

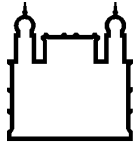
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular

ABORDAGENS DE GENÉTICA MOLECULAR APLICADAS
AO ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
EM ÁREAS DE CIRCULAÇÃO DE PARASITAS CONTENDO O
ENDOSSIMBIONTE VIRAL LRV1

LILIAN MOTTA CANTANHÊDE

RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Lilian Motta Cantanhêde

Abordagens de genética molecular aplicadas ao estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana em áreas de circulação de parasitas contendo o endossimbionte viral LRV1

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadores: Prof. Dra. Elisa Cupolillo
Prof. Dr. Renato Porrozzini

RIO DE JANEIRO
MARÇO DE 2018

Cantanhêde, Lilian Motta.

Abordagens de genética molecular aplicadas ao estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana em áreas de circulação de parasitas contendo o endossimbionte viral LRV1 / Lilian Motta Cantanhêde. - Rio de Janeiro, 2018. 160 f.; il.

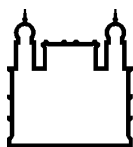
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Elisa Cupolillo.

Co-orientador: Renato de Almeida Porrozi.

Bibliografia: f. 124-148

1. Leishmaniose tegumentar. 2. espécies de Leishmania. 3. Leishmania RNA Vírus 1. 4. expressão gênica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: LILIAN MOTTA CANTANHÊDE

**ABORDAGENS DE GENÉTICA MOLECULAR APLICADAS
AO ESTUDO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA
EM ÁREAS DE CIRCULAÇÃO DE PARASITAS CONTENDO O
ENDOSSIMBIONTE VIRAL LRV1**

ORIENTADORES: Profa. Dra. Elisa Cupolillo

Prof. Dr. Renato Porrozi

Aprovada em: 27/03/2018

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Claude Pirmez – Presidente – Fundação Oswaldo Cruz /
Instituto Oswaldo Cruz.

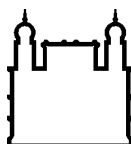
Prof. Dr. Jansen Fernandes de Medeiros – Fundação Oswaldo Cruz /
Unidade Rondônia.

Profa. Dra. Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua – Fundação Oswaldo Cruz
/ Unidade Rondônia.

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero – Universidade de Brasília.

Profa. Dra. Juliana Pavan Zuliani – Fundação Oswaldo Cruz / Unidade
Rondônia e Universidade Federal de Rondônia.

Rio de Janeiro, 27 de março de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz


DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Lilian Motta Cantanhêde**, sob orientação da Dr^a. Elisa Cupolillo e do Dr. Renato Porrozi de Almeida, foi aprovada em 27/03/2018, em sua defesa de tese de doutorado intitulada: **“Abordagens de genética molecular aplicadas ao estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana em áreas de circulação de parasitas contendo o endossimbionte viral LRV1”**, área de concentração: Biologia Celular e Molecular. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr^a. Claude Pirmez - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr^a. Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua - Fiocruz Rondônia/RO e Dr. Jansen Fernandes de Medeiros - Fiocruz Rondônia/RO e como suplentes: Dr^a. Juliana Pavan Zuliani - UNIR/RO e Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero - UnB/DF.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Biologia Celular e Molecular (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria n^o 694, de 13 de junho de 1995, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 7 (sete) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, a **liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese *on line* e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 27 de março de 2018


Leila de Mendonça Lima
Matrícula SIAPE 11919958

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob n^o DCE-6926/18 no livro n^o II, folha 12 em 27/03/2018.

Ao meu pai, José Iran, que sempre valorizou a busca pelo conhecimento e a minha mãe, Delmarise, motivação para seguir minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

A todos os pacientes que aceitaram participar da pesquisa, movidos principalmente pela esperança de ajudar uns aos outros.

A minha família, Mamãe, Larissa e Lorena, por me acompanharem e apoiarem sempre.

Aos amigos do laboratório de Epidemiologia Genética da Fiocruz Rondônia, pelo convívio, tornando leve e prazerosa a vida no laboratório, em especial a Kátia Felipin, Cristiane Mattos, Flávia Fernandes, Iasmin Pimentel, Yoda Ikenohuchi, Caroline Telles e Camila Ronconi, Enmanuella Terceiro e Ana Karoline por toda a dedicação e responsabilidade com a rotina do laboratório.

Aos meus orientadores, pela oportunidade, confiança e aprendizado, fazendo-se presentes e disponíveis sempre que solicitados.

Aos pesquisadores Camila Filgueiras e Otacílio Moreira pelo auxílio para a realização dos experimentos de carga parasitária.

Aos pesquisadores Deusilene Vieira, Luan Botelho, Michele Moraes e Soraya Santos pela disponibilidade em me auxiliar com os experimentos de carga viral.

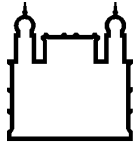
Ao pesquisador Gabriel Eduardo pelas discussões e auxílio nas atividades de laboratório.

Ao pesquisador Marcelo Ribeiro-Alves, pela importante contribuição nas análises estatísticas de expressão gênica.

A todos os professores do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular.

Aos colaboradores do Hospital Cemetrón, pela receptividade e acolhimento.

Ao Ricardo, pelo apoio em tudo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

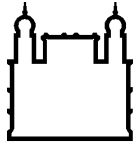
Abordagens de genética molecular aplicadas ao estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana em áreas de circulação de parasitas contendo o endossimbionte viral LRV1

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Lilian Motta Cantanhêde

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma infecção de amplo espectro clínico, com manifestações que podem apresentar desde um envolvimento cutâneo (LC) até as formas mais graves da doença, com comprometimento das mucosas (LM). Os fatores que predisõem a evolução clínica têm natureza multifatorial e não estão totalmente esclarecidos. O presente trabalho incluiu a análise de 734 amostras de pacientes, todos do Estado de Rondônia, com suspeita clínica de LT e buscou avaliar diferentes fatores que podem contribuir com a progressão da doença, sendo estes: i) a espécie do parasita, por PCR/RFLP, ii) a presença de um vírus RNA1 no interior de parasitas *Leishmania* (LRV1), por RT-PCR e, iii) a análise da expressão de 96 genes relacionados resposta imune frente a infecção por *Leishmania* e de genes de virulência do parasita, por Fluidigm. Foram avaliados também a relação de sensibilidade entre testes moleculares (PCR kDNA e hsp70) e o parasitológico direto em amostras clínicas. Considerando a importância do LRV1 na epidemiologia da LT na região onde realizamos este estudo, foram conduzidas análises filogenéticas do LRV1 em isolados de *Leishmania* por análise das sequências do vírus. Os resultados de 557 amostras positivas para LT demonstram que *L. braziliensis* é o principal agente etiológico de LT em Rondônia (84,79%) e que o perfil de pacientes acometidos é similar ao encontrado em outras regiões, com maior índice de infecção em homens (78,6%), com idade entre 20 e 60 anos, e, que o LRV1 tem uma frequência de 36,2% (N=198), sendo detectado em quatro espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* e *L. shawi*. Foram identificados genes humanos com expressão aumentada, com destaque para os genes NLRP3, CASP1, IL12, IL21, demonstrando uma efetiva resposta imune pela baixa carga parasitária observada nos pacientes que apresentaram maior expressão desses genes, ao mesmo tempo que foi observado também um aumento da expressão de genes de virulência de *Leishmania* (TRYR, PRX, MAPK, GSH e GP63). Os testes parasitológicos aplicados demonstraram elevada sensibilidade do PCR kDNA (94,8%), seguido do PCR hsp70 (77,7%) e uma menor sensibilidade do parasitológico direto (63,8%). As análises filogenéticas mostraram que as sequências LRV1 são agrupadas de acordo com as espécies parasitas reforçando a hipótese de co-evolução *Leishmania*/LRV1.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Molecular genetics approaches applied to the study of American Cutaneous Leishmaniasis in areas of parasites occurrence containing the LRV1 viral endosymbiont

ABSTRACT

PHD THESIS IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Lilian Motta Cantanhêde

Tegumentary leishmaniasis (LT) is an infection of a broad clinical spectrum, with manifestations that may present from a cutaneous involvement (CL) to more severe forms of the disease, with mucosal involvement (ML). The factors predisposing to clinical evolution are multifactorial in nature and are not fully understood. The present study was conducted at the State of Rondonia, West Amazonian Region in Brazil, and analysed 734 samples from patients with clinical suspicion of LT. The aim was to evaluate several factors that would contribute to the disease progression, as follow: i) parasite species, by PCR / RFLP, ii) presence of a RNA1 virus (LRV1), by RT-PCR and, iii) gene expression (n= 96), using Fluidigm expression assay, of genes related to the immune response to *Leishmania* infection, as well as, gene expression of some parasite genes. In addition, it was also investigated the comparative sensitivity between molecular tests (kDNA and hsp70 PCR) and parasitological direct investigation in clinical samples. Considering the relevance of LRV1 in the LT' epidemiology in the studied region, phylogenetic analysis were conducted by analysing the virus RNA sequences. The results of 557 positive samples for TL show that *L. braziliensis* is the main etiological agent of TL in Rondonia (84.79%) and that the profile of patients affected is similar to that found in other regions, with a higher infection rate in men (78.6%), with age between 20 and 60 years. LRV1 has a frequency of 36.2% (N = 198), being detected in four species: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* and *L. shawi*. Human genes with increased expression were identified, highlighting the genes NLRP3, CASP1, IL12, IL21, demonstrating an effective immunological as this was correlated with lower parasite load. It was also observed an increasing in expression of *Leishmania* genes (TRYR, PRX, MAPK, GSH and GP63). The parasitological tests applied showed high kDNA PCR sensitivity (94.8%), followed by hsp70 PCR (77.7%) and a lower parasitological test sensitivity (63.8%). Phylogenetic analyzes showed an association between LRV1 sequences clusters and *Leishmania* species, reinforcing a coevolutionary hypothesis of *Leishmania* / LRV1.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 20 |
| 1.2 A DIVERSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS E ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> NA AMAZÔNIA BRASILEIRA | 23 |
| 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 25 |
| 1.3.1 O PAPEL DO PARASITA NA EVOLUÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 27 |
| 1.3.2 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 29 |
| 1.3.3 <i>LEISHMANIA</i> RNA VÍRUS 1 E A SUA RELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA | 31 |
| 1.4 DIAGNÓSTICOS CLÍNICO E LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR | 36 |
| 1.4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA O DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES | 36 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 40 |
| 3 OBJETIVOS | 42 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 42 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 42 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 CASUÍSTICA | 43 |
| 4.2 COLETA DAS AMOSTRAS | 43 |
| 4.3 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> | 44 |
| 4.3.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA DNA DO CINETOPLASTO - kDNA | 44 |
| 4.3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA HSP70 | 45 |
| 4.3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> | 46 |
| 4.4 DETECÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> RNA VÍRUS – LRV | 47 |
| 4.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA | 48 |
| 4.6 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL | 49 |
| 4.6.1 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA PARA CURVA PADRÃO | 49 |
| 4.6.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA CURVA PADRÃO | 50 |
| 4.6.3 PURIFICAÇÃO E RECOMBINAÇÃO DO FRAGMENTO PARA CURVA PADRÃO | 51 |
| 4.6.4 PREPARO DE CÉLULAS ELETROCOMPETENTES | 52 |
| 4.6.5 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS ELETROCOMPETENTES | 53 |
| 4.6.6 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA CURVA PADRÃO | 53 |
| 4.6.7 CÁLCULO PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS | 54 |
| 4.7 ENSAIO MULTIPLEX DE EXPRESSÃO GÊNICA | 55 |

| | |
|---|-----|
| 4.7.1 SELEÇÃO DOS GENES ALVO PARA MULTIPLEX _____ | 55 |
| 4.7.2 SÍNTESE DE CDNA PARA ENSAIO MULTIPLEX _____ | 56 |
| 4.7.3 PRÉ AMPLIFICAÇÃO PARA ENSAIO MULTIPLEX _____ | 56 |
| 4.7.4 PREPARO DA REAÇÃO E MONTAGEM DA PLACA PARA O ENSAIO MULTIPLEX 96x96 _____ | 57 |
| 4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS _____ | 58 |
| 4.9 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO <i>LEISHMANIA RNA VÍRUS 1</i> _____ | 59 |
| 4.9.1 ISOLAMENTO E CULTIVO DE PARASITAS <i>LEISHMANIA</i> EM MEIO DE CULTURA _____ | 59 |
| 4.9.2 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE CDNA E PCR _____ | 60 |
| 4.9.3 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA LRV _____ | 61 |
| 4.9.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE LRV _____ | 62 |
| | |
| 5 RESULTADOS _____ | 65 |
| | |
| 5.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, A DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> E A FREQUÊNCIA DE <i>LEISHMANIA RNA VÍRUS 1</i> _____ | 65 |
| 5.1.1 DETECÇÃO DE <i>LEISHMANIA RNA VÍRUS 1</i> _____ | 69 |
| 5.1.2 ANÁLISE DESCRITIVA CONSIDERANDO APENAS OS CASOS POSITIVOS PARA PELO MENOS UM DOS EXAMES REALIZADOS _____ | 71 |
| 5.1.3 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS EXAMES _____ | 73 |
| 5.2 A EXPRESSÃO GÊNICA DE HUMANOS E PARASITAS RELACIONADAS A CARGA PARASITÁRIA E CARGA VIRAL _____ | 77 |
| 5.2.1 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA _____ | 77 |
| 5.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL _____ | 77 |
| 5.2.3 A RELAÇÃO LRV1 X CARGA PARASITÁRIA _____ | 80 |
| 5.2.4 ENSAIO MULTIPLEX DE EXPRESSÃO GÊNICA _____ | 81 |
| FIGURA 24 – GENES HUMANOS EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA E ALTA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA _____ | 84 |
| 5.3 A FILOGENIA DO <i>LEISHMANIA RNA VÍRUS 1</i> _____ | 89 |
| 5.3.1 CARACTERÍSTICAS DAS SEQUÊNCIAS _____ | 89 |
| 5.3.2 DEFINIÇÃO DOS GRUPOS E SIMILARIDADE DAS SEQUÊNCIAS _____ | 90 |
| | |
| 6 DISCUSSÃO _____ | 97 |
| | |
| 6.1 ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA DA LT NO ESTADO DE RONDÔNIA _____ | 97 |
| 6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, DIRETO E INDIRETO, DA LT _____ | 101 |
| 6.3 A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES HUMANOS E DE <i>LEISHMANIA</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS _____ | 103 |
| 6.3.2 A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES HUMANOS EM LT _____ | 105 |

| | |
|---|-----|
| 6.3.3 A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES DE <i>LEISHMANIA</i> NA LT | 111 |
| 6.4 FILOGENIA MOLECULAR DE LRV1 | 115 |
| 7 CONCLUSÕES | 121 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 124 |
| ANEXOS | 149 |
| APÊNDICES | 150 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE NOVOS CASOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA NO ANO DE 2015. FONTE: WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD N 22, WHO, 2016. 21
- FIGURA 2 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA, RELATADOS ENTRE OS ANOS DE 1998 A 2014 NOS 12 PAÍSES DE MAIORES NOTIFICAÇÕES DE CASOS DA DOENÇA. FONTE: ADAPTADO DE WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD N 22, WHO, 2016. RAF: REGIÃO AFRICANA DA OMS; RAM: REGIÃO DAS AMÉRICAS DA OMS; RMO: REGIÃO DO MEDITERRÂNEO ORIENTAL DA OMS; REU: REGIÃO EUROPEIA DA OMS; RSA: REGIÃO DO SUDESTE ASIÁTICO DA OMS; RPO: REGIÃO DO PACÍFICO OCIDENTAL DA OMS. _____ 21
- FIGURA 3 – NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NOTIFICADOS NO BRASIL, POR REGIÃO, ENTRE OS ANOS DE 2005 A 2015. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS – SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN _____ 22
- FIGURA 4 - NÚMERO DE CASOS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NOTIFICADOS NA REGIÃO NORTE POR ESTADO ENTRE OS ANOS DE 2005 A 2015. FONTE: MINISTÉRIO DA SAÚDE/SVS – SISTEMA DE INFORMAÇÕES DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN _____ 23
- FIGURA 5 - FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: CUTÂNEA LOCALIZADA (A) E MUCOSA TARDIA (B). FONTE: LABORATÓRIO DE EPIDEMIOLOGIA GENÉTICA DA FIOCRUZ RONDÔNIA. _____ 26
- FIGURA 6 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DA PARTÍCULA VIRAL EM ISOLADO DE *LEISHMANIA GUYANENSIS*. AUMENTO DE 225.000 X. FONTE: WIDMER ET AL., 1989. _____ 32
- FIGURA 7 - ESQUEMA DA TRADUÇÃO DO *LEISHMANIA RNA VÍRUS* DO TIPO 1 E DO TIPO 2. ADAPTADO DE HARTLEY ET. AL., 2012. _____ 33
- FIGURA 8 - MODELO DA PLACA UTILIZADA PARA O ENSAIO MULTIPLEX DE EXPRESSÃO GÊNICA. FONTE: MANUAL DE USO DO FLUIDIGM. MODELO DO CHIP 96.96 DYNAMIC ARRAY IFC FOR GENE EXPRESSION. _____ 58
- FIGURA 9 – ESQUEMA DO GENOMA DO LRV1 COM DESTAQUE PARA A REGIÃO DE AMPLIFICAÇÃO DOS INICIADORES LRV F E LRV ORF2. _____ 61
- FIGURA 10 – GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NA PCR PARA KDNA. GEL DE AGAROSE A 2% CORADO COM GELRED. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50PB. LINHAS 2 A 6: AMOSTRAS POSITIVAS PARA O MARCADOR KDNA. LINHA 7: CONTROLE POSITIVO E LINHA 8: CONTROLE NEGATIVO _____ 65

- FIGURA 11 – GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NA PCR PARA HSP70. GEL DE AGAROSE A 2% CORADO COM GELRED™. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50 PARES DE BASE. LINHAS 2 A 6: AMOSTRAS POSITIVAS PARA HSP70. LINHA 7: AMOSTRA NEGATIVA PARA HSP70. LINHA 8: CONTROLE POSITIVO DA REAÇÃO. LINHA 9: CONTROLE NEGATIVO. _____ 66
- FIGURA 12 – HISTOGRAMA COM A FREQUÊNCIA RELATIVA REPRESENTANDO A DISTRIBUIÇÃO DA IDADE DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO. _____ 69
- FIGURA 13 – GEL DE AGAROSE COM FRAGMENTOS AMPLIFICADOS NA PCR PARA DETECÇÃO DO LRV1. GEL DE AGAROSE A 2% CORADO COM GELRED. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50PB. LINHAS 2 A 5: AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV. LINHA 6: AMOSTRA NEGATIVA. LINHAS 7 E 8: CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO, RESPECTIVAMENTE. _____ 70
- FIGURA 14 - GEL DE AGAROSE PARA CONFIRMAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DO FRAGMENTO PARA CURVA PADRÃO. GEL DE AGAROSE A 2% CORADO COM GELRED. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50PB E LINHA 2: FRAGMENTO PURIFICADO DA AMOSTRA CP. _____ 78
- FIGURA 15 - GEL DE AGAROSE COM AS COLÔNIAS SELECIONADAS PARA PCR DE COLÔNIA. GEL DE AGAROSE A 2% CORADO COM GELRED. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 50PB; LINHAS 2 A 11: COLÔNIAS SELECIONADAS POSITIVAS PARA A TRANSFORMAÇÃO; LINHA 12: CONTROLE POSITIVO DA PCR E LINHA 13: CONTROLE NEGATIVO DA PCR _____ 78
- FIGURA 16 - GEL DE AGAROSE COM RESULTADO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO E PURIFICAÇÃO. FIGURA 17 A: GEL DE AGAROSE A 0,8% CORADO COM GELRED™. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 1KB. LINHA 2: FRAGMENTO APÓS REAÇÃO DE RESTRIÇÃO COM A ENZIMA NOTI. FIGURA 17 B: GEL DE AGAROSE A 1% CORADO COM GELRED™. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR DE 250 PB. LINHA 2: FRAGMENTO APÓS PURIFICAÇÃO. _____ 79
- FIGURA 17 – GRÁFICO DA CURVA PADRÃO OBTIDA POR ENSAIO DE QPCR COM AS DILUIÇÕES SERIADAS DO FRAGMENTO DE LRV1 PURIFICADO. _____ 79
- FIGURA 18 - DISTRIBUIÇÃO DAS 62 AMOSTRAS COM CARGA VIRAL DE LRV1 DETECTADA POR QPCR. OS PONTOS SE CORRELACIONAM NO EIXO X AO NÚMERO DE CÓPIAS DE VÍRUS EQUIVALENTE AO NÚMERO DE PARASITAS. _____ 80
- FIGURA 19 - ILUSTRANDO A CORRELAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE CARGA PARASITÁRIA E PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE LRV1. _____ 81
- FIGURA 20 – GENES EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS POSITIVAS E NEGATIVAS PARA LT. LEISHN = AMOSTRAS POSITIVAS

PARA LT; LEISHP = AMOSTRAS NEGATIVAS PARA LT. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 82

FIGURA 21 - GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS NOS GRUPOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA E ALTA CARGA PARASITÁRIA. LOWP = AMOSTRAS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA; HIGHP = AMOSTRAS COM ALTA CARGA PARASITÁRIA. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 83

FIGURA 22 – GENE HUMANO EXPRESSO DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA E AMOSTRAS DE LESÃO MUCOSA. LC = AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA; LM = AMOSTRAS DE LESÃO MUCOSA. - = VALOR DE $P \leq 0,1$. 83

FIGURA 23 – GENES HUMANOS EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA E ALTA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO MUCOSA. LOWP = AMOSTRAS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA; HIGHP = AMOSTRAS COM ALTA CARGA PARASITÁRIA. - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 84

FIGURA 24 – GENES HUMANOS EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA E ALTA CARGA PARASITÁRIA EM AMOSTRAS DE LESÃO CUTÂNEA. LOWP = AMOSTRAS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA; HIGHP = AMOSTRAS COM ALTA CARGA PARASITÁRIA. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 84

FIGURA 25 – GENES HUMANOS EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS NEGATIVAS PARA O LRV1 EM COMPARAÇÃO COM AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV1. LRVNEG = AMOSTRAS NEGATIVAS PARA O LRV; LRVPOS = AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 85

FIGURA 26 – GENES HUMANOS EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS NEGATIVAS E POSITIVAS PARA O LRV1 EM LESÕES MUCOSAS. LRVNEG = AMOSTRAS NEGATIVAS PARA O LRV; LRVPOS = AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 86

FIGURA 27 – GENES DE *LEISHMANIA* EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA X ALTA CARGA PARASITÁRIA. LOWP = AMOSTRAS COM BAIXA CARGA PARASITÁRIA; HIGHP = AMOSTRAS COM ALTA CARGA PARASITÁRIA. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; - = VALOR DE $P \leq 0,1$. _____ 87

FIGURA 28 - GENES DE *LEISHMANIA* EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS LRV1 NEGATIVO X LRV1 POSITIVO. LRVNEG = AMOSTRAS NEGATIVAS PARA O LRV; LRVPOS = AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; ** = VALOR DE $P \leq 0,01$. _____ 87

FIGURA 29 - GENES DE *LEISHMANIA* EXPRESSOS DIFERENCIALMENTE ENTRE OS GRUPOS DE AMOSTRAS LRV NEGATIVO X LRV POSITIVO EM LESÕES CUTÂNEAS. LRVNEG = AMOSTRAS NEGATIVAS PARA O LRV; LRVPOS = AMOSTRAS POSITIVAS PARA O LRV. * = VALOR DE $P \leq 0,05$; ** = VALOR DE $P \leq 0,01$. _____ 88

FIGURA 30 - MAPA PARCIAL DA AMÉRICA DO SUL INDICANDO A DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS CEPAS DE *LEISHMANIA* POSITIVAS PARA LRV1, INCLUINDO AS SEQUENCIAS DO PRESENTE ESTUDO. MAPA PARCIAL DO BRASIL (BRANCO), DIVIDIDO PELOS ESTADOS. PAÍSES VIZINHOS (CINZA) E BOLÍVIA E GUIANA FRANCESA EM CINZA ESCURO. OS GRUPOS SÃO OS MESMOS QUE RELATADOS POR TIRERA ET. AL. (2017). OS NÚMEROS INDICAM AS SEQUÊNCIAS ANALISADAS DE CADA REGIÃO GEOGRÁFICA, SEGUINDO A ID APRESENTADA NA TABELA 17. O MAPA FOI CONSTRUÍDO USANDO O QUANTUM GIS VERSÃO 2.18.13 ([HTTP://DOWNLOAD.QGIS.ORG](http://download.qgis.org)), AS CAMADAS DE BASE FORAM ADQUIRIDAS DE CARLOS EFRAIN PORTO TAPIQUEN, OROGENESIS SOLUCIONES GEOGRAFICAS, PORLAMAR, VENEZUELA, 2015, BASEADO EM FORMAS DO INSTITUTO DE PESQUISA DE SISTEMAS AMBIENTAIS (ESRI) COM DISTRIBUIÇÃO GRATUITA ([HTTP://TAPIQUEN-SIG.JIMDO.COM](http://tapiquen-sig.jimdo.com)). OS PONTOS CORRESPONDENTES DE CIDADES E PAÍSES FORAM OBTIDOS DO GOOGLE EARTH ([HTTP://EARTH.GOOGLE.COM](http://earth.google.com)). _____ 89

FIGURA 31 - ÁRVORE FILOGENÉTICA DE *LEISHMANIA* RNA VIRUS 1 DETECTADOS EM DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*) DE PAÍSES DA AMÉRICA DO SUL. OS GRUPOS A A F FORAM DEFINIDOS ANTERIORMENTE (TIRERA ET AL., 2017). L.B. = *L. BRAZILIENSIS*; L.G. = *L. GUYANENSIS*; L. = *L. SHAWI*. PARA DETALHES DAS AMOSTRAS, VER TABELA 17. A ÁRVORE FOI INFERIDA COM BASE NO MODELO TAMURA 92 E DISTRIBUIÇÃO GAMMA. SÃO MOSTRADOS OS VALORES DE BOOTSTRAP (APÓS 10.000 REPETIÇÕES) ACIMA DE 70%. _____ 91

FIGURA 32 – NEIGHBORNET MOSTRANDO A RELAÇÃO ENTRE SEQUÊNCIAS DE LRV1 DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*). _____ 92

FIGURA 33 – MINIMUM SPANNING NETWORK MOSTRANDO A CONEXÃO ENTRE AS SEQUÊNCIAS DE LRV1 DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*).__ 93

FIGURA 34 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DA CORRESPONDÊNCIA ENTRE OS GRUPOS FORMADOS POR LRV1 (CONFORME DEFINIDO NO PRESENTE ESTUDO) E OS GRUPOS DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*) AGRUPADOS POR MLSA. DEMONSTRAÇÃO DOS CLUSTERS FORMADOS EM ANÁLISES DE SEQUÊNCIAS DE LRV, CONFORME DETALHADO NA FIGURA 20, EM COMPARAÇÃO COM A FORMAÇÃO DOS CLUSTERS FORMADOS APÓS ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DE DIFERENTES ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* (*VIANNIA*) RELATADAS POR BOITÉ E COLABORADORES EM 2012. DO ESQUEMA FORAM EXCLUÍDOS GRUPOS FORMADOS POR ESPÉCIES QUE NÃO APRESENTARAM GRUPOS RELACIONADOS NAS ANÁLISES DE LRV. _____ 118

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - PROTOCOLO PARA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA O ALVO DO DNA DO CINETOPLASTO (kDNA) | 45 |
| TABELA 2 - PROTOCOLO DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO PARA HSP70 | 46 |
| TABELA 3 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) | 47 |
| TABELA 4 - PROTOCOLO PARA SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) | 47 |
| TABELA 5 - PROTOCOLO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA A DETECÇÃO DE <i>LEISHMANIA</i> RNA VÍRUS (LRV) | 48 |
| TABELA 6 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA | 49 |
| TABELA 7 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) PARA CURVA PADRÃO | 50 |
| TABELA 8 - PROTOCOLO PARA SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR (cDNA) | 50 |
| TABELA 9 - PROTOCOLO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA A CURVA PADRÃO DA CARGA VIRAL DE LRV | 51 |
| TABELA 10 - PROTOCOLO DA RECOMBINAÇÃO DO VETOR E INSERTO | 52 |
| TABELA 11 - PROTOCOLO DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO | 54 |
| TABELA 12 - PROTOCOLO UTILIZADO NA PCR EM TEMPO REAL PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO | 55 |
| TABELA 13 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR | 56 |
| TABELA 14 - PROTOCOLO DE DILUIÇÃO DOS INICIADORES PARA A PRÉ AMPLIFICAÇÃO | 56 |
| TABELA 15 - PROTOCOLO UTILIZADO PARA A PRÉ AMPLIFICAÇÃO DO cDNA | 57 |
| TABELA 16 - PROTOCOLO UTILIZADO NO PREPARO NA REAÇÃO PARA ENSAIO MULTIPLEX | 57 |
| TABELA 17 – PROTOCOLO DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 850 PB DO LRV | 61 |
| TABELA 18 – RELAÇÃO DAS SEQUENCIAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES DE FILOGENIA E DIVERGÊNCIA GENÉTICA. | 63 |
| TABELA 19 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DO EXAME PARASITOLÓGICO DIRETO E DETECÇÃO MOLECULAR DE DNA POR MEIO DE PCR DOS MARCADORES kDNA E HSP70, SUAS RESPECTIVAS PROPORÇÕES E INTERVALOS DE CONFIANÇA DE 95%, | |

| | |
|---|----|
| CONSIDERANDO APENAS O SUBCONJUNTO DE CASOS POSITIVOS (%[+]) E DO TOTAL DOS CASOS SUSPEITOS (%[+ OU -]) DE LT COM AS FORMAS CUTÂNEAS E MUCOSAS DA DOENÇA _____ | 67 |
| TABELA 20 – ANÁLISE DESCRITIVA DAS VARIÁVEIS DISCRETAS SEXO; OCORRÊNCIA DE LEISHMANIOSE PREGRESSA (“LT PREGRESSA”); FORMA DE AQUISIÇÃO PROVÁVEL (“AQUISIÇÃO”), SENDO CLASSIFICADA COMO “TRABALHO” OU “LAZER”, AGRUPADAS PELO RESULTADO POSITIVO EM QUALQUER UM DOS EXAMES _____ | 68 |
| TABELA 21 – ESTATÍSTICA DESCRITIVA DA IDADE DOS PACIENTES _____ | 69 |
| TABELA 22 – DETECÇÃO DO <i>LEISHMANIA RNA VIRUS 1</i> EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>LEISHMANIA</i> SP. POR TIPO DE LESÃO. _____ | 70 |
| TABELA 23 – DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS PARA LRV1, CLASSIFICADOS PELA AUSÊNCIA OU PRESENÇA DO LRV1, PELO TIPO DE LESÃO E PELA ESPÉCIE DO PARASITA NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA HSP70 _____ | 71 |
| TABELA 24 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS, RELATIVAS DOS DADOS OBTIDOS EM RELAÇÃO AO SEXO, TIPO DE LESÃO, FORMA DE AQUISIÇÃO DA DOENÇA, PRESENÇA DE LEISHMANIOSE PREGRESSA E RESULTADOS DOS TESTES PARASITOLÓGICOS E LRV1. _____ | 72 |
| TABELA 25 – FREQUÊNCIA DAS ESPÉCIES DE <i>LEISHMANIA</i> ENCONTRADAS POR MEIO DA TÉCNICA DE DIGESTÃO DE PRODUTO DE PCR DO FRAGMENTO HSP70 _____ | 73 |
| TABELA 26 – RESULTADO CONJUNTO DOS EXAMES REALIZADOS, AGRUPADOS PELO TIPO DE LESÃO _____ | 74 |
| TABELA 27 – RESULTADOS ISOLADOS DOS EXAMES E EXAMES MOLECULARES COMBINADOS, PARA O TOTAL DE CASOS POSITIVOS E AGRUPADOS POR TIPO DE LESÃO _____ | 74 |
| TABELA 28 - PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE DOS TESTES CONSIDERANDO 2 CENÁRIOS _ | 75 |
| TABELA 29 - PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE DOS TESTES, AVALIANDO APENAS PACIENTES COM LESÃO MUCOSA, CONSIDERANDO DOIS CENÁRIOS. _____ | 76 |
| TABELA 30 - PARÂMETROS DE SENSIBILIDADE DOS TESTES, AVALIANDO APENAS PACIENTES COM LESÃO CUTÂNEA, CONSIDERANDO DOIS CENÁRIOS _____ | 76 |

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de contrair a infecção, com registro aproximado de dois milhões de novos casos ao ano. Existem quatro formas mais frequentes de apresentação clínica da doença: Leishmaniose visceral (LV) (também conhecida como Calazar), Leishmaniose dérmica pós-kala-azar (PKDL), e duas formas de leishmaniose tegumentar (LT) que são classificadas em Leishmaniose cutânea (LC) e Leishmaniose Mucosa (LM), sendo a LC a forma clínica mais frequente ao passo que a LV pode se tornar uma forma mais séria, podendo ser fatal em casos não tratados. Além disso, as leishmanioses podem ser classificadas como uma infecção antroponótica ou zoonótica, quando o reservatório natural do parasita é humano ou animal, respectivamente (WHO, 2016).

A LT é uma doença infecciosa causada por parasitas intracelulares do gênero *Leishmania* que acomete pele e mucosas. A infecção é transmitida ao homem através da picada do inseto flebotomíneo fêmea infectado com parasitas *Leishmania* durante o repasto sanguíneo, onde o ser humano é acometido acidentalmente, por se tratar de uma infecção de perfil zoonótico (WHO, 2016). O ciclo biológico do parasita *Leishmania* é bem estabelecido (KILLICK-KENDRICK, 1990), porém, existem mecanismos de escape do parasita frente ao sistema imune do hospedeiro que ainda são desconhecidos (DA-CRUZ et al., 2002; DUTRA et al., 2011; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; HARTLEY et al., 2012a).

São conhecidas mais de 20 espécies de *Leishmania* que causam infecções em humanos. Essas espécies são amplamente distribuídas em todo o globo, com maior concentração em regiões tropicais e subtropicais e são transmitidas ao homem pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectados, durante o repasto sanguíneo (WHO, 2013).

O parasita *Leishmania* pertence ao Reino Protozoa; filo Mastigophora; ordem Kinetoplastida; família Trypanossomatidae e gênero *Leishmania*. O

gênero *Leishmania* é subdividido em três subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) (LAINSON; RYAN; SHAW, 1987) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*) (NOYES, 1998), esse incluindo apenas parasitas de lagartos, enquanto os outros dois incluem as espécies já descritas como patógenos humanos.

No Brasil foram identificadas oito espécies de *Leishmania* patogênicas ao ser humano, sendo duas do subgênero *Leishmania*: *L. infantum* e *L. amazonensis* e seis espécies do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. shawi* e *L. lindenbergi*. Das oito espécies identificadas no Brasil, todas ocorrem na Amazônia brasileira (BRASIL, 2008, 2010; LAINSON, 2010; SILVEIRA et al., 2002; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Até o ano de 2015, a leishmaniose tegumentar era considerada endêmica em 87 países (Figura 1). De acordo com a classificação das regiões pela Organização Mundial de Saúde, mais de 90% dos casos de LT estão concentrados nas regiões do Mediterrâneo (70%) e nas regiões das Américas (23%) (WHO, 2017).

Do número global de casos de LT reportados no ano de 2015, cinco países (Afeganistão, Brasil, Irã, Iraque e Síria) concentram 75% dos casos notificados, o que representa acima de 10.000 notificações da doença. Quando incluídas as notificações de mais sete países (Algeria, Colômbia, Marrocos, Peru, Sudão, Tunísia e Yemen), são então concentrados 90% dos casos de LT em todo o mundo (WHO, 2017).

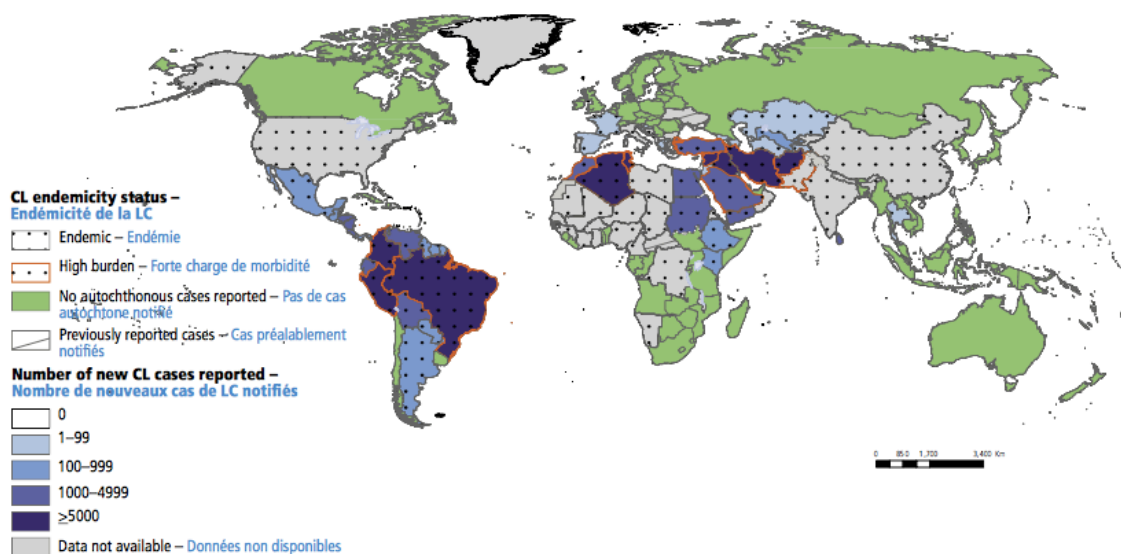


Figura 1 – Distribuição geográfica de novos casos de leishmaniose cutânea no ano de 2015. Fonte: Weekly epidemiological record n 22, WHO, 2016.

Entre os 12 países que mais reportaram casos de LC entre os anos de 1998 e 2014, pôde-se constatar que os casos de notificação autóctone triplicaram durante um período de tempo relativamente curto, e passaram de pouco mais de cinquenta mil (50.000) casos em 1998 para acima de cento e cinquenta mil (150.000) casos em 2005 (Figura 2).

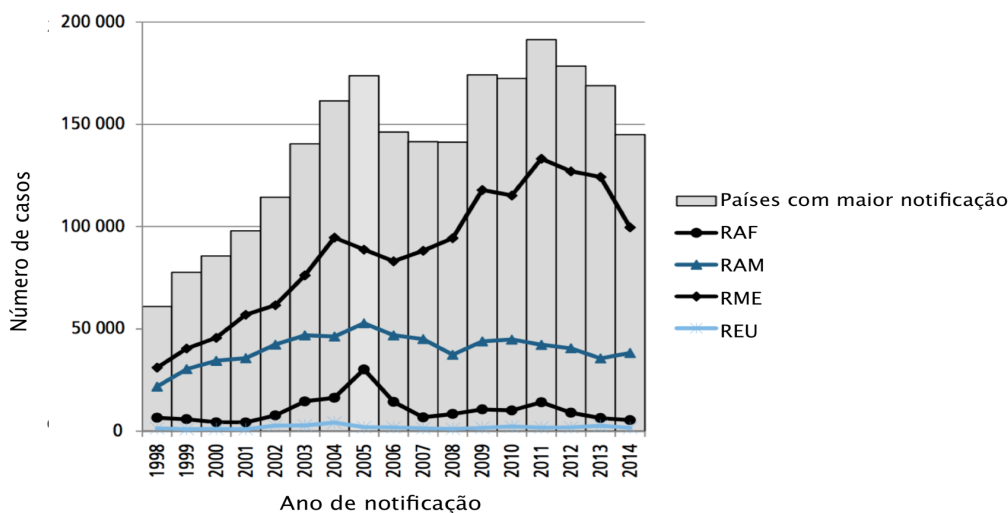


Figura 2 – Número de casos de leishmaniose cutânea, relatados entre os anos de 1998 a 2014 nos 12 países de maiores notificações de casos da doença. Fonte: adaptado de Weekly epidemiological record n 22, WHO, 2016. RAF: Região Africana da OMS; RAM: Região das Américas da OMS; RMO: Região do Mediterrâneo Oriental da OMS; REU: Região Europeia da OMS; RSA: Região do Sudeste Asiático da OMS; RPO: Região do Pacífico Ocidental da OMS.

No Brasil, até a década de 1950, os casos autóctones de LT

concentravam-se em alguns estados das regiões Sudeste e Nordeste, e estavam associados a atividades de desmatamento e instalação de novos assentamentos (BRANDÃO-FILHO et al., 1999; PASSOS et al., 1993). Com o aumento de tais atividades ocorreram mudanças no perfil epidemiológico da LT, e a partir do ano de 2003, o Brasil atingiu níveis endêmicos da doença, onde todos os estados registraram casos autóctones. Desde então, a LT que era considerada uma doença tipicamente mantida por reservatórios selvagens na floresta, se tornou uma doença periurbana em áreas desmatadas (BRASIL, 2017a).

A Região Norte vem contribuindo com o maior número de casos de LT, totalizando 42% dos casos notificados no ano de 2015 (Figura 3) e com os coeficientes de detecção mais elevados, registrando 55,53 casos por 100.000 habitantes, seguido das regiões Centro-oeste (23,11 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (12,66 casos por 100.000 habitantes) (BRASIL, 2017c).

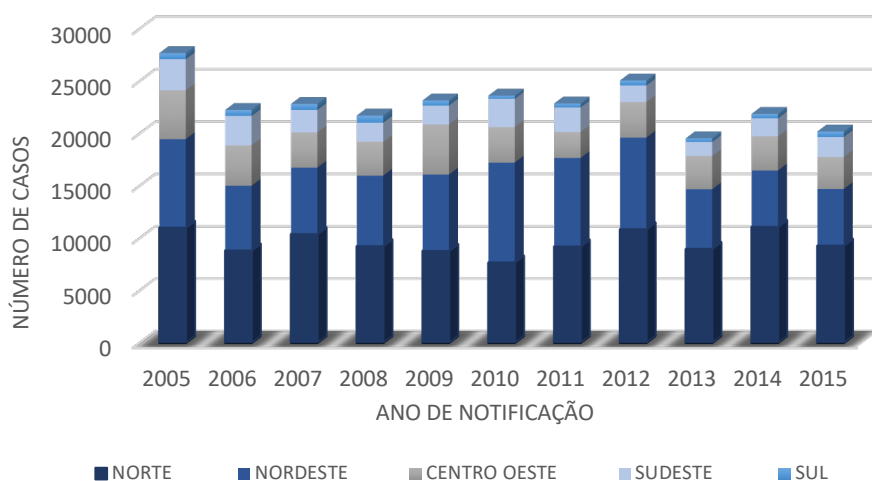


Figura 3 – Número de casos de leishmaniose tegumentar notificados no Brasil, por região, entre os anos de 2005 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN

Dentre os estados da região Norte, o Pará é o estado que possui o maior número de casos notificados, seguido dos estados do Amazonas e Rondônia (Figura 4), porém, quando avaliados os coeficientes de detecção, os números são alarmantes nos estados do Amapá (147,42 por 100.000 habitantes), Acre (146,81 por 100.000 habitantes) e Roraima 99,00 por 100.000 habitantes).

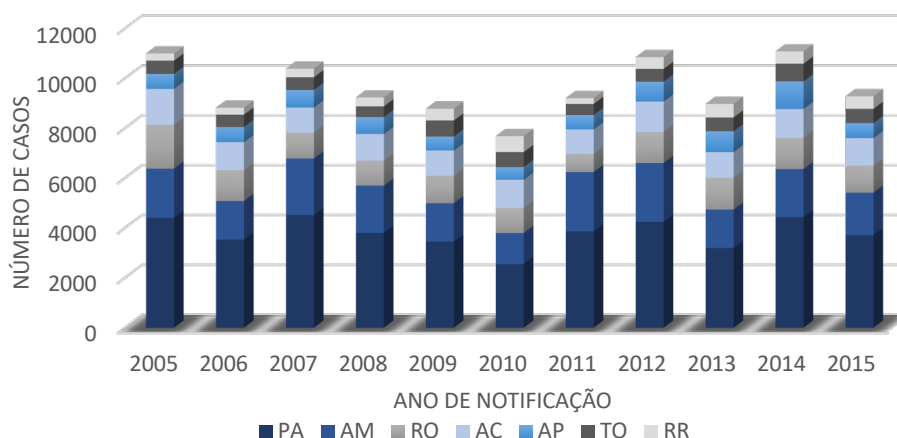


Figura 4 - Número de casos de leishmaniose tegumentar notificados na região Norte por estado entre os anos de 2005 a 2015. Fonte: Ministério da Saúde/SVS – Sistema de Informações de Agravos de Notificação - SINAN

O estado de Rondônia notifica em média 1.000 novos casos por ano, sendo o terceiro estado com maior índice de notificação, 71,54 por 100.000 habitantes.

1.2 A DIVERSIDADE DE FLEBOTOMÍNEOS E ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Existem cerca de 1.000 espécies de flebotomíneos validadas no mundo e dessas, 530 espécies conhecidamente ocorrem nas Américas (SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017), e apenas 93 espécies são comprovadas ou são prováveis vetores das leishmanioses, os demais insetos catalogados não atendem aos critérios que incriminam uma espécie com potencial vetorial (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Essa lista está em frequente mudança conforme os estudos de vetores avançam.

No Brasil já foram relatadas 275 espécies de flebotomíneos e aproximadamente 10% dessas espécies são incriminadas como transmissores da leishmaniose tegumentar (SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017). A maioria dessas espécies são endêmicas na região Amazônica brasileira, abundância que pode estar relacionada com a alta biodiversidade da região, com a variabilidade de ecossistemas e seus respectivos reservatórios mamíferos (RANGEL; LAINSON, 2009).

Em Rondônia diversos estudos foram conduzidos com a fauna de flebotomíneos e até o momento foram assinalados um total de 121 espécies

para o estado (GALARDO et al., 2015; GIL et al., 2003; OGAWA et al., 2016; RESADORE et al., 2017; TELES et al., 2013). Em um dos estudos de maior casuística conduzido na região central do estado de Rondônia foi relatada uma maior frequência de *Psychodopygus davisii* (39,6%), seguido de *Nyssomyia whitmani* (13,1%), *P. carrerai* (11,6%), e *P. hirsutus* (10,2%), com identificação por anticopo monoclonal de *L. naiffi* em pools de *P. davisii* e *P. hirsutus*, sugerindo que *P. davisii* seja um importante vetor zoonótico de leishmaniose tegumentar na região (GIL et al., 2003). Um trabalho anterior relata a presença de flagelados de *L. braziliensis* em *P. davisii* (GRIMALDI et al., 1991). Recentemente Resadore e colaboradores conduziram um estudo em diferentes localidades de Porto Velho, que além da identificação das espécies de flebotomíneos também investigaram a infecção natural dos espécimes coletadas por PCR, e observaram uma frequência elevada de *Bichronomyia antunesi* (25,07%), *Trichophoromyia ubiquitalis* (21,02%), *T. octavioi* (8,49%) e *L. flaviscutellata* (5,63%), com positividade para DNA de *Leishmania* em pools de *T. ubiquitalis* (3,28%), sugerindo que este seja um importante vetor de leishmaniose na região (RESADORE et al., 2017). Outro estudo conduzido em cavernas localizadas no interior do estado de Rondônia foi encontrado uma maior frequência de *L. ubiquitalis* (36,2%), seguido de *T. octavioi* (22,9%), onde foi detectada a presença de DNA de *Leishmania* em *T. auriensis*, *T. shawi* e *N. antunesi* (OGAWA et al., 2016).

Os vetores relatados são amplamente distribuídos em outras regiões da Amazônia, *Nyssomyia antunesi* e *T. ubiquitalis* são consideradas as espécies responsáveis pela manutenção da circulação de *Leishmania* na região devido as suas elevadas frequências, e são prováveis vetores de *Leishmania lindenbergi* (SILVEIRA et al., 2002) e *Leishmania lainsoni* (PEREIRA JÚNIOR et al., 2015; SILVEIRA et al., 1991), respectivamente.

A região amazônica também possui a maior diversidade conhecida de espécies de *Leishmania* que causam infecções em humanos. São um total de oito espécies, sendo sete responsáveis por casos de leishmaniose tegumentar, seis do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenbergi* e uma (1) do subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis* (CAMARA COELHO et al., 2011; CANTANHÊDE et al., 2015; GRIMALDI et al.,

1991; LAINSON, 2010; MARTINEZ et al., 2001; SILVEIRA et al., 2002; TELES et al., 2015; TOJAL DA SILVA et al., 2006).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Dentre a diversidade de aspectos que circundam a leishmaniose tegumentar, a pergunta que motiva grande parte dos estudos na área estão relacionadas ao amplo espectro clínico que a doença pode apresentar (ESCOBAR et al., 1992; KAYE; SCOTT, 2011).

A leishmaniose tegumentar é considerada complexa devido a diversidade de fenótipos clínicos observados no homem, relacionados principalmente a espécie do parasita (GUERRA et al., 2011; SANTRICH et al., 1990), a reposta imune (HARTLEY et al., 2012a; ROSSI; FASEL, 2017; SCOTT; NOVAIS, 2016) e a fatores genéticos do hospedeiro (CASTELLUCCI et al., 2006, 2010; SALHI et al., 2008). Na maioria dos casos, a lesão se instala no local onde ocorreu a picada do inseto vetor, após um período de incubação de duas semanas a três meses (BRASIL, 2017b). Essa lesão inicial pode curar espontaneamente ou, em situações mais comuns, apresentar uma das formas clínicas da doença (ESCOBAR et al., 1992; WEIGLE; SARAVIA, 1996).

A classificação da LT apresenta-se sob duas formas principais: cutânea e mucosa. A leishmaniose cutânea é subdividida nas formas localizada (LC), forma observada com maior frequência, disseminada (LCD), difusa (LD) e recidiva cútis. Na forma mucosa, são observados as formas tardia, concomitante, sem lesão prévia, contígua e primária (BRASIL, 2017b).

A forma mais comum da leishmaniose tegumentar é a forma cutânea localizada - LC (Figura 5 A), e se apresenta com lesões de pele, normalmente ulceradas em partes expostas do corpo. Aproximadamente 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central e mais de dois terços dos novos casos de LC ocorrem em seis países, incluindo o Brasil. Entre 0,6 e 1 milhão de novos casos ocorrem anualmente (WHO, 2016). A lesão é caracterizada por uma úlcera no local da picada da fêmea do flebotomíneo infectado, a lesão se inicia com um pequeno infiltrado inflamatório que tende a evoluir aumentando de tamanho e mantendo um formato arredondado, com borda elevada e fundo granuloso. É considerada o

tipo de lesão clássica de LT e que pode ainda, se resolver de forma espontânea ou após um ciclo do tratamento convencional. Na ausência de infecção secundária, a lesão pode apresentar-se indolor ou com pouca dor (BRASIL, 2017b).

A leishmaniose mucosa tardia (Figura 5 B) é considerada uma evolução clínica da LC que pode se apresentar meses ou anos após a lesão cutânea inicial em cerca de 5 a 10% dos pacientes com lesões de LC recuperadas. É a forma clínica mais comum das lesões mucosas e quase sempre associada a uma cicatriz de uma lesão cutânea anterior. Alguns pacientes relatam ausência de LC, porém no exame clínico deve ser observado a presença de cicatriz característica de leishmaniose cutânea, justamente pelo fato de a lesão ser considerada tardia em relação a LC. A LM é caracterizada por lesões destrutivas nas mucosas nasal e/ou oral, com resposta inflamatória exacerbada e normalmente de difícil diagnóstico laboratorial e tratamento. Mais de 90% dos casos de leishmaniose mucosa ocorrem na Bolívia, Brasil, Etiópia e Peru (WHO, 2016).

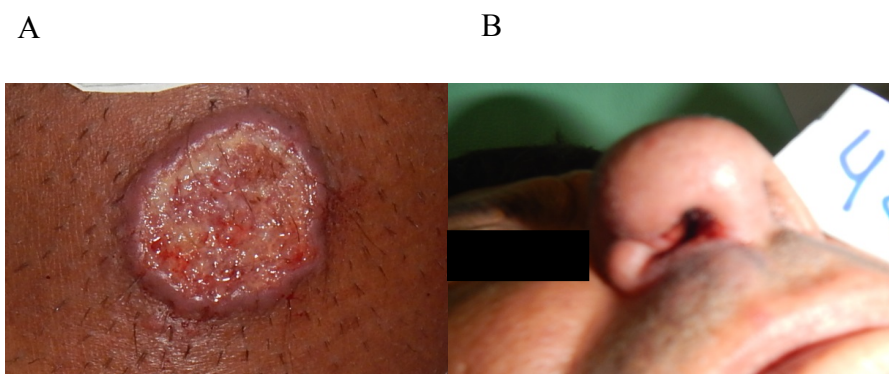


Figura 5 - Formas clínicas da leishmaniose tegumentar: cutânea localizada (A) e mucosa tardia (B). Fonte: Laboratório de Epidemiologia Genética da Fiocruz Rondônia.

De uma forma geral, cerca de 5 a 10% dos indivíduos assintomáticos ou com lesões de LC recuperadas desenvolvem a LM (AMATO et al., 2008a; DAVID; CRAFT, 2009). A Região Norte do Brasil contribui com o maior número de casos de LT e o percentual de casos de LM são superiores a média nacional. Em Rondônia são notificados cerca de 1000 novos casos por ano (68,29/100.000 habitantes) e destes, 12% são representados por casos de LM (BRASIL, 2014). As espécies relatadas associadas com lesões mucosas na região Amazônica

são *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, sendo a segunda espécie menos representativa em número de casos (GUERRA et al., 2011).

Os fatores que predispõem essa evolução clínica da LC para a LM têm natureza multifatorial e não estão totalmente esclarecidos. Serão abordados nos tópicos seguintes três aspectos relacionados à evolução clínica: i) o papel do parasita, ii) a resposta imune do hospedeiro e iii) a presença do *Leishmania RNA Virus 1* (LRV1) no interior de parasitas *Leishmania*.

1.3.1 O papel do parasita na evolução clínica da Leishmaniose Tegumentar

Um importante indicativo da evolução clínica da LT é a identificação da espécie do parasita envolvida na infecção. Apesar de tal indício não ter valor prognóstico no tratamento da doença, diferentes espécies são relacionadas com características clínicas específicas, como, por exemplo, a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose disseminada (LD) que são associadas a espécie *L. braziliensis* (CARVALHO et al., 1994; MARSDEN, 1985; QUEIROZ et al., 2012), a leishmaniose difusa (LCD) fortemente associada a *L. amazonensis* (BITTENCOURT et al., 1989; LEON et al., 1990; MILES et al., 1980) e ainda casos de falha terapêutica que são comumente associados à espécie *L. guyanensis* (BOURREAU et al., 2001; ROMERO et al., 2001).

A *L. braziliensis* é a espécie com maior distribuição geográfica no Brasil (GRIMALDI; DAVID; MCMAHON-PRATT, 1987; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994), e a responsável pelo maior número em casos de LT em humanos. Sua associação com formas atípicas da doença, levando a fenótipos clínicos distintos sugere que tais manifestações podem estar relacionadas a características genéticas específicas de determinadas cepas de *L. braziliensis* o que as diferenciam das demais cepas que levam ao fenótipo clínico mais comum da doença (GUIMARÃES et al., 2016; SILVA et al., 2018). Essa diversidade genética já havia sido relatada, porém sem associação clínica, mas sugerindo que polimorfismos observados nessa espécie contribui de forma positiva para o parasita em sua adaptação a diferentes ciclos de transmissão da doença (CUPOLILLO et al., 2003).

Após a infecção das formas promastigotas de *Leishmania*, estas iniciam o processo de colonização das células do sistema imune, primariamente de macrófagos, mas também de neutrófilos e células dendríticas. Uma parte dos parasitas são destruídos pelos macrófagos enquanto outras conseguem evadir o sistema imune e se instalar nos vacúolos parasitóforos, local onde o parasita se diferencia em amastigota e se multiplica por divisão binária (LEWIS; PETERS, 1977; MORADIN; DESCOTEAUX, 2012; OLIVIER et al., 2012).

São inúmeras e especializadas as interações entre *Leishmania* e macrófagos, que envolvem uma série de fatores de patogenicidade, o que possibilita que os parasitas utilizem da maquinaria da célula hospedeira para sua própria sobrevivência e multiplicação (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015).

Uma das proteínas de *Leishmania* mais estudadas, a mais abundante na superfície de promastigotas, é a metaloprotease de zinco (GP63) ou glicoproteína 63 (GOMEZ et al., 2009; YAO; DONELSON; WILSON, 2007). A GP63 é considerada um importante fator de virulência que cliva proteínas do hospedeiro, em especial alterando a maquinaria de fusão de membrana dos macrófagos para manipular processos essenciais para a fisiologia e função dessas células, possibilitando o processo de replicação do parasita (BRITTINGHAM et al., 1995; GOMEZ et al., 2009; OLIVIER et al., 2012).

Os mecanismos de subversão de drogas por parasitas *Leishmania* também são estudados por apresentarem importante papel na evolução clínica da LT. As proteínas de *Leishmania* envolvidas no metabolismo de antimoniais, com funções como a redução do fármaco intracelular e/ou sequestro do fármaco para o meio extracelular desempenham um papel fundamental no sucesso ou falha do tratamento e conseqüentemente na evolução clínica da LT. A exemplo estão as proteínas Aquagliceroporina 1 (AQP1) (GOURBAL et al., 2004), Proteína Associada a Resistência a Múltiplas drogas (MRPA) (EL FADILI et al., 2005), Redutase Dependente de Tio1 (TDR1) (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004), Arsenato Redutase (ACR2) (ZHOU et al., 2004), Tripanotona Redutase (TRYR) (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004) e as proteínas γ Glutamil-cisteína Sintetase (GSH1) e Glutaciona Sintetase 2 (GSH2) (GUIMOND et al., 2003).

Outras proteínas de *Leishmania* consideradas fatores de virulência do parasita estão com elevada expressão em cepas resistentes ao antimonial, como a ornitina descarboxilase (ODC) (DARLYUK et al., 2009) envolvida na síntese de aminoácidos essenciais do parasita, a Peroxiredoxina (PRX) que atua na defesa do parasita contra agente oxidantes juntamente com a Triparedoxina Redutase (TxP) (NOGOCEKE et al., 1997).

Portanto, além da espécie do parasita envolvida na infecção, as suas características genéticas também contribuem de forma positiva ou não para a evolução clínica da LT, pois determinadas características parecem influenciar desde a adaptação ao vetor e ao hospedeiro, bem como no momento da infecção das formas promastigotas de *Leishmania* e na geração da resposta imune após a infecção.

1.3.2 Aspectos imunológicos da Leishmaniose Tegumentar

A evolução clínica da LT está intimamente ligada a resposta imune gerada após a infecção pelo hospedeiro infectado. O desenvolvimento da LM é caracterizado pela presença de poucos parasitas no local da lesão secundária, após a migração parasitária, e ao mesmo tempo, por uma resposta imune exacerbada que leva a destruição tecidual, preferencialmente das mucosas nasal e/ou oral. Esse fenômeno é observado meses ou anos após a infecção primária e nas Américas é causada principalmente pela espécie *L. braziliensis*. O parasita se instala preferencialmente em macrófagos do hospedeiro, onde tem capacidade de diferenciação e replicação mesmo no ambiente agressivo em que se encontra, uma espécie de fagolisossoma. Mesmo após o recrutamento de células do sistema imune, como monócitos, macrófagos e neutrófilos, a *Leishmania* desenvolveu capacidade de se ocultar do sistema imune, afetando a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro para promover a sua própria sobrevivência (KAYE; SCOTT, 2011; ROSSI; FASEL, 2017; SCOTT; NOVAIS, 2016).

A resposta imune inata gerada após as primeiras horas após a infecção é crucial para o estabelecimento do parasita no meio intracelular da célula hospedeira, ao passo que as horas seguintes determinam o caminho da infecção, seja ele para a cura ou para a persistência parasitária (HARTLEY et al., 2014).

Na fase inicial pós infecção, a *Leishmania* se beneficia de propriedades pró inflamatórias presentes na saliva do flebotomíneo e que exerce quimio atração nos fagócitos, importante para a sua instalação (CHAGAS et al., 2014). Posteriormente são utilizados mecanismos de opsonização das células fagocíticas e mecanismos de proteção, como o Lipofosfoglicano (LPG) da *Leishmania* que recobre o parasita e o protege da lise mediada pelo complemento e ao mesmo tempo induz a ativação do complemento, promovendo a sua fagocitose (FRANCO; BEVERLEY; ZAMBONI, 2012; VINET et al., 2009).

No interior dos macrófagos, o desafio inicial do parasita é garantir a sua sobrevivência aos mecanismos de proteção dessas células. Os principais mecanismos são a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (FANG, 2004). Os produtos oriundos desses mecanismos são principalmente o NADPH oxidase 2 (NOX2) e óxido nítrico sintase (iNOS) que por sua vez produzem superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO) respectivamente (AKTAN, 2004; PANDAY et al., 2015).

Um dos principais mecanismos de sobrevivência do parasita é o LPG que protege o parasita de ROS e RNS (CARNEIRO et al., 2017; KIMA, 2007), mecanismo este desenvolvido principalmente pelas formas amastigotas do parasita (PHAM; MOURIZ; KIMA, 2005). O parasita também induz a célula hospedeira a produzir arginase, que utiliza o mesmo subproduto que iNOS, a arginina, diminuindo a produção de iNOS e estimulando a produção de nutrientes essenciais para a sobrevivência parasitária, como a L-ornitina utilizada para a síntese de poliaminas e uréia e conseqüentemente diminuindo também a produção de NO (GAUR et al., 2007). Outro inibidor de estresse oxidativo é a metaloprotease gp63, que interfere na via de sinalização do macrófago que induz a produção de NOX2 e iNOS (OLIVIER et al., 2012).

Esses mecanismos são exemplos claros da capacidade desenvolvida pelos parasitas *Leishmania* a fim de favorecer a sua infecção e sobrevivência no interior das células do sistema imune.

Após a ativação das células do sistema imune inato, ocorre o desenvolvimento da resposta imune adaptativa com a produção de citocinas pró inflamatórias. Em experimentos com camundongos, essa fase é polarizada para

dois tipos: resposta Th1 com produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), que leva a ativação da maquinaria de estresse oxidativo protegendo a célula hospedeira contra o parasita ou resposta do tipo Th2, com a produção principalmente de Interleucina 4 (IL-4) que leva ao fenótipo de susceptibilidade a infecção (OLIVEIRA et al., 2014) Vale ressaltar que essa polarização da resposta imune é dependente também do *background* genético do camundongo.

Uma outra citocina do perfil Th2, a Interleucina 10 (IL-10), produzida principalmente por células do tipo T reguladoras (Treg) é associada a persistência parasitária e resistência ao tratamento em infecções por *Leishmania* tanto em humanos como em camundongos (BOURREAU et al., 2001).

Diversos estudos vêm relatando que em humanos essa polarização não ocorre e que inclusive a produção exacerbada de TNF- α pode levar a fenótipos clínicos mais graves (ALEXANDER; BRYSON, 2005).

Um outro tipo de células T *helper*, a Th17 produz Interleucina 17 – IL-17 e em infecções por *L. braziliensis* leva ao fenótipo de cura (VARGAS-INCHAUSTEGUI; XIN; SOONG, 2008), ao passo que em casos de infecções por *L. guyanensis*, a produção de IL-17 está associada a susceptibilidade a infecção (HARTLEY et al., 2016; LOPEZ KOSTKA et al., 2009) e é contrária a produção de IFN- γ , ou seja, a polarização susceptibilidade/cura se dá pela presença de IL-17 ou IFN- γ , respectivamente e, ainda, essa polarização é associada a presença de um vírus de RNA no interior dos parasitas *Leishmania*, que quando presente é relacionado ao agravamento da infecção (HARTLEY et al., 2016).

O vírus de RNA que infecta a *Leishmania*, denominado de LRV1 (do inglês, *Leishmania RNA Virus 1*) (HARTLEY et al., 2012b; IVES et al., 2011) vem sendo associado como um dos fatores de evolução clínica da LT da forma cutânea para a forma mucosa. O LRV1 a ser destacado no presente trabalho é a participação do *Leishmania RNA Virus 1* – LRV1 através da avaliação de sua frequência nas diferentes formas clínicas observadas.

1.3.3 *Leishmania RNA Virus 1* e a sua relação com a evolução clínica

O *Leishmania RNA Vírus* - LRV foi descrito primariamente há algumas décadas em um isolado de promastigotas de *L. guyanensis*. Não houve correlação clínica da presença do vírus, porém, verificou-se que outros isolados analisados não possuíam as partículas virais (TARR et al., 1988). Posteriormente, a partícula viral foi caracterizada em outros dois isolados de *L. guyanensis* (Figura 6) onde foi verificado que as partículas virais possuíam forma circular. Posteriormente foram obtidas informações adicionais sobre o vírus, com indícios de se tratar de um vírus de dupla fita de RNA (dsRNA) (WIDMER et al., 1989). Nos anos seguintes o LRV foi descrito em 12 isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* provenientes da região amazônica (WEEKS et al., 1992b).

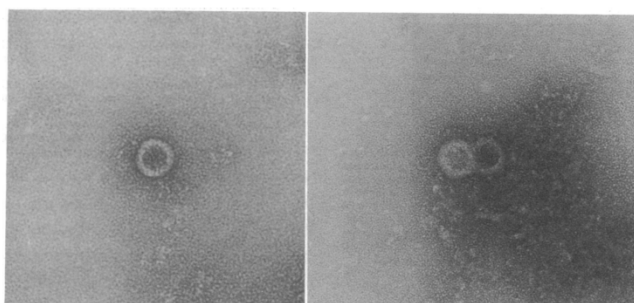


Figura 6 - Micrografia eletrônica da partícula viral em isolado de *Leishmania guyanensis*. Aumento de 225.000 x. Fonte: Widmer et al., 1989.

O LRV é um vírus de RNA de aproximadamente 5,3 kb que codifica a proteína do capsídeo viral e a RNA polimerase dependente de RNA (RDRP) (WEEKS et al., 1992b; WIDMER; PATTERSON, 1991). Devido as suas características de replicação o LRV foi classificado na família Totiviridae (PATTERSON, 1990).

Embora suas organizações genômicas sejam idênticas, há uma grande diversidade nas sequências de nucleotídeos entre os vírus de *Leishmania* (*Viannia*) e *L. major* (menos que 40 % de similaridade) (SCHEFFTER et al., 1995; SCHEFFTER; WIDMER; PATTERSON, 1994), o que os classificou em dois tipos, LRV 1 para os vírus de cepas do novo mundo e LRV2 para vírus de cepas do velho mundo.

O LRV é frequentemente encontrado em espécies de parasitas do Novo Mundo do subgênero *Viannia* (*Leishmania RNA vírus 1* - LRV1), e é encontrado esporadicamente em espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania*

(*Leishmania RNA virus 2* - LRV2) (SCHEFFTER et al., 1995; ZANGGER et al., 2014).

O LRV parece seguir a conformação dos demais Totivírus, embora haja uma variação no arranjo das sequências dos genes entre os tipos LRV1 e LRV2 (Figura 7). O LRV 1 possui uma sobreposição entre as regiões que codificam a proteína do capsídeo viral e a RNA polimerase. Essa particularidade não é observada nos vírus do tipo 2.

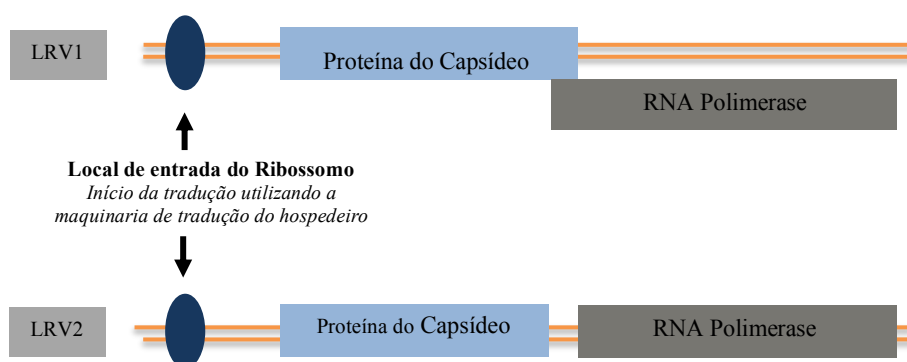


Figura 7 - Esquema da tradução do *Leishmania RNA Vírus* do tipo 1 e do tipo 2. Adaptado de Hartley et. al., 2012.

Em 1994, Scheffter e colaboradores classificaram o LRV1 em duas subespécies diferentes, LRV1-1 e LRV1-4, ao comparar os dois genomas dos primeiros vírus isolados de cepas *L. guyanensis* do Novo Mundo, através da evidência de similaridade em 76% de uma sequência de 5283 pares de bases (SCHEFFTER; WIDMER; PATTERSON, 1994). Dessa forma, o LRV1 foi dividido em subespécies classificadas de LRV1-1 a LRV1-14 (GUILBRIDE; MYLER; STUART, 1992; SCHEFFTER; WIDMER; PATTERSON, 1994) e o LRV2 em LRV2-1, apenas (SCHEFFTER et al., 1995). Atualmente são consideradas somente as espécies do LRV: LRV1 e LRV2.

A presença do vírus em *Leishmania* parece ser anterior à divergência desses parasitas pelo mundo e há evidências de evolução em conjunto com o hospedeiro. Isto porque, segundo estudos de filogenia, é possível observar que o intervalo genético entre as espécies do parasita e o encontrado entre as espécies do vírus LRV1 e 2 são semelhantes. Sendo, portanto, uma similaridade

dada de acordo com a distribuição geográfica das *Leishmania spp* (SCHEFFTER et al., 1995; WIDMER; DOOLEY, 1995).

Moléculas dsRNA não são produzidas por hospedeiros eucarióticos, que possuem vários mecanismos de detecção e inativação dessas moléculas. Os vírus dsRNA são replicados dentro do capsídeo, assim, o genoma do dsRNA nunca é exposto no citoplasma, sendo este um importante mecanismo de evasão da ativação do estado antiviral da célula hospedeira em resposta ao dsRNA (HULO et al., 2011).

A transcrição do genoma do dsRNA pela RPDR ocorre no interior do vírion. A fita positiva atua como RNA mensageiro (mRNA), dando origem a novas partículas virais, enquanto a fita negativa serve de molde para a transcrição em mRNA (MAGA; WIDMER; LEBOWITZ, 1995).

A tradução dos vírus da família Totiviridae ocorre no citoplasma do hospedeiro, produzindo um capsídeo que muitas vezes pode estar fusionado com a RDRP. Motivos de aminoácidos importantes para a função da polimerase são conservados entre as sequências de RDRP de diferentes membros da família Totiviridae sugerindo que os vírus possuem mecanismos semelhantes para a transcrição. As partículas virais maduras são transmitidas a novas células pela divisão celular (CADD et al., 1994; MAGA; WIDMER; LEBOWITZ, 1995).

Embora estudos moleculares sobre o LRV1 tenham mantido uma continuidade desde a sua primeira descrição, o interesse no seu papel funcional e clínico permaneceu desconhecido. Vários grupos especularam a influência da presença do LRV1 na virulência do parasita e passaram anos sem estudos relevantes sobre o impacto biológico do LVR1 em parasitas *Leishmania* (HARTLEY et al., 2012b). O interesse no LRV1 como um determinante para a virulência do parasita ressurgiu em 2011 por meio de um estudo realizado por Ives e colaboradores com o uso de clones de *L. guyanensis* isolados de pacientes. As amostras foram previamente classificadas devido a sua tendência a metástase, variando de altamente metastásico (M+) para não metastásico (M-) utilizando como modelo hamsters infectados. Entre os resultados obtidos foi observado que *L. guyanensis* (L.g.M+) que resultavam em lesões mucosas, apresentavam o vírus LRV1 e aumentavam a resposta imune endógena de forma não regulada, pois promoviam o aumento de citocinas inflamatórias.

Quando inoculados em camundongos, esses clones resultaram em um fenótipo de grave destruição da mucosa nasofaríngea, apesar da efetiva redução do número de parasitas. Os macrófagos infectados com o vírus apresentaram um fenótipo semelhante ao de macrófagos infectados com parasitas que causaram metástase, com aumento da expressão de quimiocinas e citocinas como CXCL10, CCL5, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6) demonstrando também que o LRV1 isoladamente, induz a amplificação da resposta inflamatória aos antígenos da *Leishmania* (IVES et al., 2011).

Posteriormente, diversos estudos exploraram a participação do LRV na evolução clínica da doença. Nosso grupo demonstrou que o risco relativo de desenvolvimento de lesão mucosa em pacientes com leishmaniose mucosa era de cerca de três vezes maior em relação aos pacientes sem o LRV (CANTANHÊDE et al., 2015). Ainda, o LRV foi relacionado com casos de falha terapêutica com o tratamento de primeira escolha em pacientes acometidos com *L. guyanensis* (BOURREAU et al., 2015) e em pacientes acometidos com *L. braziliensis* (ADAUI et al., 2015).

Outros relatos não identificaram o LRV1 em pacientes que apresentavam fenótipos clínicos de evolução da LT (OGG et al., 2003; PEREIRA et al., 2013).

Não se sabe como o LRV1 é mantido e transmitido em parasitas *Leishmania*. A transmissão extracelular de Totivírus é rara, embora já tenha sido documentada para vírus que infectam *Giardia lamblia* (RO et al., 1997). Na família Totiviridae, a propagação viral é vertical (de mãe para filho) ou horizontal (pela fusão de células) (DALZOTO et al., 2006). A infecção de vírus livre de *Leishmania* falhou ou durou apenas transitoriamente em estudo realizado por Armstrong (1993), fato este descrito em outros trabalhos com Totivírus. Assim, a transferência extracelular do vírus dsRNA provavelmente não ocorre em *Leishmania*. Um recente estudo que abordou a filogenia no LRV relata que existe uma distribuição do LRV dependente da espécie do parasita, dando suporte a hipótese de coevolução LRV/*Leishmania* (TIRERA et al., 2017).

1.4 DIAGNÓSTICOS CLÍNICO E LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

O diagnóstico de LT é realizado por meio da associação dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BRASIL, 2017b).

Os dados epidemiológicos associados ao exame clínico do paciente com suspeita de LT, em muitos casos é o necessário para o desfecho do diagnóstico, porém, o manual de vigilância da leishmaniose tegumentar recomenda o uso de pelo menos um exame laboratorial confirmatório para a infecção. Dessa forma, o diagnóstico da leishmaniose tegumentar é finalizado pela associação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BRASIL, 2017b).

Os exames laboratoriais são classificados em três categorias conforme o manual de vigilância da LT: parasitológicos, imunológicos e histopatológicos.

Os exames parasitológicos compreendem as técnicas de observação direta do parasita em lâmina, isolamento do parasita em meio de cultura, isolamento de parasita in vivo e detecção de DNA do parasita pela reação em cadeia da polimerase (PCR). O exame imunológico recomendado é a intradermoreação de Montenegro (IDRM), e no exame histopatológico o diagnóstico confirmatório é a presença de dermatite granulomatosa difusa ulcerada.

Os testes parasitológicos são mais específicos para o diagnóstico da LT, porém, apresentam desvantagens quanto a diminuição da sensibilidade relacionada ao tempo de evolução da doença (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015), com exceção da PCR, que é o mais indicado para o diagnóstico tardio da LT devido a elevada sensibilidade sendo capaz de detectar DNA em amostras diagnosticadas como negativa no exame parasitológico direto (MOHAGHEGH et al., 2013).

1.4.1 Reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico das leishmanioses

Dentre as técnicas parasitológicas, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido amplamente utilizada na clínica e laboratórios de pesquisa em todo o mundo devido as suas vantagens em relação aos métodos imunológicos

e histopatológicos. As vantagens se relacionam com a especificidade e a sensibilidade que a técnica apresenta (MOHAGHEGH et al., 2013; REIS et al., 2013; SILVA et al., 2013), além da possibilidade de um maior conhecimento sobre os parasitas, quando associada a outras técnicas moleculares, como por exemplo a identificação das espécies de *Leishmania* (ROELFSEMA et al., 2011) e ainda a detecção de casos assintomáticos (SILVA et al., 2013).

Uma das grandes desvantagens do uso da PCR para o diagnóstico é o seu elevado custo em relação ao exame de rotina, a detecção direta do parasita em lâmina. A detecção direta do parasita é de fácil e rápida execução, desde a coleta do material até a liberação do resultado, no entanto, o resultado final do exame depende de um bom profissional, inclusive para o diagnóstico diferencial principalmente em áreas endêmicas para outras doenças como histoplasmose (BAVA; TRONCOSO, 2013; THIAGO; DOS SANTOS; STEINDEL, 1998), esporotricose, cromoblastomicose, lacasiose e paracoccidiodomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017) e ainda apresenta sensibilidade inferior em relação ao PCR, sendo possível a detecção de DNA de *Leishmania* por PCR em lâminas com resultado negativo no exame de rotina (MOHAGHEGH et al., 2013).

Os métodos de coleta para aplicação da PCR para LT são variados, podendo ser utilizado sangue (SHAHBAZI et al., 2008), biópsias de pele (YEHIA et al., 2012) esfregaço da lesão (MOHAGHEGH et al., 2013; NEITZKE-ABREU et al., 2013). Devido a elevada sensibilidade da PCR é possível ainda o uso de técnicas menos agressivas de coleta levando a um menor desconforto ao paciente submetido ao exame (CANTANHÊDE et al., 2015; VALENCIA et al., 2012).

Os marcadores utilizados para a detecção do parasita também são diversos, sendo os mais utilizados para o diagnóstico da LT direcionados para o DNA do cinetoplasto - kDNA, o Espaçador Interno Transcrito - ITS1 e a proteína do choque térmico 70 - hsp70 (DA SILVA et al., 2010; DE CASSIA-PIRES et al., 2017; FIGUEROA et al., 2009; GRAÇA et al., 2012; ROELFSEMA et al., 2011; TOJAL DA SILVA et al., 2006).

O DNA do cinetoplasto consiste dos maxicírculos e dos minicírculos de kDNA. Os minicírculos têm aproximadamente 1000 pares de bases de comprimento, não possuem função definida e estão presentes entre 10.000 e

20.000 cópias por parasita, o que torna esse marcador como um dos mais utilizados em pesquisas que buscam a amplificação do DNA de *Leishmania* em diferentes tipos de amostras (CONTER et al., 2017; DEGRAVE et al., 1994; RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990; YILDIZ ZEYREK et al., 2017). Apesar de possuir uma região conservada entre as espécies de *Leishmania* de aproximadamente 200 pares de bases e possuir diversas variações no restante da sequência, esse marcador é pouco utilizado para diferenciação de espécies, principalmente do subgênero *Viannia* pois só permite a diferenciação entre gênero e subgênero e de poucas espécies (RODGERS; POPPER; WIRTH, 1990) e por isso tem desvantagem para ser aplicado em áreas com grande diversidade de parasitas (CONTER et al., 2017). Devido a alta sensibilidade do PCR kDNA, é possível a detecção de DNA de *Leishmania* em lesões de pacientes já submetidos ao tratamento completo e com cura clínica aparente (MARTÍNEZ-VALENCIA et al., 2017).

Um outro marcador muito utilizado é direcionado ao gene que codifica o espaçador interno transcrito - ITS1, que possibilita a identificação de espécies de *Leishmania* por RFLP ou sequenciamento (TOJAL DA SILVA et al., 2006), porém, algumas espécies são dificilmente separadas em gel de poliacrilamida após o RFLP, o que dificulta a sua aplicação em regiões com diversidade de espécies do subgênero *Viannia* (CANTANHÊDE, 2013; ROELFSEMA et al., 2011).

Marcadores direcionados para o gene que codifica a proteína do choque térmico 70 também são amplamente utilizados na pesquisa, principalmente devido a possibilidade de identificação da espécie do parasita quando associadas outras técnicas pós PCR como o sequenciamento ou o RFLP (GARCIA et al., 2007b, 2004; MONTALVO et al., 2010) e tem uma aplicação mais adequada para regiões onde circulam diferentes espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* como no Brasil (DA SILVA et al., 2010; MONTALVO et al., 2010). Inicialmente esse marcador apresentava pouca sensibilidade devido ao tamanho do fragmento amplificado, com cerca de 1400 pares de bases e posteriormente foram desenvolvidos iniciadores que amplificam fragmentos de 243 a 384 pares de bases de comprimento (GRAÇA et al., 2012). Uma das discussões em relação a esse marcador está relacionada a presença de

pseudogenes que podem apresentar em forma de bandas inespecíficas após a reação de restrição enzimática.

Uma das questões ainda em discussão é a escolha do marcador para o diagnóstico da LT. A determinação de um único marcador que possibilite a identificação de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* e que seja sensível para a aplicação em amostras clínicas ainda é um desafio principalmente em regiões endêmicas para diferentes espécies do parasita, como a região amazônica.

2 JUSTIFICATIVA

Um dos grandes desafios nos estudos da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas como a região amazônica é a complexidade da tríade epidemiológica. Na região existe uma diversidade de parasitas, ou seja, diversas espécies e cepas de *Leishmania* circulando, estas podendo apresentar um endossimbionte viral, o LRV1. São muitos os hospedeiros, vertebrados e invertebrados, que participam do ciclo evolutivo destes parasitas. O homem aparece como hospedeiro acidental e sua susceptibilidade será determinante no progresso da infecção.

A região Norte do Brasil concentra o maior número de casos de LT e consequentemente apresenta dificuldades na implementação de medidas de controle e prevenção da doença. Em Rondônia, pouco se conhece sobre o perfil de espécies de parasitas envolvidos nos casos humanos de LT, cenário que também é observado em outros estados da região Norte. Um estudo realizado pelo nosso grupo mostrou a ocorrência de pelo menos cinco diferentes espécies de *Leishmania* associadas a casos humanos de LT, com parasitas apresentando infecção pelo LRV1, fato que foi associado ao aumento do risco relativo do paciente apresentar lesão mucosa em até três vezes em relação aos pacientes com LT sem a presença do LRV1. No entanto, apesar de estudos com modelos experimentais apontarem para uma participação crucial do LRV1 na produção de metástase, observamos que o endossimbionte não é o único fator relacionado a evolução clínica da LT, haja vista que em uma porcentagem dos pacientes que apresentavam a forma mucosa da doença não foi detectada a presença do LRV1. Adicionalmente, parasitas contendo LRV1 parecem não circular em várias regiões endêmicas para LT e, portanto, não podem estar associados as formas metastáticas observadas nessas regiões.

O fato de *Leishmania* conter um endossimbionte torna ainda mais relevante os estudos da LT em regiões de circulação desses parasitas. Alguns estudos sugerem uma co-evolução de *Leishmania* e LRV, mas a investigação em áreas de circulação de uma única espécie do parasita limita as inferências.

A complexidade relatada aponta para a necessidade de investigação quanto ao papel do parasita, contendo ou não seu endossimbionte, e do hospedeiro humano na evolução clínica da LT em pacientes do Estado de Rondônia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento de fatores relacionados a evolução da leishmaniose tegumentar como a espécie do parasita, a presença do *Leishmania RNA Vírus 1* (LRV1), assim como a expressão de genes humanos e de genes do parasita com papel relevante na infecção.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil epidemiológico da leishmaniose tegumentar na área de abrangência do estudo;
- Determinar a sensibilidade dos testes de detecção de DNA de *Leishmania* versus o teste parasitológico direto;
- Verificar a frequência das espécies de parasitas *Leishmania* em casos humanos atendidos no Centro de Medicina Tropical de Rondônia;
- Relacionar a frequência do *Leishmania RNA Vírus 1* em pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa;
- Avaliar a influência da carga parasitária de *Leishmania* e da carga viral de LRV na expressão de genes da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro humano e na expressão de genes do parasita *Leishmania*.
- Investigar características filogenéticas de *Leishmania RNA Vírus 1* em diferentes espécies de *Leishmania*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Para a execução do projeto, foi obtida autorização do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Medicina Tropical de Rondônia (CEP/CEPEM), sob o número de Apreciação Ética CAAE nº 0020.0.046.000-11. Os pacientes com suspeita clínica de LT atendidos no Hospital de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON, foram convidados a participar da pesquisa e a sua participação foi formalizada com a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido –TCLE (APÊNDICE A).

Foram incluídos no estudo, um total de 734 amostras de pacientes com suspeita clínica de LT, coletadas no período de julho de 2013 a janeiro de 2017, onde foi realizada o teste molecular para detecção de *Leishmania* e posterior identificação da espécie do parasita, teste molecular para detecção do *Leishmania RNA Vírus* e isolamento do parasita em meio de cultura. Do total de 734 amostras de pacientes coletadas, 100 amostras coletadas no período de março de 2014 a fevereiro de 2015 foram consideradas para os experimentos de expressão gênica (Fluidigm), quantificação da carga viral (LRV) e da carga parasitária (*Leishmania*). Das amostras isoladas em meio de cultura, 13 foram detectadas com coinfeição por LRV1 e foram realizados os experimentos de sequenciamento parcial do genoma do *Leishmania RNA Vírus 1*.

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Após a assinatura do TCLE, os pacientes foram submetidos a um questionário (APÊNDICE B) que teve por finalidade a coleta de dados clínicos e epidemiológicos como idade do paciente, tempo de lesão e outros e, posteriormente, foi realizada a coleta das amostras biológicas, que consistiu em: duas escovas cervicais estéreis colocadas em contato direto com as lesões e armazenadas em solução de *RNA Later* (Ambion®) para preservar o RNA da amostra coletada, e uma coleta de aspirado de lesão, além do registro fotográfico da (s) lesão (ões). As duas coletas com escovas cervicais foram destinadas as extrações de DNA e RNA. A coleta de aspirado de lesão teve por finalidade o isolamento do parasita em meio de cultura.

As amostras coletadas para os testes moleculares foram mantidas em freezer a -20°C até o momento das análises moleculares, em torno de 5 dias.

O teste parasitológico direto (raspado) foi realizado no laboratório do hospital Cemetron conforme protocolo operacional padrão estabelecido pela equipe do hospital. Os resultados do exame foram encaminhados ao laboratório de Epidemiologia Genética da Fiocruz Rondônia juntamente com os dados clínicos e amostras coletadas para a realização da metodologia proposta.

4.3 DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

O teste inicial realizado com as amostras de suspeita clínica foi a detecção do DNA de *Leishmania* para confirmação da infecção. O teste foi realizado por PCR convencional para dois alvos moleculares distintos: o DNA do cinetoplasto (kDNA), que por ser um gene de múltiplas cópias apresenta alta sensibilidade e um fragmento do gene da proteína do choque térmico 70 (hsp70) que possibilita a identificação da espécie de *Leishmania*.

Para a extração de DNA total, foi utilizado o PureLink DNA MiniKit (Invitrogen®, Carlsbad, CA/USA) seguindo as recomendações do fabricante, adaptado para o tipo de amostra que foi coletada (escova cervical). O protocolo detalhado está disponível no Anexo 7.1. O DNA extraído foi submetido às duas reações de amplificação.

4.3.1 Reação em cadeia da polimerase para DNA do cinetoplasto - kDNA

A reação direcionada para o DNA do cinetoplasto (kDNA) foi realizada utilizando os iniciadores kDNA F- GGG(G/T) AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA e kDNA R - (C/G)(C/G)C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC (DEGRAVE et al., 1994) que amplifica um fragmento de aproximadamente 120 pares de bases, seguindo o protocolo descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Protocolo para reação em cadeia da polimerase para o alvo do DNA do cinetoplasto (kDNA)

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|-----------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 17,5 µL |
| Buffer | 10X | 2,5 µL |
| Iniciadores kDNA F + kDNA R | 10µM | 1 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 0,75 µL |
| dNTP Mix | 10mM cada | 0,5 µL |
| Taq Polimerase® | 5U/ µL | 0,25 µL |
| DNA | -- | 2,5 µL |
| Volume final | | 25 µL |

A reação em termociclador foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com os três passos seguintes, 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Como controle positivo das reações de detecção do DNA do parasita, foram utilizados DNAs extraídos de parasitas cultivados em meio de cultura (*Leishmania braziliensis* - MHOM/BR/2015/285, *Leishmania guyanensis* - MHOM/BR/2015/391 e *Leishmania amazonensis* - IFLA/BR/1967/PH8) Como controle endógeno foram utilizados iniciadores direcionados para a RNaseP, nas mesmas concentrações descritas na tabela 1.

Os fragmentos amplificados após a reação de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal (200V por 30 minutos) em gel de agarose a 2% e corados com GelRed™ (Biotium®, Hayward, CA/USA). Após eletroforese, os géis foram fotografados em fotodocumentador modelo ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala/Sweden).

4.3.2 Reação em cadeia da polimerase para hsp70

Para a amplificação do fragmento do gene da proteína do choque térmico 70 (hsp70) foram utilizados os iniciadores Hsp70cF 5'-GGACGAGATCGAGCGCATGGT-3' e Hsp70cR 5'-TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG-3' (GRAÇA et al., 2012) que amplifica um

fragmento de 234 pares de bases. A reação de amplificação foi realizada segundo protocolo descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Protocolo da reação de amplificação para hsp70

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|---------------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 37,25 µL |
| Buffer | 10X | 5 µL |
| Iniciadores hsp70c F + hsp70c R | 10µM | 3 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,5 µL |
| dNTP Mix | 10mM cada | 1 µL |
| Taq Polimerase® | 5U/ µL | 0,25 µL |
| DNA | -- | 5 µL |
| Volume final | | 50 µL |

Após o preparo da reação, as amostras foram colocadas no termociclador, com a seguinte configuração: um passo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 repetições dos três passos de amplificação (94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos), finalizado com a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Como controles positivos das reações, foram utilizados os DNA extraídos de parasitas em cultura, descritos no item 3.2.1.

Os fragmentos amplificados após a reação de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose e posterior registro da imagem, conforme descrito no item 3.2.1.

4.3.3 Identificação das espécies de *Leishmania*

Uma alíquota de 10 µL do produto amplificado na reação de PCR hsp70 foi utilizada para a reação de RFLP com as enzimas *HaeIII* e *BstUI* (1 unidade de enzima) em duas reações separadas, cada uma com o respectivo tampão da enzima na concentração 1X.

As amostras foram colocadas em banho-maria por no mínimo duas horas e no máximo 16 horas a 37° C em banho seco. Posteriormente, 5 µL da reação foi aplicado em gel de poli-acrilamida a 12% com voltagem igual a 120 por 1 hora. Os géis foram corados com nitrato de prata a 10% e visualizados em luz branca

para identificação das espécies a partir do perfil de bandas, conforme descrito por Graça et al., 2012.

4.4 DETECÇÃO DE LEISHMANIA RNA VÍRUS – LRV

A segunda coleta da lesão em escova cervical foi submetida a extração de RNA total, utilizando o PureLink RNA Mini Kit (Ambion® - Carlsbad, CA/USA) seguindo as recomendações do fabricante, com adequações ao tipo de amostra. O protocolo detalhado está disponível no Anexo B.

Ao final da extração de RNA, foi realizada a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando o *SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen® - Carlsbad, CA/USA), conforme protocolos descritos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Protocolo utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA)

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Random primer | 50 ng/ μ L | 1 μ L |
| dNTP | 10mM de cada dNTP | 1 μ L |
| H ₂ O DEPC | -- | 3 μ L |
| Volume final | | 5 μ L |

A esta reação, foi acrescido 5 μ L do RNA extraído. A reação foi mantida a 65°C por 5 minutos em termociclador e posteriormente colocado em gelo por 1 minuto e adicionado 10 μ L dos reagentes descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Protocolo para síntese de DNA complementar (cDNA)

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-------------------|---------------|-------------------|
| Buffer | 10X | 2 μ L |
| MgCl ₂ | 25 mM | 4 μ L |
| DTT | 0,1 M | 2 μ L |
| RNase OUT | 40 U/ μ L | 1 μ L |
| SuperScript® | 200U/ μ L | 1 μ L |
| Volume final | | 10 μ L |

A reação foi colocada em termociclador novamente, com as seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C para inativação das enzimas. Após inativação, a reação foi colocada em gelo e adicionado 1 µL de RNase H (40 U/µL) e mantida por 20 minutos a 37°C para exclusão dos RNAs remanescentes.

Um volume de 5 µL do cDNA foi submetido a PCR de acordo com o protocolo estabelecido da Tabela 5, utilizando os iniciadores LRV F - 5'-ATGCCTAAGAGTTTGGATTCG- 3' e LRV R - 5'-ACAACCAGACGATTGCTGTG - 3' (CANTANHÊDE et al., 2015) que amplifica um fragmento de 240 pares de bases.

Tabela 5 - Protocolo da reação em cadeia da polimerase para a detecção de *Leishmania* RNA Vírus (LRV)

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|---------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 38,25 µL |
| Buffer | 10X | 5 µL |
| Iniciadores LRV F + LRV R | 10µM | 2 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,5 µL |
| dNTP Mix | 10mM cada | 1 µL |
| Taq Polimerase® | 5U/ µL | 0,25 µL |
| DNA | -- | 5 µL |
| Volume Final | | 50 µL |

A PCR foi realizada sob as seguintes condições em termociclador: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Após amplificação por PCR, as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 2% (200 V por 30 minutos), coradas com GelRed® (Ambion) e posteriormente fotografadas em fotodocumentador, conforme descrito no item 3.2.1.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

Para a quantificação da carga parasitária, foram selecionadas 100 amostras, dentro do número total de pacientes incluídos no estudo. Uma alíquota

de DNA foi destinada ao experimento de quantificação absoluta da carga parasitária realizado em parceria o Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do Instituto Oswaldo Cruz - IOC.

O alvo molecular para a quantificação foi o hsp70, utilizando os iniciadores hsp70 Fw 5' -CACCATCACCAACGACAAGG - 3' e HSP70 Rv 5' - GTCGGAGACCGTGTCTTCA - 3' em conjunto com a sonda HSP70 Tq 5'- FAM CTGAGCAAGGACGGAT -NFQ-MGB - 3'.

Para o preparo das reações foi utilizado o protocolo descrito na tabela 6. As reações foram preparadas em placas de 384 poços e a corrida foi realizada no equipamento Viiia 7 (Applied Biosystem) com a seguinte configuração: 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

A curva padrão foi realizada na mesma placa, com sete pontos de diluição, iniciando em 10⁶ parasitas por mililitro até a diluição de 10⁰ parasitas por mililitro. Por se tratar de um projeto de cooperação com outra instituição de pesquisa, os dados de padronização do ensaio de quantificação da carga parasitária não serão apresentados.

Tabela 6 - Protocolo utilizado para a PCR em tempo real para quantificação da carga parasitária

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 0,85 µL |
| Mastermix TaqMan Roche | 2X | 5 µL |
| Iniciadores HSP70 F +R | 150µM | 0,15 µL |
| Mix RNase P | 20X | 0,5 µL |
| DNA | -- | 3 µL |
| Volume Final | | 10 µL |

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL

Para a padronização e quantificação da carga viral de LRV1 nas 100 amostras clínicas, foi realizada inicialmente a curva padrão do ensaio.

4.6.1 Extração de RNA e síntese de cDNA para curva padrão

A partir da extração de RNA da cepa MHOM/BR/2014/299 (denominada CP) utilizando o kit Purelink RNA Mini Kit (ambiom® - Carsbald, CA/USA)

seguido o protocolo proposto pelo fabricante, 150 ng do RNA extraído foi submetido à síntese de DNA complementar (cDNA) (Tabela 7), seguido de PCR e eletroforese em gel de agarose, sendo essas três etapas realizadas conforme descrito no item 3.4, com pequenas alterações de volume.

Tabela 7 - Protocolo utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA) para curva padrão

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
| Random primer | 50 ng/μL | 1 μL |
| dNTP | 10mM de cada dNTP | 1 μL |
| H ₂ O DEPC | -- | 5 μL |
| Volume final | | 7 μL |

A esta reação, foi acrescentado 3 μL do RNA extraído (correspondente a 150 ng de RNA). A reação foi mantida a 65°C por 5 minutos em termociclador e posteriormente colocado em gelo por 1 minuto e adicionado 10 μL dos reagentes descritos na tabela 8.

Tabela 8 - Protocolo para síntese de DNA complementar (cDNA)

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-------------------|--------------|-------------------|
| Buffer | 10X | 2 μL |
| MgCl ₂ | 25 mM | 4 μL |
| DTT | 0,1 M | 2 μL |
| RNase OUT | 40 U/μL | 1 μL |
| SuperScript® | 200U/μL | 1 μL |
| Volume final | | 10μL |

A reação foi colocada em termociclador novamente, com as seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 50°C e 5 minutos a 85°C para inativação das enzimas. Após inativação, a reação foi colocada em gelo e foram adicionados 3 μL de RNase H (40 U/μL) e a reação mantida por 20 minutos a 37°C para exclusão dos RNAs não sintetizados em cDNA.

4.6.2 Reação em cadeia da polimerase para curva padrão

Um volume de 9 μL do cDNA foi submetido a PCR de acordo com o protocolo estabelecido da tabela 9.

Tabela 9 - Protocolo da reação em cadeia da polimerase para a curva padrão da carga viral de LRV

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|---------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 120,75 µL |
| Buffer | 10X | 15 µL |
| Iniciadores LRV F + LRV R | 10µM | 6 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 4,5 µL |
| dNTP Mix | 10mM cada | 3 µL |
| Taq Polimerase® | 5U/ µL | 0,75 µL |
| cDNA | -- | 9 µL |
| Volume final | | 150 µL |

A PCR foi realizada sob as seguintes condições em termociclador: 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos.

4.6.3 Purificação e recombinação do fragmento para curva padrão

O volume total de 150 µL do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose a 2%, a uma corrente de 200V por 30 minutos e visualizado por coloração com GelRed™ (Biotium®, Hayward, CA/USA).

O fragmento foi seccionado do gel e purificado utilizando o kit PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen®, Löhne/Germany) seguindo as recomendações do fabricante. O produto da purificação foi quantificado em espectrofotômetro modelo NanoDROD 2000 (Thermo Scientific NanoDrop® Products, Delaware/USA) e um volume de 3 µL foi aplicado em gel de agarose e submetido a eletroforese (200V por 30 minutos) para confirmação da purificação.

O produto purificado (inserto) foi recombinado ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega® - Wisconsin/USA) seguindo o protocolo descrito na tabela 10.

Tabela 10 - Protocolo da recombinação do vetor e inserto

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-----------------------|--------------|-------------------|
| Rapid Ligation Buffer | 2X | 5 µl |
| pGEM®-T Vector | 50ng/µl | 1 µl |
| T4 DNA Ligase | 3U/µl | 1 µl |
| Inserto | 38,7ng/µl | 4 µl |
| H ₂ O | -- | 1 µl |
| Volume final | | 12 µl |

Como controle positivo da reação de clonagem, uma recombinação foi realizada utilizando 2 µl do DNA controle, disponibilizado no kit de clonagem, na concentração de 4ng/µl. As reações foram incubadas a 4°C por 16 horas.

4.6.4 Preparo de células eletrocompetentes

Para a transformação, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* da linhagem TOP10F' (Invitrogen®, Carlsbad, California, EUA) eletrocompetentes.

As células eletrocompetentes foram preparadas a partir do isolamento de colônias cultivadas em meio sólido LB Ágar contendo estreptomicina (30µg/mL) em placa de Petri e incubado a 37°C por 16 horas. Após crescimento bacteriano, foi realizado o pré inóculo, onde uma colônia da placa foi colocada para crescimento em 10mL de meio LB líquido com estreptomicina (30µg/mL) e incubado sob agitação por 16 horas a 180 rpm a 37°C. Um volume de 10 µl do pré inóculo foi transferido para 100 mL de meio LB líquido com o antibiótico correspondente, até alcançar densidade óptica de 0,5 no comprimento de onda de 600 nm (DO600nm), verificado por espectrofotômetro modelo GeneQuant 1300 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala/Sweden), e posteriormente a cultura foi incubada em gelo por 30 minutos.

Após incubação em gelo, as células foram centrifugadas a 4000 G por 15 minutos a 4°C, o meio de cultura foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com 50 mL de solução de glicerol a 10% e repetida a mesma centrifugação anterior, com descarte da solução de glicerol. Foi realizado o processo de ressuspensão das células por mais duas vezes, com volumes de 25 mL e 20 mL respectivamente, onde ao final da última centrifugação, o precipitado foi

ressuspendido em 1 mL de solução de glicerol, finalizando o preparo das células eletrocompetentes.

4.6.5 Transformação das células eletrocompetentes

A um volume de 40 µL de células eletrocompetentes, foi adicionado 1 µL do produto da recombinação (inserto + vetor) e submetido a eletroporação, utilizando o MicroPulser™ (Bio-Rad®, Hercules, CA/USA) para a obtenção das células transformadas.

As células transformadas foram semeadas em placa de Petri contendo 25 mL de meio LB ágar suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, 30 µg/mL de estreptomicina, 0,05 M de IPTG (isopropylthio-β-galactoside) e 80 µg/µL de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). A placa foi e incubada a 37°C por 16 horas.

Após crescimento bacteriano, foram selecionadas 10 colônias isoladas, tendo como critério de triagem a técnica Blue/White, onde ocorre a seleção das células transformadas, que apresentam fenótipo branco em comparação com as células que não receberam o vetor, que apresentam coloração azul.

4.6.6 Reação de restrição para curva padrão

Com a confirmação da transformação, uma colônia foi semeada em 10 mL de meio LB líquido, conforme descrito anteriormente e incubada a 37°C por 16 horas. Após crescimento bacteriano, foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen®, Germany) seguindo as recomendações do fabricante. O produto da extração plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ e submetido a reação de restrição com a enzima *NotI* que possui duplo sítio de restrição no plasmídeo, conforme protocolo descrito na tabela 11.

Tabela 11 - Protocolo da reação de restrição

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|------------------|--------------|-------------------|
| H ₂ O | -- | 15,5 µl |
| Buffer | 10X | 2 µl |
| NotI | 20U/µl | 0,5 µl |
| Miniprep | 1,9 µg/µl | 2 µl |
| Volume final | | 20 µl |

A reação foi mantida a 37°C por 16 horas. Posteriormente, 2 µl da reação foi aplicada em gel de agarose a 0,8% corado com GelRed, para confirmação da reação de restrição e o fragmento correspondente ao inserto, foi excisado do gel e purificado pelo método descrito anteriormente.

O inserto purificado foi quantificado por espectrofotômetro e utilizado como amostra para a construção da curva padrão, além disso, um volume de 2 µL do inserto purificado foi aplicado em gel de agarose a 1% para confirmação da purificação.

4.6.7 Cálculo para determinação do número de cópias

O número de cópias da amostra padrão foi determinado pela aplicação da fórmula:

$$\textit{Tamanho do inserto} \times 650$$

Onde obteve-se o peso da molécula em gramas. O valor obtido foi convertido para a concentração da amostra, resultando no número de moléculas presentes na amostra. Posteriormente, o número de Mols obtido foi aplicado à fórmula de Avogadro onde:

$$1 \textit{ molécula} = 6,023 \times 10^{23} \textit{ cópias}$$

O resultado obtido representou o número de cópias presentes na amostra padrão, por mililitro.

Com a quantificação do número de cópias/mL, foi realizada diluição seriada da amostra, partindo da concentração de $2,3 \times 10^8$ até a concentração de $2,3 \times 10^0$. Para a construção da curva padrão, o teste com as diluições foi realizado em triplicata.

O ensaio de PCR em tempo real foi realizado seguindo o protocolo descrito na tabela 12.

Tabela 12 - Protocolo utilizado na PCR em tempo real para construção da curva padrão

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-------------------------------|--------------|-------------------|
| PowerSybr Green PCR MasterMix | 2X | 12,5 µl |
| H ₂ O | -- | 8,5 µl |
| Iniciadores LRV F + LRV R | 10µM | 1 µl |
| Amostra | -- | 3 µl |
| Volume final | | 25 µl |

As corridas foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem, CA/USA) em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.7 ENSAIO MULTIPLEX DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para otimizar o número de genes a serem analisados em conjunto, com a quantidade de amostra clínica disponível, foi empregada a técnica de Fluidigm™ Circuito Integrado de Fluidos (IFCs) no sistema BioMark™ HD (Fluidigm™, San Francisco, CA/USA) que possibilita, no desenho experimental escolhido, analisar a expressão simultânea de 96 genes em 96 amostras por placa.

Em todas as amostras ensaiadas por Fluidigm, foram realizados ensaios de quantificação da carga parasitária e da carga viral e a quantificação da expressão gênica de genes humanos e do parasita, além dos experimentos já descritos (detecção e identificação da espécie de *Leishmania* e detecção de LRV1).

4.7.1 Seleção dos genes alvo para multiplex

Foram selecionados 96 alvos (Apêndice C) para a quantificação da expressão gênica, destes, 22 alvos correspondiam a genes do parasita *Leishmania* e 74 alvos a genes humanos. Dentre os genes do parasita, foram selecionados 20 genes relacionados a virulência do parasita, principalmente descritos por sua relação com a metabolismo da droga e dois genes de controle endógeno. Nos genes humanos, foram selecionados 70 genes relacionados a

resposta imune do hospedeiro, sendo alguns já relatados na literatura por estarem envolvidos na resposta frente a infecção pelo parasita *Leishmania* e outros possíveis genes candidatos além de quatro controles endógenos.

4.7.2 Síntese de cDNA para ensaio multiplex

Uma alíquota de RNA foi utilizada para a síntese do DNA complementar (cDNA), com o kit *Reverse Transcription Master Mix* (Fluidigm), que contém todos os componentes necessários para a síntese, incluindo tampão, dNTPs, iniciadores, inibidor de ribonuclease e as enzimas RNaseH com a transcriptase reversa M-MLV. O protocolo utilizado está descrito na tabela 13.

Tabela 13 - Protocolo utilizado para a síntese de DNA complementar

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|----------------------------------|--------------|-------------------|
| H ₂ O livre de RNase | -- | 3 µl |
| Reverse Transcription Master Mix | 5 X | 1 µl |
| RNA | ~50 ng/µl | 1 µl |
| Volume final | | 5 µl |

A reação foi colocada em termociclador, com a seguinte configuração: 25°C por 5 minutos, 42°C por 30 minutos e finalizando com 85°C por 5 minutos.

4.7.3 Pré amplificação para ensaio multiplex

Esta etapa consiste em uma amplificação do número de cópias dos genes alvo para um nível em que um maior número de genes seja detectável, principalmente em genes onde há poucas cópias.

Primeiramente, foi realizada uma mistura dos 96 *TaqMan*® *Gene Expression Assay 20X*, e diluição com o reagente de diluição (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) conforme descrito na tabela 14.

Tabela 14 - Protocolo de diluição dos iniciadores para a pré amplificação

| Reagente | Concentração | Volume / 96 ensaios |
|--------------------------|--------------|---------------------|
| 96 alvos <i>TaqMan</i> ® | 20X | 2 µl de cada |
| Reagente de diluição | -- | 8 µl |
| Volume final | | 200 µl |

Ao final da diluição, a concentração de cada iniciador foi igual a 0,2X (180 nM). Posteriormente foi realizada a reação de pré amplificação, conforme descrito na tabela 15.

Tabela 15 - Protocolo utilizado para a pré amplificação do cDNA

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|-------------------|--------------|-------------------|
| Preamp Master Mix | -- | 1 µl |
| Mistura TaqMan | 0,2X | 1,25 µl |
| H ₂ O | -- | 1,5 |
| cDNA | -- | 1,25 µl |
| Volume final | | 5 µl |

A reação foi colocada em termociclador, sob as seguintes condições: uma fase de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguido de 14 ciclos com as fases de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por 4 minutos. Após ciclagens, as reações foram diluídas 1:5, pela adição de 20 µL do reagente de diluição (Fluidigm), totalizando um volume final de 25 µL de cDNA pré amplificado.

4.7.4 Preparo da reação e montagem da placa para o ensaio multiplex 96x96

Após a pré amplificação do cDNA, foi realizada a mistura deste com o master mix (TaqMan Fast Advanced Master Mix, Life Technologies) e o reagente de carregamento de amostra (20X GE Sample Loading Reagent, Fluidigm), conforme descrito na tabela 16.

Tabela 16 - Protocolo utilizado no preparo na reação para ensaio multiplex

| Reagente | Concentração | Volume / 1 reação |
|---------------------------|--------------|-------------------|
| Master mix | 2X | 2,5 µl |
| GE Sample Loading Reagent | 20X | 0,25 µl |
| cDNA pré amplificado | -- | 2,25 µl |
| Volume final | | 5 µl |

A reação foi homogeneizada em vórtex e centrifugada. Um volume de 5 µl das amostras e dos iniciadores foram pipetadas em seus respectivos poços na placa e carregados no sistema de microfluídica BioMark HD (Figura 8).



Figura 8 - Modelo da placa utilizada para o ensaio multiplex de expressão gênica. Fonte: Manual de uso do Fluidigm. Modelo do chip 96.96 Dynamic Array IFC for Gene Expression.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada uma análise descritiva de variáveis entre os casos suspeitos e aqueles que tiveram um dos exames positivos: sexo; idade; ocorrência de leishmaniose pregressa (“LT pregressa”); e forma de aquisição provável (“aquisição”), sendo classificada como “trabalho” ou “lazer”. As variáveis citadas foram agrupadas pelo resultado do conjunto dos exames (ao menos um positivo *versus* nenhum exame positivo). A análise da variável de idade do paciente foi realizada por meio do teste não paramétrico H de Kruskal-Wallis.

O primeiro cenário (conjunto de exames) utiliza o conjunto de exames como “referência clínica”, sendo que os indivíduos que apresentaram pelo menos um resultado positivo, foram considerados positivos para LT. No segundo cenário (exames moleculares combinados), a referência clínica utilizada foi de que apenas os indivíduos que apresentaram pelo menos um dos exames moleculares positivos foram considerados positivos para LT.

A partir de rotinas criadas em linguagem R (CORE TEAM, 2014) de dados brutos exportados da plataforma comercial BioMark™ HD System (Fluidigm Corporation) foi realizada a correção do ruído e a análise exploratória dos dados (curva de acúmulo de fluorescência da intensidade Rn e gráficos HRM (Melting de alta resolução) para cada reação de qRT-PCR nas diferentes amostras. Na quantificação relativa da expressão, utilizou-se o ajuste de função logística de quatro parâmetros para representar cada curva de amplificação, usando a biblioteca de funções qPCR (RITZ; SPIESS, 2008) para a linguagem R. O ciclo

de quantificação foi determinado como o ciclo relativo ao ponto de máxima da segunda derivada da curva sigmoidal ajustada (cpD2). A eficiência de cada reação de amplificação foi obtida na região exponencial de amplificação, no cpD2, e calculada como a razão entre a fluorescência em cpD1 e a fluorescência do ciclo imediatamente anterior a esse (cpD2-1). A eficiência de cada gene foi então estimada pela eficiência média das eficiências calculadas para cada reação de amplificação daquele gene. Os controles endógenos empregados na normalização entre as diferentes amostras amplificadas foram selecionados entre os candidatos pelo método geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). A comparação de médias dos valores de expressão normalizados entre os grupos foi obtido via teste T não-paramétrico por permutação (B=1000 permutações) com ajustes de Bonferroni (BASSO et al., 2009). Os resultados foram ilustrados em gráficos apresentando os valores normalizados de expressão médios \pm erros padrão das médias para cada grupo. Níveis de significância bi-cadais menores ou iguais a 0,01, 0,05 e 0,1 foram considerados como “altamente significantes”, “significantes” e “sugestivos”, respectivamente.

Os resultados dos ensaios de expressão gênica foram divididos em duas partes, a primeira compreende os resultados da expressão dos genes humanos e a segunda a resultados da expressão dos genes do parasita.

4.9 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS DO *LEISHMANIA RNA VÍRUS 1*

Para a análise do genoma parcial do *Leishmania RNA vírus 1*, foram utilizados parasitas mantidos em meio de cultura.

4.9.1 Isolamento e cultivo de parasitas *Leishmania* em meio de cultura

Foi realizada a coleta de aspirado de lesão com a finalidade de isolar os parasitas em meio de cultura. Uma seringa de 1 mL contendo 200 a 400 μ l de solução salina estéril foi utilizado para a coleta na borda da lesão. O material coletado foi inoculado em tubo de ensaio com meio de cultura bifásico, contendo cerca de 1 mL de NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) e 1 mL de Schneider (Sigma®, St. Louis, MO/USA) suplementado com 30% de Soro Fetal Bovino (Vitrocell®, Campinas, SP, BR) e 2% de urina humana filtrada. O inóculo foi incubado em

estufa do tipo BOD (demanda bioquímica do oxigênio) em média cinco dias e observado o crescimento parasitário por até 30 dias após inóculo.

As amostras que apresentaram crescimento parasitário foram enviadas para a Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) para identificação da espécie e depósito.

4.9.2 Extração de RNA, síntese de cDNA e PCR

Ao atingir a fase estacionária de crescimento parasitário, um volume de 1 mL de meio de cultura contendo parasitas foi centrifugado a 5000 *g* por 5 minutos, descartado o meio de cultura e o sedimento foi submetido a extração de RNA, utilizando o PureLink RNA Mini Kit (Ambion® - Carlsbad, CA/USA) seguindo as recomendações do fabricante.

A síntese de cDNA, a reação em cadeia da polimerase e a eletroforese foi realizada conforme descrito no item 3.4.

Adicionalmente, foi desenhado um novo iniciador (LRV R 5´- AATCAATTTTCCCAGTCATGC – 3´) que foi utilizado em conjunto com o iniciador descrito anteriormente (LRV F 5´- ATGCCTAAGAGTTTGGATTTCG- 3´) (CANTANHÊDE et al., 2015) com a finalidade de amplificar um fragmento maior do genoma do LRV, correspondendo a 850 pares de bases.

Para o desenho do iniciador, foram analisadas as sequências genômicas já descritas e disponibilizadas no Genbank das espécies de LRV1-1 (numero de acesso Genbank: LRV1-1: NC002063) e LRV1-4 (número de acesso Genbank: LRV1-4: NC003601). Foi feito alinhamento múltiplo entre os dois genomas utilizando a ferramenta ClustalW2 e, baseado na quantidade de similaridades de suas sequências, foi escolhida uma região de maior afinidade entre as duas espécies, visando a otimização da PCR e proporcionando refinar a identificação das subespécies de LRV1. Desta forma, foi selecionado um iniciador que juntamente com LRV F que está localizado no início da ORF1 que amplifica um fragmento de 850 pares de bases. O iniciador foi denominado LRV ORF2 e se anela no início da região codificante da proteína do capsídeo viral designada ORF2 (Figura 9).

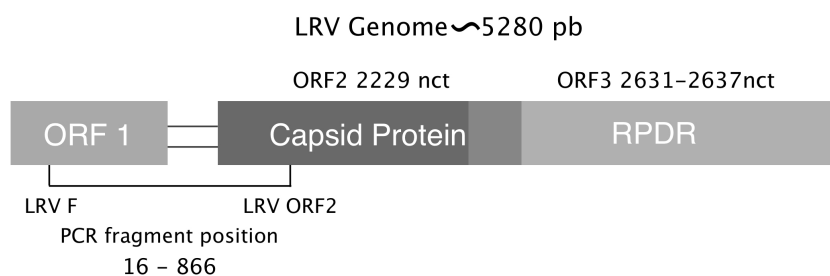


Figura 9 – Esquema do genoma do LRV1 com destaque para a região de amplificação dos iniciadores LRV F e LRV ORF2.

A reação em cadeia da polimerase para amplificação do fragmento de 850pb foi realizada conforme protocolo descrito na tabela 17.

Tabela 17 – Protocolo de PCR para amplificação do fragmento de 850 pb do LRV

| Reagente | Concentração | Volume/1 reação |
|--------------------------------|--------------|-----------------|
| H ₂ O | -- | 33,75 µL |
| Tampão | 10X | 5 µL |
| Iniciadores LRV F + LRV R ORF2 | 10µM | 3 µL |
| MgCl ₂ | 25mM | 1,5 µL |
| dNTP Mix | 10mM cada | 1,5 µL |
| Taq Polimerase® | 5U/ µL | 0,25 µL |
| cDNA | -- | 5 µL |
| Volume Final | | 50 µL |

As reações foram colocadas em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, finalizando com um passo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Um volume de 5 µL da reação foi aplicado em gel de agarose a 1,5% (200V por 35 minutos) e corados com GelRed™ (Biotium®, CA/USA). Os géis foram fotografados em fotodocumentador, conforme descrito anteriormente.

4.9.3 Purificação e sequenciamento das amostras positivas para LRV

As amostras que apresentaram positividade nas duas reações de PCR para o LRV foram purificadas para posterior sequenciamento. Os produtos de PCR foram purificados utilizando o kit Purelink Quick Gel Extraction Kit

(Invitrogen® Carlsbad, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante e quantificados em espectrofotômetro modelo NanoDrop™. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento, numa concentração entre 50 a 200 ng/μL acrescidos de 0,2 μM de cada iniciador. Para o sequenciamento foram utilizadas as plataformas de sequenciamento de DNA da Fiocruz Rio de Janeiro (RPT01A) e da Fiocruz Bahia (RPTB01B).

4.9.4 Análise das sequências de LRV

As sequências foram visualizadas e editadas no programa BioEdit (HALL, 1999). Todas as sequências foram alinhadas e verificadas manualmente utilizando o software MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). A partir das sequências obtidas foi realizado um alinhamento local para busca de sequências correspondentes a mesma região, onde foram selecionadas 33 sequências depositadas no GenBank (BENSON et al., 2005) (Tabela 18). Após alinhamento das 46 sequências, as extremidades foram cortadas e as análises posteriores foram realizadas com sequências de 444 nucleotídeos (posições 367 a 813 do genoma completo – KX808487) (BRETTMANN et al., 2016).

Para inferência do melhor modelo para construção da árvore filogenética, foi utilizada a opção find the best DNA model disponível no MEGA7 e aquele com menor BIC score (Bayesian Information Criterion) foi considerado como o que melhor descreveu o padrão de substituição nas sequências analisadas. O método de distância Tamura 1992 (T92) (TAMURA, 1992) com parâmetro de distribuição gamma (G) e sítios invariáveis (I) foi empregado para avaliar a distância genética entre as sequências e o método Maximum Likelihood 10000 replicatas (bootstrap) foi utilizado para a construção da árvore de distância entre as sequências analisadas no MEGA7.

Adicionalmente foram construídas redes através do programa SplitsTree versão 4.14.6 (HUSON; BRYANT, 2006). As redes foram construídas pelo NeighborNet e por Minimum Spanning Network.

Tabela 18 – Relação das sequencias utilizadas para as análises de filogenia e divergência genética.

| ID | ID da cepa de <i>Leishmania</i> | Número de acesso | Código Internacional de <i>Leishmania</i> | Espécie do parasita | Localidade | Referência |
|----|---------------------------------|------------------|---|------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 3562* | MG202146 | MHOM/BR/2014/308 | <i>L. braziliensis</i> | Porto Velho/RO/Brasil | Esse estudo |
| 2 | 386 | MG202144 | MHOM/BR/2015/386 | <i>L. braziliensis</i> | Porto Velho/RO/Brasil | Esse estudo |
| 3 | 3545* | MG202143 | MHOM/BR/2014/275 | <i>L. braziliensis</i> | Porto Velho/RO/Brasil | Esse estudo |
| 4 | 3569* | MG202145 | MHOM/BR/2014/299 | <i>L. braziliensis</i> | Porto Velho/RO/Brasil | Esse estudo |
| 5 | 3567* | MG202139 | MHOM/BR/2014/291 | <i>L. braziliensis</i> | Candeias/RO/Brasil | Esse estudo |
| 6 | 3538* | MG202140 | MHOM/BR/2014/271 | <i>L. guyanensis</i> | Candeias/RO/Brasil | Esse estudo |
| 7 | 3354* | MG202141 | MHOM/BR/2011/S77-ABF | <i>L. guyanensis</i> | Santarem/PA/Brasil | Esse estudo |
| 8 | 1545* | MG202142 | MCEB/BR/1984/M8408 | <i>L. shawi</i> | Parauebas/PA/Brasil | Esse estudo |
| 9 | 3460* | MG202147 | MHOM/BR/2013/04LTAVMR | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | Esse estudo |
| 10 | 3461* | MG202148 | MHOM/BR/2013/05LTAMVL | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | Esse estudo |
| 11 | 3486* | MG202149 | MHOM/BR/2013/27JNS | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | Esse estudo |
| 12 | 3542* | MG202151 | MHOM/BR/2014/233CFS | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | Esse estudo |
| 13 | 3503* | MG202150 | MHOM/BR/2013/33LGS | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | Esse estudo |
| 14 | 1398* | JX313127 | MHOM/BR/1989/IM3597 | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil | (ZANGGER et al., 2014) |
| 15 | 2001 | KY750607 | MHOM/FG/2011/2001 | <i>L. guyanensis</i> | Manaus/AM/Brasil** | (TIRERA et al., 2017) |
| 16 | M4147 | KX808487 | MHOM/BR/1975/M4147 | <i>L. guyanensis</i> | Monte Dourado/PA/Brasil | (BRETTMANN et al., 2016) |
| 17 | M4147 | U01899 | MHOM/BR/1975/M4147 | <i>L. guyanensis</i> | Monte Dourado/PA/Brasil | (SCHEFFTER; WIDMER; PATTERSON, 1994) |
| 18 | M5313 | JX313126 | IWHI/BR/1978/M5313 | <i>L. guyanensis</i> | Monte Dourado/PA/Brasil | (ZANGGER et al., 2013) |
| 19 | LF94 | KY750608 | MHOM/FG/2013/LF94 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 20 | XJ93 _{G2} | KY750609 | MHOM/FG/2013XJ93 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 21 | YA70 | KY750610 | MHOM/FG/2013YA70 | <i>L. braziliensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 22 | 2014 | KY750611 | MHOM/FG/2013/2014 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 23 | 2008 | KY750612 | MHOM/FG/2012/2008 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 24 | 2015 | KY750613 | MHOM/FG/2012/2015 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 25 | 2028 _{G1} | KY750614 | MHOM/FG/20122028 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 26 | 2028 _{G2} | KY750615 | MHOM/FG/2012/2028 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 27 | 2028 _{G3} | KY750616 | MHOM/FG/2012/2028 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 28 | LF98 | KY750617 | MHOM/FG/2013/LF98 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 29 | LV11 | KY750618 | MHOM/FG/2012/LL28 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |

| | | | | | | |
|----|----------------------|----------|-------------------|------------------------|-----------------|---------------------------|
| 30 | MC71 | KY750619 | MHOM/FG/2012/MC71 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 31 | MJ25 | KY750620 | MHOM/FG/2012/MJ25 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 32 | PD46 | KY750621 | MHOM/FG/2014/PD46 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 33 | VL19 | KY750622 | MHOM/FG/2012/VL19 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 34 | VW21 | KY750623 | MHOM/FG/2013/VW21 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 35 | WF69 _{G1} | KY750624 | MHOM/FG/2012/WF69 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 36 | WF69 _{G2} | KY750625 | MHOM/FG/2012/WF69 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 37 | XJ93 _{G1} | KY750626 | MHOM/FG2013/XJ93 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 38 | XK73 | KY750627 | MHOM/FG/2013/XK73 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 39 | YE48 | KY750628 | MHOM/FG/2013/YE48 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 40 | YR07 | KY750629 | MHOM/FG/2014/YR07 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 41 | YZ58 | KY750630 | MHOM/FG/2012/YZ58 | <i>L. guyanensis</i> | Guiana Francesa | (TIRERA et al., 2017) |
| 42 | LEM2700 | KX808483 | MHOM/BO/1990/NA | <i>L. braziliensis</i> | Bolívia | (BRETTMANN et al., 2016) |
| 43 | LEM3874 | KX808486 | MHOM/BO/IMT252 | <i>L. braziliensis</i> | Bolívia | (BRETTMANN et al., 2016) |
| 44 | LEM2780 | KX808485 | MHOM/BO/1990/CS | <i>L. braziliensis</i> | Bolívia | (BRETTMANN et al., 2016) |
| 45 | LEM2780 ₂ | KX808484 | MHOM/BO/1990/CS | <i>L. braziliensis</i> | Bolívia | (BRETTMANN et al., 2016) |
| 46 | Lb2169 | KC862308 | MHOM/BO/2011/2169 | <i>L. braziliensis</i> | Bolívia | (PARMENTIER et al., 2016) |

*IOC/L código relacionado a cepa depositada na Coleção de Leishmania do Instituto Oswaldo Cruz na Fundação Oswaldo Cruz; ** isolado na Guiana Francesa, mas a localização geográfica onde o paciente relatou ter adquirido a infecção em Manaus, Amazonas, Brasil (TIRERA et al., 2017)

5 RESULTADOS

5.1 DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, A DIVERSIDADE DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* E A FREQUÊNCIA DE *LEISHMANIA RNA VÍRUS 1*

Durante o estudo, 724 casos com suspeita clínica de leishmaniose tegumentar (LT) foram investigados. Apenas um dos casos apresentou a forma disseminada da doença, e esse caso será discutido separadamente dos demais. Os demais 723 casos eram de lesões cutâneas ou mucosas. Foram utilizados exame parasitológico direto (raspado) e detecção molecular de DNA por meio de PCR dos marcadores kDNA e hsp70, conforme descrito na metodologia.

A reação em cadeia da polimerase tendo como alvo o kDNA foi realizado conforme descrito no item 4.3.1. Os resultados das reações foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Figura 10).

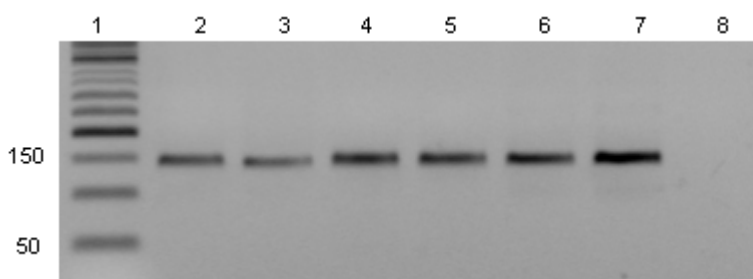


Figura 10 – Gel de agarose com fragmentos amplificados na PCR para kDNA. Gel de agarose a 2% corado com GelRed. Linha 1: marcador de peso molecular de 50pb. Linhas 2 a 6: amostras positivas para o marcador kDNA com fragmentos de 120 pares de bases. Linha 7: Controle positivo e linha 8: controle negativo

A reação em cadeia da polimerase tendo como alvo um fragmento do gene hsp70 foi realizado conforme descrito no item 4.3.2. Os resultados das reações foram visualizados após eletroforese em gel de agarose a 2% corado com GelRed (Figura 11).

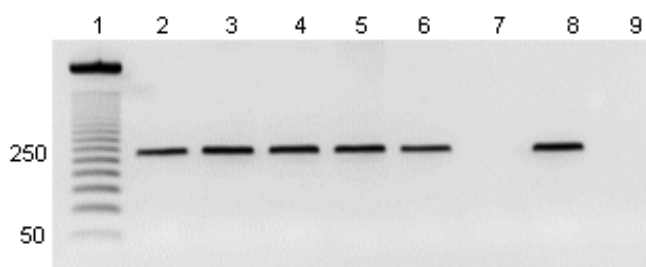


Figura 11 – Gel de agarose com fragmentos amplificados na PCR para hsp70. Gel de agarose a 2% corado com GelRed™. Linha 1: marcador de peso molecular de 50 pares de base. Linhas 2 a 6: amostras positivas para hsp70 com fragmentos de 234 pares de bases. Linha 7: amostra negativa para hsp70. Linha 8: controle positivo da reação. Linha 9: controle negativo.

Dos 723 casos suspeitos com as formas cutâneas e mucosas da doença, 557 (77,04%) foram positivos para ao menos um dos testes realizados, 298 (41,21%) foram positivos para os três exames, e 10 (1%) casos apresentaram resultados positivos no raspado e negativo em ambos os métodos moleculares. Avaliando a concordância dos testes moleculares aplicados (kDNA e hsp70), esses tiveram concordância em 75% (N= 414) das amostras (Tabela 19).

Tabela 19 – Distribuição dos resultados do exame parasitológico direto e detecção molecular de DNA por meio de PCR dos marcadores kDNA e hsp70, suas respectivas proporções e intervalos de confiança de 95%, considerando apenas o subconjunto de casos positivos (%[+]) e do total dos casos suspeitos (%[+ ou -]) de LT com as formas cutâneas e mucosas da doença

| Raspado | kDNA | hsp70 | N | %[+] | I.C.95% | %[+ ou -] | I.C.95% |
|--------------|------|-------|------------|------|---------------|-----------|---------------|
| + | + | + | 298 | 54% | (49,4%;57,6%) | 41,6% | (37,6%;44,8%) |
| + | + | - | 40 | 7% | (5,0%;9,3%) | 6% | (3,9%;7,2%) |
| + | - | + | 3 | 1% | (0,0%;1,1%) | 0,4% | (0,0%;0,9%) |
| + | - | - | 10 | 2% | (0,7%;2,9%) | 1% | (0,5%;2,2%) |
| - | + | + | 116 | 21% | (17,5%;24,2%) | 16% | (13,4%;18,7%) |
| - | + | - | 74 | 13% | (10,5%;16,1%) | 10% | (8,0%;12,4%) |
| - | - | + | 16 | 3% | (1,5%;4,3%) | 2% | (1,1%;3,3%) |
| Sub-total | | | 557 | | | 77% | (74,0%;80,1%) |
| - | | | 166 | | | 23% | (19,9%;26,0%) |
| Total | | | 723 | | | | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Na Tabela 20 é apresentada a análise descritiva de variáveis discretas (sexo; LTA progressa; e aquisição). Uma possível associação entre o resultado dos exames e as variáveis discretas foi testada utilizando o teste exato de Fisher. Os pacientes do sexo masculino representaram 78,6% do total de pacientes. 76,7% dos pacientes relatou não ter tido LT anteriormente e 84,4% relatou adquirir a infecção no local de trabalho (Tabela 20).

Tabela 20 – Análise descritiva das variáveis discretas sexo; ocorrência de leishmaniose progressa (“LT progressa”); forma de aquisição provável (“aquisição”), sendo classificada como “trabalho” ou “lazer”, agrupadas pelo resultado positivo em qualquer um dos exames

| | | Exames LT | | | | | | | | |
|------------------------|-----|------------------|---------------|-----|------------------|---------------|-----|---------------|---------------|--|
| | | Positivo (N=557) | | | Negativo (N=166) | | | Total (N=723) | | |
| Sexo | N | % | I.C.95% | N | % | I.C.95% | N | % | I.C.95% | |
| Feminino | 119 | 21,4% | (18,0%;24,8%) | 35 | 21,1% | (14,9%;27,3%) | 154 | 21,3% | (18,3%;24,3%) | |
| Masculino | 438 | 78,6% | (75,2%;82,0%) | 131 | 78,9% | (72,7%;85,1%) | 569 | 78,7% | (75,7%;81,7%) | |
| <i>p = 1,000 *</i> | | | | | | | | | | |
| LT progressa | | | | | | | | | | |
| Não | 427 | 76,7% | (73,1%;80,2%) | 121 | 72,9% | (66,1%;79,7%) | 548 | 75,8% | (72,7%;78,9%) | |
| Sim | 130 | 23,3% | (19,8%;26,9%) | 45 | 27,1% | (20,3%;33,9%) | 175 | 24,2% | (21,1%;27,3%) | |
| <i>p = 0,358 *</i> | | | | | | | | | | |
| Aquisição | | | | | | | | | | |
| Lazer | 87 | 15,6% | (12,6%;18,6%) | 58 | 34,9% | (27,7%;42,2%) | 145 | 20,1% | (17,1%;23,0%) | |
| Trabalho | 470 | 84,4% | (81,4%;87,4%) | 108 | 65,1% | (57,8%;72,3%) | 578 | 79,9% | (77,0%;82,9%) | |
| <i>p* < 0,001 *</i> | | | | | | | | | | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%. LT= leishmaniose tegumentar.

A idade do total de pacientes positivos para LT (N= 557) variou de mínima de 2 anos e máxima de 86 anos (média= 41,68) (Tabela 21).

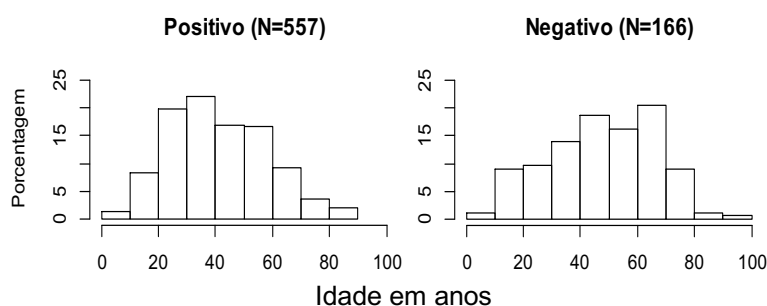
Tabela 21 – Estatística descritiva da idade dos pacientes

| Exames | Variável | Min. | 1ºqt. | Mediana | Média | 3ºqt. | Max. | (H; g.l.; p)* |
|---------------------|----------|------|-------|---------|-------|-------|------|------------------|
| Positivo (N=557) | Idade | 2 | 28 | 40 | 41,68 | 54 | 86 | (16,7;1;<0,0001) |
| Negativo (N=166) | Idade | 3 | 35,25 | 50 | 47,97 | 64 | 93 | |
| Total (N=723) | Idade | 2 | 29 | 42 | 43,13 | 56 | 93 | |

*Estatística do teste H de Kruskal-Wallis. N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

A distribuição dos valores descritos na Tabela 21 estão representados na Figura 12, onde pode-se observar uma concentração dos casos positivos em pacientes com idade entre 20 e 60 anos.

Figura 12 – Histograma com a frequência relativa representando a



distribuição da idade dos pacientes incluídos no estudo.

5.1.1 Detecção de *Leishmania RNA Virus 1*

Os resultados, conforme descrito anteriormente, foram visualizados em gel, como ilustrado na Figura 13, que apresenta algumas amostras positivas e negativa para LRV1.

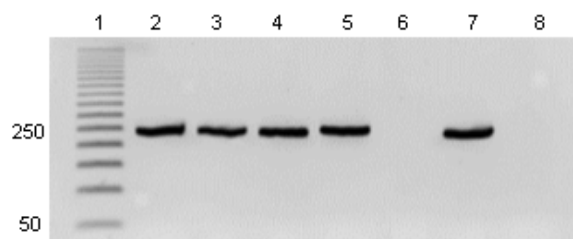


Figura 13 – Gel de agarose com fragmentos amplificados na PCR para detecção do LRV1. Gel de agarose a 2% corado com GelRed. Linha 1: Marcador de peso molecular de 50pb. Linhas 2 a 5: amostras positivas para o LRV com fragmentos amplificados de 240 pares de bases. Linha 6: amostra negativa. Linhas 7 e 8: controles positivo e negativo, respectivamente.

O LRV1 foi detectado em 27,35% das amostras analisadas considerando todas as amostras positivas para *Leishmania*. Do total de amostras positivas para o LRV1, 72,22% correspondem a amostras de LC e 27,28% a amostras de LM. Nas amostras negativas para o LRV1, 86,88% correspondem a amostras de LC e apenas 12,93% de LM, indicando uma frequência maior do LRV1 em amostras de lesão mucosa em relação as amostras de lesão cutânea (Tabela 22).

Tabela 22 – Detecção do *Leishmania RNA Virus 1* em amostras positivas para *Leishmania* sp. Por tipo de lesão.

| LRV | Tipo de Lesão | Frequência | % Observada |
|----------|---------------|------------|-------------|
| Positivo | | 27,35% | 198 |
| | Cutânea | 72,22% | 143 |
| | Mucosa | 27,78% | 55 |
| Negativo | | 72,65% | 526 |
| | Cutânea | 457 | 86,88% |
| | Mucosa | 12,93% | 68 |
| | Disseminada | 0,19% | 1 |
| Total | | | 724 |

O LRV1 foi detectado em quatro diferentes espécies do parasita: *L. braziliensis* (N= 140), *L. guyanensis* (N= 17), *L. lainsoni* (N= 2) e *L. shawi* (N= 2), em cinco amostras cuja espécie não pôde ser identificada e em 32 amostras negativas para hsp70 (Tabela 23).

Tabela 23 – Distribuição dos resultados positivos para LRV1, classificados pela ausência ou presença do LRV1, pelo tipo de lesão e pela espécie do parasita nas amostras positivas para hsp70

| Espécie do parasita | Lesão | LRV1 | | Total |
|--------------------------|---------|------|-----|-------|
| | | - | + | |
| <i>L. braziliensis</i> | Cutânea | 179 | 100 | 279 |
| | Mucosa | 21 | 40 | 61 |
| <i>L. guyanensis</i> | Cutânea | 26 | 11 | 37 |
| | Mucosa | 0 | 6 | 6 |
| <i>L. lainsoni</i> | Cutânea | 6 | 2 | 8 |
| <i>L. shawi</i> | Cutânea | 5 | 2 | 7 |
| <i>L. amazonensis</i> | Cutânea | 2 | 0 | 2 |
| <i>L. lindenbergi</i> | Cutânea | 1 | 0 | 1 |
| Espécie não identificada | Cutânea | 27 | 5 | 32 |
| Negativo HSP70 | Cutânea | 70 | 23 | 93 |
| | Mucosa | 12 | 9 | 21 |
| Total | | 349 | 198 | 547 |

5.1.2 Análise descritiva considerando apenas os casos positivos para pelo menos um dos exames realizados

Foram aprofundadas as análises relativas aos 557 casos que tiveram resultados positivos para ao menos um dos exames realizados.

Na Tabela 24 são apresentadas as frequências absolutas, relativas e o intervalo de confiança de 95% da estimativa da frequência relativa observadas das variáveis discretas estudadas, com exceção das espécies do parasita. 468 amostras (84%) positivas para LT eram de lesões cutâneas e 89 (16%) de lesões mucosas. De um total de 130 (23,3%) pacientes que relataram terem tido LT pregressa, 125 (95,5%) relataram terem feito o tratamento para LT. Não foi possível avaliar se o tratamento relatado foi específico para LT e se realizado da forma preconizada (tempo/dose do medicamento).

Tabela 24 – Frequências absolutas, relativas dos dados obtidos em relação ao sexo, tipo de lesão, forma de aquisição da doença, presença de leishmaniose progressa e resultados dos testes parasitológicos e LRV1.

| Variável | N | % | I.C.95% | N | % | I.C.95% |
|--|-----|-------|---------------|----------|-----|---------------------|
| Sexo | | | | | | |
| Masculino | 438 | 78,6 | (75,2%;82,0%) | Feminino | 119 | 21,4% (18,0%;24,8%) |
| Tipo de lesão | | | | | | |
| Cutânea | 468 | 84,0% | (81,0%;87,1%) | Mucosa | 89 | 16,0% (12,9%;19,0%) |
| Forma provável de aquisição | | | | | | |
| Trabalho | 470 | 84,4% | (81,4%;87,4%) | Lazer | 87 | 15,6% (12,6%;18,6%) |
| LT progressa | | | | | | |
| Não | 427 | 76,7% | (73,1%;80,2%) | Sim | 130 | 23,3% (19,8%;26,9%) |
| Fez tratamento progresso | | | | | | |
| Não | 125 | 95,5% | (91,9%;99,1%) | Sim | 5 | 4,5% (1,0%;8,1%) |
| Não se aplica* | 427 | | | | | |
| Exame parasitológico direto | | | | | | |
| Positivo | 351 | 63,0% | (59,0%;67,0%) | Negativo | 206 | 37,0% (33,0%;41,0%) |
| kDNA | | | | | | |
| Positivo | 528 | 94,8% | (92,8%;96,6%) | Negativo | 29 | 5,2% (3,4%;7,1%) |
| Hsp70 | | | | | | |
| Positivo | 433 | 77,7% | (74,3%;81,2%) | Negativo | 124 | 22,3% (18,8%;25,7%) |
| Positivo para um dos testes moleculares | | | | | | |
| Sim | 547 | 98,2% | (97,1%;99,3%) | Não | 10 | 1,8% (0,7%;2,9%) |
| (LRV1) | | | | | | |
| Positivo | 198 | 36,2 | (32,2%;40,2%) | Negativo | 349 | 63,8% (59,8%;67,8%) |
| Não testados** | 10 | | | | | |

*Foram considerados nessa variável apenas os pacientes que tiveram LT progressa ou encaminhados como recidiva; **10 pacientes tiveram resultados positivos no exame parasitológico direto (Raspado) porém não foram positivos nos testes moleculares, e não foi realizada a busca pelo LRV1. N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Os resultados dos testes aplicados para o diagnóstico demonstraram que o exame parasitológico direto apresentou positividade em 63% das amostras, o kDNA em 94,8% e o hsp70 em 77,7%. A combinação dos dois testes moleculares apresentou positividade igual a 98,2%.

O LRV1 foi detectado em 198 amostras (36,2%) e o resultado foi negativo para o vírus em 349 (63,8%) das amostras.

Na Tabela 25 são apresentados os resultados da identificação de espécies utilizando a técnica de digestão enzimática (RFLP) do produto de amplificação de DNA do hsp70.

A espécie mais frequente foi *L. braziliensis* identificada em 84,79% (N= 340) das amostras, seguido de *L. guyanensis* em 10,72% (N= 43). Foram

identificadas mais quatro espécies de *Leishmania* nos casos analisados, com menor frequência (Tabela 25).

Tabela 25 – Frequência das espécies de *Leishmania* encontradas por meio da técnica de digestão de produto de PCR do fragmento hsp70

| Resultado da digestão HSP70 | N | % (hsp70+) | I.C.95% | % (ID+) | I.C.95% |
|-------------------------------------|-----|------------|---------------|---------|---------------|
| <i>L. amazonensis</i> | 2 | 0,46% | (0,0%;1,1%) | 0,50% | (0,0%;1,2%) |
| <i>L. braziliensis</i> | 340 | 78,52% | (74,7%;82,4%) | 84,79% | (81,3%;88,3%) |
| <i>L. guyanensis</i> | 43 | 9,93% | (7,1%;12,7%) | 10,72% | (7,7%;13,8%) |
| <i>L. lainsoni</i> | 8 | 1,85% | (0,6%;3,1%) | 2,00% | (0,6%;3,4%) |
| <i>L. lindenbergi</i> | 1 | 0,23% | (0,0%;0,7%) | 0,25% | (0,0%;0,7%) |
| <i>L. shawi</i> | 7 | 1,62% | (0,4%;2,8%) | 1,75% | (0,5%;3,0%) |
| Padrão de digestão não identificado | 32 | 7,39% | (4,9%;9,9%) | 7,98% | (5,3%;10,6%) |
| Negativo para hsp70 | 124 | - | - | - | - |

As porcentagens são mostradas relativas ao conjunto de casos positivos para o hsp70 (coluna hsp70+) e relativas ao conjunto de casos em que foi o padrão de digestão permitiu a determinação da espécie (coluna ID+). N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Em 32 amostras (7,98%) não foi possível identificar a espécie envolvida na infecção (Tabela 25), por apresentarem fragmentos com tamanho distinto das espécies de *Leishmania* analisadas na reação de RFLP e/ou por apresentarem bandas fracas e de difícil visualização no gel.

5.1.3 Comparação entre os resultados dos exames

Na tabela 18 foram apresentados os resultados dos exames realizados. No presente tópico é apresentada uma análise individualizada e mais detalhada sobre a relação entre os exames.

Na Tabela 26 são apresentados os resultados dos testes agrupados pelo tipo de lesão (mucosa ou cutânea).

Os resultados dos testes aplicados variaram conforme o tipo de lesão. Em 56% (N= 263) das lesões cutâneas todos os testes foram positivos e em lesões mucosas apenas 39% (N= 35) das amostras apresentou resultados positivo nos três testes. Essa diferença por tipo de lesão se deu principalmente por conta do raspado ter apresentado resultado negativo em 36% (n=32) das amostras de

mucosa ao passo que nas amostras de lesões cutâneas o raspado foi negativo em 13% (N= 61) (Tabela 26).

Tabela 26 – Resultado conjunto dos exames realizados, agrupados pelo tipo de lesão

| Exame | | | Lesão cutânea | | | Lesão mucosa | | |
|---------|------|-------|---------------|-----|---------------|--------------|-----|---------------|
| Raspado | kDNA | hsp70 | N | % | I.C.95% | N | % | I.C.95% |
| + | + | + | 263 | 56% | (51,7%;60,7%) | 35 | 39% | (29,2%;49,5%) |
| + | + | - | 32 | 7% | (4,6%;9,1%) | 8 | 9% | (3,0%;14,9%) |
| + | - | + | 3 | 1% | (0,0%;1,4%) | 0 | 0% | (0,0%;0,0%) |
| + | - | - | 9 | 2% | (0,7%;3,2%) | 1 | 1% | (0,0%;3,3%) |
| - | + | + | 84 | 18% | (14,5%;21,4%) | 32 | 36% | (26,0%;45,9%) |
| - | + | - | 84 | 18% | (10,0%;16,1%) | 13 | 10% | (7,3%;21,9%) |
| - | - | + | 16 | 3% | (1,8%;5,1%) | 0 | 0% | (0,0%;0,0%) |
| Total | | | 468 | | | 89 | | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Na Tabela 27 são apresentados os resultados dos exames isoladamente, bem como a combinação dos exames moleculares, para o total de casos positivos e agrupados por tipo de lesão.

O raspado foi o teste que apresentou o menor índice de positividade nos dois tipos de lesão, 66% (N= 307) em cutânea e 49% (N= 44) em mucosa. O kDNA apresentou os maiores índices de positividade, 99% (N= 440) em lesões cutâneas e 94% (N=88) em lesões mucosas. O hsp70 foi positivo em 78% (N= 366) das lesões cutâneas e em 75% (N= 67) das lesões mucosas (Tabela 27).

Tabela 27 – Resultados isolados dos exames e exames moleculares combinados, para o total de casos positivos e agrupados por tipo de lesão

| Exame | Total (N=557) | | | | Cutânea (N=468) | | | | Mucosa (N = 89) | | | |
|------------------------|---------------|-----|------|---------------|-----------------|-----|------|---------------|-----------------|----|------|----------------|
| | - | + | %(+) | I.C.95% | - | + | %(+) | I.C.95% | - | + | %(+) | I.C.95% |
| Raspado | 206 | 351 | 63% | (59,0%;67,0%) | 161 | 307 | 66% | (61,3%;69,9%) | 45 | 44 | 49% | (39,1%;59,8%) |
| kDNA | 29 | 528 | 95% | (92,9%;96,6%) | 28 | 440 | 99% | (96,7%;100%) | 1 | 88 | 94% | (91,9%;96,2%) |
| hsp70 | 124 | 433 | 78% | (74,3%;81,2%) | 102 | 366 | 78% | (74,5%;81,9%) | 22 | 67 | 75% | (66,3%;84,2%) |
| Moleculares combinados | 10 | 547 | 98% | (97,1%;99,3%) | 9 | 459 | 98% | (96,8%;99,3%) | 1 | 88 | 99% | (96,7%;100,0%) |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Na Tabela 28 são apresentados apenas os parâmetros de sensibilidade dos testes considerando dois cenários para posterior discussão, reiterando que todos os indivíduos examinados tinham suspeita clínica de LT.

Quando a referência clínica foi o conjunto de exames, o kDNA apresentou sensibilidade de 95% ao passo que o raspado apresentou 63% de sensibilidade. Quando a referência clínica foram os exames moleculares combinados, o kDNA apresentou 97% de sensibilidade contra 62% do raspado (Tabela 28).

Tabela 28 - Parâmetros de sensibilidade dos testes considerando 2 cenários

| "Referência clínica" | Exame | | "Referência clínica" | | Sensibilidade (I.C.95%) |
|-------------------------------|------------------------|---|----------------------|-----|-------------------------|
| | | | + | - | |
| Conjunto de exames | Raspado | + | 351 | 0 | 0,63 (0,59; 0,67) |
| | | - | 206 | 166 | |
| | kDNA | + | 528 | 0 | 0,95 (0,93; 0,96) |
| | | - | 29 | 166 | |
| | hsp70 | + | 433 | 0 | 0,78 (0,74; 0,81) |
| | | - | 124 | 166 | |
| | Moleculares combinados | + | 547 | 0 | 0,98 (0,97; 0,99) |
| | | - | 10 | 166 | |
| Exames moleculares combinados | Raspado | + | 341 | 10 | 0,62 (0,58; 0,66) |
| | | - | 206 | 166 | |
| | kDNA | + | 528 | 0 | 0,97 (0,95; 0,98) |
| | | - | 19 | 176 | |
| | hsp70 | + | 433 | 0 | 0,79 (0,76; 0,82) |
| | | - | 114 | 176 | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Nas Tabelas 29 e 30 foi empregado o mesmo método da Tabela 26, porém agrupando os casos em função do tipo de lesão.

Na tabela 29 são apresentados os resultados avaliando os dois cenários em amostras de lesão mucosa. No conjunto de exames o teste que apresentou maior sensibilidade foi o kDNA com 94% e o teste que apresentou a menor sensibilidade foi o raspado, com 49%.

Tabela 29 - Parâmetros de sensibilidade dos testes, avaliando apenas pacientes com lesão mucosa, considerando dois cenários.

| "Referência clínica" | Exame | "Referência clínica" | | Sensibilidade (I.C.95%) | |
|-------------------------------|---------|----------------------|----|-------------------------|-------------------|
| | | + | - | | |
| Conjunto de exames | Raspado | + | 44 | 0 | 0,49 (0,39; 0,60) |
| | | - | 45 | 34 | |
| | kDNA | + | 83 | 5 | 0,94 (0,91; 0,96) |
| | | - | 1 | 34 | |
| | hsp70 | + | 67 | 0 | 0,75 (0,65; 0,84) |
| | | - | 22 | 34 | |
| Moleculares combinados | + | 88 | 0 | 0,99 (0,94; 1,00) | |
| | - | 1 | 34 | | |
| Exames moleculares combinados | Raspado | + | 43 | 1 | 0,49 (0,38; 0,60) |
| | | - | 45 | 34 | |
| | kDNA | + | 83 | 5 | 0,96 (0,94; 0,97) |
| | | - | 0 | 35 | |
| | hsp70 | + | 67 | 0 | 0,76 (0,66; 0,85) |
| | | - | 21 | 35 | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

Quando analisados os diferentes testes aplicados a lesões cutâneas, pode-se observar que o kDNA apresentou sensibilidade de 99% no conjunto de exames e 100% de sensibilidade quando utilizado o parâmetro de exames moleculares combinados. O raspado apresentou sensibilidade superior em relação ao observado nas lesões mucosas, com índice de 66% no conjunto de exames e 65% na combinação de exames moleculares (Tabela 30).

Tabela 30 - Parâmetros de sensibilidade dos testes, avaliando apenas pacientes com lesão cutânea, considerando dois cenários

| "Referência clínica" | Exame | "Referência clínica" | | Sensibilidade (I.C.95%) | |
|-------------------------------|---------|----------------------|-----|-------------------------|-------------------|
| | | + | - | | |
| Conjunto de exames | Raspado | + | 307 | 0 | 0,66 (0,61; 0,70) |
| | | - | 161 | 132 | |
| | kDNA | + | 440 | 0 | 0,99 (0,94; 1,00) |
| | | - | 28 | 132 | |
| | hsp70 | + | 366 | 0 | 0,78 (0,74; 0,82) |
| | | - | 102 | 132 | |
| Moleculares combinados | + | 459 | 0 | 0,98 (0,96; 0,99) | |
| | - | 9 | 132 | | |
| Exames moleculares combinados | Raspado | + | 298 | 9 | 0,65 (0,60; 0,69) |
| | | - | 161 | 132 | |
| | kDNA | + | 440 | 0 | 1,00 (0,96; 1,00) |
| | | - | 19 | 141 | |
| | hsp70 | + | 366 | 0 | 0,80 (0,97; 1,00) |
| | | - | 93 | 141 | |

N= número de amostras. I.C.95%= Intervalo de confiança de 95%.

5.2 A EXPRESSÃO GÊNICA DE HUMANOS E PARASITAS RELACIONADAS A CARGA PARASITÁRIA E CARGA VIRAL

Esta seção compreende os resultados dos experimentos realizados com um número de 100 amostras clínicas com suspeita de LT coletadas num período de tempo contínuo, de fevereiro a novembro de 2015, sendo 88 amostras positivas (infecção por *Leishmania* confirmada por PCR em tempo real) e 12 negativas. A relação dos genes investigados quanto a expressão gênica está apresentada no Apêndice C.

5.2.1 Quantificação da carga parasitária

Foram realizados os ensaios de linearidade (curva-padrão) para determinação do limite de detecção para *L. (V.) braziliensis*, sendo detectados cinco pontos para o hsp70 (10^6 a 10^2 parasitas/mL). A partir da curva-padrão foram obtidas as quantificações da carga parasitária.

As amostras com carga parasitária positiva totalizaram 92 amostras e foram classificadas em dois grupos para as análises de expressão: High Parasite (HighP) e Low Parasite (LowP), para amostras com alta e baixa carga parasitária, respectivamente. No grupo HighP foram agrupadas 55 amostras com carga mínima de 117,47 parasitas/mL e máxima de 6.350.526 parasitas/mL. O grupo LowP totalizou 37 amostras com carga mínima de 0,98 parasitas/mL e máxima de 99,28 parasitas/mL.

5.2.2 Quantificação da carga viral

Após a extração de RNA, síntese de cDNA e PCR da amostra CP, o produto obtido após a PCR foi purificado conforme descrito anteriormente e visualizado em gel de agarose (Figura 14).

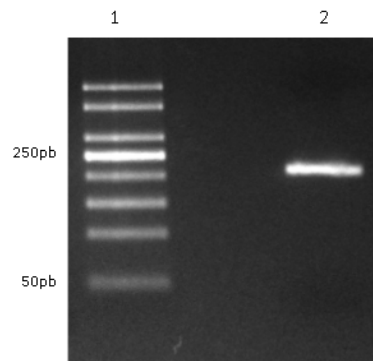


Figura 14 - Gel de agarose para confirmação da purificação do fragmento para curva padrão. Gel de agarose a 2% corado com GelRed. Linha 1: marcador de peso molecular de 50pb e linha 2: fragmento purificado da amostra CP com fragmento de 240 pares de bases.

Posteriormente a clonagem do produto purificado, foram selecionadas 10 colônias com perfil positivo (coloração branca) e submetidas a PCR direta com os iniciadores LRV F e LRV R. Os produtos foram visualizados em gel de agarose (Figura 15) confirmando a positividade dos clones selecionados na placa.

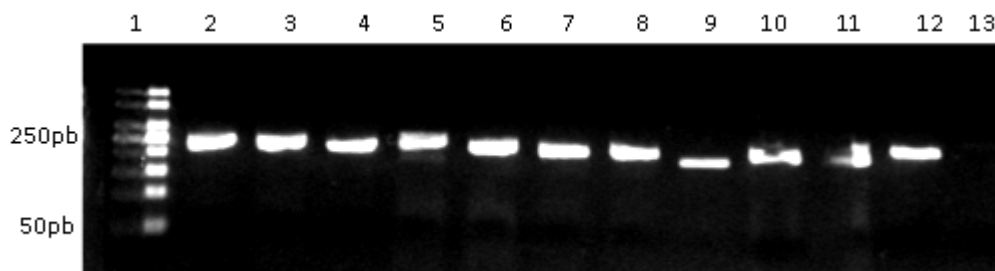


Figura 15 - Gel de agarose com as colônias selecionadas para PCR de colônia. Gel de agarose a 2% corado com GelRed. Linha 1: Marcador de peso molecular de 50pb; Linhas 2 a 11: colônias selecionadas positivas para a transformação; Linha 12: Controle positivo da PCR e Linha 13: Controle negativo da PCR

Após a reação de restrição enzimática com a enzima *NotI*, o resultado foi verificado em gel de agarose a 0,8% (Figura 16 A) e o fragmento excisado do gel foi purificado com a finalidade de obtenção somente do fragmento referente a sequencia do LRV1. A purificação foi confirmada em gel de agarose a 2% onde foi observado a presença do fragmento de aproximadamente 250 pares de bases (Figura 16 B).

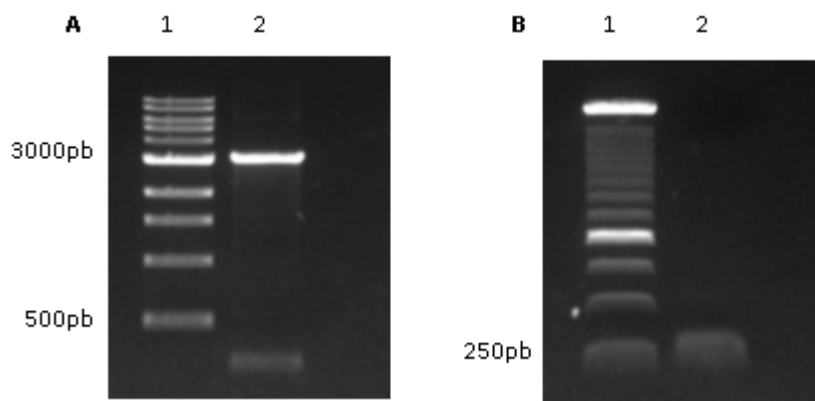


Figura 16 - Gel de agarose com resultado da reação de restrição e purificação. Figura 16 A: Gel de agarose a 0,8% corado com GelRed™. Linha 1: Marcador de peso molecular de 1kB. Linha 2: Fragmento após reação de restrição com a enzima NotI. Figura 16 B: Gel de agarose a 1% corado com GelRed™. Linha 1: Marcador de peso molecular de 250 pb. Linha 2: fragmento após purificação.

O resultado obtido no ensaio de qPCR após a diluição seriada pode ser observado na Figura 17. As diluições foram realizadas nas concentrações de 1×10^8 a 1×10^0 . O valor de R^2 foi igual a 0,99795 e obtida a fórmula $y = 2,9327x + 5,6132$ para a quantificação do número de cópias do LRV1. O ensaio de qPCR para obtenção da curva padrão foi realizado em triplicata e os valores de cada ponto representam a média das triplicatas.

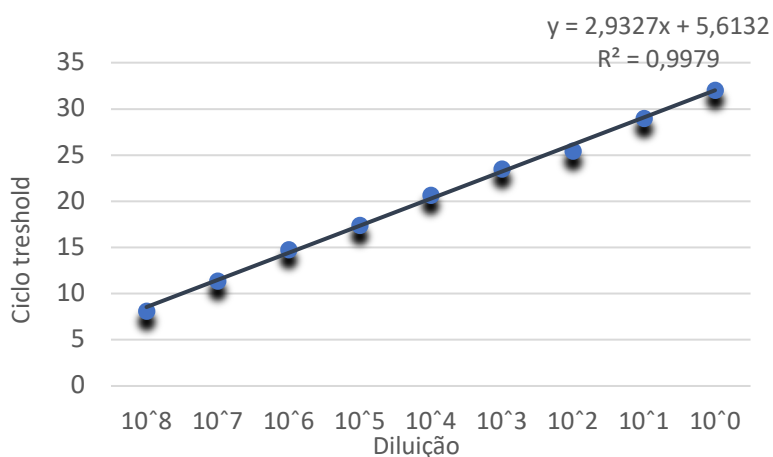


Figura 17 – Gráfico da curva padrão obtida por ensaio de qPCR com as diluições seriadas do fragmento de LRV1 purificado.

A quantificação da carga viral foi realizada num total de 100 amostras clínicas. Destas, foi possível detectar cópias virais em um total de 62 amostras. A distribuição das amostras positivas na reação de qPCR para LRV1 podem ser visualizadas na Figura 18, onde observamos a distribuição das 62 amostras em

relação ao número de cópias de LRV1 corrigida pelo número de parasitas detectado na carga parasitária.

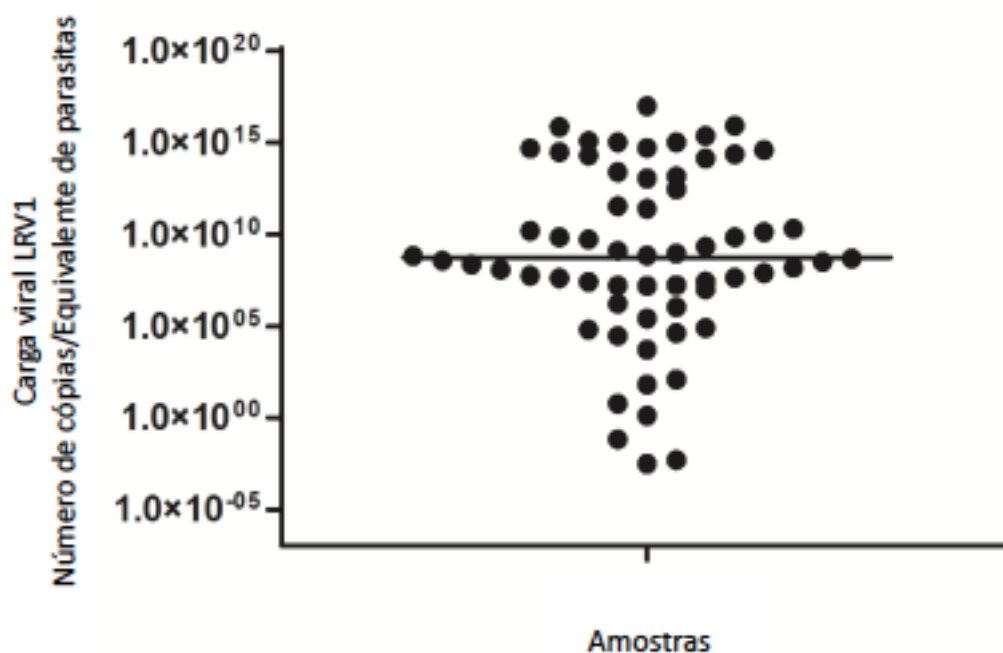


Figura 18 - Distribuição das 62 amostras com carga viral de LRV1 detectada por qPCR. Os pontos se correlacionam no eixo X ao número de cópias de vírus equivalente ao número de parasitas.

Foram positivos no teste de quantificação da carga parasitária um total de 62 amostras, que foram agrupadas em alta carga viral (HighLV) e baixa carga viral (LowLV). No grupo HighLV foram agrupadas 35 amostras com carga mínima de 5,56 cópias/mL e máxima de 93.453,59 cópias/mL. O grupo LowLV totalizou 27 amostras com carga mínima de 0,08 cópias/mL e máxima de 3,46 cópias/mL. O número de cópias de LRV1 foi corrigido pelo número de cópias do parasita.

5.2.3 A relação LRV1 x Carga parasitária

A partir da classificação das amostras em relação a carga parasitária e a presença e ausência do LRV1, foi realizado o Teste exato de Fisher, com a finalidade de verificar a associação entre o LRV1 e a carga parasitária, onde a hipótese nula é a de que o LRV1 não possui relação com a carga parasitária e a hipótese alternativa de que o LRV1 possui relação. Foi obtido o valor de $p=$

0.001603, indicando que a presença do LRV1 possui associação com a carga parasitária (Figura 19).

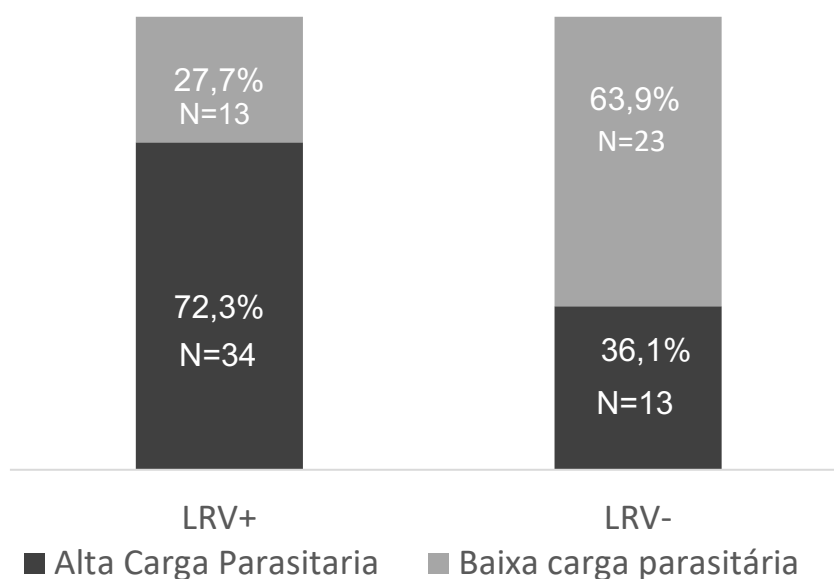


Figura 19 - Relação entre os resultados de carga parasitária e presença ou ausência de LRV1.

5.2.4 Ensaio multiplex de expressão gênica

Os resultados dos ensaios de expressão gênica foram divididos em duas partes, a primeira compreende os resultados da expressão dos genes humanos e a segunda a resultados da expressão dos genes do parasita.

Do total de 74 genes humanos investigados (Apêndice C), seis genes (ligante de quimiocina 2 - CCL2, ligante de quimiocina11 - CXCL11, receptor de quimiocina 3 - CXCR3, Interleucina 17A - IL-17A, Interleucina 4 - IL-4 e molécula adaptadora de receptor do tipo Toll - TICAM1) apresentaram resultados negativos para a maioria das amostras testadas, e devido a falha de desempenho no ensaio multiplex, os resultados desses genes não foram explorados.

As análises dos demais genes foram realizadas pela comparação da expressão dos genes entre diferentes grupos de amostras.

A análise inicial avaliou a expressão dos genes no grupo de amostras com resultado negativo para leishmaniose tegumentar versus o grupo de amostras positivas para leishmaniose tegumentar. Os genes de "*protein kinase interferon inducible doublestranded RNAdependent activator* – PRKRA", do Fator de

crescimento Beta 2 - TFGB2 e do Receptor associado 3 do TNF - TRAF3 foram mais expressos no grupo de amostras positivas para LT (Figura 20). No grupo de amostras negativas nenhum gene foi significativamente mais expresso.

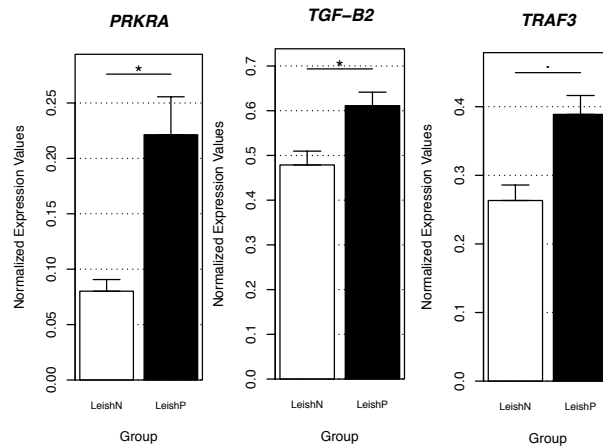


Figura 20 – Genes expressos diferencialmente entre os grupos de amostras positivas e negativas para LT. LeishN = amostras positivas para LT; LeishP = amostras negativas para LT. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

Quando comparadas as expressões gênicas do grupo com baixa carga parasitária versus o grupo com alta carga parasitária, alguns genes apresentaram diferença significativa na expressão: Caspase 1 - CASP1, receptor de quimiocina CCR8, Interleucina 12 - IL12, Interleucina 21 - IL21, Interleucina 1 alfa - ILA e Inflamassoma de NALP3 - NALP3, todos com expressão aumentada no grupo com baixa carga parasitária (Figura 21).

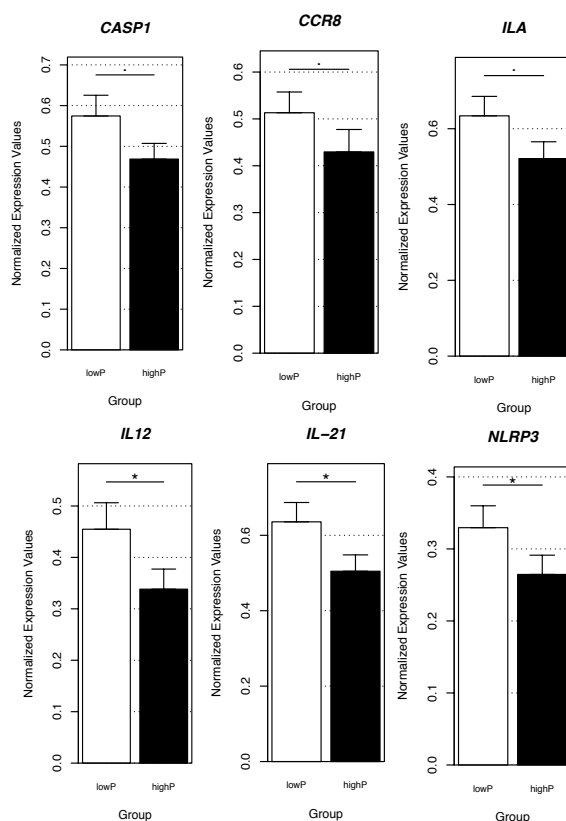


Figura 21 - Genes diferencialmente expressos nos grupos com baixa carga parasitária e alta carga parasitária. lowP = amostras com baixa carga parasitária; highP = amostras com alta carga parasitária. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

Quando comparadas as expressões nos grupos de amostras de pacientes com a forma cutânea (LC) da doença em relação ao grupo de amostras com a forma mucosa (LM), apenas o gene da Caspase 5 - CASP5 foi significativamente mais expresso no grupo LC (Figura 22).

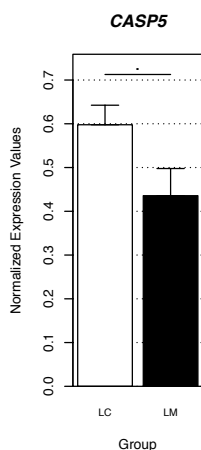


Figura 22 – Gene humano expresso diferencialmente entre os grupos de amostras de lesão cutânea e amostras de lesão mucosa. LC = amostras de lesão cutânea; LM = amostras de lesão mucosa. - = valor de $p \leq 0,1$.

Foram obtidos resultados com significância estatística para os genes do Fator de crescimento Beta - TGF1 e da Interleucina 12 - IL12 para os grupos de LM (Figura 23) e dos genes da Interleucina 12 - IL12, da Interleucina 21 - IL21 e do gene do Inflamassoma de NLRP3 para os grupos LC (Figura 24), quando consideramos grupos de amostras em relação a carga parasitária agrupadas por tipo de lesão (LC – leishmaniose cutânea e LM – leishmaniose mucosa).

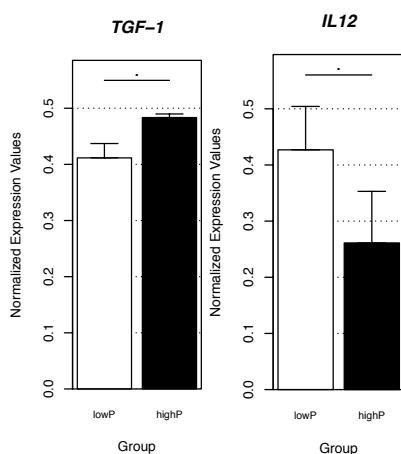


Figura 23 – Genes humanos expressos diferencialmente entre os grupos com baixa carga parasitária e alta carga parasitária em amostras de lesão mucosa. lowP = amostras com baixa carga parasitária; highP = amostras com alta carga parasitária. - = valor de $p \leq 0,1$.

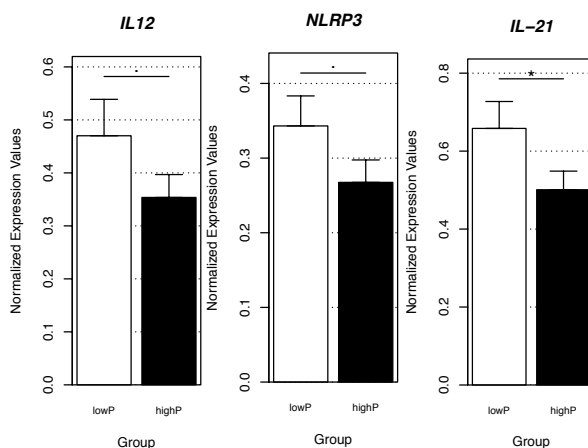


Figura 24 – Genes humanos expressos diferencialmente entre os grupos com baixa carga parasitária e alta carga parasitária em amostras de lesão cutânea. lowP = amostras com baixa carga parasitária; highP = amostras com alta carga parasitária. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

Analisamos a participação do LRV1 na expressão dos genes estudados e para isso consideramos grupos formados por amostras LRV negativas (LRVneg) x amostras LRV positivas (LRVpos), considerando todas as amostras (Figura 25), apenas amostras de pacientes com lesão mucosa (Figura 26) e amostras de pacientes com lesão cutânea. Nesse último grupo não foi observado nenhum

gene diferencialmente expresso, bem como na comparação entre os grupos com alta e baixa carga viral.

Os genes da Caspase 1 - CASP1, Interleucina 21 - IL21 e do Receptor associado 6 do TNF - TRAF6 foram mais expressos no grupo negativo para LRV1 enquanto Caspase 8 - CASP8 e IL17A foram mais expressos no grupo positivo para LRV1 (Figura 25). O gene da Interleucina 17A não apresentou diferença significativa, provavelmente por ser um dos alvos que foi detectado em um pequeno número de amostras, porém foi ilustrado devido a recente descoberta da participação desse gene no desfecho clínico de amostras LRV positivas e será discutido posteriormente com mais detalhe.

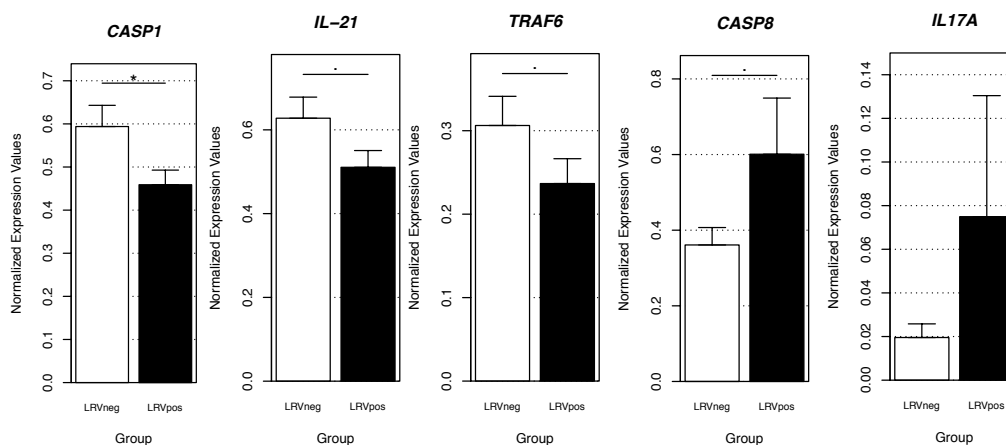


Figura 25 – Genes humanos expressos diferencialmente entre os grupos de amostras negativas para o LRV1 em comparação com amostras positivas para o LRV1. LRVneg = amostras negativas para o LRV; LRVpos = amostras positivas para o LRV. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

Os genes ilustrados na figura 26 apresentaram expressão aumentada no grupo de amostras LRV negativas em comparação com as amostras LRV positivas em pacientes com lesão mucosa.

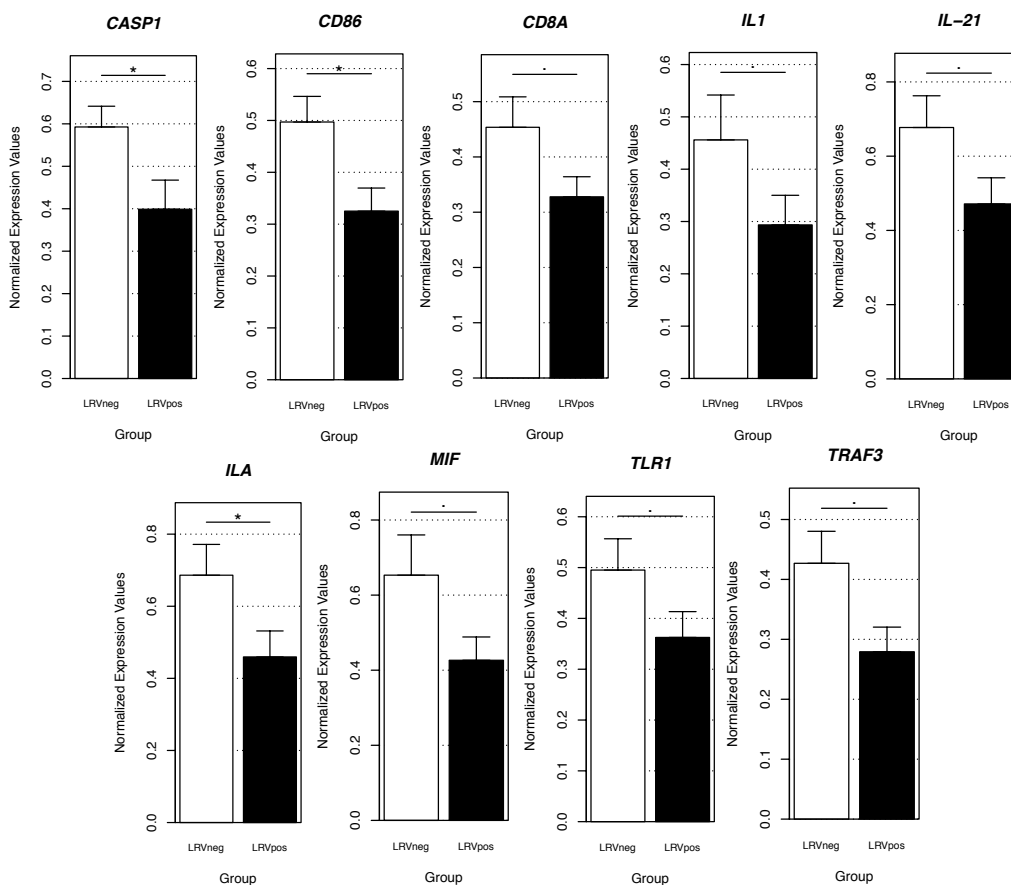


Figura 26 – Genes humanos expressos diferencialmente entre os grupos de amostras negativas e positivas para o LRV1 em lesões mucosas. LRVneg = amostras negativas para o LRV; LRVpos = amostras positivas para o LRV. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

Também analisamos comparativamente a expressão dos genes considerando quatro grupos de amostras: (i) alta carga parasitária e alta carga viral, (ii) alta carga parasitária e baixa carga viral, (iii) baixa carga parasitária e alta carga viral e (iv) baixa carga parasitária e baixa carga viral. Com exceção de três genes (MYD88, TGF1 e CASP5) os demais genes foram menos expressos no último grupo, porém nenhum com significância estatística. Esses resultados precisam ser melhor investigados, mas reforçam a participação do parasita e de seu endossimbionte na regulação da expressão de genes humanos.

As análises da expressão dos genes de *Leishmania* também foram realizadas comparando a expressão de genes em diferentes grupos. Quando comparadas as expressões no grupo com alta carga parasitária (highP) versus o grupo com baixa carga parasitária (lowP), foram expressos com significância estatística os genes da Glicoproteína 63 - GP63, Proteína quinase ativadora de

mitose - MAPK e da peroxiredoxina – PXR, todos mais expressos no grupo com baixa carga parasitária (Figura 27).

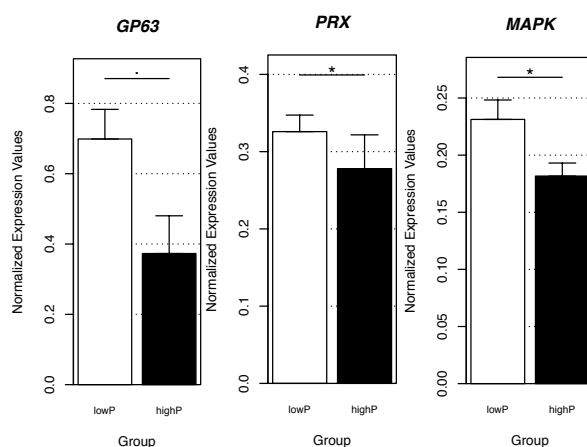


Figura 27 – Genes de *Leishmania* expressos diferencialmente entre os grupos de amostras com baixa carga parasitária x alta carga parasitária. lowP = amostras com baixa carga parasitária; highP = amostras com alta carga parasitária. * = valor de $p \leq 0,05$; - = valor de $p \leq 0,1$.

A análise da expressão dos genes de *Leishmania* entre os grupos de amostras LRV1 positivas e LRV1 negativas demonstra que os genes da Proteína do choque térmico 60 foi diferencialmente mais expresso no grupo LRV1 positivo ao passo que o gene da Tripanotona redutase – TRYR foi mais expresso no grupo LRV negativo (Figura 28).

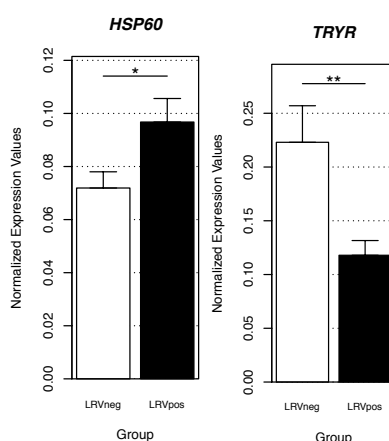


Figura 28 - Genes de *Leishmania* expressos diferencialmente entre os grupos de amostras LRV1 negativo x LRV1 positivo. LRVneg = amostras negativas para o LRV; LRVpos = amostras positivas para o LRV. * = valor de $p \leq 0,05$; ** = valor de $p \leq 0,01$.

Analisando os grupos negativos e positivos para LRV1 em amostras de lesão cutânea observamos maior expressão no grupo LRVneg para os genes gama glutamil cisteína sintetase – GSH, da Proteína quinase ativadora de mitose

– MAPK, da peroxiredoxina – PRX e da Tripanotona redutase – TRYR, enquanto o gene da Thiolase-like – THIOIOL foi mais expresso no grupo LRVpos (Figura 29).

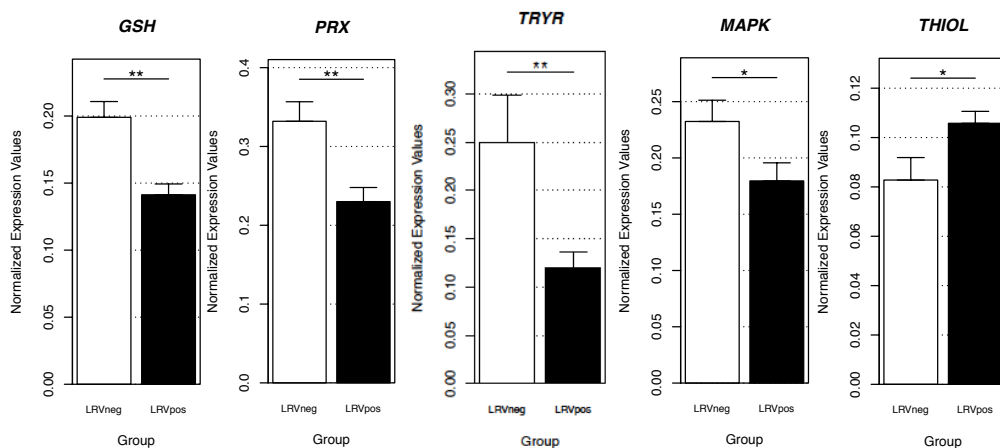


Figura 29 - Genes de *Leishmania* expressos diferencialmente entre os grupos de amostras LRV negativo x LRV positivo em Lesões Cutâneas. LRVneg = amostras negativas para o LRV; LRVpos = amostras positivas para o LRV. * = valor de $p \leq 0,05$; ** = valor de $p \leq 0,01$.

A análise da expressão dos genes de *Leishmania* entre os grupos de pacientes com LC e LM não apresentou diferença significativa para os genes analisados.

5.3 A FILOGENIA DO *LEISHMANIA RNA VÍRUS 1*

As sequências analisadas correspondem a LRV1 detectados em cepas de *Leishmania* isoladas em diferentes áreas da região Amazônica brasileira, da Bolívia e Guiana Francesa (Figura 30).



Figura 30 - Mapa parcial da América do Sul indicando a distribuição geográfica das cepas de *Leishmania* positivas para LRV1, incluindo as sequências do presente estudo. Mapa parcial do Brasil (branco), dividido pelos Estados. Países vizinhos (cinza) e Bolívia e Guiana Francesa em cinza escuro. Os grupos são os mesmos que relatados por Tirera et. al. (2017). Os números indicam as sequências analisadas de cada região geográfica, seguindo a ID apresentada na Tabela 17. O mapa foi construído usando o Quantum GIS versão 2.18.13 (<http://download.qgis.org>), as camadas de base foram adquiridas de Carlos Efrain Porto Tapiquen, Orogenesis Soluciones Geograficas, Porlamar, Venezuela, 2015, baseado em formas do Instituto de Pesquisa de Sistemas Ambientais (ESRI) com distribuição gratuita (<http://tapiquen-sig.jimdo.com>). Os pontos correspondentes de cidades e países foram obtidos do Google Earth (<http://earth.google.com>).

5.3.1 Características das sequências

As sequências apresentaram 252 sítios conservados, 192 sítios polimórficos e 166 sítios parcimoniosamente informativos. A composição de nucleotídeos corresponde a 26,3%(U), 23,3%(C), 28,9%(A), 21,5%(G). Foi

realizado o teste Phi (BRUEN; PHILIPPE; BRYANT, 2006) e não foi observada evidência significativa de recombinação.

5.3.2 Definição dos grupos e similaridade das sequências

Para a definição dos nomes dos grupos observados nas análises filogenéticas foi adotada a mesma nomenclatura utilizada anteriormente (TIRERA et al., 2017) uma vez que os mesmos seis grupos observados no estudo anterior foram mantidos (Figura 31), embora tenhamos usado uma região pequena do genoma viral, enquanto no estudo anterior os grupos foram definidos após análise do genoma completo.

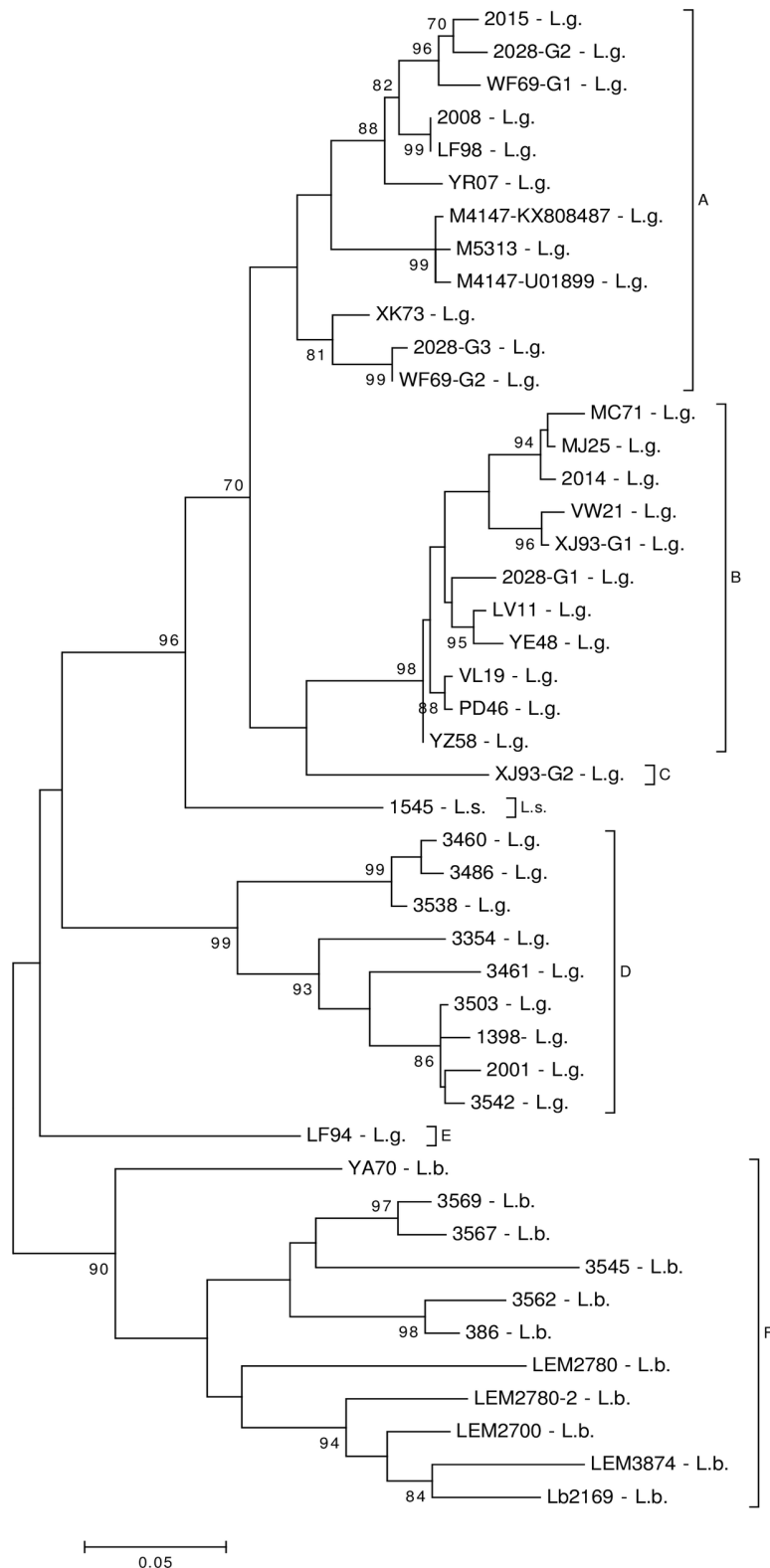


Figura 31 - Árvore filogenética de *Leishmania* RNA Virus 1 detectados em diferentes espécies de *Leishmania* (*Viannia*) de países da América do Sul. Os grupos A a F foram definidos anteriormente (TIRERA et al., 2017). L.b. = *L. braziliensis*; L.g. = *L. guyanensis*; L. = *L. shawi*. Para detalhes das amostras, ver Tabela 17. A árvore foi inferida com base no modelo Tamura 92 e distribuição Gamma. São mostrados os valores de Bootstrap (após 10.000 repetições) acima de 70%.

Todas as sequências de LRV1 de *L. guyanensis* obtidas no presente estudo se agruparam no grupo D, que no estudo anterior foi representado por uma sequência de LRV1 de *L. guyanensis* isolada no Brasil (1398) e por sequência de LRV1 de *L. guyanensis* (2001) isolada de um paciente que adquiriu a infecção no Brasil (Manaus, Amazonas).

Todos os grupos apresentaram valores de bootstrap altos, indicando bom suporte para a formação desses grupos. Os grupos de A a E configuram sequências de vírus de *L. guyanensis* e o grupo F com sequências LRV1 de *L. braziliensis*. Adicionalmente, analisamos, pela primeira vez, sequência de LRV1 detectado em *L. shawi* e essa foi identificada como Ls na árvore filogenética.

A rede construída pelo NeighborNet (Figura 32) demonstram os mesmos grupos observados na Figura 31. Na MinSpanning Network três clusters foram apresentados, sendo um composto por todas as sequências de LRV1 de *L. braziliensis* (I), o outro por todas as sequências de LRV1 de *L. guyanensis* do grupo D (II) e o terceiro pelas demais sequências de LRV1 de *L. guyanensis*, além de *L. shawi* (Figura 33).

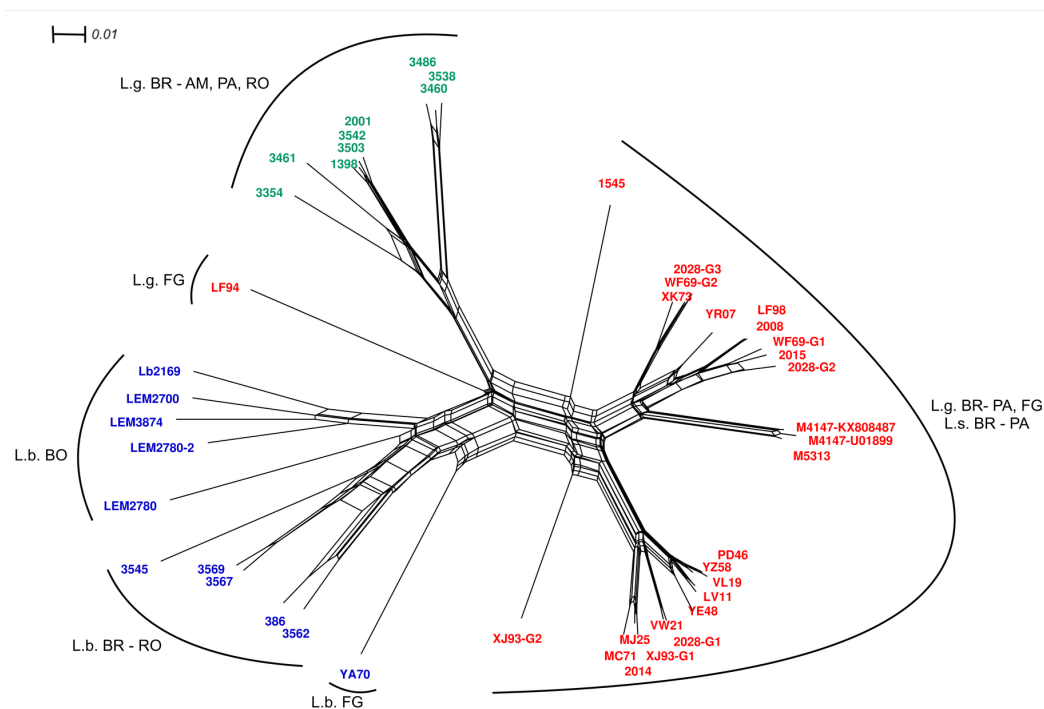


Figura 32 – NeighborNet mostrando a relação entre sequências de LRV1 de diferentes espécies de *Leishmania* (*Viannia*).

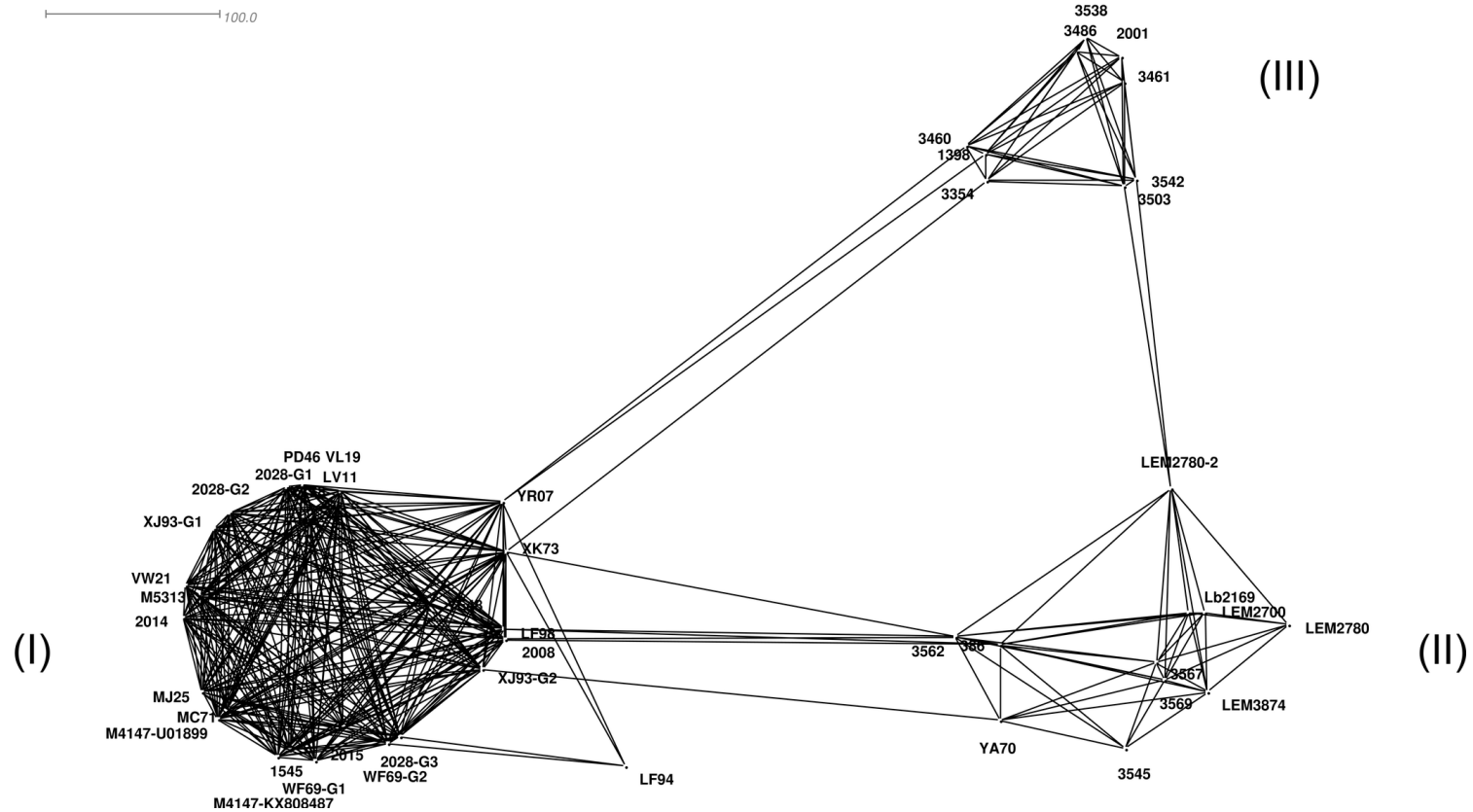


Figura 33 – Minimum Spanning Network mostrando a conexão entre as sequências de LRV1 de diferentes espécies de *Leishmania (Viannia)*.

Os grupos A, B e C mantiveram a mesma composição do que relatado anteriormente (TIRERA et al., 2017). Destaca-se o fato de que todas as sequências de LRV1 de *L. guyanensis* da Guiana Francesa, com exceção da sequência do grupo E, estão nesses grupos, embora no grupo A um subgrupo bastante robusto seja observado e este contém 3 sequências de LRV1 de *L. guyanensis* de Monte Dourado. Duas dessas, U01899 e KX808487, obtidas da mesma cepa de *L. guyanensis* disponibilizadas nos anos de 1994 e 2017, respectivamente, e estas apresentaram três diferenças de nucleotídeos entre elas.

No grupo A, com exceção das duas sequências idênticas, as divergências variaram de 2 (2028_{G3} x WF69_{G2}) a 42 (2028_{G2} x M4147-U01899) com média igual a 29,5. O grupo B, composto somente por vírus de cepas isoladas na Guiana Francesa, apresentou divergência mínima igual a 2 (3354 x 3542) e maior divergência igual a 27 (MC71 x VW21).

As sequências de LRV1 de cepas de *L. guyanensis* identificadas neste trabalho e isoladas de pacientes de Rondônia e do Amazonas apresentaram a menor diversidade dentro do grupo D (variando de 4 a 46, com média igual a 29,06). A única sequência de LRV1 de *L. guyanensis* de RO (3538) apresentou menor divergência com as sequências 3460 e 3486 do AM (igual a 8 e 9 respectivamente) e maior divergência com as sequências 3354, do PA e 2001, LF94 e XJ93_{G2} da Guiana Francesa: 48, 47, 66 e 68, respectivamente.

A média geral da distância de Tamura foi de 0,187 e a distância máxima foi observada entre sequências LRV1 do grupo F, composto de *L. braziliensis* e sequências de LRV1 do grupo A de *L. guyanensis* (0,329), mostrando 91 diferenças. As sequências de LRV1 do grupo B apresentou a menor distância média do grupo (0,040), enquanto as sequências de LRV1 do grupo F apresentou a maior distância média do grupo (0,146); essa distância foi próxima da média entre as sequências do grupo A e B (média = 0,155). Os grupos A e D apresentaram 0,063 e 0,084 como distância média dentro de cada grupo. A distância média mais baixa entre os grupos foi observada entre os grupos B e C (0,0108), seguida dos grupos A e B (0,114). Considerando apenas LRV1 de *L.*

guyanensis, as sequências do grupo D foram as mais divergentes (entre a distância média do grupo variando de 0,190 a 0,203), corroborando sua posição MinSpanning network (Figura 31).

As duas sequências de LRV1 de cepas de *L. guyanensis* mais divergentes foram LF94 e XJ93_{G2}. A sequência LF94 pertence ao grupo E apresentou maior similaridade com o grupo D, ao passo que a sequência XJ93_{G2} que pertence ao grupo C apresentou maior similaridade com as sequências dos grupos A e B. O grupo E manteve-se isolado, conforme demonstrado anteriormente, apesar da sequência M92355 não ter sido incluída nas análises.

A sequência única de LRV1 de *L. shawi* (1545) apresentou maior similaridade com as sequências de LRV1 de *L. guyanensis* dos grupos A e B (mínima de 51 e máxima de 73, média = 66,6) e maior divergência com o grupo F de *Leishmania (V.) braziliensis* (mínima de 72 e máxima de 92, média 79,7).

No grupo F, além das sequências de LRV1 de *L. (V.) braziliensis* já reportadas (YA70 e Lb2169), foram agrupadas as demais sequências de cepas da mesma espécie de *Leishmania*, provenientes de isolados da Bolívia e de Rondônia/Brasil. Não foi identificada nenhuma sequência idêntica dos vírus de *L. braziliensis*. As sequências com menor divergência foram a 3569 e a 3567 (número de diferenças igual a 12) e a maior divergência observada entre as sequências 3545 e Lb2169 da Bolívia (número de diferenças igual a 77). Considerando somente os vírus encontrados em cepas de *Leishmania (V.) braziliensis* de RO, as diferenças variaram entre mínimo de 12 e máximo de 58, média = 40,9. As cepas de LRV1 de *Leishmania (V.) braziliensis* da Bolívia apresentaram maior diferença entre as sequências (mínimo 36 e máximo 68, média igual a 49,5). A única cepa de LRV1 de *Leishmania (V.) braziliensis* da Guiana Francesa (YA70) apresentou divergência semelhante entre os demais parasitas *Leishmania* de RO e da Bolívia (mínima 62 a máxima 76, média = 68). Dentro do grupo F a sequência mais divergente foi a YA70. A árvore filogenética (Figura 20) mostra a formação de dois sub-grupos, separando as sequências de LRV1 da Bolívia daquelas de RO, mas com baixo suporte de bootstrap. Embora a divergência dentro desse grupo seja semelhante a observada entre os grupos

A e B de *L. guyanensis*, o resultado apresentado na MinSpanning Network suporta ainda mais que as sequências de LRV1 de *L. braziliensis* aqui analisadas formam um único grupo (Figura 31).

As sequências foram analisadas no software BLOG versão 2.0 (WEITSCHEK et al., 2013) com a finalidade de detectar caracteres específicos de LRV1 de diferentes espécies de *Leishmania* e localizações geográficas. Em todas as sequências de LRV de *L. braziliensis* foi detectado uma base “G” na posição 369. Quando comparadas as sequências de *L. braziliensis* do Brasil (RO) e da Bolívia, foram detectados caracteres específicos de vírus do Brasil (possui G na posição 247 e G na posição 316), e da Bolívia (possui A na posição 262 e G na posição 369). Nas sequências de LRV de *L. guyanensis* do Brasil os caracteres específicos foram detectados em uma única posição (possui T na posição 196) e *L. guyanensis* da Guiana Francesa (não possui C na posição 79 e G na posição 393).

6 DISCUSSÃO

6.1 ASPECTOS DA EPIDEMIOLOGIA DA LT NO ESTADO DE RONDÔNIA

Foram analisadas 724 amostras de pacientes com suspeita clínica de LT. Uma das amostras analisadas foi coletada de paciente que apresentava a forma disseminada da doença, infecção causada por *L. braziliensis* e negativa para o LRV1, as demais 723 amostras correspondiam a lesões cutâneas e mucosas. Devido parte das análises estatísticas utilizarem o tipo de lesão para inferir as associações, a amostras de leishmaniose disseminada foi excluída das análises realizadas nesse estudo.

Um total de 77% (N=557) das amostras analisadas foram positivas para pelo menos um dos testes parasitológicos aplicados. Apesar de se tratar de uma análise baseada em amostra com suspeita clínica, o índice de positividade foi alto, mas não podemos inferir que as demais amostras analisadas eram realmente negativas para LT.

A ausência de um exame considerado padrão ouro para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana, ou mesmo de uma referência clínica padronizada, prejudica a estimativa dos parâmetros clássicos de acurácia diagnóstica dos testes (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo) (BOSSUYT et al., 2015).

As análises das variáveis (sexo, idade, tipo de lesão, forma de aquisição da doença, relato de LT progressa) foram realizadas com base nas 557 amostras que tiveram resultado positivo para pelo menos um dos três testes.

A idade dos pacientes positivos para LT variou de 2 a 86. Na figura 13 podemos observar que houve uma concentração maior dos casos, na escala entre 20 e 60 anos. O número de casos foi mais frequente em pacientes do sexo masculino totalizando 78,6% (N=438) dos casos, e apenas 21,4% das amostras correspondiam a pacientes do sexo feminino. A forma de aquisição mais frequente foi no exercício de atividade remunerada, correspondendo a 84,4% do total de casos. Esse perfil é similar ao descrito em outras áreas da região

Amazônica. No Acre, 63 a 81,1% dos casos de LT foram registrados em pacientes do sexo masculino, com idade variando de 2 a 86, sendo a maior parte entre 15 e 45 anos (APARECIDA; GALATI, 2008; OLIART-GUZMÁN et al., 2013; TELES et al., 2015). No Amazonas também foi observado um maior número de casos de LT em pacientes do sexo masculino com 86,2% dos casos e cerca de 90% deles também ocorreram na faixa etária entre 15 a 45 anos (CHAGAS et al., 2006). A forma de aquisição abordada não foi realizada de acordo com os demais trabalhos descritos na literatura, onde é verificado o tipo de atividade exercida pelo paciente. Aqui, abordamos somente se a aquisição foi durante o exercício de atividade remunerada ou em atividades de lazer.

Cerca de um terço dos pacientes (N=130/23,3%) positivos relatam a existência de LT progressa (43,08% de LM e 56,92% de LC), e destes, 95,5% relata ter feito algum tipo de tratamento para a lesão anterior. Não foi avaliado o tipo de tratamento realizado pelo paciente, se este foi específico para LT e ainda se seguiu o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a). Um dos principais fatores relacionados a recidiva de LT é a falha terapêutica, que é relatada em até 33% dos casos, sendo associada a espécie do parasita (AREVALO et al., 2007; LLANOS-CUENTAS et al., 2008), a presença de LRV1 (ADAUI et al., 2015; BOURREAU et al., 2015), resposta imune do hospedeiro (TUON et al., 2008), ao tipo de lesão (AMATO et al., 2008a), entre outros.

A lesão cutânea foi a forma clínica mais frequente nas amostras analisadas, caracterizada em 468 pacientes (84,02%), as demais amostras (N=89/15,98%) eram de pacientes que apresentaram lesões mucosas. Por se tratar de uma amostra coletada no Centro de Referência em Medicina Tropical do estado, não é possível estimar que esse número represente a porcentagem de LC e LM em Porto Velho, tendo em vista que é um hospital de referência, é provável que uma maior quantidade de pacientes com a forma clínica mucosa seja encaminhada a esse centro. De forma geral, a proporção de LM nas Américas é de 3,1% em relação a LC, porém, esse número varia conforme a frequência das espécies, aspectos genéticos e imunológicos do hospedeiro, e ainda a disponibilidade de diagnóstico e tratamento (REVEIZ et al., 2013). No Brasil, em média 5 a 7% dos pacientes evoluem para LM (AMATO et al., 2008a;

LESSA et al., 2007), entretanto na Bolívia (país fronteiro com o estado de Rondônia) essa porcentagem varia de 12 a 14,5% (TEDESQUI et al., 2012), semelhante ao observado nesse estudo. É importante ressaltar que na Bolívia o tratamento para LT é custeado pelo paciente, sendo o acesso não universal.

Em 433 amostras foi possível a identificação da espécie de *Leishmania* (Tabela 23). A espécie mais frequente foi *L. braziliensis* identificada em 84,79% dos casos. Esse cenário é o observado em outras regiões que fazem fronteira com o estado de Rondônia, como o Mato Grosso (CARVALHO et al., 2006) e a Bolívia (MARTINEZ et al., 2001). No Acre, a espécie mais frequente também é *L. braziliensis*, responsável por cerca de 60% dos casos humanos de LT, seguido de infecções por *L. shawi* (TELES et al., 2015) ou *L. lainsoni* (TOJAL DA SILVA et al., 2006). No nosso estudo a segunda espécie mais frequente foi *L. guyanensis*, sendo esta espécie responsável por cerca de 70% dos casos de LT no Amazonas, único estado do Brasil onde *L. braziliensis* não ocorre com maior frequência (CAMARA COELHO et al., 2011; GUERRA et al., 2011). Em Rondônia, um estudo conduzido pelo nosso grupo já havia descrito o cenário de distribuição das espécies em 156 amostras clínicas (CANTANHÊDE et al., 2015), e a frequência das espécies é muito semelhante ao observado nesse estudo, com destaque para a identificação de *L. lindenbergi*, sendo o primeiro relato dessa espécie em Rondônia e que, até o momento, só havia sido observada em uma região do Pará (SILVEIRA et al., 2002). É importante ressaltar que as amostras analisadas no estudo anterior não fazem parte no número amostral analisado no presente estudo.

A frequência das espécies por tipo de lesão foi avaliada em conjunto com a presença ou não do LRV1 (Tabela 30). Devido a baixa frequência das demais espécies, com exceção de *L. braziliensis*, não foi possível fazer correlação entre espécie e o tipo de lesão. De 340 amostras identificadas como *L. braziliensis*, 279 eram de lesão cutânea (82,06%) e 61 de lesão mucosa (17,94%). Essa é a espécie mais associada a lesões mucosas (AMATO et al., 2008b). Em 43 amostras positivas para *L. guyanensis*, 37 (86,05%) correspondiam a lesões cutâneas e 6 (13,95%) a lesões mucosa. Essa espécie é pouco associada a

casos de LM, mas já foi relatada no Amazonas (GUERRA et al., 2011) e em Rondônia (CANTANHÊDE et al., 2015).

As outras espécies relatadas (*L. lainsoni* N=8, *L. shawi* N=7, *L. amazonensis* N=2 e *L. lindenbergi* N=1) foram detectadas somente em amostras de pacientes com lesão cutânea.

O teste de detecção do LRV1 foi executado em todas as amostras que tiveram resultado positivo em pelo menos um dos marcadores moleculares, totalizando 547 amostras e foi positivo em 198 (36,2%) amostras. O LRV1 parece ter uma distribuição geográfica limitada, uma vez que algumas regiões relatam elevadas frequências do vírus (ADAUI et al., 2015; BOURREAU et al., 2015; CANTANHÊDE et al., 2015; WEEKS et al., 1992a) com até 74% de coinfeção (GINOUVÈS et al., 2016) ao passo que, em outras regiões, existem relatos de baixa frequência ou mesmo não existem relatos do endossimbionte nas cepas analisadas (MACEDO et al., 2017; OGG et al., 2003; PEREIRA et al., 2013).

Em relação ao tipo de lesão, o LRV1 foi positivo em 143 (72,22%) amostras de LC e em 55 (27,78%) de LM. As amostras negativas para LRV1 (N=526) corresponderam a 457 (86,88%) de LC e apenas 68 (12,93) de LM (Tabela 29). O LRV1 foi mais frequente em LM com 44,71% (N=123) do que em LC, com 23,83% de 600 amostras. Esse resultado corrobora com o fato de que o LRV1 é associado a um dos fenótipos clínicos mais grave da doença (IVES et al., 2011) e inclusive já foi relatado que o vírus é mais frequente em amostras de LM (CANTANHÊDE et al., 2015). Além disso, a presença do LRV1 é associado a casos de falha terapêutica em infecções por *L. guyanensis* (BOURREAU et al., 2015) e *L. braziliensis* (ADAUI et al., 2015). Aqui não realizamos o acompanhamento clínico desses pacientes para avaliar a resposta ao tratamento.

O vírus LRV1 foi detectado em quatro diferentes espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis* (N=100), *L. guyanensis* (N=11), *L. lainsoni* (N=2) e *L. shawi* (N=2). Em cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* existem diversos relatos de LRV1 (ADAUI et al., 2015; BOURREAU et al., 2015; GINOUVÈS et al., 2016; GUILBRIDE; MYLER; STUART, 1992; OGG et al., 2003; SAIZ et al., 1998;

SALINAS et al., 1996; WEEKS et al., 1992), um único relato em *L. lainsoni* (CANTANHÊDE et al., 2015), e este se trata do primeiro relato de LRV1 em amostra de *L. shawi*. Em outras espécies também já foram relatadas com LRV, como: *L. major* e *L. infantum* (HAJJARAN et al., 2016) e *L. aethiopica* (ZANGGER et al., 2014) coinfectadas por LRV2. A detecção de LRV em espécies como *L. lainsoni* e *L. shawi* diretamente da amostra coletada do paciente frequentemente apresenta um questionamento quanto a possibilidade de infecção mista com espécies que são frequentemente observadas com a infecção viral, como *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. No entanto, acreditamos que, embora infecção mista não possa ser inteiramente descartada, cepas de *L. lainsoni* e *L. shawi* também apresentam LRV1, visto que detectamos cultura de *L. shawi* (cepa de referência), infectada pelo vírus, como apresentamos nos resultados sobre filogenia de LRV1, e recentemente nosso grupo encontrou outras cepas de *L. shawi*, assim como algumas de *L. lainsoni*, com o endossimbionte viral (dados não publicados).

6.2 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, DIRETO E INDIRETO, DA LT

Foram realizados três testes parasitológicos para a confirmação da infecção por *Leishmania*. O teste que apresentou maior índice de positividade foi o PCR direcionado para o kDNA, que foi positivo em 528 (94,8%) amostras. O hsp70 foi o segundo teste molecular mais sensível, positivo em 433 (77,7%) amostras e o parasitológico direto, ou raspado, positivo em 351 (63%) do total de 724 amostras testadas (Tabela 22). O raspado é o teste mais amplamente utilizado no diagnóstico da LT, que é realizado com rapidez e de fácil execução, além de ter alta especificidade, entretanto sua sensibilidade é baixa, em torno de 40 a 74,4%, a com a sensibilidade variando de acordo com o tipo de lesão, o método de coleta e preparo das lâminas, além da própria experiência do microscopista (BENSOUSSAN et al., 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; SZARGIKI et al., 2009). Os testes moleculares para LT possuem maior sensibilidade frente ao raspado, com relato de sensibilidade de até 100% (LEMRANI et al., 2009; MUÑOZ et al., 2016; REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Nesse trabalho também

foi observado maior sensibilidade dos testes moleculares (PCR), de acordo com os dados da literatura. O kDNA é um dos alvos moleculares mais sensíveis, com relatos de até 97% de sensibilidade, incluindo amostras de leishmaniose mucosa (DISCH et al., 2005; SUÁREZ et al., 2015). O hsp70 também expressa alta sensibilidade, porém menor que o kDNA, mas com sensibilidade em torno de 90% (GARCIA et al., 2007; MONTALVO et al., 2010).

Como relatado anteriormente em relação ao raspado, a sensibilidade do teste é dependente de vários fatores, incluindo o tipo de lesão do paciente. O teste de sensibilidade que foi realizado com base no tipo de lesão ressalta que este é associado a sensibilidade do teste, com diminuição da sensibilidade em LM (49%) em relação a LC (66%). A variável tipo de lesão parece não refletir nos alvos moleculares testados, onde foi observada sensibilidade de 99% em LC e 94% em LM para o kDNA e 78% em LC e 75% em LM para o hsp70, apesar da literatura relatar que existe diferença de sensibilidade de marcadores moleculares por tipo de lesão (OVALLE-BRACHO; DÍAZ-TORO; MUVDI-ARENAS, 2016). Provavelmente, a alta sensibilidade em lesões de LM aqui relatadas ocorreu devido a repetições dos testes moleculares nessas amostras e que eram realizadas na tentativa de aprimorar a reação de PCR e com isso, aumentar as chances chegar ao diagnóstico final de LT. Com base na suspeita clínica da amostra, em um primeiro resultado negativo nos testes moleculares para as amostras de LM, os testes eram repetidos com o uso de enzimas com melhor performance e/ou a partir de uma nova extração de DNA para aumentar a concentração do DNA, devido a evidência clínica estar fortemente associada a LT. Como a avaliação da sensibilidade não era alvo primário do presente trabalho, essas metodologias foram aplicadas nas amostras clínicas e podem ter gerado dados inconsistentes de sensibilidade em amostras de LM com base nos testes moleculares.

Em relação a espécie do parasita, não foi observada diferença entre os testes aplicados. Mais uma vez que, a baixa frequência das demais espécies com exceção de *L. braziliensis* dificultou a obtenção desse dado.

6.3 A EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE GENES HUMANOS E DE *LEISHMANIA* EM AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram avaliados os níveis de expressão de 72 genes humanos relacionados a resposta imune frente a infecções diversas, incluindo a infecção por *Leishmania* e 22 genes de *Leishmania* relacionados a virulência do parasita. Os resultados observados após análises, considerando diferentes arranjos, revelam a expressão diferencial de diversos genes, tanto humanos como de *Leishmania*.

Para a formação dos grupos a serem comparados nas análises estatísticas, as amostras foram caracterizadas em relação a carga parasitária e a carga viral (APÊNDICE D). Das 100 amostras com suspeita clínica, os resultados de qPCR mostraram positividade para a carga parasitária em 92 amostras. Anterior ao ensaio de qPCR, essas mesmas amostras haviam sido caracterizadas por PCR convencional e foi observado que, em 12 amostras com resultado negativo para LT por PCR convencional, foi possível detectar carga parasitária por qPCR. Isto pode ter acontecido devido a sensibilidade da reação de qPCR ser superior a da reação de PCR convencional (LEÓN et al., 2017). Em seis amostras que haviam sido classificadas como positivo para *Leishmania* por PCR convencional, resultaram negativamente no teste de qPCR para carga parasitária. Nesse caso, uma das hipóteses é que possa ter acontecido a degradação do DNA nessas amostras, ou ainda, algum problema técnico relacionado ao teste de qPCR. Na análise de qPCR para carga viral, também foi observado discordância entre os resultados do qPCR e do PCR convencional, onde em 16 amostras que haviam sido classificadas como negativas anteriormente por PCR convencional, foi possível detectar cópias virais no ensaio de qPCR. Novamente, essa discordância foi atribuída a diferença de sensibilidade entre as técnicas, e, devido ao grande número de amostras discordantes, fica sugestionado que, para a detecção de LRV em amostras clínicas, o ideal é o uso de qPCR. Infelizmente, essa técnica não pode ser aplicada para todas as amostras analisadas no presente estudo. Com base

nisso, os critérios para a formação dos grupos para análise foram baseados nos resultados de qPCR, tanto para a carga parasitária como para a carga viral.

6.3.1 A relação da presença do LRV e da carga parasitária

Foi verificada uma alta frequência de amostras com alta carga parasitária que eram positivas para o LRV1, com base nos resultados de qPCR direcionados para o LRV1 e para *Leishmania* (Figura 20). A relação do LRV1 com a carga de parasitas em modelos experimentais já foi relatada (IVES et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que, em infecções por *L. guyanensis* em modelo animal, a presença do LRV1 induz a uma maior carga de parasitas nas lesões (HARTLEY et al., 2018). Outro estudo relata que a imunização de camundongos com vacina produzida a partir da proteína do capsídeo viral de LRV1 tem capacidade de diminuir a carga de parasitas nas lesões quando estes eram submetidos a uma nova infecção com parasitas *L. guyanensis* LRV1+ (CASTIGLIONI et al., 2017).

Observamos aqui uma relação entre a presença do LRV1 e as amostras com alta carga parasitária ($p= 0.001603$), porém não foi observado a relação da carga viral e da carga parasitária. Isso corrobora outros estudos que mostram que em um mesmo paciente existem parasitas com e sem LRV e com número variável de partículas viras por célula do parasita (ZANGGER et al., 2013).

6.3.1 A relação da presença do LRV1 e da carga parasitária

Foi verificada uma alta frequência de amostras com alta carga parasitária que eram positivas para o LRV1, com base nos resultados de qPCR direcionados para o LRV1 e para *Leishmania* (Figura 20). A relação do LRV1 com a carga de parasitas em modelos experimentais já foi relatada (IVES et al., 2011). Recentemente foi demonstrado que, em infecções por *L. guyanensis* em modelo animal, a presença do LRV1 induz a uma maior carga de parasitas nas lesões (HARTLEY et al., 2018). Outro estudo relata que a imunização de camundongos com vacina produzida a partir da proteína do capsídeo viral de LRV1 tem capacidade de diminuir a carga de parasitas nas lesões quando estes eram submetidos a uma nova infecção com parasitas *L. guyanensis* LRV1+ (CASTIGLIONI et al., 2017).

Observamos aqui uma relação entre a presença do LRV1 e as amostras com alta carga parasitária ($p= 0.001603$), porém não foi observado a relação da carga viral e da carga parasitária. Isso corrobora outros estudos que mostram que em um mesmo paciente existem parasitas com e sem LRV e com número variável de partículas viras por célula do parasita (ZANGGER et al., 2013).

6.3.2 A expressão diferencial de genes humanos em LT

O gene da PKR foi mais expresso no grupo de amostras positivas para *Leishmania* em relação ao grupo de amostras negativas (Figura 21). A proteína quinase dependente de RNA de fita dupla (PRKRA ou PKR) é uma proteína induzida por Interferon do tipo I (MEURS et al., 1990) e ativada no sangue periférico após infecções diversas por diferentes moléculas, entre elas o fator de crescimento (TGF) (WILLIAMS, 1999). Juntamente com a PKR, outro gene com expressão aumentada no grupo de amostras positivas para *Leishmania* foi o fator de crescimento Beta 2 (TGF- β 2), gene que codifica um ligante da superfamília TGF- β (REFSEQ, 2016), uma das moléculas indutoras de PKR (WILLIAMS, 1999) e que, aparentemente, está associada ao aumento dessa proteína.

O fator de crescimento beta (TGF- β) tem potentes efeitos reguladores negativos sobre os macrófagos (TSUNAWAKI et al., 1988), com capacidade de influenciar o destino de *Leishmania* para o interior dessas células (NELSON et al., 1991). TGF- β induz a replicação intracelular do parasita, aumentando a produção de Interleucina 10, uma importante citocina regulatória, ao passo que a indução de resposta imune com anticorpos monoclonais anti-TGF- β neutralizantes tem a capacidade de diminuir os níveis de infecção (BARRAL et al., 1993, 1995). É importante ressaltar que no presente estudo não foi observado o aumento da produção de IL-10 nesse grupo e que este aumento pode estar relacionado com a cepa do parasita, uma vez que as cepas ou populações de *L. braziliensis* que circulam especificamente nessas regiões do Brasil (Norte e Nordeste) são geneticamente diversas, resultando em fenótipos clínicos diferentes (CUPOLILLO et al., 2003; SILVA et al., 2018).

Em infecção experimental em modelo murino por *Leishmania amazonensis* já havia sido relatado o aumento simultâneo de PKR e IFN- β ,

fenômeno dependente da via Toll 2, uma vez que camundongos mutantes para essa via produziram baixas concentrações de PKR e IFN- β . O aumento de Interferon é dependente de sinalização de PKR, que é induzido por *Leishmania*, resultando na manutenção e aumento da infecção (VIVARINI et al., 2011), sugerindo que o bloqueio da via PKR seja um importante alvo terapêutico contra a infecção por *Leishmania* (VIVARINI et al., 2017).

O receptor associado 3 do TNF - TRAF3 está envolvido na ativação de Toll 4 e na regulação positiva de Interferon do tipo I. Em infecção experimental por *Leishmania donovani*, TRAF3 mostrou ser um importante regulador molecular explorado pelo parasita para uma infecção bem sucedida, pois a sua inibição levou ao aumento de IL-12 e TNF- α e consequente diminuição da carga parasitária (GUPTA et al., 2014). Nós identificamos o TRAF3 como um dos genes com expressão aumentada no grupo de amostras positivas para LT em relação ao grupo de amostras negativas (Figura 21). Os níveis de TNF- α não foram expressos diferencialmente nos grupos analisados, porém, a IL-12 esteve aumentada em três análises comparativas distintas: (i) com alta e baixa carga parasitária; (ii) com alta e baixa carga parasitária em lesões cutâneas e (iii) alta e baixa carga parasitária em lesões mucosas, todos com os níveis de IL-12 aumentados no grupo com baixa carga parasitária. O conjunto de resultados reforça a hipótese de que ocorre uma diminuição da carga parasitária quando níveis dessa citocina estão aumentados, um fenômeno também observado em humanos. Nesses três grupos não foi observada a diminuição de TRAF3.

Os genes CASP1, CCR8, IFNA2 e ILA apresentaram expressão aumentada no grupo de amostras com baixa carga parasitária quando comparado com o grupo com alta carga parasitária (Figura 22). Tal aumento foi sugestivo com base na análise estatística. Os genes IL-21, IL-12 e NLRP3 também foram aumentados nesse grupo de amostras, mas com uma expressão mais indicativa de participação, uma vez que o valor de significância foi $\leq 0,05$. Muitos desses genes atuam em conjunto, o que justifica o aumento simultâneo dos mesmos.

Os receptores da família NLR ("Nod-like receptors") são importantes para a ativação de uma resposta imune do tipo Th1, eficaz contra infecções (CHEN et al., 2009). Certos NLRs regulam a montagem de inflamassoma, um complexo multimérico que contém Caspase-1 ativada (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009). O inflamassoma NLRP3 foi identificado como uma plataforma do sistema imune inato crucial para o reconhecimento de *Leishmania* spp. A ativação do inflamassoma desencadeia mecanismos dos macrófagos que levam a diminuição da replicação intracelular do parasita (LIMA-JUNIOR et al., 2013). A caspase-1 ativa, um dos principais componentes do complexo NLRP3, tem atividade enzimática de clivagem de outras proteínas em suas formas precursoras, como a IL-1 β para sua forma ativa (DENES; LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2012; LIMA-JUNIOR et al., 2013). Nós verificamos um aumento significativo da expressão tanto de NLRP3 como de Casp1, o que é esperado, visto que a caspase 1 é um dos principais componentes de NLRP3. Curiosamente, foi observado também o aumento significativo de IL-1 (ILA), quando era esperado encontrar a porção beta da Interleucina 1, que é aumentada por atividade de caspase 1. A IL-1 β é importante para a resistência do hospedeiro a infecção, principalmente de parasitas intracelulares, uma vez que promove o aumento da produção de óxido nítrico, levando a destruição do patógeno. Os três genes com expressão aumentada (NLRP3, CASP1 e ILA) foram verificados no grupo com baixa carga parasitária, concluindo que a resposta imune foi ativada via NLR após o reconhecimento do parasita, controlando a infecção.

A Interleucina 21 (IL-21) é uma das citocinas importantes para a ativação de células do tipo Th1 e Th17, que controlam a infecção por *Leishmania* (BELKAID et al., 2002). Relatamos aqui o aumento da expressão do gene IL-21 no grupo de amostras com baixa carga parasitária (Figura 22). O gene CCR8 também foi mais expresso no grupo de baixa carga parasitária. Trata-se de um membro da família de receptores de quimiocina do tipo beta (REFSEQ, 2008), expressos principalmente em células endoteliais microvasculares dérmicas. As interações do receptor CCR8 e de outros receptores da mesma família foram relacionados com uma melhora acentuada no reparo de lesões de pele,

sugerindo a modulação dessa quimiocina como abordagem terapêutica para a cicatrização (BÜNEMANN et al., 2018).

A comparação dos grupos de amostras de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) em relação as amostras com leishmaniose mucosa (LM) indicou um aumento da expressão do gene que codifica a Caspase 5 (CASP5) no grupo LC (Figura 23). As caspases inflamatórias (também conhecidas como caspases do grupo I) são codificadas por três genes principais em humanos caspase-1, caspase-4 e caspase-5 (LAMKANFI et al., 2002). A função da caspase 5 é pouco explorada em humanos, mas possui função ortóloga a caspase 11 de camundongo, onde a deficiência dessa caspase leva a falha na produção de IL-1 β madura. Assim como a caspase 1, a expressão da caspase 11 é induzida por LPS (MARTINON; TSCHOPP, 2004). A caspase 5 é um dos componentes do inflamassoma NLRP1, que assim como o NLRP3 discriminado anteriormente, é um complexo multiprotéico que participa da resposta imune inata (MARTINON; TSCHOPP, 2007). Seu aumento no grupo LC em relação ao grupo LM pode estar ocorrendo devido a ativação do NLRP1 pelos parasitas *Leishmania*, o que não ocorre em LM por se tratar de uma infecção crônica.

Os genes que codificam o Fator de Transformação do Crescimento Beta 1 (TGF-1) e da Interleucina 12 (IL-12) foram mais expressos quando analisados os grupos com alta e baixa carga parasitária em amostras de leishmaniose mucosa, sendo que o TGF-1 estava aumentada no grupo com alta carga parasitária e a IL-12 no grupo com baixa carga parasitária (Figura 24). A IL-12 foi discutida anteriormente, bem como o TGF- β , este último como regulador negativo de macrófagos (TSUNAWAKI et al., 1988), favorecendo a infecção e a replicação de *Leishmania* (BARRAL et al., 1993, 1995). O aumento da porção 1 do TGF- β no grupo com alta carga parasitária, condiz com a função da proteína, bem como o aumento da IL-12, que inibe a proliferação do parasita e esteve aumentada no grupo com baixa carga parasitária. Os resultados observados sugerem que tais genes estão expressos de forma antagonista, sendo necessária uma maior investigação para confirmar essa hipótese.

Nas análises de baixa e alta carga parasitária de amostras de lesões cutâneas, o gene IL-12 também apresentou maior expressão no grupo com baixa carga, conforme observado na análise comparativa considerando todas as amostras com baixa e alta carga (Figura 25), bem como na análise de carga parasitária de lesões mucosas (Figura 24). Esta observação novamente sugere que a IL-12 pode estar relacionada com a diminuição da carga parasitária. Outros genes que também foram mais expressos no grupo com baixa carga foram NLRP3 e IL-21 (Figura 25). Ambos os genes já foram discutidos pelo seu aumento quando analisadas as amostras com alta e baixa carga parasitária (Figura 21). A IL-12 exerce um papel importante no controle da infecção pela ativação de células do tipo Th1 e Th17 (BELKAID et al., 2002) e o NLRP3 pela ativação de macrófagos e consequente diminuição da carga parasitária (LIMA-JUNIOR et al., 2013). O gene IL-12 foi o único que se manteve com expressão aumentada em todas as análises de carga parasitária. A ausência do aumento de NLRP3 e IL-21 no grupo de alta e baixa carga de lesões mucosas indica que na lesão cutânea ambos os genes atuam no controle da proliferação do parasita, fato que não parece acontecer na leishmaniose mucosa, possivelmente devido a cronicidade da infecção levando a uma resposta imune mais balanceada.

Nas análises comparativas de expressão gênica considerando a presença e ausência do LRV1, observamos um aumento na expressão dos genes TRAF6, IL-21 e CASP1 no grupo de amostras LRV1 negativas e um aumento da expressão de CASP8 no grupo LRV1 positivo (Figura 26).

O Fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) é uma molécula adaptadora que atua principalmente na ativação do sinal gerado pela ligação de LPS a moléculas do tipo TLR4 (AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001; KAWASAKI; KAWAI, 2014)(AKIRA; TAKEDA; KAISHO, 2001). A ausência de TRAF6 leva a uma sinalização defeituosa de LPS e consequentemente, uma não ativação da via de TLR4 (LOMAGA et al., 1999), que tem por finalidade proteger o hospedeiro. O aumento de TRAF6 no grupo LRV1 negativo indica que está ocorrendo o controle da infecção pela ativação dessa via, uma vez que o grupo de amostras LRV1 negativas compreendem a amostras com baixa carga parasitária. O mesmo pode estar ocorrendo pelo aumento de IL-21 e CASP1,

que conforme já discutido, exercem atividades relacionadas ao controle da proliferação dos parasitas.

A Caspase 8 (CASP8) é um membro das cisteínas proteases, que estão implicadas na apoptose e processamento de citocinas. Quando está em sua forma ativa, tem a capacidade de propagar o sinal apoptótico através da ativação de outras caspases induzindo a morte celular (KRUIDERING; EVAN, 2000). Em infecção por *Leishmania braziliensis* o processo de apoptose pela morte de células T CD4+ e CD8+ é descrito em pacientes com leishmaniose cutânea ativa (BERTHO et al., 2000) e o bloqueio da caspase 8 ativa uma resposta imune protetora em infecções por *L. major* (PEREIRA-MANFRO et al., 2014). O aumento da CASP8 no grupo LRV1 positivo (Figura 26) pode indicar a ocorrência de um processo apoptótico intenso, que pode ser induzido por infecções virais causando imunossupressão em diferentes graus.

A expressão gênica de amostras LRV1 positivas e negativas em pacientes com leishmaniose mucosa indica a expressão aumentada de CASP1 e IL-21, conforme observado na análise anterior, e também dos genes TRAF3, TLR1, MIF, ILA, IL1, CD8A e CD86, todos com maior expressão no grupo de amostras LRV1 negativas (Figura 27). O aumento simultâneo de CASP1, ILA, IL1 e IL-21 já havia sido observado nas análises anteriores, relacionados a uma função protetora contra o parasita, o que se repete nesse grupo de amostras, uma vez que o grupo LRV negativo é associado a amostras com baixa carga parasitária.

A função de TRAF3 também já foi discutida anteriormente, trata-se de uma molécula utilizada pela *Leishmania* para o favorecimento da infecção (GUPTA et al., 2014). Aqui, observamos o aumento da expressão de TRAF3 no grupo LRV negativo, contraditório ao observado anteriormente, uma vez que parasitas sem LRV1 tendem a apresentar baixa carga parasitária.

TLR1 é um membro da família de receptores do tipo toll (TLR) e que reconhece o padrão molecular associado ao patógeno com uma especificidade para bactérias gram-positivas (LIEN; INGALLS, 2002; ROCK et al., 1998).

A molécula CD86 (do inglês *Cluster of Differentiation* 86) é uma proteína expressa em células apresentadoras de antígeno que fornece sinais

coestimuladores necessários para a ativação e sobrevivência de células T. É o ligante para duas proteínas diferentes na superfície das células T: CD28 (para auto regulação) e CTLA-4 (para atenuação da regulação) (CHEN et al., 1994). O antígeno CD8 é uma glicoproteína de superfície celular encontrada na maioria dos linfócitos T citotóxicos que medeia eficientes interações célula-célula dentro do sistema imunológico. Pode se apresentar na forma de um homodímero, com duas cadeias alfa, ou um heterodímero formado pelas cadeias alfa e beta. O gene CD8A codifica as isoformas de cadeia alfa CD8 (REFSEQ, NOV 2011). O aumento de CD86 e CD8A no grupo LRV1 negativo em leishmaniose mucosa indica a participação das células T no controle da infecção. Curiosamente, essa observação foi particular desse grupo, sugerindo que a baixa expressão desses genes no grupo LRV1 positivo possui relação com a presença do vírus ou ainda com a quantidade de parasitas, uma vez que a presença do vírus está associada a uma maior carga parasitária.

6.3.3 A expressão diferencial de genes de *Leishmania* na LT

Nas análises envolvendo os 22 genes de *Leishmania*, foi detectada a expressão diferencial num total de 7 genes, considerando os diferentes grupos de análise: MAPK, PRX, GP63, THIOL, TRYR, GSH e HSP70.

Na comparação da expressão dos grupos com baixa e alta carga parasitária, os genes MAPK e PRX foram mais expressos nas amostras com baixa carga e o gene GP63 foi sugestivamente mais expresso também nesse grupo (Figura 28).

O gene PRX codifica a peroxiredoxina, peroxidase altamente conservada e abundante em diferentes organismos (HALL; KARPLUS; POOLE, 2009; POOLE; HALL; NELSON, 2011). Em *Leishmania* e outros tripanossomatídeos a peroxiredoxina têm função de proteger o parasita da morte celular programada, pois como peroxidase, reduz espécies reativas de oxigênio (ROS). Em promastigotas a PRX é restrita ao cinetoplasto, ao passo que em amastigota, ela é altamente expressa (TEIXEIRA et al., 2015). Em humanos a PRX atua como barreira a ativação de MAPK, uma vez que as MAPK medeiam as respostas celulares a uma variedade de estímulos, incluindo ROS (LATIMER; VEAL, 2016).

A MAPK de *Leishmania* foi pouco explorada, mas acredita-se que possui atividade similar a observada em humanos. O aumento simultâneo tanto de PRX como de MAPK em amostras com baixa carga parasitária é um indicativo de que os parasitas desse grupo estejam sob ação de ROS da célula hospedeira, e que as suas maquinarias de defesa não estejam conseguindo controlar a resposta imune contra si e que isso reflita na diminuição da carga parasitária, embora esses parasitas, mesmo em menor quantidade, aparentam estar com os fatores de virulência ativados, pois estão expressando uma maior quantidade de MAPK e PRX.

A GP63 é considerada um dos principais fatores de virulência de *Leishmania* devido a sua participação no sucesso da infecção, favorecendo a sobrevivência no interior de macrófagos e exercendo controle sobre a ativação do complemento, resultando em maior resistência à lise mediada pelo complemento (BRITTINGHAM et al., 1995; JOSHI et al., 2002). Mais uma vez, o aumento de um fator de virulência no grupo de amostras com baixa carga parasitária demonstra que a ativação desses fatores ocorre a partir de uma necessidade de sobrevivência do parasita no interior da célula hospedeira, o que corrobora com o observado em relação a expressão dos genes humanos, onde os genes que desempenham papel protetor a infecção encontravam-se com expressão aumentada nesse mesmo grupo. A relação da carga parasitária baixa e da expressão de GP63 aumentada já foi relatada anteriormente em infecção por *L. braziliensis* (LOURENÇO, 2015) reforçando a hipótese observada no presente estudo.

Os genes PRX e MAPK também foram diferencialmente expressos quando consideramos para análise, amostras LRV1 negativas e positivas de lesão cutânea, com maior expressão no grupo de amostras negativas para o LRV1 (Figura 30). Como a presença do vírus é relacionado com o aumento da carga parasitária, é esperado que esses genes estejam com maior expressão no grupo LRV1 negativo. Ainda, a regulação negativa de MAPK está relacionada a falha terapêutica em infecção por *L. donovani* (ASHUTOSH et al., 2012), e casos de falha terapêutica foram associados a presença de LRV1 em pacientes com infecções por *L. braziliensis* (ADAUI et al., 2016) e por *L. guyanensis*

(BOURREAU et al., 2015). Aqui, foi observada menor expressão de MAPK no grupo LRV positivo. Tais observações sugerem que não somente o LRV1 contribui com a falha terapêutica, mas que ele também possa influenciar na expressão de MAPK. Por não termos realizado o acompanhamento clínico dos pacientes incluídos no estudo, não podemos inferir no resultado pós tratamento.

Outro gene mais expresso no grupo LRV1 negativo foi o GSH, que codifica gama-glutamilcisteína sintetase e tem função de biossíntese de glutathiona e tripanotiona (codificada pelo gene TRYR) (OZA et al., 2005; TETAUD et al., 1998), além de desenvolver um papel importante na sobrevivência do parasita frente a estresses oxidativos da célula hospedeira (MUKHERJEE et al., 2009; ROMÃO et al., 1999). Tanto o GSH como o TRYR, que também possui atividade redutora contra estresse oxidativo, foram super expressos no grupo LRV1 negativo, com valor de $p \leq 0,01$, indicando um agonismo dessas moléculas. Conseqüentemente, esse aumento no potencial do parasita em sobreviver ao estresse oxidativo da célula hospedeira está ocorrendo justamente pela efetiva resposta imune, assim como observado em PRX e MAPK.

Moléculas de Thiol estão envolvidas na resistência ao antimonial pela ação direta em compostos de radicais livres no ambiente intracelular, levando a sobrevivência e proliferação do parasita (SINGH; CHATTERJEE; SUNDAR, 2014). Foi observado o aumento da expressão do THIOL no grupo LRV1 positivo em relação ao grupo LRV1 negativo. Apesar do fato de que o grupo LRV1 positivo é formado principalmente por amostras com alta carga parasitária e que esse gene possa estar contribuindo para a proliferação dos parasitas, não foram avaliadas amostras de pacientes submetidos ao tratamento, portanto, não é possível atribuir esse aumento do THIOL a resistência ao antimonial.

Por fim, a comparação da expressão em amostras LRV1 negativas em relação as amostras LRV1 positivas demonstrou um aumento da expressão do gene HSP60 (Figura 29), que codifica a proteína do choque térmico 60 e está expressa em maior quantidade na mitocôndria (BUKAU; HORWICH, 1998). A sua produção é influenciada pelo estresse oxidativo gerado pelo parasita na tentativa de subverter a resposta ao antimonial (MATRANGOLO et al., 2013) e

ainda, como mecanismo de defesa frente ao sistema imune do hospedeiro. Nesse último caso, sua produção é condicionada a resposta imune efetiva e seu aumento tem por finalidade proteger as proteínas do parasita, para que estas não sejam desnaturadas frente ao estresse oxidativo, este gerado como consequência de sua proliferação, ou seja, a proliferação do parasita com consequente aumento do funcionamento de sua maquinaria celular, gerando agentes oxidantes que leva ao aumento da proteína do choque térmico 60 (PÉREZ-MORALES; ESPINOZA, 2015; REQUENA; MONTALVO; FRAGA, 2015). A expressão aumentada do gene HSP60 foi observada no grupo de amostras positivas para o LRV1, que como já relatado inúmeras vezes, se relaciona com um aumento da carga parasitária, sugerindo que esse aumento esteja favorecendo a sobrevivência do parasita. Pode ser ainda que, o aumento da expressão desse gene esteja relacionado ao estresse causado pela presença do LRV1 no interior dessas células, aumentando a tolerância dos parasitas as condições diversas de estresse e, dessa forma, mantendo uma alta carga de parasitas.

Nossos resultados corroboram com outros estudos onde observa-se uma relação entre presença de LRV1 e o aumento da carga parasitária (IVES et al., 2011; HARTLEY et al., 2018), porém, em relação a expressão de genes relacionados a fatores de virulência do parasita, foi observado que estes genes estão aumentados nos grupos de amostras com baixa carga parasitária, o que é contraditório em relação a estudos que mostram que a presença do LRV1 em infecções por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* induz a falha terapêutica (ADAUI et al., 2015; BOURREAU et al., 2015). Além dos genes de virulência, nesses mesmos grupos de baixa carga parasitária, também foi observado o aumento da expressão de genes da resposta imune responsáveis por controlar a infecção. Um recente estudo aborda a relação entre a carga parasitária e a susceptibilidade ou resistência ao tratamento com antimonial, relatando que foi observada baixa carga parasitária em amostras de pacientes infectados por *L. braziliensis* e que responderam mau ao tratamento com antimonial, enquanto que o mesmo não foi observado em amostras de pacientes que respondem bem ao tratamento, mais uma vez, ressaltando que a carga parasitária não reflete a

progressão da doença (PEREIRA et al., 2017), nesse caso, considerando a análise de amostras submetidas ao tratamento. É importante ressaltar que o presente estudo avaliou a expressão gênica em amostras coletadas antes do início do tratamento.

É contraditório o fato de que o LRV1, que aumenta a carga parasitária, esteja envolvido na indução de falha terapêutica, pois, o que observamos aqui é que, apesar da presença do LRV1 realmente ter relação com o aumento da carga parasitária, os grupos com baixa carga parasitária é que apresentam um perfil de maior virulência, mesmo com uma resposta imune eficaz. É provável que tais observações sejam influenciadas pelo tempo de infecção, uma vez que, assim como em outras infecções virais, o LRV1 pode estar induzindo a uma maior replicação da *Leishmania* e ao mesmo tempo, com o tempo de infecção, esse efeito seja imunomodulador, caracterizando uma resposta imune menos eficaz.

6.4 FILOGENIA MOLECULAR DE LRV1

Relatamos aqui um total de 13 sequências de LRV1 de três diferentes espécies de *Leishmania* de cepas circulantes no Brasil, incluindo o primeiro relato na literatura do vírus em *L. shawi*. A região do genoma do LRV1 analisada compreende parcialmente as ORFs 1 e 2, a primeira com função indefinida até o momento e a segunda responsável por codificar a proteína do capsídeo viral (CP) (STUART et al., 1992). Após alinhamento com as demais sequências disponíveis no GenBank, as análises realizadas com fragmentos de 444 pares de bases demonstraram a capacidade de formação de agrupamentos espécie específicos, além de uma separação geográfica quando analisadas sequências de vírus de uma mesma espécie de *Leishmania*, como por exemplo a formação de grupos de LRV1 de *L. guyanensis* e o grupo de vírus de *L. braziliensis*. Mais uma vez, a relação de endossimbiose e a hipótese de coevolução do vírus com o parasita é reforçada (WIDMER; DOOLEY, 1995).

A metodologia apresentada sugere que essa região pode ser utilizada para futuros estudos que avaliem a relação endossimbionte entre LRV1 e diferentes espécies de *Leishmania*; os resultados foram satisfatórios quando comparados a um estudo recente que analisou 24 genomas completos de LRV1

da Guiana Francesa e uma região de 299 pares de bases da ORF3 do genoma viral incluindo sequências virais da Bolívia e Peru (TIRERA et al., 2017). Nossos resultados, analisando parte do genoma viral e adicionando novas sequências de LRV1, mostram os mesmos grupos que o estudo anterior, indicando que a região estudada aqui é filogeneticamente informativa. Os resultados concordam mais fortemente com os obtidos através da análise do genoma completo do que os obtidos quando os mesmos autores analisaram uma sequência parcial de 299 nucleotídeos do capsídeo viral.

Os grupos A e B correspondem a grupos previamente definidos, nos quais as sequências LRV1 de cepas de *L. guyanensis* da Guiana Francesa (TIRERA et al., 2017) são agrupadas. O grupo A foi formado por nove sequências provenientes da Guiana Francesa além das três sequências de vírus de *L. guyanensis* de Monte Dourado/PA no Brasil (M5313 e as duas sequências M4147), cidade vizinha ao estado do Amapá que faz divisa com a Guiana Francesa. A diferença de três nucleotídeos observada nas duas sequências e LRV1 da cepa M4147 pode ter ocorrido por diferentes fatores, entre eles a diferença temporal dos estudos, ocorridos nos anos de 1994 (SCHEFFTER; WIDMER; PATTERSON, 1994) e 2016 (BRETTMANN et al., 2016), que incluem diferentes metodologias de sequenciamento que podem ter gerado estas diferenças. O grupo B, composto por 11 sequências de *L. guyanensis*, apresentou a menor divergência entre as sequências, em comparação com os demais grupos, e a composição se manteve similar ao relatado por Tirera e colaboradores em 2017.

As sequências e LRV1 de *L. guyanensis* apresentadas nesse estudo foram todas agrupadas no Grupo D. Este grupo teve uma sequência que foi previamente relatada de uma cepa isolada de um paciente que contraiu a doença em Manaus, Amazonas. Destacamos que este grupo incluiu, além das sequências LRV1 de *L. guyanensis* do Amazonas, sequências LRV1 de *L. guyanensis* de RO e da cidade de Santarém no PA (3354). Santarém e Monte Dourado são separados geograficamente pelo rio Amazonas, uma importante barreira geográfica para vetores que podem sugerir a divergência de sequências desta espécie parasita.

Estudos anteriores com anticorpos monoclonais já haviam demonstrado diferenças significativas entre isolados de *L. guyanensis* de regiões do Pará ao Norte do Rio Amazonas e da Guiana Francesa em relação a parasitas isolados em algumas regiões do Amazonas, incluindo Manaus (GRIMALDI et al., 1991; ROMERO et al., 2002). De fato, quando observamos a formação dos grupos a partir das sequências analisadas, concluímos que as mesmas convergem com os estudos do parasita com anticorpos monoclonais. Os grupos A e B compreendem todas as sequências de vírus de isolados da Guiana Francesa e do Pará, ao passo que nos grupos D e E são observados os vírus de isolados de Manaus e um único isolado de Porto Velho. As análises de multilocus, quer por marcadores de microsatélites (MLMT), quer pela análise de sequências de nucleotídeos de vários genes (MLSA), mostram a homogeneidade genética em *L. guyanensis*. No entanto, com base no MLMT, as cepas de *L. guyanensis* de Manaus formam uma população, enquanto que uma estirpe do Acre (estado vizinho RO) permaneceu em uma população diferente, juntamente com outras espécies do subgênero *Viannia* (KUHLS et al., 2013). Os estudos de MLSA demonstraram a formação de um grupo composto por Tipos de Sequências (TS) de *L. guyanensis* de Manaus, enquanto que dois TSs do Pará não estavam nesse grupo (BOITÉ et al., 2012). Ao comparar a árvore gerada pela análise das sequências LRV1 estudadas aqui com uma árvore NJ obtida a partir da análise de sequências multilocus de cepas *Leishmania* do subgênero *Viannia* (BOITÉ et al., 2012) é possível observar uma grande semelhança, reforçando a hipótese de co-evolução de *Leishmania*/LRV (Figura 34).

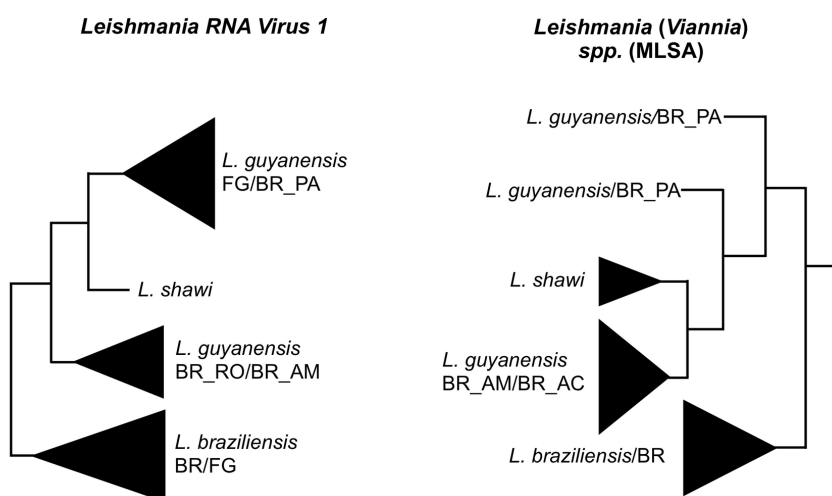


Figura 34 - Esquema representativo da correspondência entre os grupos formados por LRV1 (conforme definido no presente estudo) e os grupos de *Leishmania* (*Viannia*) agrupados por MLSA. Demonstração dos clusters formados em análises de sequências de LRV, conforme detalhado na Figura 20, em comparação com a formação dos clusters formados após análise de sequências de diferentes espécies de *Leishmania* (*Viannia*) relatadas por Boité e colaboradores em 2012. Do esquema foram excluídos grupos formados por espécies que não apresentaram grupos relacionados nas análises de LRV.

A observação da formação de dois grupos de LRV1 de *L. guyanensis* foi reforçada com os resultados de Minspaning Network e NeighborNet, onde um dos clusters formados são compostos unicamente pelas sequências de LRV do grupo D, que incluem amostras de RO e AM, e um grande cluster de LRV de *L. guyanensis* composto por todas as sequências de LRV da Guiana Francesa, incluindo as amostras do PA e o isolado único de *L. shawi*, também do PA. Destacamos que vários estudos apontam para a semelhança genética entre *L. guyanensis* e *L. shawi*, sendo esse último um complexo clonal distinto no grupo *L. guyanensis* (BOITÉ et al., 2012). A sequência LRV1 da linhagem 1545 de *L. shawi* mostrou maior semelhança com as sequências dos Grupos A e B. Esta cepa foi isolada em Parauebas, Pará, Brasil, onde é observada a circulação de cepas de *L. guyanensis* portadoras do epítipo B19 (GRIMALDI et al., 1991), como as cepas de *Leishmania* da Guiana Francesa.

Dois isolados de LRV1 da Guiana Francesa apresentaram maior divergência e formaram os grupos independentes C e E, igualmente já relatado (TIRERA et al., 2017). A sequência LF94 (grupo E) apresentou maior similaridade com o grupo D que compreendem as sequências de *L. guyanensis* das regiões de Manaus e Candeias do Jari e a sequência XJ93_{G2} (grupo C) maior similaridade com os grupos A e B onde foram agrupadas as demais sequências da Guiana Francesa. Os dados da localização geográfica dos isolados da Guiana Francesa não estão disponíveis e, provavelmente, este fator pode estar influenciando na formação desses grupos.

O grupo F foi formado por LRV de *L. braziliensis* e foi o grupo que apresentou a maior divergência entre as sequências (12 a 77 diferenças), outro dado que confirma relatos de polimorfismos dessa espécie (BRITO et al., 1993;

CHOUICHA et al., 1997; PERAZA; URBINA; ZELEDÓN, 1998; REVOLLO et al., 1992).

A análise de caracteres únicos forneceu dados específicos para as sequências de LRV de *L. braziliensis* do Brasil e da Bolívia. Com base nos resultados observados na árvore filogenética, há indício da presença de diferenças nas sequências dos dois países, porém com valor de bootstrap baixo, sendo dessa forma considerado um único grupo denominado grupo F. Os resultados de Minspaning Network e NeighborNet reforçam as observações da árvore filogenética. No Minspaning Network é observado um grupo formado unicamente por sequências de *L. braziliensis* e na NeighborNet as sequências formam grupos distintos com as sequências de cada país.

Os resultados apresentados no presente trabalho são baseados em um pequeno número de sequências, de poucas regiões geográficas. Uma amostra de sequências de LRV com maior distribuição geográfica se faz necessária para confirmação da hipótese de co-evolução LRV1 e espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Vários estudos examinaram a presença de LRV1 em cepas de *Leishmania* e é de salientar que o endossimbionte viral não foi detectado (OGG et al., 2003; PEREIRA et al., 2013) em regiões que provavelmente possuem a mesma população de *L. braziliensis* como Rio de Janeiro e Minas Gerais, de acordo com as análises por MLMT (KUHLS et al., 2013), mas estão presentes nas populações que circulam na parte norte da América do Sul, com a população de *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. shawi*. Como demonstrado anteriormente, LRV são transmitidos intracelularmente durante a divisão celular. As infecções mistas em uma mesma cultura de *Leishmania* com duas cepas de LRV1 já foram observadas (TIRERA et al., 2017) e também células de *Leishmania* infectadas e não infectadas por LRV na mesma cultura (ZANGGER et al., 2013). É importante mencionar que na mesma região, estão presentes *Leishmania* com e sem LRV1. É possível que um efeito gargalo (*bottleneck*) tenha ocorrido durante o processo de dispersão de *L. braziliensis*, considerando que as outras espécies de *L. (Viannia)* parecem estar restritas à região amazônica e que os parasitas sem partículas virais foram melhor adaptados às condições encontradas, especialmente em relação às espécies de

flebotomíneos. É provável que a mistura populacional seja um importante determinante implicado na dinâmica da co-evolução (GOMEZ; ASHBY; BUCKLING, 2014).

Recentemente, sugeriu-se que LRV infectou parasitas do gênero *Leishmania* ao mesmo tempo em que o ciclo de vida dixênico surgia em Leishmaniinae (GRYBCHUK et al., 2017), evoluindo com esse parasita desde então, antes da divergência do gênero de *Leishmania*. Os mecanismos que determinam a especificidade *Leishmania*-LRV não são documentados e entendidos como para outros grupos de parasitas. As consequências da co-evolução *Leishmania*-LRV dependem da dinâmica co-evolutiva e provavelmente envolvem seleção flutuante e co-evolução antagonista (direcional para aumentar a infectividade/resistência). Sob seleção flutuante, podem ser observadas oscilações na frequência de genótipos com fenótipos específicos de resistência e infectividade (GANDON et al., 2008) ou pode-se observar flutuações na faixa de resistência e infectividade (SASAKI, 2000). As espécies e populações de *Leishmania* são estruturadas espacialmente (BOITÉ et al., 2012; KUHLS et al., 2013) e a extensão do fluxo de genes entre as populações pode alterar a dinâmica co-evolutiva e resultar em padrões de adaptação local e assim explicar a dispersão das populações de *L. braziliensis* sem LRV1, que pode representar uma população *Leishmania* resistente ao vírus, estabilizada após o processo de co-evolução. Existe um importante emaranhamento ecológico e evolutivo no curso da co-evolução de *Leishmania*-LRV. A interação das espécies de *Leishmania* com seus hospedeiros teve impacto direto neste processo evolutivo.

7 CONCLUSÕES

Considerando as variáveis sexo, idade e forma de aquisição da doença, o perfil dos pacientes diagnosticados com LT em Rondônia é bastante similar ao descrito para outras áreas endêmicas da região Amazônica, onde o acometimento de pacientes do sexo masculino é maior, a idade se concentra entre pacientes com 20 a 60 anos e que estes são infectados principalmente enquanto desenvolvem atividades remuneradas, relacionadas a agricultura, extrativismo mineral e madeireiro, entre outras atividades que o coloquem em contato direto com áreas de floresta ou em desflorestamento.

A distribuição das espécies de *Leishmania* também possui similaridades ao relatado nas demais regiões que fazem fronteira com o estado, exceto o Amazonas. Existe um predomínio de infecções onde o agente etiológico é *L. braziliensis*, ao mesmo tempo que existe uma diversidade de espécies envolvidas em casos humanos de LT, apesar de estarem em menor frequência.

Foi observada uma elevada frequência de coinfeção por LRV1 e a presença do endossimbionte influencia na carga de parasita nas lesões, o que pode ser concluído através da associação observada entre amostras positivas para o vírus com uma maior carga parasitária nas lesões

Com as análises de frequência de positividade dos testes parasitológicos aplicados, podemos concluir que o raspado, como esperado, possui baixa capacidade diagnóstica, principalmente em amostras de leishmaniose mucosa, ao passo que o uso de ferramentas moleculares aumenta consideravelmente a sensibilidade do diagnóstico. A sensibilidade dos testes moleculares varia conforme o marcador utilizado, mas a combinação de mais de um alvo molecular, que seja espécie específico, possibilita além de alta sensibilidade, também a identificação das espécies.

Foram identificados genes humanos diferencialmente expressos em amostras de pacientes com LT. Alguns genes se destacaram e foram sugestivos de controlar a infecção, seja pela ativação de macrófagos, ou por desencadear uma via de sinalização importante para a efetiva resposta imune, como os genes

IL-21, CASP1, ILA, IL-12 e NLRP3. Outros genes apresentaram expressão diferencial em amostras positivas para LT e/ou com alta carga parasitária, como os genes CASP8, PKR, TGF-B e TRAF3. Os genes indicativos de controlarem a infecção ou os que indicam susceptibilidade ao parasita, revelam que, no organismo humano, a polarização da resposta imune na leishmaniose tegumentar ocorre de forma diferente do observado em modelos animais. Isto porque foram investigados genes que, na literatura, estão fortemente associados com os perfis Th1 (controle da infecção) ou Th2 (susceptibilidade a infecção) e estes, no nosso estudo, não apresentaram expressão diferencial.

Apesar de haver certa concordância entre o observado no presente estudo com o que é relatado na literatura, em relação aos genes de *Leishmania*, os resultados sugerem que uma infecção bem-sucedida não depende somente de fatores de virulência do parasita e/ou de uma resposta imune falha, mas que uma resposta imune efetora contra a infecção, estimula a produção desses fatores de virulência. É provável que, nesses casos, sejam replicados no sistema in vivo, parasitas com maior resistência em relação aqueles parasitas que têm maior capacidade de se proliferar. São necessários testes funcionais para testar a hipótese aqui apresentada, que indica que a alta carga parasitária pode não ser o indicativo de uma infecção bem sucedida, ao passo que uma baixa carga parasitária também pode não representar um parasita pouco virulento. Essas observações levam em conta parasitas não submetidos ao tratamento.

As análises de filogenia do LRV1 aqui apresentadas corroboraram com o estudo recente com base em sequências completas do genoma de LRV1. Isto, juntamente com a facilidade de acessar regiões de sequência mais curtas, permite sugerir nossa abordagem para futuros estudos sobre a sistemática molecular de LRV1. Além disso, a partir da abordagem que realizamos, foi verificado que existe uma especificidade entre as sequências de LRV1 e as espécies de *Leishmania*. A partir de tais observações, e com base nas informações da literatura a respeito desse tema, podemos concluir que existe um perfil co-evolutivo entre *Leishmania* do subgênero *L. (Viannia)* e o seu endossimbionte viral, LRV1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAUI, V. et al. Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–32, 2015.

ADAUI, V. et al. Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. v. 213, 2016.

AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature immunology**, v. 2, n. 8, p. 675–80, ago. 2001.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life sciences**, v. 75, n. 6, p. 639–53, 25 jun. 2004.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: Paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v. 99, n. 1, p. 17–23, 2005.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. **Acta tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, jan. 2008.

APARECIDA, E.; GALATI, B. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar e descrição das populações de flebotomíneos no município de Acrelândia , Acre , Brasil Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis and description of in the city of Acrelandia , Acre , Brazil. v. 11, n. 2, p. 241–251, 2008.

AREVALO, J. et al. Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846–51, 15 jun. 2007.

ASHUTOSH et al. Downregulation of Mitogen-Activated Protein Kinase 1 of *Leishmania donovani* Field Isolates Is Associated with Antimony Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 518–525, jan. 2012.

BARRAL, A. et al. Transforming growth factor beta as a virulence

mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3442–3446, 1993.

BARRAL, A et al. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 947–954, 1995.

BASSO, D. et al. Nonparametric One-Way ANOVA. In: [s.l: s.n.]. p. 105–132.

BAVA, J.; TRONCOSO, A. Giemsa and Grocott in the recognition of *Histoplasma capsulatum* in blood smears. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 418–420, 2013.

BELKAID, Y. et al. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–7, 5 dez. 2002.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. DATABASE ISS., p. 34–38, 2005.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.

BERTHO, A L. et al. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 33, n. 3, p. 317–25, 2000.

BITTENCOURT, A. et al. In situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 585–6, 1989.

BOSSUYT, P. M. et al. STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. **BMJ**, p. h5527, 28 out. 2015.

BOURREAU, E. et al. High Intralesional Interleukin-10 Messenger RNA

Expression in Localized Cutaneous Leishmaniasis Is Associated with Unresponsiveness to Treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 12, p. 1628–1630, 2001.

BOURREAU, E. et al. Leishmania-RNA virus presence in *L. guyanensis* parasites increases the risk of first-line treatment failure and symptomatic relapse. **The Journal of infectious diseases**, p. 1–28, 2015.

BRANDÃO-FILHO, S. P. et al. Epidemiological surveys confirm an increasing burden of cutaneous leishmaniasis in north-east Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 488–94, 1999.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: [s.n.].

BRASIL. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Segunda Ed ed. Brasília: Editora do Ministério da Saude, 2010.

BRASIL. **Manual De Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério Da Saúde, v. 1º ED., 2017a.

BRASIL. **MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. MINISTÉRIO ed. Brasília/DF: [s.n.].

BRASIL, Ministério da Saúde. **Leishmaniose Tegumentar Americana - Casos Confirmados Notificados No Sistema De Informação De Agravos De Notificação - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanwin/cnv/ltabr.def>>.

BRETTMANN, E. A. et al. Tilting the balance between RNA interference and replication eradicates *Leishmania* RNA virus 1 and mitigates the inflammatory response. p. 1–8, 2016.

BRITO, M. E. F. DE et al. Human cutaneous leishmaniasis due to a new enzymatic variant of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* occurring in Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 4, p. 633–634, dez. 1993.

BRITTINGHAM, A. et al. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 155, n. 6, p. 3102–11, 15 set. 1995.

BRUEN, T. C.; PHILIPPE, H.; BRYANT, D. A simple and robust statistical test for detecting the presence of recombination. **Genetics**, v. 172, n. 4, p. 2665–2681, 2006.

BUKAU, B.; HORWICH, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 351–366, 1998.

BÜNEMANN, E. et al. Chemokine ligand-receptor interactions critically regulate cutaneous wound healing. **European journal of medical research**, v. 23, n. 1, p. 4, 16 jan. 2018.

CADD, T. L. et al. Mutational analysis of the capsid protein of Leishmania RNA virus LRV1-4. **Journal of virology**, v. 68, n. 12, p. 7738–45, dez. 1994.

CAMARA COELHO, L. I. et al. Characterization of Leishmania spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. **Parasitology research**, v. 108, n. 3, p. 671–7, mar. 2011.

CANTANHÊDE, L. M. et al. Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004079, 15 set. 2015.

CANTANHÊDE, L. M. Dissertação. **Detecção De Leishmaniavírus Em Amostras De Pacientes Com Leishmaniose Tegumentar Americana Atendidos No Centro De Medicina Tropical De Rondônia- CEMETRON**. Universidade Federal de Rondônia. Porto Velho, Rondônia. 2013.

CARNEIRO, M. B. H. et al. NOX2-Derived Reactive Oxygen Species Control Inflammation during *Leishmania amazonensis* Infection by Mediating Infection-Induced Neutrophil Apoptosis. **The Journal of Immunology**, p. j11700899, 2017.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of

disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CARVALHO, M. D. L. R. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta tropica**, v. 98, n. 3, p. 277–85, jul. 2006.

CASTELLUCCI, L. et al. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 4, p. 519–27, 15 ago. 2006.

CASTELLUCCI, L. et al. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC medical genetics**, v. 11, n. 1, p. 10, jan. 2010.

CASTIGLIONI, P. et al. Exacerbated Leishmaniasis Caused by a Viral Endosymbiont can be Prevented by Immunization with Its Viral Capsid. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005240, 18 jan. 2017.

CHAGAS, A. C. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga , município de Presidente American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in a mining village – Pitinga. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 9, n. 2, p. 186–192, 2006.

CHAGAS, A. C. et al. Lundep, a Sand Fly Salivary Endonuclease Increases Leishmania Parasite Survival in Neutrophils and Inhibits X11a Contact Activation in Human Plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, 2014.

CHEN, C. et al. Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 152, n. 10, p. 4929–36, 15 maio 1994.

CHEN, G. et al. **NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease.** [s.l: s.n.].

CHOUICHA, N. et al. Phylogenetic taxonomy of Leishmania (Viannia) braziliensis based on isoenzymatic study of 137 isolates. **Parasitology**, v. 115 (Pt 4, p. 343–8, out. 1997.

CONTER, C. C. et al. New primers for the detection Leishmania species by multiplex polymerase chain reaction. **Parasitology Research**, 2017.

CORE TEAM, R. R: **A Language and Environment for Statistical Computing** Vienna, Austria, 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126–32, jul. 2003.

DA-CRUZ, A. M. et al. T-Cell-Mediated Immune Responses in Patients with Cutaneous or Mucosal Leishmaniasis: Long-Term Evaluation after Therapy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 2, p. 251–256, 1 mar. 2002.

DA SILVA, L. A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying Leishmania species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 1, p. 77–83, 2010.

DARLYUK, I. et al. Arginine Homeostasis and Transport in the Human Pathogen Leishmania donovani. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 30, p. 19800–19807, 24 jul. 2009.

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 1 jan. 2009.

DE CASSIA-PIRES, R. et al. Multiplex PCR as a tool for the diagnosis of Leishmania spp. KDNA and the gapdh housekeeping gene of mammal hosts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–12, 2017.

DEGRAVE, W. et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania--a mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 463–9, 1994.

DENES, A.; LOPEZ-CASTEJON, G.; BROUGH, D. Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 7, p. e338–e338, 5 jul. 2012.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-

leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 2, p. 405–412, 15 jul. 2004.

DISCH, J. et al. Leishmania (Viannia) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 51, n. 3, p. 185–90, mar. 2005.

DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory and effector activities in human cutaneous and mucosal Leishmaniasis: Understanding mechanisms of pathology. **Drug Development Research**, v. 72, n. 6, p. 430–436, 2011.

EL FADILI, K. et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1988–93, maio 2005.

ESCOBAR, M. A. et al. American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis (Tegumentary): A Diagnostic Challenge. **Tropical Doctor**, v. 22, p. 69–78, 1992.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.

FIGUEROA, R. A. et al. Detection of Leishmania in unaffected mucosal tissues of patients with cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) species. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 4, p. 638–46, 15 ago. 2009.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate immune activation and subversion of mammalian functions by Leishmania lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

GALARDO, A. K. R. et al. Phlebotominae sand flies (Diptera: Psychodidae): Potential vectors of American cutaneous leishmaniasis agents in the area associated with the Santo Antônio hydroelectric system in Western Amazonian, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 265–271, 2015.

GARCIA, A. L. et al. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular characterization of a peridomestic transmission cycle in

the Amazonian lowlands of Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 12, p. 1208–1213, 2007a.

GARCIA, A. L. et al. American tegumentary leishmaniasis: direct species identification of *Leishmania* in non-invasive clinical samples. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 4, p. 368–71, abr. 2007b.

GARCIA, L. et al. Culture-Independent Species Typing of Neotropical. **Society**, v. 42, n. 5, p. 2294–2297, 2004.

GAUR, U. et al. An Effect of Parasite-Encoded Arginase on the Outcome of Murine Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8446–8453, 2007.

GIL, L. H. S. et al. Recent Observations on the Sand Fly (Diptera: Psychodidae) Fauna of the State of Rondônia , Western Amazônia , Brazil : the Importance of *Psychodopygus davis* as a Vector of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis. v. 98, n. September, p. 751–755, 2003.

GINOUVÈS, M. et al. Prevalence and distribution of leishmania RNA virus 1 in leishmania parasites from French Guiana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 102–106, 2016.

GOMEZ, M. A. et al. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. **Science signaling**, v. 2, n. 90, p. ra58, jan. 2009.

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

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 30, p. 31010–7, 23 jul. 2004.

GRAÇA, G. C. DA et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664–

74, ago. 2012.

GRIMALDI, G. et al. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 44, n. 6, p. 645–61, jun. 1991.

GRIMALDI, G.; DAVID, J. R.; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 36, n. 2, p. 270–87, mar. 1987.

GRYBCHUK, D. et al. Viral discovery and diversity in trypanosomatid protozoa with a focus on relatives of the human parasite Leishmania. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 2017, p. 201717806, 2017.

GUERRA, J. A. D. O. et al. Mucosal Leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in the Brazilian Amazon. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e980, jan. 2011.

GUILBRIDE, L.; MYLER, P. J.; STUART, K. Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different Leishmania species. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 101–104, ago. 1992.

GUIMARÃES, L. H. et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for Leishmania braziliensis: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2016.

GUIMOND, C. et al. Modulation of gene expression in Leishmania drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 20, p. 5886–96, 15 out. 2003.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. In: **Advances in Applied Microbiology**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 82p. 155–184.

GUPTA, P. et al. Leishmania donovani targets tumor necrosis factor

receptor-associated factor (TRAF) 3 for impairing TLR4-mediated host response. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 28, n. 4, p. 1756–68, abr. 2014.

HAJJARAN, H. et al. Detection and molecular identification of leishmania RNA virus (LRV) in Iranian Leishmania species. **Archives of virology**, v. 161, n. 12, p. 3385–3390, dez. 2016.

HALL, A.; KARPLUS, P. A.; POOLE, L. B. Functions. v. 276, n. 9, p. 2469–2477, 2009.

HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT**. [s.l: s.n.].

HARTLEY, M. et al. Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005852, set. 2016.

HARTLEY, M. et al. Leishmania guyanensis parasites block the activation of the inflammasome by inhibiting maturation of IL - 1 β . **Microbial Cell**, n. C1, p. 1–13, 2018.

HARTLEY, M.-A. et al. **The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis**, 2012a.

HARTLEY, M.-A. et al. Leishmania RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. July, p. 99, jan. 2012b.

HARTLEY, M.-A. et al. The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 30, n. 8, p. 412–422, ago. 2014.

HULO, C. et al. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. **Nucleic acids research**, v. 39, n. Database issue, p. D576-82, jan. 2011.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 2, p. 254–67, fev. 2006.

IVES, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6018, p. 775–8, 11 fev. 2011.

JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in Leishmania major identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 120, n. 1, p. 33–40, mar. 2002.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–15, ago. 2011.

KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of Leishmania in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, v. 65, n. October, p. 37–42, 15 ago. 1990.

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087–1096, 2007.

KRUIDERING, M.; EVAN, G. I. Caspase-8 in apoptosis: the beginning of “the end”? **IUBMB life**, v. 50, n. 2, p. 85–90, ago. 2000.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–4, jul. 2016.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, jun. 2010.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. **Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1987.

LAMKANFI, M. et al. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 4, p. 358–

61, abr. 2002.

LATIMER, H. R.; VEAL, E. A. Peroxiredoxins in Regulation of MAPK Signalling Pathways; Sensors and Barriers to Signal Transduction. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 1, p. 40–45, 2016.

LEMIRANI, M. et al. PCR detection of Leishmania in skin biopsies. **Journal of infection in developing countries**, v. 3, n. 2, p. 115–22, 15 set. 2009.

LEÓN, C. M. et al. Analytical performance of Four Polymerase Chain Reaction (PCR) and real time PCR (qPCR) assays for the detection of six Leishmania species DNA in Colombia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. OCT, p. 1–13, 2017.

LEON, L. L. et al. Antigenic differences of Leishmania amazonensis isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 5, p. 678–680, set. 1990.

LESSA, M. M. et al. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 73, n. 6, p. 843–7, 2007.

LEWIS, D. H.; PETERS, W. The resistance of intracellular Leishmania parasites to digestion by lysosomal enzymes. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 71, n. 3, p. 295–312, set. 1977.

LIEN, E.; INGALLS, R. R. Toll-like receptors. **Critical care medicine**, v. 30, n. 1 Suppl, p. S1-11, jan. 2002.

LIMA-JUNIOR, D. S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 2, p. 223–31, 15 jan. 2008.

LOMAGA, M. A. et al. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. **Genes & development**, v. 13,

n. 8, p. 1015–24, 15 abr. 1999.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 3039–46, 1 mar. 2009.

LOURENÇO, L. S. DE A. 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. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2015.

MACEDO, D. H. et al. HHS Public Access. v. 210, p. 50–54, 2017.

MAGA, J. A; WIDMER, G.; LEBOWITZ, J. H. Leishmania RNA virus 1-mediated cap-independent translation. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 9, p. 4884–9, set. 1995.

MARSDEN, P. D. Clinical presentations of *Leishmania braziliensis braziliensis*. **Parasitology Today**, v. 1, n. 5, p. 129–133, 1985.

MARTÍNEZ-VALENCIA, A. J. et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–15, 2017.

MARTINEZ, E. et al. A first case of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) lainsoni* in Bolivia. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 375–377, jul. 2001.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 229–65, 2009.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases. **Cell**, v. 117, n. 5, p. 561–74, 28 maio 2004.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 1, p. 10–22, 15 jan. 2007.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral

leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 1994.

MATRANGOLO, F. S. V. et al. Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and-susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 190, n. 2, p. 63–75, 2013.

MEURS, E. et al. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. **Cell**, v. 62, n. 2, p. 379–90, 27 jul. 1990.

MILES, M. A. et al. Some methods for the enzymic characterization of Latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 243–52, 1980.

MOHAGHEGH, M. A. et al. Molecular identification of *Leishmania* species using samples obtained from negative stained smears. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 8, n. 2, p. 337–341, 2013.

MONTALVO, A. M. et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: A universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology**, v. 137, n. 8, p. 1159–1168, 2010.

MONTALVO, A. M. et al. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. **Parasitology Research**, v. 116, n. 7, p. 1843–1848, 2017.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. September, p. 1–7, 2012.

MUKHERJEE, A. et al. The γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 914–927, 2009.

MUÑOZ, E. B. et al. Diagnostic Efficacy of Molecular Techniques for Detection and Identification of *Leishmania* Species in Human Whole Blood and

Skin Samples from Ecuador. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 4, p. 803–805, 2016.

NEITZKE-ABREU, H. C. et al. Detection of DNA from Leishmania (Viannia): accuracy of polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e62473, 2013.

NELSON, B. J. et al. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 146, n. 6, p. 1849–1857, 1991.

NOGOCEKE, E. et al. A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in Crithidia fasciculata. **Biological chemistry**, v. 378, n. 8, p. 827–36, ago. 1997.

NOYES, H. Implications of a Neotropical Origin of the Genus Leishmania. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, p. 657–661, 1998.

OGAWA, G. M. et al. Sandfly fauna (Diptera: Psychodidae) from caves in the state of Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 1, p. 61–68, 2016.

OGG, M. M. et al. Short report: quantification of leishmanivirus RNA in clinical samples and its possible role in pathogenesis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 69, n. 3, p. 309–13, set. 2003.

OLIART-GUZMÁN, H. et al. Características Epidemiológicas Da Leishmaniose Tegumentar Americana Na Fronteira Amazônica: Estudo Retrospectivo Em Assis Brasil, Acre. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 2, p. 187–200, 2013.

OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–32, abr. 2014.

OLIVIER, M. et al. Leishmania virulence factors: Focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1377–1389, 2012.

OVALLE-BRACHO, C.; DÍAZ-TORO, Y. R.; MUVDI-ARENAS, S. Polymerase chain reaction-miniexon: A promising diagnostic method for mucocutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 55, n. 5, p. 531–539, 2016.

OZA, S. L. et al. Trypanothione biosynthesis in *Leishmania major*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 139, n. 1, p. 107–16, jan. 2005.

PAIVA-CAVALCANTI, M. DE et al. Leishmaniasis diagnosis : an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, p. 1–10, 2015.

PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.

PARMENTIER, L. et al. Case Report: Severe cutaneous leishmaniasis in a human immunodeficiency virus patient coinfecting with *Leishmania braziliensis* and its endosymbiotic virus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 840–843, 2016.

PASSOS, V. M. A. et al. Epidemiological aspects of American Cutaneous Leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 103–110, mar. 1993.

PATTERSON, J. L. Viruses of protozoan parasites. **Experimental Parasitology**, v. 70, n. 1, p. 111–113, jan. 1990.

PERAZA, J.; URBINA, A.; ZELEDÓN, R. Zymodeme and Serodeme Characterization of *Leishmania* Isolates Obtained from Costa Rican Patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 3, p. 283–287, maio 1998.

PEREIRA-MANFRO, W. F. et al. Inhibition of caspase-8 activity promotes protective Th1- and Th2-mediated immunity to *Leishmania major* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 95, n. 2, p. 347–355, fev. 2014.

PEREIRA, L. D. O. R. et al. Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with *Leishmania RNA virus 1* infection in Brazil. **Memórias**

do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. 5, p. 665–7, ago. 2013.

PEREIRA, L. DE O. R. et al. Is *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 132–137, 2017.

PEREIRA JÚNIOR, A. M. et al. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

PÉREZ-MORALES, D.; ESPINOZA, B. The role of small heat shock proteins in parasites. **Cell Stress and Chaperones**, v. 20, n. 5, p. 767–780, 2015.

PHAM, N. K.; MOURIZ, J.; KIMA, P. E. *Leishmania* *pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8322–8333, 2005.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.

POOLE, L. B.; HALL, A.; NELSON, K. J. Overview of peroxiredoxins in oxidant defense and redox regulation. **Current protocols in toxicology**, v. Chapter 7, p. Unit7.9, ago. 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 17, n. 11, p. e367–e377, nov. 2017.

QUEIROZ, A. et al. Association between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Strain Polymorphisms. v. 50, n. 12, p. 4028–4034, 2012.

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

REIS, L. E. S. et al. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: A comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 3–4, p. 498–503, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 1, p. 21–5, jan. 2007.

REQUENA, J. M.; MONTALVO, A. M.; FRAGA, J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

RESADORE, F. et al. Phlebotomine sand fly composition (Diptera: Psychodidae) and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Porto Velho Municipality, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 3, p. 798–803, 2017.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. e61843, 29 abr. 2013.

REVOLLO, S. et al. Isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis braziliensis* isolates obtained from Bolivian and Peruvian patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 388–91, 1992.

RITZ, C.; SPIESS, A.-N. qpcR: an R package for sigmoidal model selection in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 13, p. 1549–51, 1 jul. 2008.

RO, Y.; SCHEFFTER, S. M.; PATTERSON, J. L. Specific in vitro cleavage of a *Leishmania* virus capsid-RNA-dependent RNA polymerase polyprotein by a host cysteine-like protease. **Journal of virology**, v. 71, n. 12, p. 8983–90, dez. 1997.

ROCK, F. L. et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the**

United States of America, v. 95, n. 2, p. 588–93, 20 jan. 1998.

RODGERS, M. R.; POPPER, S. J.; WIRTH, D. F. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 3, p. 267–275, 1990.

ROELFSEMA, J. H. et al. Evaluation and improvement of two PCR targets in molecular typing of clinical samples of Leishmania patients. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 36–41, 2011.

ROMÃO, P. R. et al. Glutathione protects macrophages and Leishmania major against nitric oxide-mediated cytotoxicity. **Parasitology**, v. 118 (Pt 6, p. 559–66, jun. 1999.

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

ROMERO, G. A. S. et al. Identification of antigenically distinct populations of Leishmania (Viannia) guyanensis from Manaus, Brazil, using monoclonal antibodies. **Acta tropica**, v. 82, n. 1, p. 25–9, abr. 2002.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions ! n. December, 2017.

SAIZ, M. et al. Short report: detection of Leishmanivirus in human biopsy samples of leishmaniasis from Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 58, n. 2, p. 192–4, fev. 1998.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, p. 6139–6148, 2008.

SALINAS, G. et al. Leishmania RNA viruses in Leishmania of the Viannia subgenus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 54, n. 4, p. 425–9, abr. 1996.

SANTRICH, C. et al. Mucosal disease caused by Leishmania braziliensis

guyanensis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 1, p. 51–55, 1990.

SCHEFFTER, S. M. et al. The complete sequence of Leishmania RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 84–90, 10 set. 1995.

SCHEFFTER, S.; WIDMER, G.; PATTERSON, J. L. Complete sequence of Leishmania RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. **Virology**, v. 199, n. 2, p. 479–83, mar. 1994.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.

SHAHBAZI, F. et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: a comparison with the parasitological methods. **Parasitology research**, v. 103, n. 5, p. 1159–62, out. 2008.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, psychodidae, phlebotominae): Genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 2017, n. 660, p. 67–106, 2017.

SILVA, L. A. et al. Uso da reação em cadeia da polimerase para o diagnóstico de infecção assintomática por Leishmania em área endêmica de leishmaniose visceral. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101–104, 2013.

SILVA, S. C. et al. Molecular epidemiology and in vitro evidence suggest that Leishmania braziliensis strain helps determine antimony response among American tegumentary leishmaniasis patients. **Acta Tropica**, v. 178, p. 34–39, 2018.

SILVEIRA, F. T. et al. **Cutaneous leishmaniasis in the Amazon region: natural infection of the sandfly Lutzomyia ubiquitalis (Psychodidae: Phlebotominae) by Leishmania (Viannia) Lainsoni in Pará State, Brazil.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1991.

SILVEIRA, F. T. et al. An outbreak of cutaneous leishmaniasis among

soldiers in Belém, Pará State, Brazil, caused by *Leishmania (Viannia) lindenbergi* n. sp. **Parasite**, v. 9, n. 1, p. 43–50, 1 set. 2002.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, maio 2004.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. **Parasites & vectors**, v. 7, p. 596, 17 dez. 2014.

STUART, K. D. et al. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 18, p. 8596–600, 15 set. 1992.

SUÁREZ, M. et al. Quantification of *leishmania (Viannia)* kinetoplast DNA in ulcers of cutaneous leishmaniasis reveals inter-site and intersampling variability in parasite load. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. 1–14, 2015.

SZARGIKI, R. et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Bjid**, v. 12, n. 1, p. 47–52, 2009.

TAMURA, K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. **Molecular biology and evolution**, v. 9, n. 4, p. 678–87, jul. 1992.

TARR, P. I. et al. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9572–5, dez. 1988.

TEDESQUI, V. L. et al. Active surveillance of American tegumentary leishmaniasis in endemic areas in rural Bolivia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 1, p. 30–4, fev. 2012.

TEIXEIRA, F. et al. Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial

chaperone reservoir in *Leishmania infantum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 7, p. E616–E624, 17 fev. 2015.

TELES, C. B. G. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis and phlebotomine sandfly population, in the municipality of Monte Negro, State of Rondônia, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 1, p. 60–66, jan. 2013.

TELES, C. B. G. et al. Molecular characterization of American cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, 2015.

TETAUD, E. et al. Cloning and characterization of the two enzymes responsible for trypanothione biosynthesis in *Crithidia fasciculata*. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 31, p. 19383–90, 31 jul. 1998.

THIAGO, P. DE T.; DOS SANTOS, J. I.; STEINDEL, M. [Histoplasmosis in the region of the hard palate simulating a lesion caused by *Leishmania*]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 2, p. 225–9, 1998.

TIRERA, S. et al. Unraveling the genetic diversity and phylogeny of *Leishmania* RNA virus 1 strains of infected *Leishmania* isolates circulating in French Guiana. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. 1–20, 2017.

TOJAL DA SILVA, A. C. et al. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 11, n. 9, p. 1388–98, set. 2006.

TSUNAWAKI, S. et al. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. **Nature**, v. 334, n. 6179, p. 260–2, 21 jul. 1988.

TUON, F. F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 128, n. 3, p. 442–6, set. 2008.

VALENCIA, B. M. et al. Non-invasive cytology brush PCR for the diagnosis and causative species identification of American cutaneous leishmaniasis in Peru. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49738, jan. 2012.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 18 jun. 2002.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. Leishmania braziliensis infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 11, p. 7537–45, 1 jun. 2008.

VINET, A. F. et al. The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of Synaptotagmin V. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, 2009.

VIVARINI, A. DE C. et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 25, n. 12, p. 4162–73, dez. 2011.

VIVARINI, ÁISLAN DE C. et al. Systems approach reveals nuclear factor erythroid 2-related factor 2/protein kinase r crosstalk in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. SEP, p. 1–18, 2017.

WEEKS, R. et al. LRV1 Viral Particles in Leishmania guyanensis Contain. v. 66, n. 3, p. 1389–1393, 1992a.

WEEKS, R. S. et al. Transcribing and replicating particles in a double-stranded RNA virus from Leishmania. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 52, n. 2, p. 207–13, jun. 1992b.

WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 433–450, set. 1996.

WEITSCHEK, E. et al. BLOG 2.0: a software system for character-based species classification with DNA Barcode sequences. What it does, how to use it. **Molecular Ecology Resources**, p. n/a-n/a, jan. 2013.

WHO. World Healthy Organization - Leishmaniasis. **Fact sheet N°375**, 2013.

WHO. **WHO: Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire** World Health organization Geneva. [s.l: s.n.].

WIDMER, G. et al. Characterization of a RNA virus from the parasite Leishmania. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 15, p. 5979–82, ago. 1989.

WIDMER, G.; DOOLEY, S. Phylogenetic analysis of Leishmania RNA virus and leishmania suggests ancient virus-parasite association. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 12, p. 2300–2304, 1995.

WIDMER, G.; PATTERSON, J. L. Genomic structure and RNA polymerase activity in Leishmania virus. **Journal of virology**, v. 65, n. 8, p. 4211–5, ago. 1991.

WILLIAMS, B. R. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, p. 6112–6120, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniases. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva: [s.n.].

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen Leishmania donovani. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–32, 17 set. 2004.

YAO, C.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. Internal and surface-localized major surface proteases of Leishmania spp. and their differential release from promastigotes. **Eukaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1905–1912, 2007.

YEHIA, L. et al. Molecular diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species identification: analysis of 122 biopsies with varied parasite index. **Journal of cutaneous pathology**, v. 39, n. 3, p. 347–55, mar. 2012.

YILDIZ ZEYREK, F. et al. [Comparison of polymerase chain reaction using kinetoplast DNA specific primers and other parasitological methods in the diagnosis of clinical samples of suspected patients with cutaneous leishmaniasis in Şanlıurfa]. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 51, n. 4, p. 340–349, out. 2017.

ZANGGER, H. et al. Detection of Leishmania RNA virus in Leishmania parasites. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 1, p. e2006, jan. 2013.

ZANGGER, H. et al. Leishmania aethiopica field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2836, abr. 2014.

ZHOU, Y. et al. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37445–51, 3 set. 2004.

ANEXOS

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE ESCOVA CERVICAL

A escova cervical após a coleta da amostra, foi colocada em microtubo de 2,0 mL e armazenada a -20°C até o momento da extração.

Kit utilizado: PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA/USA)

1 - Adicionar ao microtubo contendo a escova cervical, 200 µL de tampão de lise e 20 µL de Proteinase K. Homogeneizar em vórtex por 15 segundo

2 - Adicionar 200 µL do tampão de ligação e homogeneizar em vórtex por 15 segundos

3 - Adicionar 200 µL de álcool 70% estéril

4 - Centrifugar a 12000 g por 15 segundos e descartar a escova cervical

5 - Passar 750 µL do microtubo para a coluna e centrifugar a 12000 g por 30 segundos

6 - Descartar o filtrado e adicionar 500 µL do tampão de lavagem 1 a coluna. Centrifugar a 12000 g por 30 segundos

7 - Descartar o filtrado e adicionar 500 µL do tampão de lavagem 2. Centrifugar a 12000 g por 2 minutos

8 - Descartar o filtrado e transferir a coluna para um novo microtubo de 1,5 mL.

9 - Adicionar 60 µL do tampão de eluição no centro da coluna e incubar a temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugar a 12000 g por 1 minuto

10 - Repetir o passo 9 e por fim, descartar a coluna e armazenar o DNA a -20°C

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento utilizado para formalizar a participação dos voluntários na pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO (A) COMO VOLUNTÁRIO (A) A PARTICIPAR DA PESQUISA:

AVALIAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS A FISIOPATOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

JUSTIFICATIVA: A leishmaniose tegumentar, conhecida popularmente como ferida-brava é uma infecção que apresenta inicialmente uma lesão cutânea apresentando feridas indolores na pele e pode evoluir para lesões mais graves, com o aparecimento de ferimentos nas mucosas (boca, nariz) do paciente. É uma doença transmitida pela picada do inseto infectado, tem maior ocorrência em áreas rurais, próximas a florestas, e é considerada um problema de saúde pública mundial pela Organização Mundial de Saúde. Em todas as regiões brasileiras, a leishmaniose está presente, sendo a Região Norte responsável pelo maior número dos casos. Alguns pacientes que trataram a leishmaniose cutânea, anos após cura aparente das feridas, apresentam uma forma mais grave da doença que atinge as mucosas. Os motivos que levam ao aparecimento dessas lesões não são totalmente esclarecidos e são de origem multifatorial, podendo estar relacionados a características genéticas e imunológicas do paciente, a espécie de *Leishmania* envolvida no caso, a com infecção com outros patógenos, e até mesmo a presença de um vírus conhecido como Leishmania RNA Virus (LRV) que pode estar no interior da *Leishmania*. Até o momento, não se sabe em detalhes qual desses motivos podem influenciar de forma significativa no agravamento da doença. A presente pesquisa visa avaliar diferentes fatores que podem contribuir para o surgimento de uma leishmaniose mucosa utilizando diferentes metodologias.

Junto com você serão convidados e inseridos no estudo mais 599 participantes, totalizando ao final do estudo 600 participantes.

II) **OBJETIVO:** Avaliar os perfis genéticos, imunológicos e epidemiológicos de pacientes com Leishmaniose Tegumentar atendidos no Hospital de Medicina Tropical de Rondônia, CEMETRON bem como as características epidemiológicas da doença nessa região.

III) **PROCEDIMENTOS:** Após o aceite do voluntário em participar da pesquisa, este receberá o TCLE e os esclarecimentos sobre a pesquisa. Serão coletados 10 mL de sangue periférico sob condições de assepsia de rotina hospitalar, 4 swabs estéreis serão colocados em contato direto com a borda das lesões e será coletado um aspirado da lesão a fim de realizar o isolamento do parasita. As coletas de sangue, de aspirado e da lesão serão realizadas por um profissional qualificado e capacitado para tal função. As lesões serão fotografadas e medidas, sendo preservada a identificação do paciente pelo registro.

Existe um desconforto, e será de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue e da coleta da lesão, sendo justificada para que se possa realizar o procedimento.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO:

Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador (es) irá (ao) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos testes que serão realizados dentro de laboratório de pesquisa serão armazenados em banco de dados e os resultados referentes à identificação do agente causador da Leishmaniose serão encaminhados ao laboratório do CEMETRON para retirada pelo paciente. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada na Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ RO e outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO O POR EVENTUAIS DANOS:

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional.

ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM BIORREPOSITÓRIO E BIOBANCO

As amostras colhidas nesse trabalho serão armazenadas em Biorrepositórios primeiramente, que se destina a ser um tipo de depósito ao qual suas amostras ficarão no tempo de realização deste projeto de pesquisa, cuja guarda ficará com o pesquisador principal Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira e de responsabilidade institucional da Fiocruz Rondônia, este depósito permanecerá o tempo programado para realização do trabalho.

Caso haja necessidade poderá ser prolongada mediante justificativa e aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa). Este material poderá sofrer transferência para Biobanco institucional, pelo qual sua amostra fará parte de um banco de responsabilidade institucional podendo ser utilizado para pesquisas futuras, essas pesquisas também serão avaliadas por CEP's. Seu material biológico será armazenado sobre um sistema seguro de identificação, que garante o sigilo, o respeito à confidencialidade e à recuperação dos seus dados, para fornecimento de informações de seu interesse ou para a obtenção de consentimento específico para utilização em nova pesquisa;

Por isso torna-se necessário que marque qualquer alternativa abaixo, que condiz com sua participação nesse estudo:

() Necessidade de novo consentimento a cada pesquisa (a cada nova pesquisa o pesquisador responsável entrará em contato para adquirir novo termo de consentimento livre e esclarecido).

() Dispensa de novo consentimento a cada pesquisa (seu material biológico poderá ser utilizado para pesquisa futuras sem a necessidade de novo termo de consentimento livre e esclarecido).

É importante esclarecer que você participante desta pesquisa tem garantia expressa da possibilidade de acesso do conhecimento dos resultados obtidos com a utilização dos materiais biológicos e as orientações quanto as suas implicações, em qualquer tempo. Para isso ficará o contato da instituição responsável por seu armazenamento (FIOCRUZ – RO – (69) 32196008).

DECLARAÇÃO DO (A) PARTICIPANTE (A) OU DO SEU RESPONSÁVEL:

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O Pesquisador Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira certificou-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a Biomédica Lilian Motta Cantanhêde e/ou o pesquisador Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, nos telefones (69) 3219 6008, (69) 32196000 ou nos e-mails licantanhede@gmail.com e ricardogodoi@fiocruz.com

Declaro que recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.


_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Pesquisador Responsável

Pesquisador Responsável:
Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira
Diretor Fiocruz Rondônia
BR 364, Km 3,5, Lagoa - Porto Velho - RO

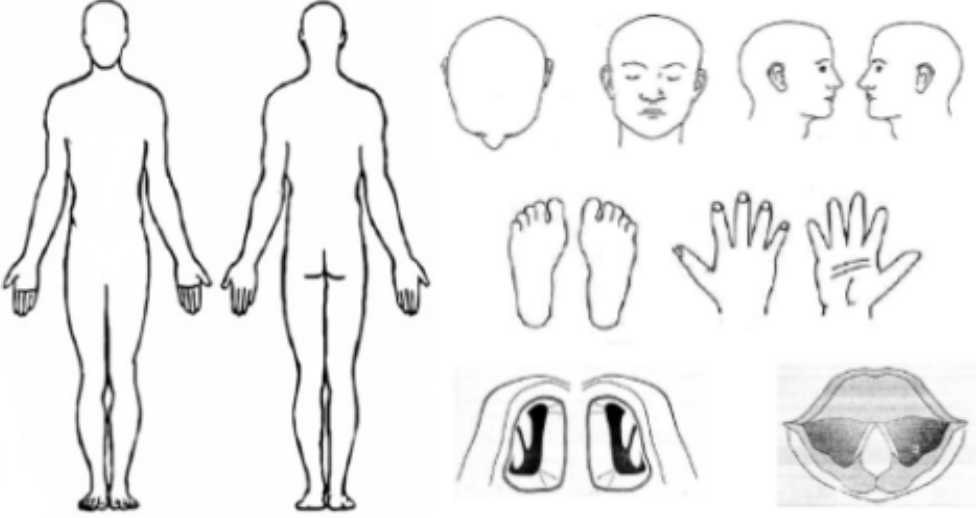
APÊNDICE B – Ficha de entrevista utilizada para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com suspeita clínica de LTA

| | | | |
|---|--|---|---|
|  | | Número: <input type="text"/> | |
| FICHA DE ENTREVISTA - LEISHMANIOSE | | | |
| Identificação do paciente | Nome: <input type="text"/> | | Sexo: <input type="checkbox"/> F () <input type="checkbox"/> M () <input type="checkbox"/> I () |
| | Idade: <input type="text"/> | Escolaridade: <input type="text"/> | Telefone: <input type="text"/> Ocupação principal: <input type="text"/> |
| | Endereço atual: <input type="text"/> | | |
| | Cidade: <input type="text"/> | Estado: <input type="text"/> | |
| Antecedentes Médicos | Já teve Leishmaniose: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () <input type="checkbox"/> NSI () | | Fez tratamento: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () <input type="checkbox"/> NSI () |
| | Onde foi tratado: <input type="text"/> | | |
| | Natureza do tratamento: <input type="checkbox"/> Tópico () <input type="checkbox"/> Sistêmico () <input type="checkbox"/> NSI () | | Ano de tratamento: <input type="text"/> Obteve cura: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () <input type="checkbox"/> Parcial () |
| | Droga: <input type="text"/> | Dose: <input type="text"/> | Tratamento Completo: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () <input type="checkbox"/> NSI () |
| Situação Epidemiológica | Localização do domicílio: <input type="checkbox"/> Rural () <input type="checkbox"/> Urbana () <input type="checkbox"/> Periurbana () | | Quantas pessoas residem no domicílio: <input type="text"/> |
| | Casos de LTA na família: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () | | |
| | Cria animais no quintal: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () | | Quais: <input type="text"/> |
| | Adquiriu a infecção: <input type="checkbox"/> Trabalho () <input type="checkbox"/> Lazer () <input type="checkbox"/> NSI () | | Relata outros casos de LTA: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () |
| | | Conhece o inseto vetor: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () | |
| Observações: <input type="text"/> | | | |
| Dados da colera | Tipo de lesão: <input type="checkbox"/> Cutânea () <input type="checkbox"/> Mucosa () <input type="checkbox"/> Cutâneo Mucosa () <input type="checkbox"/> Disseminada () <input type="checkbox"/> Difusa () | | Tempo da lesão: <input type="text"/> |
| | Tipo de entrada: <input type="checkbox"/> Caso novo () <input type="checkbox"/> Recidiva () | | Exames anteriores: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () |
| | Quais: <input type="text"/> | | |
| | Provável local de infecção: <input type="text"/> | | |
| | Em tratamento: <input type="checkbox"/> Sim () <input type="checkbox"/> Não () | | Qual medicamento: <input type="text"/> |
| Local das lesões (marcar na figura abaixo): <input type="text"/> | | | |

Número:

| | | |
|--------------|--|--|
| Exame Físico | Lesão Mucosa Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>) | Formas Tardia (<input type="checkbox"/>) Primária (<input type="checkbox"/>) Indeterminada (<input type="checkbox"/>) Concomitante (<input type="checkbox"/>) Outras (<input type="checkbox"/>) |
| | Queixas nasais Dor (<input type="checkbox"/>) Secreção (<input type="checkbox"/>) Sangramento (<input type="checkbox"/>) Crostas (<input type="checkbox"/>) Ferimento (<input type="checkbox"/>) Deformidade (<input type="checkbox"/>) Outros (<input type="checkbox"/>) | |
| | Tipo de lesão Infiltração (<input type="checkbox"/>) Ulceração (<input type="checkbox"/>) Erosão (<input type="checkbox"/>) Hiperemia (<input type="checkbox"/>) Edema (<input type="checkbox"/>) | Lesão em mucosa bucal Sim (<input type="checkbox"/>) Não (<input type="checkbox"/>) |
| | Observações | |

| | |
|------------------|------|
| História Clínica | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

| | |
|------------------------|---|
| Localização das lesões |  |
| | Amostras coletadas: Sangue (<input type="checkbox"/>) Swab LC (<input type="checkbox"/>) Swab LM (<input type="checkbox"/>) Punção (<input type="checkbox"/>) Biópsia (<input type="checkbox"/>) Outro: <input type="text"/> |

Responsável pela coleta

Data/Hora

APÊNDICE C – Lista de iniciadores selecionados para os ensaios de Fluidigm.

| | DESCRIÇÃO - REFERÊNCIA | GENE | SEQUÊNCIA DO INICIADOR | TM | LOCALIZAÇÃO | TAMANHO/pb |
|----|---|----------------|----------------------------|-------|-------------|------------|
| 1 | Aquagliceroporina 1 | AQP1 F | CTTTGCGGTGTGGAGTGAGATA | 60.35 | 525-546 | 156 |
| | | AQP1 R | CCAGAGTTGATACCTGTCTGTGATAC | 60.73 | 680-656 | |
| 2 | γ glutamil-cisteína sintetase | γ GSH F | CTACGACTCTATCTCCATCTTCATCA | 59.35 | 1191-1216 | 115 |
| | | γ GSH R | CACACCAGCCTTCTCCAGC | 60.67 | 1305-1287 | |
| 3 | Multidrug resistance associated protein A | MRPA F | AAGTGGGCAGCGACTCAAA | 59.85 | 3637-3655 | 81 |
| | | MRPA R | CCAGTTCAGCGTCTCCGTT | 60.01 | 3717-3699 | |
| 4 | Redutase dependente de Tiol 1 | TDR1 F | GCTTCTTCCTGGACAACGC | 59.13 | 971-989 | 89 |
| | | TDR1 R | CTCAAACCTCAGCCTTCGCATC | 59.60 | 1059-1039 | |
| 5 | Glutathiona sintetase | GSH2 F | ACGAAGAGCGACGACCCA | 60.98 | 1546-1563 | 158 |
| | | GSH2 R | GTGACGCCGTAGATGCCA | 59.82 | 1703-1686 | |
| 6 | Tripanotiona Redutase | TRYR F | GAAAAGGATGGCGAGGTGC | 59.20 | 1255-1273 | 76 |
| | | TRYR R | AGATGCCTACGCTCTGAATGAT | 59.37 | 1330-1309 | |
| 7 | Ornitina Descaboxilase | ODC F | CAGTCTGTCGTGCCGATGGA | 62.21 | 1519-1538 | 121 |
| | | ODC R | CGTTCAGCAGGAGAAGCGTC | 61.35 | 1639-1620 | |
| 8 | Arsenato redutase 2 | ACR2 F | CAAACCTGATTCGTTTCGCCA | 59.13 | 51-70 | 71 |
| | | ACR2 R | CAATGAAGCCGCAGTCTCG | 59.29 | 121-103 | |
| 9 | Actina | Actin F | GGCGAACGAGGAGTCATTTG | 57.86 | 702-720 | 100 |
| | | Actin R | ATCAGCGACGGCTTGAACAG | 61.91 | 801-781 | |
| 10 | S8 | S8 F | CGACTTGATGCGGGGA | 59.01 | 357-373 | 111 |
| | | S8 R | GGCGAAGCCTTGTTTCACG | 59.44 | 467-450 | |
| 11 | Tryparedoxin peroxidase | TP F | TTCAGTTCGTGGAGAAGCAC | 58.13 | 488-507 | 104 |
| | | TP R | GCTGAAGTAGCCCTCAATGG | 58.33 | 591-572 | |
| 12 | Heat chock protein 70 | HSP70 F | AAGCGCAAGAACAAGGGTAA | 58.02 | 742-761 | 146 |
| | | HSP70 R | AAGTCGACGTTGTGCAACAG | 58.53 | 887-868 | |
| 13 | Heat chock protein 83 | HSP83 F | TCATCATGGACAACCTGCGAG | 57.99 | 56-75 | 187 |
| | | HSP83 R | TTGTTCTCCGCCATCTCTTC | 57.61 | 242-223 | |
| 14 | Heat chock protein 60 | HSP60 F | GAACTTCGACCCTTCCATCC | 57.97 | 960-979 | 155 |
| | | HSP60 R | GGTTGTAGTCACTCGTCTCG | 57.76 | 1114-1095 | |

| | | | | | | |
|----|---|------------|-------------------------|-------|-----------|-----|
| 15 | putative sodium stibogluconate resistance protein | SSR F | GGGAGGCGGAAAATACTGAG | 58.05 | 668-687 | 87 |
| | | SSF R | TTAAGTTCCACTCGCTCGAC | 57.66 | 754-735 | |
| 16 | Glicoproteína 63 | Gp63 F | GATGCGACAGTGGAGTGAAA | 58.20 | 1749-1768 | 120 |
| | | Gp63 R | CAGGGGAGGCTGATAACAAG | 57.66 | 1868-1849 | |
| 17 | mitogen activated protein kinase, putative | MAPK F | TACACCCCTTCCACTTTGA | 58.18 | 967-986 | 80 |
| | | MAPK R | TTGACGCTCTCCTCGTAGAT | 57.96 | 1046-1027 | |
| 18 | multidrug resistance protein | MRP F | TTGGTGAAGAGCCGTTCTAT | 56.56 | 14-33 | 77 |
| | | MRP R | CCATGTGTAGAAGAGCGGG | 57.63 | 90-72 | |
| 19 | clathrin heavy chain, putative | Clathrin F | TTGGCTTCTACCTCAGGACA | 57.98 | 4274-4293 | 63 |
| | | Clathrin R | GCTTGAAGATGGAGGACAGG | 57.96 | 4336-4317 | |
| 20 | Thiolase protein-like protein | Thiol F | AATCCGTCCAAGTGGTTTCC | 58.09 | 475-494 | 195 |
| | | Thiol R | CGGGACAACCTTCGTCTTTGA | 58.14 | 669-650 | |
| 21 | Enolase | ENOL F | GCAAAGCTGTGCATGGAGAA | 59.40 | 1069-1088 | 207 |
| | | ENOL R | GTAGCCGTACTTGGATGCG | 58.41 | 1275-1257 | |
| 22 | Peroxiredoxin | PRX F | GTTTGCCCGACAGAGATCAT | 57.97 | 238-257 | 64 |
| | | PRX R | GCGTGTCAGCTTCTCAAAC | 57.98 | 301-282 | |
| 23 | Toll-like receptor 1 - NM_003263 | TLR 1 F | TTCAAACGTGAAGCTACAGGG | 60.2 | 834-854 | 105 |
| | | TLR 1 R | CCGAACACATCGCTGACAAC | 61.0 | 938-918 | |
| 24 | Toll-like receptor 2 - NM_003264 | TLR2 F | ATCCTCCAATCAGGCTTCTCT | 60.0 | 63-83 | 118 |
| | | TLR2 R | GGACAGGTCAAGGCTTTTTACA | 60.4 | 180-159 | |
| 25 | Toll-like receptor 3 - NM_003265 | TLR3 F | CAAACACAAGCATTCCGAATCTG | 60.6 | 737-759 | 145 |
| | | TLR3 R | AAGGAATCGTTACCAACCACATT | 60.2 | 881-859 | |
| 26 | Toll-like receptor 4 - NM_138554 | TLR4 F | TTGGACAGTTTCCCACATTGA | 60.0 | 424-445 | 76 |
| | | TLR4 R | AAGCATTCCCACCTTTGTTGG | 60.1 | 499-479 | |
| 27 | Toll-like receptor 5 - NM_003268 | TLR5 F | TCCCTGAACCTCACGAGTCTTT | 60.4 | 904-924 | 105 |
| | | TLR5 R | GTTGTCAAGTCCGTAAAATGC | 60.0 | 1012-991 | |
| 28 | Toll-like receptor 6 - NM_006068 | TLR6 F | TTCTCCGACGGAAATGAATTTGC | 60.7 | 82-104 | 75 |
| | | TLR6 R | CAGCGGTAGGTCTTTTGGAAAC | 60.9 | 156-136 | |
| 29 | Toll-like receptor 7 - NM_016562 | TLR 7 F | TCCTTGGGGCTAGATGGTTTC | 60.9 | 71-91 | 79 |
| | | TLR 7 R | TCCACGATCACATGGTTCTTTG | 60.6 | 149-128 | |
| 30 | Toll-like receptor 8 - NM_138636 | TLR 8 F | ATGTTCTTCAGTCGTCAATGC | 60.9 | 10-31 | 143 |
| | | TLR 8 R | TTGCTGCACTCTGCAATAACT | 60.2 | 152-132 | |
| 31 | Toll-like receptor 9 - NM_017442 | TLR 9 F | AATCCCTCATATCCCTGTCCC | 60.2 | 60.2 | 104 |
| | | TLR9 R | GTTGCCGTCCATGAATAGGAAG | 61.0 | 61.0 | |
| 32 | Toll-like receptor adaptor molecule 1 | TICAM1 F | GCCAGCAACTTGGAATCAGC | 60.67 | 610-630 | 93 |
| | | TICAM1 R | GGGGTTCGTACAGAGCTTG | 60.37 | 702-684 | |

| | | | | | | |
|----|---|---------------|----------------------------|-------|-----------|-----|
| 33 | Toll-like receptor adaptor molecule 2 - NM_021649 | TICAM2 F | CTGACTCACAGCTGGACCG | 60.0 | 11-29 | 74 |
| | | TICAM2 R | GACTGCTGCTTTGCCGTG | 59.7 | 84-67 | |
| 34 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 - NM_001511 | CXCL1 F | TGGCTTAGAACAAAGGGGCTTA | 59.6 | 1037-1058 | 110 |
| | | CXCL1 R | AAAGGTAGCCCTTGTTTCCCC | 60.2 | 1146-1126 | |
| 35 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 - NM_002982 | CCL2 F | TGCAATCAATGCCCCAGTCA | 60.2 | 151-170 | 100 |
| | | CCL2 R | ACACTTGCTGCTGGTGATTCT | 60.2 | 250-230 | |
| 36 | Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 - NM_001504 | CXCR3 F | GCTCTCCCCAATATCCTCGC | 60.0 | 1255-1274 | 98 |
| | | CXCR3 R | AATGGTGCAGTCCTCAGAGC | 60.0 | 1352-1333 | |
| 37 | Chemokine (C-C motif) ligand 5 - NM_002985 | CCL5 F | TGCTGCTTTGCCTACATTGC | 59.7 | 165-184 | 105 |
| | | CCL5 R | TCGGGTGACAAAGACGACTG | 59.9 | 269-250 | |
| 38 | Chemokine (C-C motif) receptor 5 - NM_000579 | CCR5 F | GAGTGAAGAATCCTGCCACCT | 59.7 | 21-41 | 97 |
| | | CCR5 R | ACGGGCTTTTCTCACTGGATT | 59.9 | 117-97 | |
| 39 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 9 - NM_002416 | CXCL9 F | TCCCATGAAGAAAGGGAACGG | 60.0 | 2018-2038 | 90 |
| | | CXCL9 R | AGGCTAACTGGGCACCAATC | 60.0 | 2107-2088 | |
| 40 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 10 - NM_001565 | CXCL10 F | TGAATCCAGAATCGAAGGCCA | 59.5 | 329-349 | 100 |
| | | CXCL10 R | TGCATCGATTTTGCTCCCCT | 60.00 | 428-409 | |
| 41 | Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 - NM_005409 | CXCL11 F | ACCCAAGTAACAACCTGTGACAAAAT | 59.5 | 365-389 | 104 |
| | | CXCL11 R | GATTATAAGCCTTGCTTGCTTCGAT | 60.0 | 468-444 | |
| 42 | Interleucina 1 β - NM_000576 | IL1 β F | AACCTCTTCGAGGCACAAGG | 59.9 | 5-24 | 107 |
| | | IL1 β R | GGCGAGCTCAGGTACTTCTG | 60.1 | 111-92 | |
| 43 | Interleukin 1 alpha - NM_000575 | IL1A F | CGTTTTGACGACGCACTTGT | 59.9 | 825-844 | 91 |
| | | IL1A R | CTGGCAGCTTAAGCCTGAGT | 60.0 | 915-896 | |
| 44 | Interleucina 2 - NM_000586 | IL2 F | ACAGGATGCAACTCCTGTCTT | 59.3 | 60-80 | 104 |
| | | IL2 R | ATGCTCCAGTTGTAGCTGTGT | 59.6 | 163-143 | |
| 45 | Interleucina 4 - NM_000589 | IL4 F | GCACCGAGTTGACCGTAACA | 60.6 | 208-227 | 98 |
| | | IL4 R | GTAGAACTGCCGGAGCACAG | 60.7 | 305-286 | |
| 46 | Interleucina 6 - NM_000600 | Il6 F | AACCCCAATAAATATAGGACTGGA | 59.5 | 15-39 | 108 |
| | | Il6 R | GTTCATAGCTGGGCTCCTGG | 60.0 | 122-103 | |
| 47 | Interleucina 10 - Oliveira, 2014 | IL10 F | CGAGATGCCTTCAGCAGAGTG | 61.0 | 192-212 | 128 |
| | | IL 10 R | TCATCTCAGAACAAGGCTTGGC | 60.8 | 318-298 | |
| 48 | Interleucina 12 - Oliveira, 2014 | IL12 F | CAGCCTGGGAAACATAACAAGAC | 59.9 | 1722-1744 | 109 |
| | | IL12 R | CTCCTGCCTCATCCTCCTGAA | 60.7 | 1830-1810 | |
| 49 | Interleukin 17 receptor A- NM_014339 | ILRA-17 F | CTGCCTCAATGACTGCCTCA | 60.0 | 1000-1019 | 107 |
| | | ILRA-17 R | TGAACCAGTACACCCACAGG | 59.5 | 1106-1087 | |
| 50 | Interleukin 17A - Oliveira, 2014 | IL17A F | TGGGAAGACCTCATTGGTGT | 59.5 | 54-73 | 84 |
| | | IL17A R | GGATTTTCGTGGGATTGTGAT | 59.5 | 137-118 | |

| | | | | | | |
|----|---|------------------|--------------------------|------|-----------|-----|
| 51 | Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor) - NM_001562 | IL18 F | TGCCAACTCTGGCTGCTAAA | 59.8 | 95-114 | 104 |
| | | IL18 R | TTGTTGCGAGAGGAAGCGAT | 60.0 | 198-179 | |
| 52 | Interleucina 21 - NM_021803 | IL-21 F | ATCCAGTCCTGGCAACATGG | 60.0 | 52-71 | 101 |
| | | IL-21 R | TGTGGCGATCTTGACCTTGG | 60.3 | 152-133 | |
| 53 | Fator de Necrose Tumoral α - NM_000594 | TNF- α F | CTGGGCAGGTCTACTTTGGG | 60.0 | 843-862 | 108 |
| | | TNF- α R | GGTGTCTGAAGGAGGGGGTA | 60.0 | 950-931 | |
| 54 | TNF receptor-associated factor 3 - NM_003300 | TRAF3 F | ACCGCGAGAACTCCTCTTTC | 59.7 | 190-209 | 84 |
| | | TRAF3 R | TTTAGCGCGGGTTAGTCTG | 60.1 | 273-254 | |
| 55 | TNF receptor-associated factor 6 - NM_004620 | TRAF6 F | CGCACTAGAACGAGCAAGTGATA | 60.7 | 255-277 | 91 |
| | | TRAF6 R | GCAGTCACTTTCAGACTGGC | 59.9 | 345-326 | |
| 56 | Interferon beta - NM_002176 | IFN- β F | ACGCCGATTGACCATCTAT | 59.8 | 318-337 | 85 |
| | | IFN- β R | GTCTCATTCCAGCCAGTGCT | 60.0 | 402-383 | |
| 57 | Interferon beta 1 - NM_002176 | IFNB1 R | ACGCCGATTGACCATCTAT | 59.8 | 318-337 | 85 |
| | | IFNB1 R | GTCTCATTCCAGCCAGTGCT | 60.0 | 402-383 | |
| 58 | Interferon gamma - NM_000619 | IFNG F | TCGGTAACTGACTTGAATGTCCA | 61.0 | 364-386 | 93 |
| | | IFNG R | TCGCTTCCCTGTTTTAGCTGC | 61.2 | 456-436 | |
| 59 | Interferon alpha 2 - NM_000605 | IFNA2 F | GTTTCTGCTATGACCATGACACG | 59.9 | 717-739 | 93 |
| | | IFNA2 R | GGGACTAGTGCCTTAAGAGCTG | 60.1 | 809-788 | |
| 60 | Interferon regulatory factor 4 - NM_002460 | IRF4 F | AATGGTTGCCAGGTGACAGG | 60.0 | 760-779 | 100 |
| | | IRF4 R | AGGCTTCGGCAGACCTTATG | 59.8 | 859-840 | |
| 61 | Protein kinase, interferon-inducible dsRNA dependent activator - NM_003690 | PRKRA F | CTACGGCACCAAGGCTCC | 60.1 | 21-38 | 84 |
| | | PRKRA R | CACCTCCTCCGACTCCCC | 60.5 | 104-87 | |
| 62 | Transforming growth factor beta 1 - Oliveira, 2014 | TGF- β 1 F | GGACACCAACTATTGCTTCAG | 59.8 | | |
| | | TGF- β 1 R | TCCAGGCTCCAAATGTAGG | 60.0 | | |
| 63 | Transforming growth factor, beta 2 - NM_003238 | TGFB2 F | GGAGCGACGAAGAGTACTACG | 60.1 | 1646-1666 | 84 |
| | | TGFB2 R | TGGGCGGGATGGCATTTC | 59.9 | 1729-1712 | |
| 64 | Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa - NM_007315 | STAT1 F | ATGGCGAGAACCCTAAGTTTCAGT | 59.9 | 4110-4132 | 108 |
| | | STAT1 R | ACTGACAGCTAAACCTCAGCAA | 59.9 | 4217-4196 | |
| 65 | Signal transducer and activator of transcription 6, interleukin-4 induced - NM_003153 | STAT6 F | CTCGCTGGACAGAGCTACAG | 59.9 | 206-225 | 77 |
| | | STAT6 R | GGCAACCCCTCTGCTGTC | 60.2 | 282-265 | |
| 66 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 - NM_003998 | NFKB1 F | CCCGCGCCGCTTAGG | 60.2 | 397-411 | 82 |
| | | NFKB1 R | TCTTCTGCCATTCTGAAGCCG | 60.5 | 478-458 | |
| 67 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 - NM_002502 | NFKB2 F | CTACTGGAGGCCCTGTCTGA | 60.3 | 2764-2783 | 97 |
| | | NFKB2 R | CCTTCACCTCTGTGCTGGG | 60.0 | 2860-2842 | |
| 68 | Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 - NM_006092 | NOD1 F | CCTGGTGGCCAAGTGATTGT | 60.5 | 161-180 | 92 |
| | | NOD1 R | TTTCTGTAATCGCCGCCACA | 60.3 | 252-233 | |

| | | | | | | |
|----|--|----------|--------------------------|------|-----------|-----|
| 69 | Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 - NM_022162 | NOD2 F | ATGGGCTTTGATGGGGGAAG | 60.0 | 96-115 | 100 |
| | | NOD2 R | CGAGCACATTTTACAACCCG | 60.3 | 195-176 | |
| 70 | NLR family, pyrin domain containing 1 - NM_033004 | NLRP1 F | TACTCTGATCCCTCCAGCCC | 60.1 | 4632-4651 | 89 |
| | | NLRP1 R | GCTGCTCTCGATACTGGTCC | 59.9 | 4720-4701 | |
| 71 | NLR family, pyrin domain containing 3 - NM_183395 | NLRP3 F | TCACCATGTGCTTCATCCCC | 60.0 | 1963-1982 | 101 |
| | | NLRP3 R | GGTGGTCTTGATGTCTGGG | 60.0 | 2063-2044 | |
| 72 | NLR family, CARD domain containing 4 - NM_021209 | NLRC4 F | TCGGTGGAGTGGACCAAAAC | 60.1 | 45-64 | 99 |
| | | NLRC4 R | TCCCAGAGGACTTCCAGCAG | 60.5 | 143-124 | |
| 73 | Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase - NM_033292 | CASP1 F | GCCCACCACTGAAAGAGTGA | 59.8 | 1202-1221 | 98 |
| | | CASP1 R | TTCACTTCTGCCACAGAC | 59.8 | 1299-1280 | |
| 74 | Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase - NM_004347 | CASP5 F | GCTGTACAAAGAGACAGAGGCT | 60.0 | 4-25 | 109 |
| | | CASP5 R | TCCAATCCACTCTGAAGGATACC | 59.5 | 112-90 | |
| 75 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase - NM_001228 | CASP8 F | TTCTGCCTACAGTTCCACTT | 59.0 | 597-617 | 92 |
| | | CASP8 R | CGACCCTCCGCCAGAAAG | 60.0 | 688-671 | |
| 76 | Mitogen-activated protein kinase 1 - NM_002745 | MAPK1 F | AGTTCTTGACCCCTGGTCTCT | 60.1 | 1384-1403 | 93 |
| | | MAPK1 R | CACAACACTACCAGAAACCGCC | 59.9 | 1476-1457 | |
| 77 | Macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor) - NM_002415 | MIF F | GTCCGAGAAGTCAGGCACG | 60.4 | 12-30 | 104 |
| | | MIF R | CGATGAACATCGGCATGATGG | 59.8 | 113-93 | |
| 78 | Heat shock 70kDa protein 1A - NM_005345 | HSPA1A F | GGGCTTTCCAAGATTGCTG | 59.4 | 2170-2189 | 95 |
| | | HSPA1A R | TGCAAACACAGGAAATTGAGAACT | 59.6 | 2264-2241 | |
| 79 | Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein - NM_001039661 | TIRAP F | AGGACAGGCAAGGTTTCATTCA | 60.1 | 2023-2044 | 96 |
| | | TIRAP R | GGGGGCACAAAAGTACACATTG | 60.2 | 2118-2097 | |
| 80 | Myeloid differentiation primary response gene (88) - NM_002468 | MYD88 F | GCTCATCGAAAAGAGGTGCC | 59.5 | 853-872 | 105 |
| | | MYD88 R | GGAGAGAGGCTGAGTGCAAA | 59.6 | 957-938 | |
| 81 | Interferon regulatory factor 1 | IRF1 F | CTGTGCGAGTGTACCGGATG | 62.6 | 314-333 | 110 |
| | | IRF1 R | ATCCCCACATGACTTCCTCTT | 60.2 | 426-406 | |
| 82 | Interferon regulatory factor 3 - NM_001571 | IRF3 F | GAGCTCAGCTGACGGGAAAG | 60.0 | 136-155 | 110 |
| | | IRF3 R | CTACGATGGAAGGTCCGGGG | 59.2 | 245-227 | |
| 83 | Chemokine (C-C motif) receptor 6 - NM_004367 | CCR6 F | GAGAGGGCCACGTGTATATG | 60.0 | 93-113 | 92 |
| | | CCR6 R | CACAAACCAACAGCCACAGT | 59.2 | 184-165 | |
| 84 | Chemokine (C-C motif) receptor 4 | CCR4 F | AGAAGGCATCAAGGCATTTGG | 60.9 | 93-113 | 118 |
| | | CCR4 R | ACACATCAGTCATGGACCTGAG | 61.4 | 229-208 | |
| 85 | Chemokine (C-C motif) receptor 8 | CCR8 F | CTGTCTGACCTGCTTTTTGTCT | 60.4 | 235-256 | 90 |
| | | CCR8 R | CCACTTTGCACATTACAGTCCC | 61.4 | 325-304 | |
| 86 | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) | FASLG F | ATTTAACAGGCAAGTCCAACCTCA | 60.1 | 443-465 | 109 |

| | | | | | | |
|----|--|----------|--------------------------|------|-----------|-----|
| | | FASLG R | GGCCACCCTTCTTATACTTCACT | 61.4 | 541-519 | |
| 87 | C-reactive protein, pentraxin-related | CRP F | AACGAAGCCTCTCAAAGCCTT | 62.0 | 132-152 | 85 |
| | | CRP R | CTCTTGGTGGCATAACGAGAAAAT | 60.6 | 227-205 | |
| 88 | CD86 molecule - NM_006889 | CD86 F | TACGGGGAGCTCGCAAATAC | 59.9 | 70-89 | 80 |
| | | CD86 R | TAAGCACAGCAGCATTCCCA | 59.9 | 149-130 | |
| 89 | CD8a molecule - NM_001768 | CD8A F | CGCTGTCAGATCCCCTTTGT | 60.0 | 80-99 | 102 |
| | | CD8A R | GCCATTGCAACAGCCTTCAA | 59.9 | 181-162 | |
| 90 | Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1 | IFNAR1 F | ATTTACACCATTTTCGCAAAGCTC | 60.0 | 357-379 | 109 |
| | | IFNAR1 R | TCCAAAGCCCACATAACACTAT | 60.0 | 476-454 | |
| 91 | Mannose-binding lectin (protein C) 2 | MBL2 | CCCTGTTTCCATCACTCCCTC | 61.8 | 5-25 | 91 |
| | | MBL2 | GCAGGTCTTTTGGGCATCC | 61.1 | 96-78 | |
| 92 | Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor) - NM_003150 | STAT3 F | GACATTCCCAAGGAGGAGGC | 60.1 | 2244-2263 | 96 |
| | | STAT3 R | GGTCTTCAGGTATGGGGCAG | 59.8 | 2339-2320 | |
| 93 | Ribosomal protein, large, P0 - NM_001002 | RPLP F | CCTCGTGGAAGTGACATCGT | 59.7 | 119-138 | 76 |
| | | RPLP R | CTGTCTTCCCTGGGCATCAC | 60.3 | 194-175 | |
| 94 | Beta actin | ACTB F | CCTCGCCTTTGCCGATCC | 60.5 | 36-53 | 77 |
| | | ACTB R | CGCGGCGATATCATCATCCAT | 60.5 | 105-85 | |
| 95 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 - NM_001101 | HPRT1 F | CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT | 61.9 | 16-36 | 120 |
| | | HPRT1 R | AGACG TTCAGTCCTGTCCATAA | 60.5 | 146-125 | |
| 96 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - NM_002046 | GAPDH F | CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC | 59.8 | 116-135 | 75 |
| | | GAPDH R | ATGGTGTCTGAGCGATGTGG | 60.1 | 90-171 | |

Apêndice D – Relação dos resultados obtidos de carga parasitária e carga viral, descritos na seção de expressão gênica

| N | ID Amostra | Carga viral (N de cópias) | Carga parasitária (Eq. Parasito) | PCR convencional | Raspado (microscopia) |
|----|------------|---------------------------|----------------------------------|------------------|-----------------------|
| 1 | 388 | NEGATIVO | 37,3344 | Lb | POSITIVO |
| 2 | 389 | NEGATIVO | 27,6388 | Lb | NEGATIVO |
| 3 | 390 | 36,0805 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 4 | 391 | 17,2608 | 511509,0625 | Lg | POSITIVO |
| 5 | 393 | NEGATIVO | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 6 | 394 | NEGATIVO | 215044,6875 | Lg | POSITIVO |
| 7 | 395 | 36,0805 | 6353,0713 | Lssp | NEGATIVO |
| 8 | 396 | 2,3631 | 281399,4688 | Lb | POSITIVO |
| 9 | 397 | 1,0150 | 47,0513 | Lb | POSITIVO |
| 10 | 398 | 5,5621 | 6,5247 | Lb | NEGATIVO |
| 11 | 399 | 1171,8933 | 388780,5625 | Lb | POSITIVO |
| 12 | 400 | NEGATIVO | 64200,7031 | Lb | POSITIVO |
| 13 | 401 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 14 | 402 | NEGATIVO | 117,4712 | Lb | NEGATIVO |
| 15 | 403 | NEGATIVO | NEGATIVO | Lb | NEGATIVO |
| 16 | 404 | 1,1039 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 17 | 405 | 56,2710 | 2918,4919 | Lb | POSITIVO |
| 18 | 406 | NA | 175,3098 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 19 | 407 | 0,3558 | 199801,8281 | La | POSITIVO |
| 20 | 408 | 0,6179 | 3637,6494 | Lb | POSITIVO |
| 21 | 409 | NEGATIVO | 2,9495 | Lb | POSITIVO |
| 22 | 410 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | POSITIVO |
| 23 | 411 | 0,6217 | 8032,4980 | Lb | POSITIVO |
| 24 | 412 | 0,3188 | 209900,6406 | Lb | POSITIVO |
| 25 | 413 | 93453,5981 | 0,9893 | Lb | POSITIVO |
| 26 | 414 | 272,6005 | 233094,0313 | Lb | POSITIVO |
| 27 | 415 | 8,6843 | 16,6522 | Lb | POSITIVO |
| 28 | 417 | 0,3262 | 1664,4257 | Lb | POSITIVO |
| 29 | 418 | 0,4158 | 319,8503 | Lssp | POSITIVO |
| 30 | 419 | 0,4693 | 5745,6406 | Lb | POSITIVO |
| 31 | 420 | 0,7778 | 6,3356 | Lssp | NEGATIVO |
| 32 | 421 | NEGATIVO | 9,0560 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 33 | 422 | NEGATIVO | 8,4087 | Lssp | NEGATIVO |
| 34 | 423 | 0,2563 | 10117,2031 | Lb | POSITIVO |
| 35 | 424 | 2044,1772 | 6350526,0000 | Lg | POSITIVO |
| 36 | 425 | NEGATIVO | 42,5473 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 37 | 426 | NEGATIVO | 99,2858 | NEGATIVO | POSITIVO |
| 38 | 427 | 2,6355 | 3158,9585 | Lb | POSITIVO |
| 39 | 428 | 1,2173 | 11,2981 | Lssp | NEGATIVO |
| 40 | 429 | NEGATIVO | 19,8318 | Lssp | POSITIVO |
| 41 | 430 | NEGATIVO | 8,5198 | Lssp | NEGATIVO |
| 42 | 431 | 0,2649 | 4,6249 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 43 | 432 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 44 | 433 | NEGATIVO | 10,3763 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 45 | 434 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 46 | 435 | NEGATIVO | 10,7240 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 47 | 436 | 25,5887 | 33662,9375 | Lg | POSITIVO |
| 48 | 437 | NEGATIVO | 624,2771 | Lssp | NEGATIVO |

| | | | | | |
|-----|-----|------------|--------------|----------|----------|
| 49 | 438 | 2,9625 | 19,5020 | Lb | NEGATIVO |
| 50 | 439 | 5,6681 | 5066,2051 | Lb | NEGATIVO |
| 51 | 440 | NEGATIVO | 11,5250 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 52 | 441 | 48,3613 | 8480,3770 | Lg | POSITIVO |
| 53 | 442 | NEGATIVO | 3440,3867 | Lb | POSITIVO |
| 54 | 443 | 1,9919 | 1710,3865 | Lb | POSITIVO |
| 55 | 444 | NEGATIVO | 464857,7813 | Lb | POSITIVO |
| 56 | 445 | NEGATIVO | 18,1592 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 57 | 446 | 2015,2810 | 1867367,5000 | Lb | POSITIVO |
| 58 | 447 | 0,4563 | 17566,0801 | Lb | POSITIVO |
| 59 | 448 | 0,3729 | 2897,9658 | Lb | NEGATIVO |
| 60 | 449 | NEGATIVO | 4,0802 | Lssp | NEGATIVO |
| 61 | 450 | 0,3024 | 1784,2007 | Lb | POSITIVO |
| 62 | 451 | 0,1712 | 1744,8960 | Lssp | POSITIVO |
| 63 | 452 | 0,9038 | 10264,9004 | Lb | POSITIVO |
| 64 | 453 | 2,9789 | 22,7052 | Lb | POSITIVO |
| 65 | 454 | 0,5772 | 21140,3477 | Lg | POSITIVO |
| 66 | 455 | 0,2784 | 11,4507 | Lb | NEGATIVO |
| 67 | 456 | 0,5167 | 2,8414 | Lb | NEGATIVO |
| 68 | 457 | 3,4635 | 4390,6387 | Lb | NEGATIVO |
| 69 | 458 | 1,9099 | 127335,1406 | Ls | NEGATIVO |
| 70 | 459 | 532,4348 | 1039,3755 | Lb | POSITIVO |
| 71 | 460 | 0,2245 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 72 | 461 | 0,1145 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 73 | 462 | 0,2930 | 5216,8086 | Lb | POSITIVO |
| 74 | 463 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 75 | 464 | 62,4799 | 43,0665 | Lb | POSITIVO |
| 76 | 465 | NEGATIVO | 3,1104 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 77 | 466 | 0,1132 | 8916,2051 | Lb | POSITIVO |
| 78 | 467 | 0,6203 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 79 | 468 | NEGATIVO | 21780,6055 | Lb | POSITIVO |
| 80 | 469 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 81 | 470 | 0,3530 | 5,7007 | Lb | POSITIVO |
| 82 | 471 | 0,0992 | 22,6049 | Lssp | POSITIVO |
| 83 | 472 | 1293,8855 | 57,1097 | Lb | POSITIVO |
| 84 | 473 | 0,2981 | 19,2841 | Lssp | POSITIVO |
| 85 | 474 | NEGATIVO | 6,1091 | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 86 | 475 | 0,1222 | 8627,9277 | Lb | POSITIVO |
| 87 | 476 | NA | 17460,9531 | Lb | POSITIVO |
| 88 | 477 | 3773,9123 | 1142,1522 | Lb | POSITIVO |
| 89 | 478 | 0,1796 | 19,9272 | Lssp | POSITIVO |
| 90 | 479 | 0,1464 | NEGATIVO | Lb | POSITIVO |
| 91 | 480 | 17747,8912 | 35,6632 | Lb | POSITIVO |
| 92 | 481 | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| 93 | 482 | 0,0882 | 24917,3398 | Lb | POSITIVO |
| 94 | 484 | 0,0781 | 2328,1680 | Lb | POSITIVO |
| 95 | 485 | 0,1673 | 138,9277 | Lg | POSITIVO |
| 96 | 486 | 0,2318 | 12,8337 | Lg | POSITIVO |
| 97 | 487 | 0,3434 | 19,8847 | Lb | POSITIVO |
| 98 | 488 | NEGATIVO | 11821,7910 | Lb | POSITIVO |
| 99 | 489 | 24,0497 | 20186,4355 | Lb | NEGATIVO |
| 100 | 490 | NEGATIVO | 10,3013 | NEGATIVO | NEGATIVO |