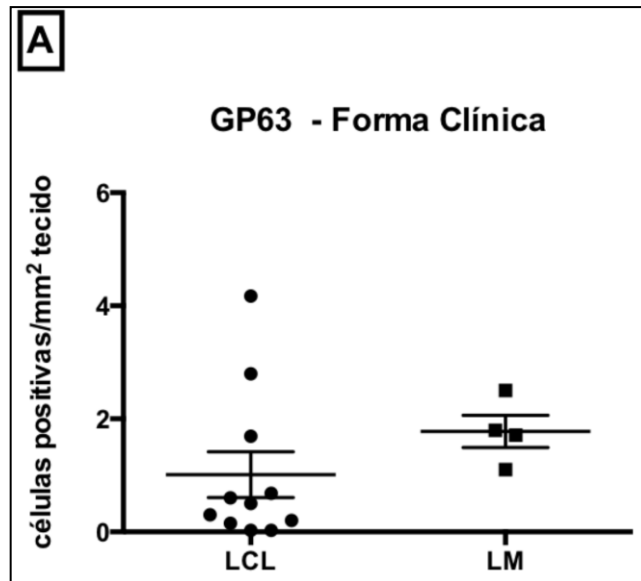


Figura 17: Imunolocalização de GP63 em lesões cutâneas e mucosas de LTA. Cortes parafinados foram submetidos a ensaios de imunoperoxidase com o uso de anticorpo monoclonal anti-GP63. Os pacientes foram classificados de acordo com a forma clínica (A) e com a resposta ao tratamento (B). Os valores estão expressos em número de células positivas/mm² de tecido. As barras representam a média ± erro padrão.

A frequência de células apresentando imunomarcagem para LPG no infiltrado inflamatório era semelhante ($p=0,5$) entre os pacientes com LCL (média ± erro padrão de $0,71 \pm 0,17$) e LM (média ± erro padrão de $1,02 \pm 0,47$). Em relação à resposta ao tratamento, foi verificado que a frequência de células positivas para este fator era significativamente maior ($p=0,01$) no grupo de MR (média ± erro padrão de

0,96 ± 0,24), quando comparado ao grupo de BR (média ± erro padrão de 0,36 ± 0,14). Estes dados estão demonstrados na figura 18.

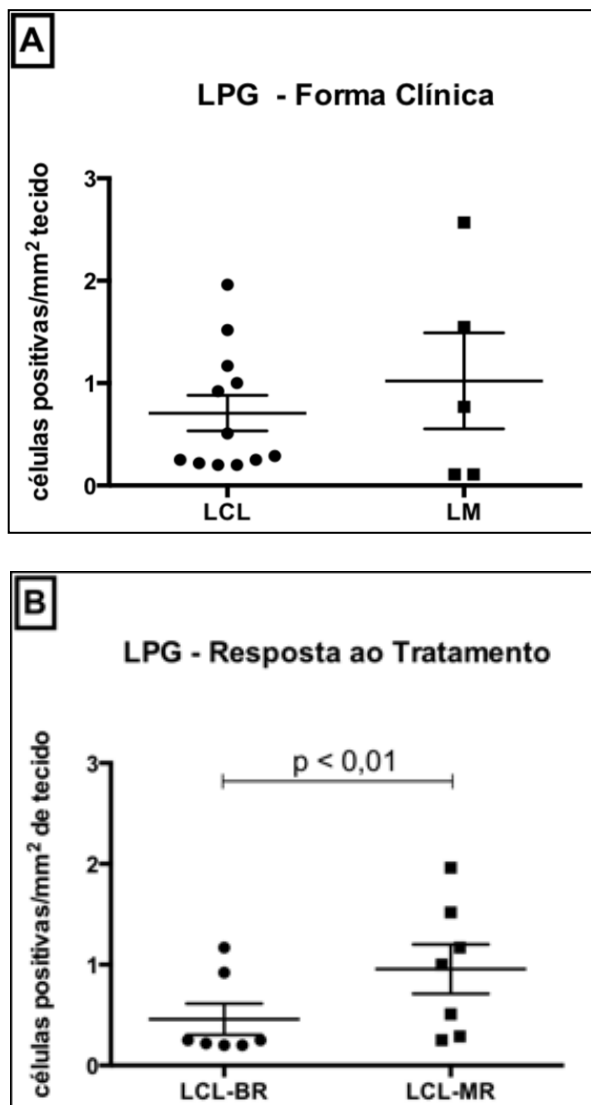


Figura 18: Imunolocalização de LPG em lesões cutâneas e mucosas de LTA. Cortes parafinados foram submetidos a ensaios de imunoperoxidase com o uso de anticorpo monoclonal anti-LPG. Os pacientes foram classificados de acordo com a forma clínica (A) e com a resposta ao tratamento (B). Os valores estão expressos em número de células positivas/mm² de tecido. As barras representam a média ± erro padrão.

5 – Discussão

Este estudo teve como foco principal a quantificação da carga parasitária e a detecção dos fatores de virulência GP63 e LPG em lesões cutâneas e mucosas causadas por *L. (V.) braziliensis*. Todos os resultados foram analisados de acordo com a forma clínica e a resposta ao tratamento, na tentativa de se estabelecer uma possível correlação com a evolução da LTA.

Nossa casuística foi classificada tendo por base características clínicas e evolutivas já descritas da LTA que ocorre nas áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis* do sudeste do Brasil, particularmente no Rio de Janeiro (Oliveira-Neto, 2000; Vieira-Gonçalves, 2008). O perfil clínico mais frequente foi o de LCL, onde os pacientes apresentavam uma lesão ulcerada, com evolução de 3 meses e que respondeu bem ao tratamento com antimoniato de meglumina. Embora já tenha sido relatado que lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* tendem à cura espontânea em um período variando entre seis a 15 meses de evolução (Costa et al., 1987; Reithinger et al., 2007), todos os pacientes receberam tratamento específico pois o risco do surgimento de comprometimento mucoso após a cura clínica das lesões cutâneas primárias é maior naqueles pacientes não submetidos ao tratamento (Monge-Maillo & López-Vélez, 2013).

Embora em uma casuística representativa do estado do Rio de Janeiro (Oliveira-Neto et al., 2000) não tenha sido observada diferença na distribuição dos pacientes de LTA de acordo com o sexo, a nossa casuística evidenciou que a maior parte dos pacientes pertencia ao sexo masculino, como já relatado na literatura, que descreve a LTA como uma doença predominante em homens (Martins et al., 2014; Ministério da Saúde, 2007; Murback et al., 2011). De fato, os nossos resultados foram gerados utilizando-se casos não só de áreas endêmicas do Rio de Janeiro como também de pacientes provenientes de outras regiões do sudeste do país.

A doença foi observada em quase todas as faixas etárias, entretanto os casos de LCL e de LM estavam em sua maioria incluídos nas faixas etárias da quarta e quinta décadas, respectivamente. Além disso, foi verificado que pacientes com LM apresentavam faixa etária mais alta do que os pacientes com LCL. Particularmente nos casos com comprometimento mucoso o tempo de evolução da doença era maior do que nos casos cutâneos. Estes dados se alinham com o que está descrito na literatura (Ministério da Saúde, 2007; Oliveira-Neto et al., 2000). O mesmo

comportamento foi observado em relação à IDR, que apresentou uma maior reatividade nos casos de LM, quando comparada aos casos de LCL. No presente estudo, a maior parte dos pacientes tinha diâmetro de induração maior que 5mm, significando um resultado positivo na IDR. A IDR é uma avaliação da resposta imune (hipersensibilidade celular tardia do paciente) e, por este motivo, espera-se que esteja aumentada nos casos de lesões mucosas. Estes pacientes desenvolvem uma resposta imune específica de célula T frente aos antígenos do parasito (Silveira et al., 2009). Nenhuma diferença foi observada em relação à resposta ao tratamento. Dados semelhantes foram descritos por Sadeghian et al. (2006), onde se observou em uma casuística de 198 pacientes com LCL não haver relação significativa entre a IDR e a evolução da doença. Entretanto, em outro estudo em área de *L.(V.) braziliensis* foi mostrada uma clara associação entre maior reatividade à IDR e menor risco de falha terapêutica em casos de LCL (Antonio et al., 2014). O que se pode concluir sobre esse conjunto de resultados é que a correlação do resultado da IDR com outros parâmetros clínicos na LTA, incluindo a resposta ao tratamento, ainda precisa ser melhor esclarecida, uma vez que não existe uma padronização do teste em relação à composição antigênica. Há estudos que utilizam extrato de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* da cepa IFLA/BR/67/PH8 (Mayrink et al., 1978; Costa et al., 1996) e enquanto outros utilizam a cepa MHOM/BR/86/BA (Romero et al., 2001). Também existem variações, por exemplo, na profundidade de aplicação do antígeno na pele e no tempo de leitura do resultado, que pode variar de 48 a 72h. Consequentemente, esta falta de padronização do teste leva a discordâncias no seu resultado.

Muitos estudos sobre os aspectos epidemiológicos e imunológicos da infecção por *Leishmania* em humanos, especialmente aqueles que envolvem espécies dermatrópicas, optam por analisar os resultados agrupando os pacientes de acordo com a forma clínica ou com o tempo de evolução das lesões. O tempo de evolução representa um parâmetro de difícil definição pois envolve uma imprecisão da informação quando indagada ao paciente na primeira consulta. Além disso, nas formas cutâneas não existe um consenso para classificar as lesões como recentes ou tardias. Por exemplo, existem autores que definem como lesões recentes aquelas com até dois meses de evolução (Freitas-Teixeira et al., 2012) e outros que utilizam como critério um tempo menor que seis meses (Hoseini et al., 2014). Por este motivo, neste trabalho os casos de LCL foram avaliados, a partir da categorização dos pacientes em grupos de BR e MR ao tratamento com antimonial de meglumina. A

resposta ao tratamento é um parâmetro menos subjetivo que o tempo de evolução da doença e pode ser facilmente acompanhado e documentado pelo médico assistente, permitindo uma maior confiança na inclusão desta informação nos prontuários.

No que se refere ao diagnóstico de leishmanioses, inúmeras publicações já demonstraram que a sensibilidade da PCR convencional é superior à dos métodos baseados na microscopia, como observado no presente estudo (Costa et al., 2002; Pirmez et al., 1999; Strauss-Ayali et al., 2004). Porém os testes de PCR em amostras clínicas apresentam uma sensibilidade variável, dependendo do protocolo de extração do DNA, da escolha dos alvos e das condições de ciclagem, além de não ser apropriado para quantificação da carga parasitária.

Sabe-se que a PCR em tempo real requer um alto investimento inicial, necessitando de aporte contínuo de insumos e a necessidade de treinamento permanente específico dos profissionais envolvidos. Nas áreas endêmicas de leishmanioses tanto na América Latina como em outras regiões, as políticas de saúde até o momento não possibilitam a inclusão desta ferramenta na rotina (Sudarshan et al., 2014). Mesmo assim, o uso desta ferramenta, aliada à análise de alta resolução (HRM) e outras metodologias de bioinformática, poderá contribuir positivamente nas ações de monitoramento e controle da doença porque possibilita não só o diagnóstico e a quantificação da carga parasitária, mas também a determinação de espécies (Ceccarelli et al., 2014; Pita-Pereira et al., 2012).

Os resultados de detecção de DNA de *Leishmania* por qPCR aqui apresentados evidenciaram uma alta frequência de amostras positivas nos grupos de LCL e LM. Em relação à resposta ao tratamento, foi observado que os casos de MR apresentaram uma frequência de positividade significativamente menor do que os casos de BR. Além disso, a qPCR mostrou ser um método de maior acurácia, quando comparado com a PCR convencional. Essa diferença foi ainda mais evidente nos casos de LM. Embora existam alguns dados mostrando a equivalência entre a PCR e a qPCR na detecção de DNA do parasito em amostras de sangue de pacientes com leishmaniose visceral (Pereira et al., 2014), outros estudos que avaliam a sensibilidade da PCR convencional vs qPCR em diferentes amostras clínicas têm trazido resultados muito promissores. Tupperwar et al. (2008), utilizando um modelo experimental de infecção por *L. infantum*, mostraram que a capacidade de detecção de DNA genômico do PCR convencional era de 0,1ng, enquanto que a qPCR apresentava um limite de detecção na ordem de 10 fg. E outra abordagem que tinha como proposta a comparação de testes moleculares entre diferentes

laboratórios, observou que, mesmo com a diversidade de formas clínicas estudadas, a qPCR que usava como alvo kDNA apresentou uma sensibilidade significativamente maior do que a PCR convencional, especialmente nas amostras com baixa concentração de DNA (Cruz et al., 2013).

Como já mencionado, o kDNA exibe uma alta sensibilidade tanto na PCR convencional como nos ensaios de quantificação por PCR em tempo real. Porém, este alvo apresenta uma variação importante no número de cópias entre espécies e também entre isolados de uma mesma espécie, o que limita parcialmente sua utilização para se determinar a carga parasitária de amostras de pacientes. Desta forma, o desenho experimental para qPCR do presente estudo utilizou como alvo o SSR, um gene multi-cópia que apresenta boa sensibilidade quando comparado com alvos de mono-cópia, como o gene da DNA polimerase (Bezerra Vasconcelos et al., 2011; Prina et al., 2007).

Anteriormente, já havia sido demonstrada que a eficiência na detecção, na diferenciação de espécies e na quantificação da carga parasitária foi semelhante quando se comparou o método TaqMan® com o SYBR Green® (Weirather et al., 2011). Por este motivo, em todos os ensaios de amplificação de DNA parasitário realizados neste estudo, foi utilizado o corante SYBR-Green, que representa um sistema com maior aplicabilidade, pensando-se numa proposta de rotina diagnóstica de uma doença negligenciada como a leishmaniose.

No presente estudo, verificamos que a carga parasitária das lesões cutâneas era significativamente maior do que nos casos mucosos. Por outro lado, as lesões que evoluíram de maneira desfavorável ao tratamento exibiam um parasitismo tissular significativamente menor do que os casos com boa evolução. Esta diferença pode ser explicada pelo perfil inflamatório destas lesões. Nosso grupo já havia demonstrado que: 1) lesões de MR apresentam um infiltrado inflamatório com intensa atividade de metaloproteinase de matriz -2 (MMP-2) e elevado número de células produtoras de IFN- γ , IL-10 e TGF- β (Maretti-Mira et al., 2011a) e 2) na infecção *in vitro* de macrófagos provenientes de pacientes com história previa de lesão mucosa ocorre secreção e ativação de MMP-9, fenômeno não observado em culturas de macrófagos de pacientes curados de LCL (Maretti-Mira et al., 2011b). A presença de um infiltrado inflamatório muito extenso e exacerbado tanto nas lesões de MR como nas lesões mucosas pode levar à morte celular, incluindo as formas amastigotas. Corroborando estes achados, Prina et al. (2007) mostraram que a degradação do DNA nuclear e do cinetoplasto ocorre muito rapidamente após a morte das amastigotas.

Os estudos que envolvem a caracterização do perfil do infiltrado inflamatório das lesões de LTA são extremamente relevantes, uma vez que permitem a identificação de marcadores prognósticos. Isto levaria, no futuro, a uma melhoria no manejo clínicos dos pacientes (Rodrigues et al., 2011). Estes estudos, no entanto, vem focando na caracterização de fatores que são produzidos pelo hospedeiro no contexto da interação com o parasito. Por isso, deve-se também buscar um conhecimento sobre a influência do parasito na evolução das lesões.

A carga parasitária parece não ser o elemento chave na evolução clínica dos casos de LTA estudados. Nas áreas endêmicas do Rio de Janeiro, a maioria dos pacientes responde bem ao tratamento e isolados de *Leishmania (V.) braziliensis* dessas áreas apresentam uma sensibilidade maior ao antimoniato de meglumina, quando comparados com outras espécies (Azeredo Coutinho et. al, 2007). Isto sugere que a persistência do parasito em lesões de MR, tanto primárias como recidivas, deve envolver outros mecanismos não relacionados com a resistência à droga. Um mesmo raciocínio pode ser usado para os casos mucosos.

Nosso trabalho evidenciou por técnica de RT-PCR que a expressão gênica de GP63 era relativamente maior nos casos mucosos quando comparados com os casos cutâneos. Além disso, essa expressão ocorreu de forma mais significativa nos casos de MR em relação aos de BR. Quando foi avaliada a síntese *in situ* deste marcador por ensaios de imunohistoquímica, os resultados mostraram que nas lesões de MR havia um maior número de células marcadas quando comparadas com as lesões de BR. O mesmo padrão de marcação foi observado para LPG. Não foram detectadas diferenças na produção tecidual dos dois fatores de virulência, quando os casos foram avaliados de acordo com a forma clínica.

Na literatura não foram encontrados relatos evidenciando transcritos de GP63 em lesões causadas por *L. (V.) braziliensis*, o que dificulta a análise dos nossos resultados. Streit et al. (1996) demonstraram que na linhagem de macrófagos humanos U937 ocorre uma modificação do perfil de isoformas de GP63 nas amastigotas de *L. chagasi*, quando comparadas com as formas promastigotas. Isto mostra que após adentrar nas células dos hospedeiros mamíferos o parasito pode modular os processos de expressão gênica e síntese deste grupo de proteínas. Em outro estudo, utilizando também um parasito com tropismo visceral foi observado que esta metaloproteinase expressa diferentes isoformas de acordo com o estágio evolutivo do parasito e que podem estar localizadas em diferentes organelas. Nas formas amastigotas, a GP63 é detectada próxima à bolsa flagelar, um sítio importante

de exocitose/endocitose do parasito (Hsiao et al., 2008). Uma vez atingindo a localização intracelular a GP63 incorpora-se nos lisossomos protegendo o parasito da degradação. Com base nestas informações pode-se pensar que nas lesões de pacientes com MR e de pacientes com LM, a expressão diferencial de isoformas de GP63 poderia contribuir para a sobrevivência dos parasitos no interior de células fagocitárias e manutenção da infecção (Yao, 2010).

Estudos prévios mostraram que a imunohistoquímica poderia servir como uma alternativa para o diagnóstico de leishmaniose. Entretanto, a maioria desses estudos utiliza anticorpos policlonais que não permitem uma identificação precisa das classes de antígenos que podem estar presentes nas lesões. Mais recentemente, um estudo propôs a utilização de anticorpos monoclonais anti-LPG para detecção de amastigotas em lesões cutâneas. Com os resultados obtidos, os autores confirmam a importância da validação deste método que pode funcionar não somente para o diagnóstico em si, mas também para estudos epidemiológicos, clínicos e histopatológicos (Alves et al., 2013; Quintella et al., 2009; Tafuri et al., 2004). De fato, nosso trabalho demonstrou que havia uma correlação entre os níveis de produção “in situ” não só de LPG mas também de GP63 nas lesões de acordo com a resposta ao tratamento.

Nossos resultados mostraram que existe um padrão diferencial de resposta ao tratamento nos pacientes que apresentam maior expressão de fatores de virulência, em especial GP63. No entanto, a carga parasitária parece não exercer um papel tão fundamental neste contexto. Independente do número de parasitos na lesão, a viabilidade destes e sua virulência é que parecem ser decisivos na cronicidade e gravidade da infecção. Desta forma, os dados aqui apresentados indicam que são necessários novos estudos para se entender melhor a dinâmica da multiplicação dos parasitos e da expressão de fatores de virulência no sítio inflamatório, e como estes processos podem influenciar na evolução da LTA causada não só por *L. (V.) braziliensis* mas também por outras espécies de importância clínico-epidemiológica no país. O entendimento desta interação entre parasito e hospedeiro que ocorre no sítio de infecção da LTA, ainda pouco esclarecido, pode fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos e/ou condutas clínicas mais seguras.

6 – Conclusões

A partir da análise do conjunto de dados, pode-se concluir que:

- 1) A casuística estudada apresentou uma predominância do sexo masculino, o que corrobora com os dados da literatura que mostram a associação da LTA como uma doença ocupacional;
- 2) A média de idade e o tempo de evolução foram significativamente maiores entre os pacientes com LM, quando comparados com os pacientes com LCL, confirmando dados prévios que mostraram o longo intervalo entre a doença cutânea e o posterior acometimento mucoso;
- 3) A reatividade à IDRМ foi significativamente mais intensa nos casos de LM do que nos casos de LCL, confirmando dados que evidenciaram que uma resposta exacerbada de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania* pode estar associada a uma evolução clínica desfavorável;
- 4) Houve um maior parasitismo tecidual nos casos de BR quando comparados com os casos de MR, demonstrando que a carga parasitária isoladamente não representa um fator essencial na evolução clínica da LTA;
- 5) A frequência da expressão gênica de GP63 e a produção *in situ* desta metaloproteinase e de LPG estavam associadas com a má resposta ao tratamento, indicando que os fatores de virulência expressos pelo parasito podem influenciar na evolução desfavorável nos casos de LTA.

7 - Referências Bibliográficas

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M; 2012. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 7 (5): e35671.

Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, Melo MN, Tafuri WL, Raso P, Soares RP, Tafuri WL. 2013. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. Plos One. May; vol 8, issue 5.

Antonio I, Fagundes A, Oliveira R, Pinto P, Bedoya-Pacheco S, Vasconcellos E, Valete-Rosalino M, Lyra M, Passos S, Pimentel M & Schubach A. 2014. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 56 (5): 375-380.

Antunes PCA, Coutinho JO 1939. Notas sobre flebótomos sul-americanos. II. Descrição de *Flebotomus whitmani* n. sp. e da armadura bucal de algumas espécies. Bol Biológico IV: 448-451.

Aragão H de B. 1922. Transmissão de leishmaniose no Brasil pelo *Phlebotomus intermedius*. Bras. Med, 36: 129-30.

Arango Duque G, Descoteaux A. 2015. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. Curr. Opin. Microbiol. 26: 32–40.

Assis RR, Ibraim IC, Nogueira PM, Soares RP, Turco SJ. 2012. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. Biochim Biophys Acta. Sep; 1820 (9): 1354-65.

Aviles, H., Belli, A., Armijos, R., Monroy, F.P., Harris, E., 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. J. Parasitol. 85, 181–187.

Azeredo-Coutinho RB, Mendonça SC, Callahan H, Portal AC, Max G. 2007. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is

higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. J Parasitol. Jun; 93 (3): 688-93.

Barretto MP, Coutinho JO. 1940. Contribuição ao conhecimento dos flebótomos de São Paulo II. Descrição do macho de *Phlebotomus limai* (Fonseca, 1935) e de duas novas espécies: *Phlebotomus ayrozai* e *P. amarali* (Diptera, Psychodidae). Ann Fac Med Univ São Paulo 16: 127-139.

Bates PA. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. Int J Parasitol. Aug; 37 (10): 1097-106.

Bell AS, Ranford-Cartwright LC. 2002. Real-time quantitative PCR in parasitology. Trends Parasitol. Aug;18 (8): 337-42.

Bezerra-Vasconcelos DR, Melo LM, Albuquerque ÉS, Luciano MC, Bevilaqua CM. 2011. Real-time PCR to assess the *Leishmania* load in *Lutzomyia longipalpis* sand flies: screening of target genes and assessment of quantitative methods. Exp Parasitol. Nov; 129 (3): 234-9.

Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. Aug; 102 (5): 625-30.

Blum JA, Hatz CF. 2009. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers. J Travel Med. Mar-Apr; 16 (2): 123-31.

Boaventura VS, Cafe V, Costa J, Oliveira F, Báfica A, Rosato A, de Freitas LA, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A. 2006. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg. 75 (2): 267.

Boggild, A.K.; Miranda-Verastegui, C.; Espinosa, D.; Arevalo, J.; Martinez- Medina, D.; Llanos-Cuentas, A.; Low, D.E. 2008. Optimization of microculture and evaluation of miniculture for the isolation of *Leishmania* parasites from cutaneous lesions in Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 79 (6): 847-852.

Bouvier J, Schneider P, Etges R, Bordier C. 1990. Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. *Biochemistry*. Oct 30; 29 (43): 10113-9.

Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M. 2001. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 828-831.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. 1995. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J. Immunol.* 155: 3102-3111.

Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, Dorval ME, Oshiro ET, de Oliveira AL, Pirmez C. 2007. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jun; 102 (4): 497-500.

Camargo EP. 1964 Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. May-Jun; 6: 93-100.

Carvalho AM, Amorim CF, Barbosa JL, Lago AS, Carvalho EM. 2015. Age Modifies the Immunologic Response and Clinical Presentation of American Tegumentary Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. Apr 27. pii: 14-0631. [Epub ahead of print]

Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt AL, Marsden P. 1994a. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica*. 56: 315-25.

Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn CI, Bacellar O. 1994b. Immunoregulation in leishmaniasis. *J Braz Ass Adv Sci*. 46: 441-5.

Castilho TM, Camargo LM, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. 2008. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of

American *Leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Am J Trop Med Hyg 78: 122-132.

Ceccarelli M, Galluzzi L, Migliazzo A, Magnani M. 2014. Detection and characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR green-based real-time PCR and high resolution melt analysis targeting kinetoplast minicircle DNA. PLoS One. Feb 13; 9 (2).

Coelho-Finamore JM, Freitas VC, Assis RR, Melo MN, Novozhilova N, Secundino NF, Pimenta PF, Turco SJ, Soares RP. 2011. *Leishmania infantum*: Lipophosphoglycan intraspecific variation and interaction with vertebrate and invertebrate hosts. Int J Parasitol. Mar; 41 (3-4): 333-42.

Costa JM, Netto EM, Vale KC, Osaki NK, Tada MS, Marsden PD. 1987. Spontaneous healing of cutaneous *Leishmania braziliensis* ulcers. Trans R Soc Trop Med Hyg; 81 (4): 606.

Costa C, Toledo V, Genaro O, Williams P, Mayrink W. 1996. Montenegro skin test—evaluation of the composition and stability of the antigen preparation. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91: 193–194.

Costa CH, Stewart JM, Gomes RB, Garcez LM, Ramos PK, Bozza M, Satoskar A, Dissanayake S, Santos RS, Silva MR, Shaw JJ, David JR, Maguire JH. 2002. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. Am J Trop Med Hyg. Apr; 66 (4): 334-7.

Costa Lima, A.M.C., 1941a. Considerações sobre alguns redivídeos da subfamília *Stenopodinae*. Revista Brasileira de Biologia 1: 337-342.

Coutinho J O, Barretto M P. 1941. Contribuição ao conhecimento dos Flebotomus de São Paulo VII. Descrição de *Phlebotomus guimaraesi*, n. sp. e das fêmeas de *Phlebotomus pestanai* (Barreto & Coutinho, 1941) e de *Phlebotomus lanei* (Barretto & Coutinho, 1941) (Diptera, Psychodidae). Rev. Biol. Hyg. 11: 74–88.

Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, Veland N, Jara M, Adai V, Castrillón C, Arévalo J, Moreno J, Cañavate C. 2013. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Exp Parasitol.* Jul; 134 (3): 281-9.

Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. 1989. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol.* 1989 Jul 15; 143 (2): 617-22.

Daneshbad Y, Oryan A, Davarmanesh M, Shirian s, Negahban S, Aledavood A, Davarpanah MA, Soleimanpoor H, Daneshbad K. 2011. Clinical, Histopathologic and Cytologic Diagnosis of Mucosal Leishmaniasis and Literature Review. *Arch Pathol Lab Med – vol 135.*

David CV, Craft N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* Nov-Dec; 22 (6): 491-502.

Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in andean countries. *Cad Saude Publica.* 16: 925-50.

de Magalhães AV, Chiarini LH, Raick AN. 1982. The histopathology of cutaneous leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo;* 24 (5): 268-76.

de Magalhães AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD. 1986. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo;* 28 (4): 253-62.

de Paiva Cavalcanti M, Dantas-Torres F, da Cunha Gonçalves de Albuquerque S, Silva de Moraes RC, de Brito ME, Otranto D, Brandão-Filho SP. 2013. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in animals and humans. *Mol Cell Probes.* Jun-Aug; 27 (3-4): 122-8.

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U. 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst*

Oswaldo Cruz; 89 (3): 463-9.

Desjardins M, Nzala NN, Corsini R, Rondeau C. 1997. Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci. Sep*; 110 (Pt 18): 2303-14.

Dobson DE, Scholtes LD, Myler PJ, Turco SJ, Beverley SM. 2006. Genomic organization and expression of the expanded SCG/L/R gene family of *Leishmania major*: internal clusters and telomeric localization of SCGs mediating species-specific LPG modifications. *Mol Biochem Parasitol. Apr*; 146 (2): 231-41.

Dobson DE, Kamhawi S, Lawyer P, Turco SJ, Beverley SM, Sacks DL. 2010. *Leishmania major* survival in selective *Phlebotomus papatasi* sand fly vector requires a specific SCG-encoded lipophosphoglycan galactosylation pattern. *PLoS Pathog. Nov 11*; 6 (11).

Dorak T. 2006. Real-Time PCR. Ed Taylor & Francis, New York, US.

Falqueto A. 1986. Participação do cão no ciclo de transmissão da leishmaniose tegumentar no município de Viana, Estado do Espírito Santo, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* : 155-63.

Forattini OP, Rabello EX, Pattolé D. 1958. [culicoides of the neotropical regions (Diptera, ceratopogonidae). II. Data on biology in natural conditions]. *Arq Fac Hig Saude Publica Univ São Paulo. Jun*; 12 (1): 1-52.

Forestier CL, Gao Q, Boons GJ. 2015. *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front Cell Infect Microbiol. Jan 21*; 4: 193.

Fraiha, H, J J Shaw & R Lainson, 1971. Phlebotominae Brasileiros II. *Psychodopygus wellcomei*, nova espécie antropófila de flebótomo do grupo squamiventris, do sul do estado do Pará, Brasil (Diptera: Psychodidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 69: 489-500.

Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. 2012. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Parasitol Res.* 165126.

Freitas-Teixeira PM, Silveira-Lemos D, Giunchetti RC, Baratta-Masini A, Mayrink W, Peruhype-Magalhães V, Rocha RD, Campi-Azevedo AC, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA. 2012. Distinct pattern of immunophenotypic features of innate and adaptive immunity as a putative signature of clinical and laboratorial status of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* Oct; 76 (4): 421-32.

Gentile C, Meireles-Filho ACA, Britto C, Lima JBP, Valle D, Peixoto AA. 2006. Cloning and daily expression of the timeless gene in *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 36: 878–884.

Giorgione JR, Turco SJ, Epanand RM. 1996. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the lipophosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 93: 11634-11639.

Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. 2014. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* Aug; 36 (8): 367-76.

Gomes A, Armelin I, Menon S, Pereira-Chioccola V. 2008. *Leishmania (V.) braziliensis*: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 119: 319–324.

Gomes CM, Paula NA, Moraes OO, Soares KA, Roselino AM, Sampaio RN. 2014. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* Sep-Oct; 89 (5): 701-9.

Grevelink SA, Lerner EA. Leishmaniasis. 1996. *J Am Acad Dermatol.* Feb; 34 (2 Pt 1): 257-72.

Grimaldi G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *Am J Trop Med Hyg.* Dec; 41 (6):

687-725.

Guha-Niyogi A, Sullivan DR, Turco SJ. 2001. Glycoconjugate structures of parasitic protozoa. *Glycobiology*. Apr; 11 (4): 45R-59R.

Hartley MA, Ronet C, Zangger H, Beverley SM, Fasel N. 2012. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. *Front Cell Infect Microbiol*. Jul 12; 2: 99.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. Sep; 11 (9): 1026-30.

Hoseini SG, Javanmard SH, Hejazi SH, Rafiei L, Zarkesh SH, Karbalaii K, Khamesipour A. Comparison of immune regulatory factors in acute and chronic lesions of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. 2014. *J Res Med Sci*. Mar; 19 (Suppl 1): S36-40.

Hsiao CH, Yao C, Storlie P, Donelson JE, Wilson ME. 2008. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*. Feb; 157 (2): 148-59.

Ibraim IC, de Assis RR, Pessoa NL, Campos MA, Melo MN, Turco SJ, Soares RP. 2013. Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages. *Parasit Vectors*. Mar 7; 6: 54.

Ilg T. 2001. Lipophosphoglycan of the protozoan parasite *Leishmania*: stage- and species-specific importance for colonization of the sandfly vector, transmission and virulence to mammals. *Med Microbiol Immunol*. Nov; 190 (1-2): 13-7.

Isnard A, Shio MT, Olivier M. 2012. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol*. May 16; 2: 72.

Ives A, Ronet C, Prevel, F, Ruzzante G, Fuertes-Marraco S, Schutz F, Zangger H, Revaz-Breton M, Lye LF, Hickerson S M, Beverley SM, Acha-Orbea H, Launois P,

Fasel N, Masina S. 2011. *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. *Science*. Feb 11. 331 (6018): 775–778.

Jara M, Adai V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M, Cruz I, Van der Auwera G, Llanos-Cuentas A, Dujardin JC, Arevalo J. 2013. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania (Viannia)* organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. *J Clin Microbiol*. Jun; 51 (6): 1826-33.

Kaye P, Scott P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. Jul 11; 9 (8): 604-15.

Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. 2012. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem*. 19 (10): 1443-74.

Kweider M, Lemesre JL, Darcy F, Kusnierz JP, Capron A, Santoro F. 1987. Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000-dalton surface antigen. *J Immunol*. Jan 1; 138 (1): 299-305.

Lainson R, Shaw JJ. 1987. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120 In W Peters & R Killick-Kendrick (eds) *The leishmaniases in biology and medicine*, Vol. 1. *Biology and Epidemiology*. Academic Press, England.

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 89 (3): 435-43.

Lessa MM, Lessa HA, Castro TW, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. 2007. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Braz. J. Otorhinolaryngol*. Nov-Dec: 73 (6): 843-7.

Liew FY, O'Donnell CA. 1993. Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32: 161-259.

Lindenberg A. 1909. A úlcera de Bauru e o seu micróbio. Comunicação preventiva. Revista Médica de S. Paulo. 12: 116-120.

Llanos-Cuentas EA. 1984. Estudo clínico evolutivo da leishmaniose em área endêmica de *L. braziliensis braziliensis* [Dissertação]. Brasília (DF).

Lutz, A. & Neiva, A. 1912. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. Mem. Inst. O. Cruz, 4:84-95.

Macedo AB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, Mendonça SC, Marins-Dos-Santos A, de Fatima Madeira M, Gagini T, Pimentel MI, De Luca PM. 2012. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol. Mar; 167 (3): 505-13.

Mangabeira O F, 1942. Contribuição ao estudo dos *Flebotomus* (*Diptera* : *Psychodidae*), Descrição dos machos de 24 novas espécies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 37: 190-201,

Manna L, Gravino AE, Picillo E, Decaro N, Buonavoglia C. 2008. *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. Ann N Y Acad Sci 1149: 358-360.

Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. 2011 A. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. Clin Exp Immunol. Feb; 163 (2): 207-14.

Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N. 2011 B. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. Acta Trop. Aug;119 (2-3): 160-4.

Maretti-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, Liu M, Kang D, Li H, Pirmez C, Craft N. 2012. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. PLoS Negl Trop Dis. 6 (9).

Marsden, PD, Nonata, RR. 1975. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. Rev Soc Bras Med Trop. 9: 309-326.

Marsden, PD. 1985. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. Parasitology today (Personal ed.). Nov; 1 (5): 129-33.

Marsden PD. 1986. Mucosal leishmaniasis ("spundia" escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg. 80 (6): 859 - 876.

Martins A, Barreto J, Lauris J, Martins A. 2014. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. An Bras Dermatol. 89 (1): 52-8.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. J Clin Microbiol 42: 5249-5255.

Mayrink W, Costa C, da Magalhães P, Melo M, Dias M, Lima A. 1978. Responses to Montenegro antigen after immunization with killed *Leishmania* promastigotes. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 72, pp. 676–679.

McConville MJ, Ferguson MA. 1993. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. Biochem J. Sep 1; 294 (Pt 2): 305-24.

Ministerio da Saúde. Guia de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 1994. Brasília/DF. 3ª. edição.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2007. 2ª edição. Brasília/DF: Editora do Ministério da Saúde.

Ministerio da Saude. 2012. <http://tabnet.datasus.gov.br>. Acessado em junho de 2015.

Monge-Maillo B, López-Vélez R. 2013. Therapeutic options for Old World cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*. Nov; 73 (17): 1889-920.

Montenegro J. 1926. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology*. 13: 187.

Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. 1993. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. *The Journal of Immunology*. 150: 4457-4465.

Moradin N, Descontaux A. 2012. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Cellular and Infection Microbiology*. Mini review article. Sep: doi: 10.3389/fcimb.0012.

Moreira J. 1895. Distribuição geográfica do botão endêmico dos países quentes. *Anais da Sociedade de Medicina da Bahia*. Abr. *Gazeta Médica da Bahia*, Salvador, v.26, p.369-374.

Murback N, Filho G, Nascimento R, Nakazato K, Dorval M. 2011. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *An Bras Dermatol*. 86 (1): 55-63.

Nathan C, Shiloh MU. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 8841-8848.

Nicolle CM. 1908. Culture du parasite du Bouton *d'Orient*. *Compt. Rendu. Hebdomadaire des séances de l'Academie de science*. Paris. 146: 842-43.

Novy FG, MacNeal WJ. 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. *J. Infect. Dis*. 1: 1-30.

Oliveira- Camera, Junger J, do Espírito Santo F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandes O, Pirmez C. 2006. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. Dec; 100 (12): 1112-7.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). Am J Trop Med Hyg. Dec; 57 (6): 651-5.

Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Goncalves-Costa SC, Brahin LR, Menezes CR, Pirmez C. 2000. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. Int J Dermatol 39: 506-514.

Oliveira-Neto MP, Mattos M da S. 2006. Successful therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Jul-Aug; 39 (4): 367-8. Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

Olivier M, Brownsey RW, Reiner NE. 1992. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 89: 7481-7485.

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. 2005. Subversion Mechanisms by which *Leishmania* Parasites can Escape the Host Immune Response: Signaling Point of View. Clin. Microbiol. Rev. 18: 293.

Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. Microbes and Infection; 14: 1377-1389.

Orlandi PA Jr, Turco SJ. 1987. Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J. Biol. Chem. Jul 25: 262 (21): 10384-91.

Pace D. 2014. Leishmaniasis. J Infect. 2014 Nov; 69 Suppl 1: S10-8.

Pearson RD, Sousa AQ. 1996. Clinical spectrum of Leishmaniasis. Clin. Infect. Dis. Jan; 22 (1): 1-13.

Pereira LOR, Maretti-Mira AC, Rodrigues KM, Lima RB, Oliveira-Neto MP, Cupolillo E, Pirmez C, Oliveira MP. 2013. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. August. Vol. 108 (5): 665-667.

Pereira MR, Rocha-Silva F, Graciele-Melo C, Lafuente CR, Magalhães T, Caligorne RB. 2014. Comparison between conventional and real-time PCR assays for diagnosis of visceral leishmaniasis. Biomed Res Int. 2014:639310.

Pessoa, SB, Barreto, MP. 1948. Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Educação e Saúde, Imprensa Nacional. Rio de Janeiro. BRASIL.

Pimenta PF, Pinto da Silva P, Rangarajan D, Smith DF, Sacks DL. 1994. *Leishmania major*: association of the differentially expressed gene B protein and the surface lipophosphoglycan as revealed by membrane capping. Exp. Parasitol. Nov; 79 (3): 468-79.

Pinto C. 1926. *Phlebotomus neivai* e *Phlebotomus fischeri* n. sp. sobre o aparelho espiracular dos *phlebótomos* e seu valor específico. Ciência Méd 4: 370-375.

Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W, Fernandes O. 1999. Use of PCR in Diagnosis of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol. 37 (6): 1819-1823.

Pita-Pereira D, Lins R, Oliveira MP, Lima RB, Pereira BA, Moreira OC, Brazil RP, Britto C. 2012. SYBR Green-based real-time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniasis. Parasit Vectors. Jan 12; 5:15.

Podinovskaia M, Descoteaux A. 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. Future Microbiol, 10:111-129.

Prina E, Roux E, Mattei D, Milon G. 2007. *Leishmania* DNA is rapidly degraded following parasite death: an analysis by microscopy and real-time PCR. *Microbes Infect.* Sep; 9 (11): 1307-15.

Puentes SM, Sacks DL, da Silva RP, Joiner KA. 1988. Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. *J Exp Med.* Mar 1; 167 (3): 887-902.

Quintella LP, Cuzzi T, Madeira Mde F, Okamoto T, Schubach Ade O. 2009. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (L.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* Mar-Apr; 51 (2): 83-6.

Rangel EF, Lainson R. 2003. Ecologia das leishmanioses: transmissores de leishmaniose tegumentar americana. In EF Rangel, R Lainson (eds), *Flebotomíneos do Brasil*. Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 291-310.

Reithinger R, Dujardin JC. 2007. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J Clin Microbiol* 45: 21-25.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 7 (9): 581-96.

Rey, L. 2008. O Complexo *Leishmania braziliensis* e as leishmanioses cutâneas das Américas. In: *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos*, 4ª Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. Brasil: 372-95.

Ridley DS. 1980. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 74 (4): 515-21.

Rodgers M, Popper S, Wirth D. 1990. Amplification of Kinetoplast DNA as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Experimental Parasitology* 71, 267-275.

Rodrigues KM, Oliveira MP, Maretti-Mira AC, Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Silva L, Soares DA, Dolci EL, Perico RA, Pirmez C. 2011. Influence of the Notch system in the therapeutic response of American tegumentary leishmaniasis. *Br J Dermatol*. Jun; 164 (6): 1228-34.

Romero GA, Sampaio RN, Macedo Vde O, Marsden PD. 1999. Sensitivity of a vacuum aspiratory culture technique for diagnosis of localized cutaneous leishmaniasis in an endemic area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jul-Aug; 94 (4): 505-8.

Romero G, Guerra M, Paes M, Mace V. 2001. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 65 (5): 456–465

Romero GA, Noronha EF, Pirmez C, Pires Fdo E, Fernandes O, Nehme NS, Cupolillo E, Firoozmand L, da Graça GC, Volpini A, Santos SL, Romanha AJ. 2009. Sensitivity and reproducibility of a PCR assay for *Leishmania* detection using skin biopsy imprints on filter paper. *Acta Trop*. Jan;109 (1): 74-7. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.10.003. Epub Oct 18.

Sacks D L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. *Exp. Parasitol*. Nov: 79 (3): 468-79.

Sadeghian G1, Momeni A, Siadat AH, Yousefi P. 2006. Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J*. Dec 10; 12 (7): 3.

Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G, Fernandes O. 1998. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*. Sep; 178 (3): 911-4.

Seay MB, Heard PL, Chaudhuri G. 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 15; 93 (21): 11634-9.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 31, 423–431.

Singh S, Sivakumar R. 2003. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 49: 55-60.

Singh S. 2014. Changing trends in the epidemiology, clinical presentation and diagnosis of *Leishmania*–HIV co-infection in India. *International Journal of Infectious Diseases*. 29: 103–112.

Souza LW, Souza SV, Botelho AC. 2012. Comparative analyses of the geographic distribution of the histopathological spectrum and *Leishmania* Species of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. *An Bras Dermatol*. 87 (3): 369-74.

Souza W, Sabroza P, Santos C, Sousa E, Henrique M, Coutinho S. 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Tropica*, 52: 111-119.

Sousa Ade Q, Parise ME, Pompeu MM, Coehlo Filho JM, Vasconcelos IA, Lima JW, et al. 1995. Bubonic leishmaniasis: A common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceará, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. Oct; 53 (4): 380-5.

Sousa AQ, Pompeu MM, Frutuoso MS, Lima JW, Tinel JM, Pearson RD. 2014. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. Nov; 91 (5): 905-7.

Splendore A. 1911. Buba-blastomicosi-leishmanosi. Nota sopra alcune affezioni framboesiche osservate in Brasile. *Arch für Schiffs-und Tropenhyg*. 15: 105-15.

Strauss-Ayali D1, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G. 2004. Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis*. May 1; 189 (9): 1729-33.

Streit JA, Donelson JE, Agey MW, Wilson ME. 1996. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infect Immun.* May; 64 (5): 1810-8.

Sudarshan M, Singh T, Singh AK, Chourasia A, Singh B, Wilson ME, Chakravarty J, Sundar S. 2014. Quantitative PCR in Epidemiology for Early Detection of Visceral Leishmaniasis Cases in India. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* December. Volume 8, Issue 12. e3366.

Tafuri WL, Santos RL, Arantes RM, Gonçalves R, de Melo MN, Michalick MS, Tafuri WL. 2004. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods.* Sep; 292 (1-2): 17-23.

Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schonian G, Toz SO, Jaffe CL, Baneth G. 2010. Detection and identification of old world *Leishmania* by high resolution melt analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e581.

Toledo Junior A, Daher AB, Amaral TA, Carvalho SF, Romero GA, Rabello A. 2014. Poor response to azithromycin in cutaneous leishmaniasis leading to a premature interruption of a multicentric phase III clinical trial in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* Nov-Dec; 47 (6): 756-62.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Amato Neto V. 2008. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* Feb; 47 (2): 109-24.

Turco SJ, Descoteaux A. 1992. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 65-94.

van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, Peekel I, Schallig H. 2008. Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol* 46: 73-78.

Vasconcellos Ede C, Pimentel MI, Schubach Ade O, de Oliveira Rde V, Azeredo-Coutinho RB, Silva Fda C, Salgueiro Mde M, Moreira JS, Madeira Mde F, Baptista C, Valete-Rosalino CM. 2012. Intralesional meglumine antimoniate for treatment of cutaneous leishmaniasis patients with contraindication to systemic therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). *Am J Trop Med Hyg.* Aug; 87 (2): 257-60.

Vergel C, Walker J, Saravia N. 2005. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 72 (4) 423–429.

Vianna G. 1911. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). *Bras. Med.* 25:411.

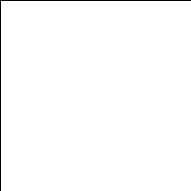
Volf P, Hostomska J, Rohousova I. 2008. Molecular crosstalks in *Leishmania*-sandfly-host relationships. *Parasite.* Sep; 15 (3): 237-43.

Wall, E.C., Watson, J., Armstrong, M., Chiodini, P.L., Lockwood, D.N., 2012. Epidemiology of imported cutaneous leishmaniasis at the Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom: use of polymerase chain reaction to identify the species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 115–118.

Ward RD, Fraiha H. 1977. *Lutzomyia umbratilis*, a new species of sandfly from Brazil (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 14: 313-317.

Weinkopff T, Oliveira C, Carvalho A, Hauyon-La Torre Y, Muniz A, Miranda J, Barral A, Tacchini-Cottier F. 2014. Repeated Exposure to *Lutzomyia intermedia* Sand Fly Saliva Induces Local Expression of Interferon-Inducible Genes Both at the Site of Injection in Mice and in Human Blood. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* January, Volume 8, Issue 1, e2627.

Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania spp.* in human samples. *J Clin Microbiol.* Nov; 49 (11): 3892-904.



World health Statistics 2007. 1. Health status indicators. 2. World health. 3. Health services – statistics. 4. Mortality. 5. Life expectancy. 6. Demography. 7. Statistics. World Health Organization.

Wright SD, Siverstein SC. 1983. Receptors for C3b and iC3b promote fagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 158: 2016-23.

Yang S, Rothman RE. 2004. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. *Lancet Infect Dis*. Jun; 4 (6): 337-48.

Yao C, Donelson JE, Wilson ME. 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. Nov; 132 (1): 1-16.

Yurchenko VY, Merzlyak EM, Kolesnikov AA, Martinkina LP, Vengerov YY. 1999. Structure of *Leishmania* minicircle kinetoplast DNA classes. *J Clin Microbiol*. May; 37 (5): 1656-7.