

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO ACADÊMICO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS**

**Estudo molecular comparativo entre parasitos isolados de pacientes com
formas cutânea localizada e disseminada da leishmaniose tegumentar
americana, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em
Leishmanioses, 1989 a 2018**

Elizabeth Cristina Araújo Ferreira da Silva

Rio de Janeiro

2021

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PCDI-INI E.C.A.F.SILVA

ELIZABETH CRISTINA ARAUJO FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO MOLECULAR COMPARATIVO ENTRE PARASITOS ISOLADOS
DE PACIENTES COM FORMAS CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ATENDIDOS NO LABORATÓRIO
DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM LEISHMANIOSES, 1989 A 2018**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel e da Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva

Rio de Janeiro

2021

Ficha Catalográfica

Silva, Elizabeth Cristina Araujo Ferreira da.

ESTUDO MOLECULAR COMPARATIVO ENTRE PARASITOS ISOLADOS DE PACIENTES COM FORMAS CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ATENDIDOS NO LABORATÓRIO DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM LEISHMANIOSES, 1989 A 2018 / Elizabeth Cristina Araujo Ferreira da Silva. - Rio de Janeiro, 2021.

89 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2021.

Orientadora: Maria Inês Fernandes Pimentel.

Co-orientadora: Aline Fagundes da Silva.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. leishmaniose cutânea. 3. leishmaniose mucocutânea. 4. Leishmania (Viannia) braziliensis. 5. variação genética. I. Título.

ELIZABETH CRISTINA ARAUJO FERREIRA DA SILVA

**ESTUDO MOLECULAR COMPARATIVO ENTRE PARASITOS ISOLADOS DE
PACIENTES COM FORMAS CUTÂNEA LOCALIZADA E DISSEMINADA DA
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA, ATENDIDOS NO LABORATÓRIO
DE PESQUISA CLÍNICA E VIGILÂNCIA EM LEISHMANIOSES, 1989 A 2018**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel
Coorientadora: Profa. Dra. Aline Fagundes da Silva

Aprovado em: 23/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fátima Conceição Silva
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz
Presidente

Profa. Dra. Luciana de Freitas Campos Miranda
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz
Revisora

Profa. Dra. Cíntia Xavier de Mello
Instituto Oswaldo Cruz – IOC/Fiocruz
Membro

Profa. Dra. Fernanda Nunes Santos
Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – INI/Fiocruz
Suplente

Dedico esta dissertação à minha família, em memória de meu pai José Edson Ferreira da Silva e meus avós Milton Andrade de Araujo e Dalila dos Santos Araujo.

Dedico também aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À minha amada mãe Cátia Maria Araújo Ferreira da Silva e ao meu amado e saudoso pai José Edson Ferreira da Silva, que nos deixou cedo demais. Todo meu agradecimento a vocês, que sempre me incentivaram a ser uma boa pessoa e atingir meus objetivos. Eu não seria nada sem vocês.

Ao meu irmão Guilherme Luís Araújo Ferreira da Silva que sempre esteve ao meu lado e me apoiando a cada passo.

À minha orientadora Dra. Maria Inês Fernandes Pimentel por toda a paciência, suporte, dedicação e ensinamentos. Por ser sempre compreensiva a todo momento e ter a capacidade de me manter calma quando eu mais precisava.

À minha coorientadora Dra. Aline Fagundes da Silva pela paciência e pelos ensinamentos.

Aos amigos que fiz no mestrado, Alejandra Galeano, Karine Venegas, Karina Medeiros, Juliana Piedade e Rodrigo Pernas, pela amizade e apoio durante essa caminhada.

À minha querida amiga Inês Melo por todos os conselhos e por me passar a calma que eu precisava em todos os momentos.

Ao meu amigo Luã Cardoso que me acompanha desde a época da faculdade e sempre me ajudou e incentivou.

À minha equipe maravilhosa do LaPClinVigileish. A Yasmin Santos por toda a ajuda desde o começo. A Andréia Alves por todas as conversas e ensinamentos. A Andreza Pain, Luciana Freitas e Cíntia Mello por sempre estarem ao meu lado me apoiando e me ajudando. A Fernanda Santos pelo carinho e suporte. A Marcela Mello e Gisele Dias que sempre estavam presentes quando eu mais precisei.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante” - Augusto Branco.

Silva, E.C.A.F. **Estudo molecular comparativo entre parasitos isolados de pacientes com formas cutânea localizada e disseminada da leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2018.** Rio de Janeiro, 2021, 89f. **Dissertação** [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas – Fundação Oswaldo Cruz.

RESUMO

A leishmaniose disseminada (LDi) caracteriza-se por um número elevado (≥ 10) de lesões cutâneas polimórficas, provavelmente devido à disseminação hemática dos parasitos, atingindo partes distintas do tegumento, podendo ou não ser acompanhada de acometimento de mucosas. É causada por espécies distintas de *Leishmania* e é relativamente infrequente no contexto da leishmaniose tegumentar americana. Sua resposta ao tratamento específico é alvo de controvérsia: pode responder bem ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes, entretanto existem casos relatados de resistência medicamentosa. O objetivo deste estudo foi a comparação do perfil genético dos parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL), atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, entre 1989 e 2018. Foi realizado um estudo caso-controle genotípico dos isolados derivados de fragmentos de lesões cutâneas obtidos através de biópsia antes do tratamento. Isolados de pacientes com LDi e de pacientes com LCL foram caracterizados genotipicamente utilizando primers direcionados para o minicírculo de DNA do cinetoplasto (kDNA) e para os genes codificadores da proteína do choque térmico 70 (hsp70), com sequenciamento destas regiões e comparação posterior. Todos os isolados parasitários foram caracterizados como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Houve maior variabilidade genética nos isolados de pacientes com LDi, quando comparados aos isolados dos pacientes com LCL. A análise filogenética através dos alvos selecionados não demonstrou diferenças entre os isolados de pacientes com LDi e com LCL em relação aos parâmetros clínicos (tempo de evolução, presença de comorbidades), laboratoriais por ocasião do diagnóstico (presença de amastigotas no exame histopatológico e no exame direto – escarificação e/ou impressão em lâmina; reação em cadeia da polimerase; sorologia - reação de imunofluorescência indireta e/ou ensaio imunoenzimático; intradermorreação de Montenegro), e de desfecho após o primeiro tratamento (cura ou recidiva). Houve agrupamento genotípico em um cluster de isolados de pacientes com LDi e com LCL procedentes do município do Rio de Janeiro, mostrando similaridade entre eles. Não foi possível demonstrar agrupamento distinto (clusters) entre isolados de casos com LDi e de controles com LCL através dos alvos genéticos estudados em relação aos diferentes parâmetros clínicos, laboratoriais e de desfecho. Futuros estudos com alvos distintos poderão avaliar se existem diferenças genéticas adicionais entre os parasitos isolados de casos com LDi e com LCL que possam auxiliar a compreender estas diferentes expressões clínicas da doença.

PALAVRAS CHAVES: Leishmaniose tegumentar americana; leishmaniose cutânea; leishmaniose mucocutânea; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; variação genética.

Silva, E.C.A.F. **Comparative molecular study between parasites isolated from patients with localized and disseminated cutaneous forms of American tegumentary leishmaniasis, attended at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniasis, 1989 to 2018.** Rio de Janeiro, 2021, 89f. Dissertation [Master in Clinical Research in Infectious Diseases] - Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases - Oswaldo Cruz Foundation.

ABSTRACT

Disseminated cutaneous leishmaniasis (DCL) is characterized by a high number (≥ 10) of polymorphic skin lesions, probably caused by the hematic dissemination of the parasites, reaching different parts of the skin, and which may or may not be accompanied by mucosal involvement. It is caused by distinct species of *Leishmania* and it is relatively infrequent in the context of American Tegumentary Leishmaniasis. Its response to specific treatment is controversial: it may respond well to conventional treatment with pentavalent antimonials, however there are reported cases of drug resistance. The aim of this study was to compare the genetic profile of the parasites isolated from patients with DCL and from patients with localized cutaneous leishmaniasis (LCL), treated at the Laboratory of Clinical Research and Surveillance in Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectious Diseases, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, between 1989 and 2018. A genotypic case-control study of isolates derived from fragments of skin lesions obtained through biopsy before treatment was performed. Isolates from DCL patients and LCL patients were genotypically characterized using the kinetoplast DNA (kDNA) and the genes encoding the heat shock protein 70 (hsp70), with sequencing of these regions and subsequent comparison among them. All parasitic isolates were characterized as *Leishmania (Viannia) braziliensis*. There was greater genetic variability in isolates from DCL patients when compared to isolates from LCL patients. The phylogenetic analysis through the selected targets showed no differences between isolates from patients with DCL and LCL in relation to clinical parameters (time of evolution, presence of comorbidities), laboratory parameters at the time of diagnosis (presence of amastigotes in the histopathological examination and in the direct examination – skin smear and/or tissue printing; polymerase chain reaction; serology - indirect immunofluorescence reaction and/or immunoenzymatic assay; leishmanin skin reaction), and outcome after the first treatment (cure or relapse). There was a genotypic grouping in a cluster of isolates from patients with DCL and LCL from the city of Rio de Janeiro, showing similarity between them. It was not possible to demonstrate distinct grouping (clusters) between isolates from cases with DCL and controls with LCL using the studied genetic targets in relation to the different clinical, laboratory and outcome parameters. Future studies with different targets might be able to verify if there are additional genetic differences between the isolated parasites of cases with DCL and with LCL that may help to better understand these different clinical expressions of the disease.

KEY WORDS: American Tegumentary Leishmaniasis; cutaneous leishmaniasis; mucocutaneous leishmaniasis; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; genetic variation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Ciclo das Leishmanioses.Fonte:LaPClinVigiLeish,INI, Fiocruz.....	18
Figura 1.2: Status de endemidade da leishmaniose cutânea ao redor do mundo, 2020. Fonte: WHO,2021.....	19
Figura 1.3: Lesão de leishmaniose cutânea localizada em perna. Fonte: LaPClinVigiLeish,INI, Fiocruz.....	22
Figura 1.4: Paciente com leishmaniose cutânea disseminada com numerosas lesões nas mãos e na região abdominal. Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.....	24
Figura 1.5: Desenho esquemático do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de <i>Leishmania</i> spp., mostrando os blocos de sequências conservadas (CSB) e a região variável. Fonte: AKHOUND et al., 2017.....	31
Figura 1.6: Posição dos primers de PCR e produtos utilizados para sequenciamento na região de codificação de Hsp70. Neste estudo amplificamos o fragmento PCR-N com 593 bp utilizando os primers Hsp70 F-25 e Hsp70 R-617. Fonte: AUWERA et al., 2013.....	32
Figura 1.7: Modelo esquemático dos procedimentos necessários para realização de sequenciamento. Fonte: AZAMBUJA et al., 2014.....	34
Figura 5.1: Desenho esquemático com o total de pacientes e respectivas amostras selecionadas para o estudo.....	43
Figura 5.2: Cromatograma adequado para a análise do sequenciamento.....	49
Figura 5.3: Cromatograma inadequado para a análise do sequenciamento....	49
Figura 5.4: Árvore obtida através do programa MEGA 6 da região variável do minicírculo de kDNA, comparando as amostras dos pacientes do grupo dos casos com o grupo dos controles.....	54
Figura 5.5: Árvore obtida através do programa MEGA 6 do gene hsp70, comparando as amostras dos pacientes do grupo dos casos com o grupo dos controles.....	55
Figura 5.6: Árvore filogenética do alvo minicírculo de kDNA demonstrando a procedência de cada um dos casos e controles.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1: Características clínicas e demográficas dos pacientes com leishmaniose disseminada cujos isolados parasitários estavam disponíveis (casos) ou com leishmaniose cutânea localizada que foram selecionados (controles) para estudo genotípico. LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz, 2000 a 2018.....	44
Tabela 5.2: Características clínicas, laboratoriais e desfecho após tratamento inicial com antimoniato de meglumina em pacientes com leishmaniose disseminada (casos) e leishmaniose cutânea localizada (controles), pareados segundo idade e sexo. INI/Fiocruz, 1989 a 2018.....	47
Tabela 5.3: Sequências do alvo de minicírculo de kDNA dos casos pareados com seus respectivos controles.....	50
Tabela 5.4: Sequências do alvo hsp70 dos casos pareadas com seus respectivos controles.....	51
Tabela 5.5: Estimativas de variabilidade genética sobre pares de sequência entre grupos.....	52
Tabela 5.6: Estimativas de variabilidade genética média sobre pares de sequência dentro de grupos.....	52

LISTA DE QUADRO

Quadro 4.1: Sequência dos primers utilizados no estudo.....	40
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

bp	Pares de base
DAT	Teste de aglutinação direta
ddNTPs	Didesoxiribonucleotídeos
dNTP	Desoxiribonucleotídeo
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HSP	Proteína de choque térmico
hsp70	Gene da proteína do choque térmico 70
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
kDNA	DNA do cinetoplasto
LaPClinVigiLeish	Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LDi	Leishmaniose disseminada
LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NaCl-EDTA	Cloreto de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético
N ₂ L	Nitrogênio Líquido
NNN	McNeal, Novy e Nicolle
OH	Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da polimerase em cadeia
PCR-RFLP	Reação da polimerase em cadeia com polimorfismo de

	comprimento de fragmento de restrição
PKDL	Leishmaniose dérmica pós calazar
RJ	Estado do Rio de Janeiro
Sb ⁺⁵	Íon antimônio
SFB	Soro fetal bovino
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Leishmanioses	17
1.2 Ciclo das Leishmanioses	17
1.3 Taxonomia	18
1.4 Formas da LTA.....	18
1.5 Epidemiologia	19
1.6 Tratamento.....	20
1.7 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil	20
1.8 Classificação clínica da LTA	21
1.9 Leishmaniose cutânea disseminada.....	23
1.10 Diagnóstico da LTA	26
1.11 Análise genética dos parasitos na LTA.....	28
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo geral	37
3.2 Objetivos específicos	37
4. METODOLOGIA	38
4.1 Casuística	38
4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão	38
4.1.1.1. Critérios de inclusão	38
4.1.1.2. Critérios de exclusão	38
4.1.1.3. Cálculo amostral	38
4.2. Análises laboratoriais	39
4.2.1. Seleção dos isolados parasitários.	39
4.2.2. Recuperação das amostras do nitrogênio líquido e preparo das massas parasitárias.....	39
4.2.3. Extração de DNA.....	39
4.2.4 Análise da variabilidade genética	40
4.2.4.1 Técnicas de PCR	40
4.2.4.2 Sequenciamento	41
4.3 Aspectos éticos	42

5. RESULTADOS	43
6. DISCUSSÃO	57
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
ANEXO I: TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE.....	79
ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/INI.....	80
ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

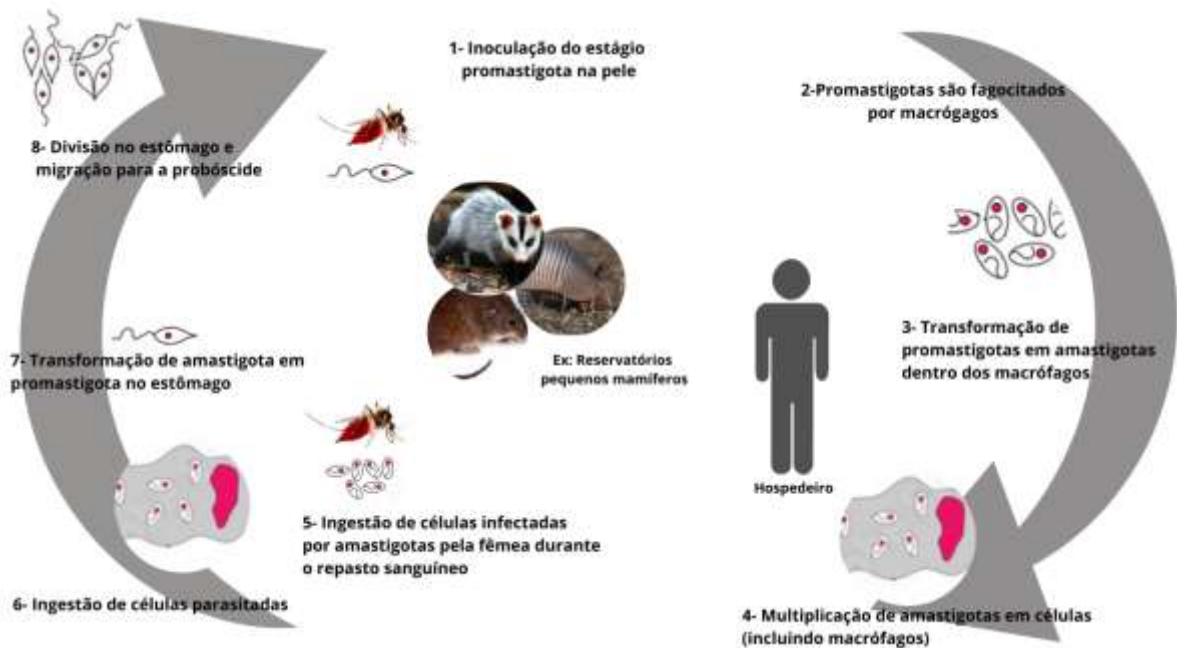
As leishmanioses são doenças infecciosas parasitárias causadas por protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram mais de um milhão de casos novos ao ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2021).

São doenças transmitidas pelas fêmeas de insetos de aproximadamente 2-3 milímetros de comprimento dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomia* (BRASIL, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Os insetos do gênero *Phlebotomus* spp. são comumente encontrados na Europa, norte da África, Oriente Médio e Ásia. Já os do gênero *Lutzomia* spp. são encontrados nas Américas, do sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (CATAÑO; PINZÓN, 2019; REITHINGER et al., 2007). Há cerca de 500 flebotomíneos conhecidos, mas apenas 30 destes são incriminados na transmissão da doença (BATES, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016).

1.2 Ciclo das Leishmanioses

A fêmea do inseto precisa de um repasto sanguíneo para a ovulação e desenvolvimento do ovo. Ao realizar o seu repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, o flebotomíneo adquire *Leishmania* spp. na forma amastigota. Ao longo de um período de 4 a 25 dias os parasitos se diferenciam na forma promastigota e se multiplicam no intestino do vetor. Ao realizar um novo repasto sanguíneo, as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas no novo hospedeiro (BATES, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016) onde penetram nas células do sistema fagocítico mononuclear, assumem a forma amastigota e se multiplicam por divisão binária (READY, 2013), e assim é concluído o ciclo de transmissão (Figura 1.1) (BATES, 2007; SRIVASTAVA et al., 2016).

Figura 1.1: Ciclo das Leishmanioses.



Fonte: Elaboração própria, LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

1.3 Taxonomia

A taxonomia é complexa, abrangendo mais de 20 espécies agrupadas em dois subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*). (BAÑULS, 2002; FRAGA et al., 2010; LAINSON; SHAW, 1987; ODIWUOR et al., 2011). Estas espécies estão envolvidas em doenças negligenciadas que causam importante morbidade em áreas endêmicas, principalmente nas áreas tropicais e subtropicais (CANTACESSI et al., 2015; SALES et al., 2019), afetando predominantemente populações pobres (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

1.4 Formas da LTA

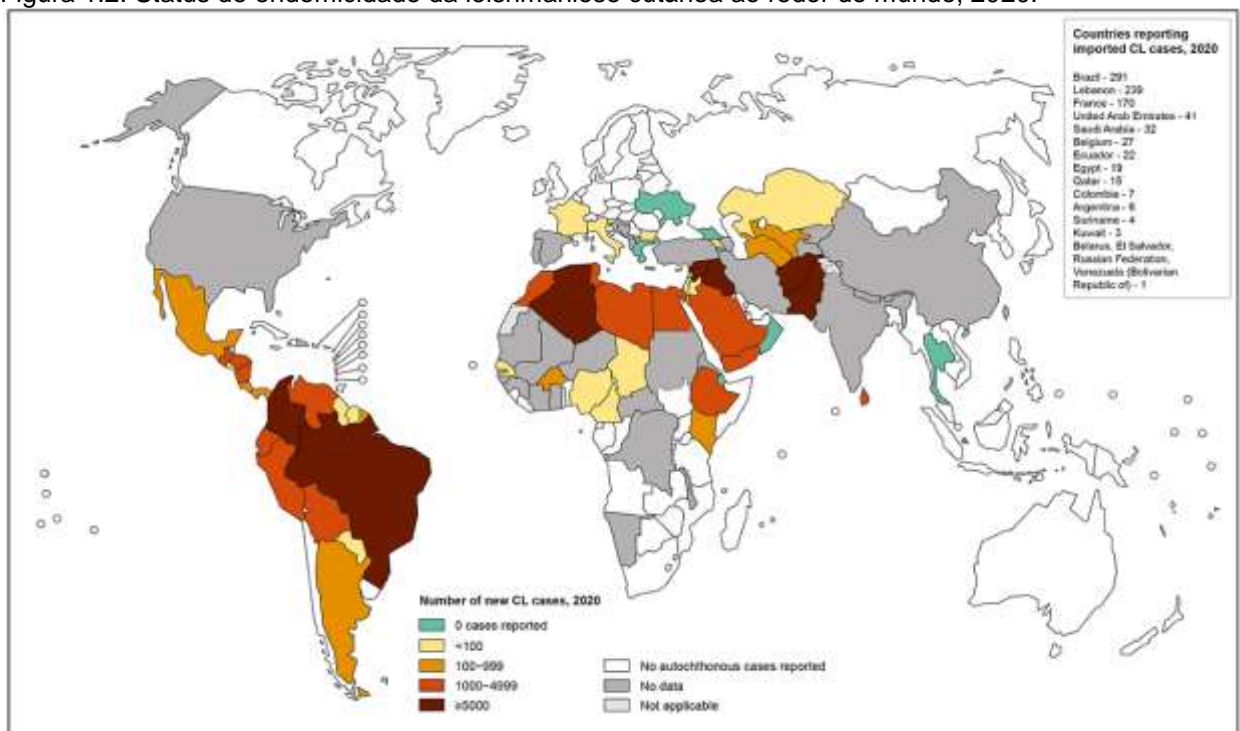
As manifestações clínicas da doença em seres humanos dependem de interações complexas entre as características da *Leishmania* spp. e as respostas imunológicas do hospedeiro. As leishmanioses podem se manifestar de diversas formas, desde lesões cutâneas até quadros com envolvimento do fígado e de outras vísceras (leishmaniose visceral ou calazar). As formas que afetam o tegumento são divididas em leishmaniose cutânea (LC), e leishmaniose mucosa (LM) ou mucocutânea. Existem também outras formas que derivam das principais, como a

leishmaniose difusa (LCD, que se caracteriza por anergia específica ao parasito), leishmaniose disseminada (LDi), caracterizada por 10 lesões ou mais em áreas não contíguas do tegumento, leishmaniose *recidiva cutis* e a leishmaniose dérmica pós calazar (PKDL) (SINGH; DEY; SIVAKUMAR, 2005; SRIVASTAVA et al., 2016).

1.5 Epidemiologia

A leishmaniose tegumentar representa um problema de saúde pública em dezenas de países localizados em quatro continentes, sendo eles África, Ásia, Américas e Europa (WHO, 2010; WHO, 2021). Aproximadamente 95% dos casos da doença ocorrem nas Américas, bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Oitenta e cinco por cento dos novos casos são registrados em 10 países, sendo eles Afeganistão, Argélia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Paquistão, República Árabe da Síria e Tunísia (Figura 1.2).

Figura 1.2: Status de endemicidade da leishmaniose cutânea ao redor do mundo, 2020.



Fonte: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) (2021).

A LC e a LM do Novo Mundo são conhecidas como leishmaniose tegumentar americana (LTA) (BRASIL, 2017).

1.6 Tratamento

Nas últimas décadas, o arsenal terapêutico da LTA se caracterizou por poucos medicamentos disponíveis. O tratamento da leishmaniose cutânea ou mucocutânea é realizado com diversos medicamentos, como antimoniais pentavalentes, pentamidina, miltefosina, anfotericina B e paromomicina (WHO, 2010). Porém, esses medicamentos apresentam problemas como custo elevado, toxicidade para alguns sistemas e órgãos, duração do tratamento, via de administração e o desenvolvimento de parasitos resistentes aos fármacos, o que pode levar a dificuldades no tratamento, inclusive o abandono (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010; SRIVASTAVA et al., 2016). O acesso a medicamentos para o tratamento das leishmanioses é desafiador nos países pobres que apresentam maior número de casos. Alguns fatores contribuem para tal dificuldade, como o fato de serem dispendiosos, de alguns protocolos de tratamento incluírem poucos ou nenhum dos tratamentos contra leishmaniose na lista de medicamentos essenciais, do fornecimento destes não ser contínuo, entre outros problemas (WHO, 2021). No Brasil, os medicamentos para LTA são disponibilizados pelo Ministério da Saúde sem repasse do custo de aquisição aos pacientes (BRASIL, 2017), entretanto ocasionalmente ocorrem problemas na disponibilização de algum dos medicamentos recomendados. O tratamento da LTA deve ser feito segundo a forma clínica e os exames laboratoriais, obedecendo aos critérios para cada situação, após avaliação de possíveis contraindicações, e com monitorização dos eventos adversos. Deve levar em consideração a espécie infectante, ou pelo menos as informações relacionadas às espécies em circulação no local, em consonância com os dados clínicos. O Ministério da Saúde estabelece diretrizes gerais adaptáveis pelos centros de referência para sua realidade local, segundo avaliação do risco-benefício para cada paciente (BRASIL, 2017).

1.7 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no Brasil

Entre 2010 e 2019, o número médio de casos anuais de LTA no Brasil foi de 18.697, com um coeficiente de detecção médio de 9,32 casos/100.000 habitantes (BRASIL, 2020a; BRASIL, 2020b).

Apesar da LTA ser causada por diversas espécies de *Leishmania*, no Brasil *L. (V.) braziliensis* é a principal responsável pela doença (MACHADO, PRATES, MACHADO, 2019; MEMBRIVE, et al, 2017; TURETZ, MACHADO, KO AL, et al, 2002; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010).

No Brasil a LTA possui ampla distribuição, com registro de casos em todas as unidades da federação (BRASIL, 2017). A região Norte apresenta o maior coeficiente de casos, seguida pelas regiões Nordeste e Centro-Oeste (BRASIL, 2020a). Afeta principalmente as áreas rurais ou próximas a regiões de mata, onde há abundância de animais silvestres, como preguiças, roedores silvestres e tamanduá; e insetos flebotomíneos (SALES et al., 2019). Maior número de casos é notificado durante a estação chuvosa (GUERRA et al., 2015). Houve uma diminuição no número de casos no Brasil no período de 1990 a 2016 (BEZERRA et al., 2018). No estado do Rio de Janeiro (RJ) também houve uma diminuição no coeficiente de incidência entre 2004 e 2016 (VITA et al., 2016). No RJ, a LTA é causada quase exclusivamente pela *Leishmania (V.) braziliensis*, cuja transmissão depende da adaptação do vetor *Lutzomyia intermedia* ao domicílio e peridomicílio (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

1.8 Classificação clínica da LTA

Aspectos relacionados a *Leishmania* e à resposta imunológica do hospedeiro determinam a forma clínica da LTA e influenciam o resultado terapêutico (BRASIL, 2017).

As características típicas da leishmaniose cutânea localizada (LCL) são uma ou poucas lesões ulceradas, com fundo granulomatoso e bordas infiltradas, localizadas geralmente em áreas expostas do corpo (BRASIL, 2017) (Figura 1.3).

Figura 1.3: Lesão de leishmaniose cutânea localizada em perna.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

Leishmaniose *recidiva cutis* é caracterizada por reativação da lesão em cicatriz de lesão anterior (OLIVEIRA-NETO et al., 1998).

A LCD é uma forma rara de LTA causada por *Leishmania mexicana* ou *Leishmania amazonensis*, encontrada ocasionalmente no México e norte do Brasil, caracterizada por anergia específica e áreas infiltradas com abundância parasitária (MARIZ et al. 2019). Já foi descrito um caso no estado do Rio de Janeiro causado por *L. (L.) amazonensis* (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007).

A LDi caracteriza-se por um número elevado de lesões cutâneas (≥ 10), polimórficas (ulceradas, papulosas, pustulosas), acometendo mais de um segmento corporal, com ou sem acometimento de mucosas, e há relatos de aumento recente da sua ocorrência (ROSA; MACHADO, 2011; MACHADO et al., 2019).

A leishmaniose mucosa (LM) manifesta-se com lesões destrutivas, crônicas, nas mucosas do nariz, boca, faringe, laringe, ou na genitália (BRASIL, 2017); que parecem ser consequentes à disseminação hemática (LLANOS-CUENTAS et al, 1985). As apresentações clínicas da LM são: forma mucosa tardia, forma mucosa concomitante, forma mucosa contígua, forma mucosa primária ou forma mucosa de origem indeterminada (BRASIL, 2017; MARZOCHI; MARZOCHI, 1994).

1.9 Leishmaniose cutânea disseminada

Nas semanas subsequentes à picada do inseto vetor infectante e à formação da ulceração inicial, na LDi numerosas lesões polimórficas (úlceras, pápulas, pústulas, placas infiltradas) surgem na mesma ou em outras partes do tegumento (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019). A disseminação hemática dos parasitos parece ser responsável pelas numerosas lesões cutâneas e pelas lesões mucosas na LDi, porém o mecanismo de disseminação não é conhecido; pode ser causada por espécies distintas de *Leishmania* (CARVALHO et al., 1994; CATAÑO; PINZÓN, 2019). Vários pacientes relatam sintomas sistêmicos durante este período. Os mais comuns são febre, astenia, calafrios, mal-estar e náusea, o que reforça a percepção geral de que o processo de disseminação seja por via hemática (CARVALHO et al., 1994; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; TURETZ et al., 2002).

O quadro clínico característico consiste na coexistência de vários tipos de lesões cutâneas, como lesões pustulosas que lembram acne, pápulas inflamatórias (que podem ser exulceradas e com crostas), nódulos, úlceras e raramente lesões verrucosas ou vegetantes em segmentos corporais não contíguos. Alguns pacientes podem ter centenas ou até milhares de lesões (COUPPIÉ et al., 2004) sem poupar nenhum segmento corporal (CARVALHO et al., 1994; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; TURETZ et al., 2002).

Pode haver diversas lesões na face, mas também afeta intensamente o tronco e os membros (Figura 1.4). Lesões ulceradas com bordas infiltradas no tronco, membros inferiores e superiores são comuns, ocorrendo em dias ou semanas após a picada do inseto vetor. O envolvimento de membranas mucosas é frequente, com predileção pela mucosa nasal, e frequentemente caracterizada pela presença de infiltração com ou sem ulceração (MACHADO et al., 2015; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019). Em alguns pacientes a presença de linfadenopatia em várias regiões do corpo pode ocorrer durante a fase de disseminação (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019). Lesões genitais são também comuns nestes pacientes (LYRA et al, 2020).

Figura 1.4: Paciente com leishmaniose cutânea disseminada com numerosas lesões nas mãos e na região abdominal.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

No Brasil, LDi tem sido descrita predominantemente em estados da Região Nordeste (GALVÃO et al., 1993; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019), mas recentemente também há relatos de séries de casos na região Sudeste (VERNAL et al., 2016; VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008). Na Bahia, LDi parece estar aumentando em número de casos ao longo dos anos (JIRMANUS et al., 2012).

A LDi acomete pacientes imunocompetentes, mas também indivíduos imunossuprimidos, como os HIV positivos (GUERRA et al., 2011; LINDOSO et al., 2009; MACHADO et al., 1992). A LDi pode estar associada à ingestão de bebidas alcoólicas; o álcool causa desregulação das respostas imunes inatas e adaptativas possivelmente levando ao aumento da carga parasitária nestes pacientes. As deficiências de vitaminas e micronutrientes também são comuns em pessoas que fazem mau uso do álcool e também podem contribuir para o risco de LDi (SOUSA et al., 2021). Pode responder bem ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes (CARVALHO et al., 1994), porém há relatos de falha terapêutica afetando até 75% dos pacientes com este tratamento (MACHADO et al., 2019), especialmente quando associada ao HIV (LINDOSO et al., 2009). Má resposta terapêutica pode variar conforme a espécie parasitária; em um estudo, foi observada em pacientes com *L. amazonensis*, mas não com *L. (V.) braziliensis* (CARVALHO et al., 1994).

A característica mais marcante que diferencia LCL, LM e LDi é o grau de metástase da lesão de inoculação original. As lesões de LCL são geralmente restritas à porta de entrada do parasito. LM é definida pelo acometimento de mucosas. Já LDi é caracterizada por uma ampla disseminação para locais cutâneos ou mucosas, distantes do local de inoculação (QUEIROZ et al., 2012).

A ocorrência de lesão cutânea ulcerada é influenciada pela intensidade de reação inflamatória (DANTAS et al., 2014; GOLLOB; ANTONELLI; DUTRA, 2005; MORGADO et al., 2018). Quando comparadas as respostas imunes envolvidas na LCL e na LDi, a imunidade do hospedeiro na LCL parece ser mais eficiente, com maior produção de interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (DANTAS et al., 2014; GUIMARÃES et al. 2005; TURETZ et al. 2002). Demonstraram-se semelhanças nas concentrações de células CD8+, Ki67+, NK, macrófagos, neutrófilos, e expressão de óxido nítrico sintase-2 (NOS2) em pacientes com LCL e LDi, mas pacientes com LCL apresentaram maior concentração de células CD4+ e mastócitos, enquanto pacientes com LDi apresentaram maior número de células CD25+; as diferenças não foram suficientes, isoladamente, para distinguir os dois grupos (PEREIRA, 2017). Outro estudo *in situ* mostrou também semelhanças entre as concentrações de células entre os grupos LCL e LDi, sugerindo que poucas diferenças entre as lesões de ambas as formas clínicas podem ser demonstradas observando-se apenas os tecidos (DANTAS et al, 2014).

Os principais diagnósticos diferenciais da LDi são outras formas de LTA, como a LCD e LCL. No caso de LCD, o quadro clínico se assemelha a algumas manifestações da hanseníase virchowiana, com placas e nódulos infiltrados. LDi por sua vez, exibe lesões papulosas e inflamatórias superficiais, além de ulcerações (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

O tratamento de primeira escolha da LDi recomendado pelo Ministério da Saúde é com antimoniato de meglumina na dose de 20 mg do íon antimônio (Sb^{+5}) por quilograma de peso por dia por 30 dias. A anfotericina B lipossomal é indicada como primeira escolha para os pacientes com idade acima de 50 anos, insuficiência renal, cardíaca e hepática, transplantados renais, gestantes e nos casos graves ou com grande número de lesões (acima de 20 lesões). Como segunda escolha, recomenda-se a anfotericina B desoxicolato (BRASIL, 2017).

1.10 Diagnóstico da LTA

O diagnóstico de LTA geralmente é realizado com base em características clínicas e confirmado por uma variedade de exames, como intradermoreação de Montenegro (IDRM), histopatologia, cultura, exame direto, métodos moleculares e sorologia. Um grande problema dos métodos de diagnóstico é que a maioria depende da presença do parasito, necessitando de quantidade suficiente deles nas lesões (CHIARAMONTE et al., PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016; 1999; SOUZA et al., 2013). Ferramentas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitam uma detecção mais rápida e sensível dos parasitos (GUERBOUJ et al., 2014).

O diagnóstico diferencial clínico e laboratorial para doenças como esporotricose, tuberculose, paracoccidioidomicose entre outras, deve ser considerado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

O exame direto, através da escarificação da lesão que consiste na disposição do material coletado em lâmina, coloração, e visualização em microscópio óptico, representa um método simples e acessível mesmo em condições de escassez de recursos laboratoriais em áreas endêmicas (MELLO; MADEIRA, 2015). A impressão em lâmina de um fragmento de lesão cutânea coletado através de procedimento de biópsia também constitui método simples com sensibilidade superior à do exame histopatológico (SOUSA et al., 2014).

O exame histopatológico pode demonstrar os parasitos nos tecidos em 44% a 53% dos casos (QUINTELLA et al., 2009; SOUSA et al., 2014), sendo fundamental para o diagnóstico diferencial com outras enfermidades. A imunohistoquímica é mais sensível que a histopatologia convencional na visualização dos parasitos (QUINTELLA et al., 2009).

A cultura é um método de referência diagnóstica pois em casos positivos permite a visualização das formas promastigotas através do microscópio óptico. O fragmento de tecido é inoculado em meio de cultura bifásico NNN (McNeal, Novy e Nicolle), acrescido de meio líquido Schneider® e incubado entre 26°C e 28°C, temperatura ideal para o crescimento do parasito. A partir do quinto dia podem ser observadas as formas promastigotas. São realizadas observações semanais por até um mês para avaliação do crescimento parasitário e liberação do laudo (BRASIL, 2017). Apesar de ser um método com excelente especificidade, pode apresentar sensibilidade em torno de 70% dos casos (LUZ et al, 2009, RASTI et al., 2016),

havendo possibilidade de contaminação por fungos e bactérias que causam dificuldades do crescimento do parasito (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012; REITHINGER et al., 2007; SARKARI et al., 2014).

Os métodos sorológicos são pouco utilizados para o diagnóstico da LTA devido à limitada manifestação sistêmica e conseqüentemente uma menor produção de anticorpos quando comparada a produção por LV (ROCHA et al., 2006; SARKARI et al., 2014). A especificidade é variável principalmente em áreas onde pode haver reação cruzada com outros parasitos como *Trypanosoma cruzi* (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). Entretanto, a sorologia é muito útil para casos em que a manifestação clínica é compatível com LTA e outros testes foram negativos. Dentre os métodos sorológicos estão a reação de imunofluorescência indireta (IFI) e o ensaio imunoenzimático (enzime linked immunosorbent assay, ELISA), úteis também para o acompanhamento dos casos, além do teste de aglutinação direta (DAT) (CATALDO et al., 2010; FURTADO, 1980; PORFIRIO-PASSOS et al., 2012; SZARGIKI et al., 2009; SARKARI et al., 2014).

A IDRM é baseada na reação de hipersensibilidade tardia (BRAZ, 2019; GUEDES et al., 2017). A resposta imune celular se manifesta por um endurecimento cutâneo resultante da aplicação intradérmica do antígeno de *Leishmania*, que pode ser medido em milímetros (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; GUEDES et al., 2017). É utilizado como método complementar ao diagnóstico por apresentar alta sensibilidade e especificidade, e além disso é de fácil execução e de baixo custo, pelo fato de não requerer equipamentos sofisticados (ANTONIO et al., 2014; GUEDES et al., 2017). As desvantagens é que o teste não distingue entre infecções passadas ou atuais (REITHINGER; DUJARDIN, 2007) e o antígeno para realização da IDRM não está disponível no Brasil há alguns anos, sem previsão de fornecimento pelo Ministério da Saúde.

Diferentes métodos moleculares foram avaliados para o diagnóstico de leishmaniose, como eletroforese em gel de campo pulsado e eletroforese de enzima multilocus, porém ensaios baseados em PCR constituem o principal método de diagnóstico (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). São muito úteis para a confirmação de suspeita clínica, especialmente em condições em que não se é possível a detecção de parasitos por outros métodos (FAGUNDES et al., 2010; OLIVEIRA-RIBEIRO et al., 2017). Possuem uma alta sensibilidade e especificidade em relação às técnicas de

impressão em lâmina, histopatologia e cultura (FAGUNDES et al., 2010). Para sua realização são necessários equipamentos como termociclador, cuba de eletroforese, transiluminador UV e câmera. São técnicas que requerem tempo, e esses fatores fazem com que se tornem técnicas custosas (REITHINGER; DUJARDIN, 2007). São úteis para o diagnóstico pelo fato de não requererem uma grande quantidade de amostra, pois o DNA de *Leishmania* está presente mesmo que em quantidades mínimas em amostras biológicas (FRAGA et al., 2010; PANDEY et al., 2009). Diversos tipos de amostras podem ser utilizados na reação, incluindo medula óssea (CORTES et al., 2004; FRAGA et al., 2010), biópsias de pele (FRAGA et al., 2010; STARK et al., 2006), nódulos linfáticos ou camada leucocitária e sangue periférico (FRAGA et al., 2010; LACHAUD et al. 2001).

1.11 Análise genética dos parasitos na LTA

Espécies de *Leishmania* circulam naturalmente como um grupo de subpopulações heterogêneas, e a demonstração da policlonalidade do inóculo inicial de múltiplas cepas foi previamente relatado em outros estudos (OLIVEIRA et al, 2013). Diferentes padrões epidemiológicos podem influenciar os níveis de variabilidade genética e influenciar a diversidade da população de parasitos na evolução e distribuição das características relacionadas à virulência, resistência aos medicamentos e infectividade (GAGINI et al., 2017).

Leishmania (V.) braziliensis mostrou existência de vários polimorfismos genéticos intraespecíficos e variabilidade de manifestações clínicas observadas (OLIVEIRA et al, 2013). Polimorfismos em minicírculos do DNA de cinetoplastos (kDNA) podem surgir durante a infecção com um único clone do parasito, mas podem ser revertidos ao padrão original. Essa plasticidade do minicírculo pode ser entendida como uma desvantagem, potencialmente limitando, em alguns casos, a interpretação dos resultados (GAGINI et al., 2017).

L. (V.) braziliensis mostrou polimorfismos genéticos em diferentes regiões brasileiras onde esta espécie é endêmica, com alta diversidade molecular na bacia amazônica, enquanto isolados do Rio de Janeiro eram mais homogêneos (CUPOLILLO et al., 2003).

A diversidade clínica e epidemiológica da leishmaniose se soma à complexidade da taxonomia (FRAGA et al., 2010, ODIWUOR et al., 2011;

ROUGERON et al., 2009; TIBAYRENC et al., 1993). *Leishmanias* têm um ciclo de vida dimórfico, onde existem formas promastigotas extracelulares, que se multiplicam no trato alimentar do vetor, e formas amastigotas intracelulares que se multiplicam nas células mononucleares do hospedeiro. O acúmulo gradual de mutações por divisão celular mitótica e/ou por recombinação sexual produzem misturas de genomas (INBAR et al., 2019; ROUGERON; DE MEEUS; BANULS, 2015). A ampla diversidade genética dos parasitos do gênero *Leishmania*, sobretudo *L. (V.) braziliensis*, espécie de maior prevalência no Brasil, é conhecida (CUPOLILLO et al., 2003; ISHIKAWA et al., 2002; PACHECO et al., 1990). Esses organismos mostram plasticidade inter e intraespécies quanto ao número e tamanho dos cromossomos (cariótipo molecular), e também no genoma mitocondrial, variando, principalmente, no tamanho e organização dos maxicírculos. Diferentes padrões epidemiológicos poderiam influenciar os níveis de variabilidade: a elevada heterogeneidade genética de *L. (V.) braziliensis* na Amazônia foi relacionada ao grande número de vetores que atuam nos ciclos de transmissão ali, ao contrário da costa atlântica do Brasil, onde as amostras indicaram baixo nível de heterogeneidade, provavelmente refletindo a adaptação de clones parasitários a diferentes vetores (CUPOLILLO et al., 2003).

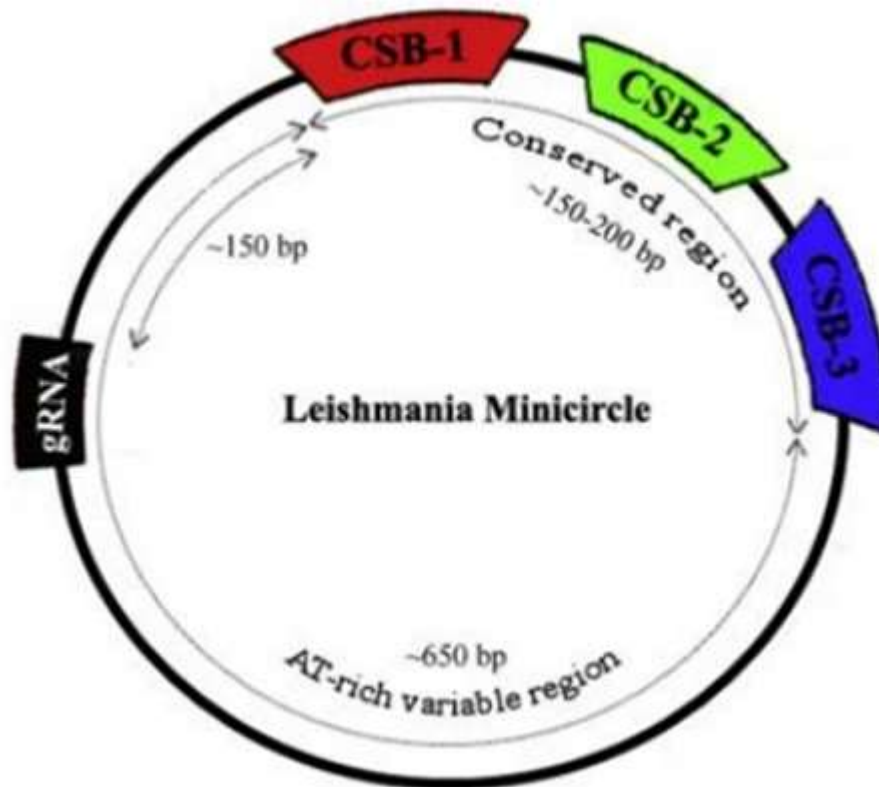
O kDNA é uma região diferenciada da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida. É uma rede concatenada de moléculas circulares, os maxicírculos e os minicírculos (Figura 1.5). (OLIVEIRA, 2013; RODGERS et al. 1990; SIMPSON, 1987). O tamanho dos maxicírculos varia de 20 a 40 kb. Possuem genes que codificam as proteínas mitocondriais, tais como genes rRNAs e de proteínas do complexo respiratório (ARAÚJO, 2008; KLINGBEIL; ENGLUND, 2004). São formados por sequências homogêneas e estão presentes com cerca de 50 cópias por rede (OLIVEIRA, 2013; SIMPSON, 1987; RODGERS et al. 1990). Os minicírculos possuem 1.4 kb e estão presentes em milhares de cópias (cerca de 10.000 a 20.000 cópias por rede). O tamanho varia de 700 a 900 pares de base (bp) entre as diferentes espécies de *Leishmania*. São responsáveis pela estrutura da rede. Sua função genética principal é a de codificar os pequenos RNAs guias que comandam a especificidade da edição de RNA (OLIVEIRA, 2013; RODGERS et al. 1990; SIMPSON, 1987).

Os minicírculos possuem duas regiões diferentes: região conservada e região variável. A região conservada possui uma sequência de nucleotídeos de 120 a 200 bp (OLIVEIRA, 2013; SIMPSON, 1987). Nesta região se encontram pequenos blocos

conservados de sequências que são semelhantes entre os tripanosomatídeos. A região variável é a região heterogênica das sequências e é diferente entre as classes de minicírculos da mesma rede. A rápida taxa evolutiva da região variável poderia explicar a diversidade dos minicírculos. Estas regiões podem ser evidenciadas em toda a molécula e ocorre um grande número de cópias na rede de kDNA do parasito, fazendo com que o kDNA seja um excelente alvo para estudos de evolução da espécie e para o diagnóstico molecular (DEGRAVE et al. 1994; OLIVEIRA et al., 2013).

Os minicírculos do kDNA foram os primeiros alvos moleculares a serem estudados em parasitos do gênero *Leishmania* pela técnica de PCR (PACHECO et al., 1990). Pela análise das regiões variáveis dessas moléculas, foram desenvolvidos iniciadores, utilizados na PCR, que identificam as espécies responsáveis pela LTA, em nível de subgêneros ou complexos (BAPTISTA et al., 2012; FERREIRA; GOMES; PEREIRA-CHIOCCOLA, 2015; GAGINI et al., 2017; MARCUSSI et al., 2008). É possível amplificar todo o minicírculo de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, gerando um fragmento de 750 bp (VERGEL, 2005). O material amplificado pode ser sequenciado e analisado utilizando programas Bioedit Sequence Alignment Editor, Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis e Basic Alignment Search Tool (BLAST)).

Figura 1.5: Desenho esquemático do minicírculo do DNA do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania* spp., mostrando os blocos de seqüências conservadas (CSB) e a região variável.



Fonte: AKHOUND et al (2017).

As células eucariontes e procariontes possuem genes que codificam proteínas com função de proteção celular e acompanham ou auxiliam no transporte, síntese, degradação e desdobraimento por interagirem de forma reversível com outros genes, as quais são chamadas Proteínas de Choque Térmico (Heat Shock Protein - Hsp) (KREGEL, 2002; MAYER & BUKAU, 2005). São bastante conservadas evolutivamente, o que demonstra importância para os seres vivos (CAMPOS, 2007; CLAYTON et al., 1995; ZÜGEL; KAUFMANN, 1999).

A nomenclatura se dá a partir de seus pesos moleculares, por exemplo HSP-72, que possui 72 kDa, e assim respectivamente. A partir disso foram agrupadas por tamanhos próximos, sendo divididas em famílias. As principais são as pequenas hsps, hsp40, hsp60, hsp70, hsp90 e hsp100 (CAMPOS, 2007; KIANG; TSOKOS, 1998; ROBERT, 2003).

Dentre as hsps, a hsp70 é a mais conservada e a primeira a ser induzida em resposta a diversos fatores estressantes (CASTRO et al., 2013; MUKHOPADHYAY et al., 2003). São abundantemente expressas durante a diferenciação celular (KREGEL,

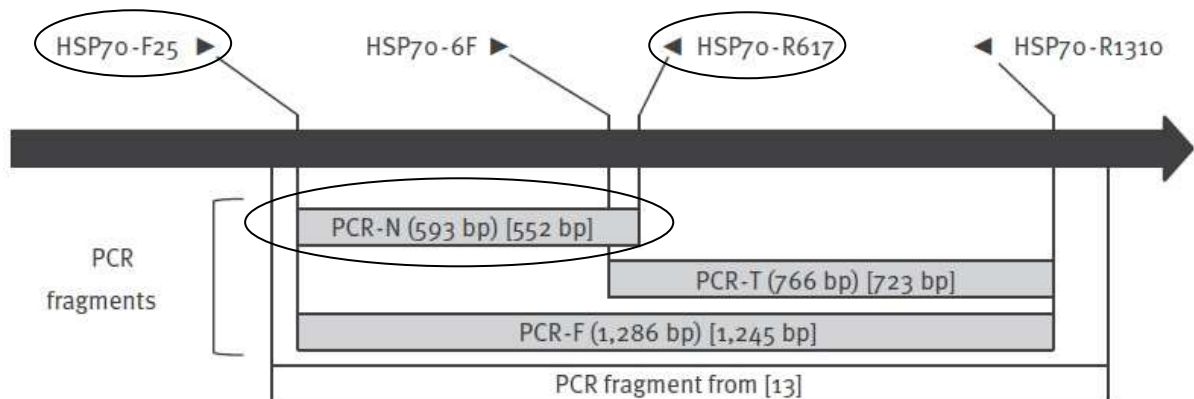
2002; MAYER & BUKAU, 2005). É expressa em grande quantidade na fase de diferenciação entre amastigotas e promastigotas no ciclo da leishmaniose, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no invertebrado, pelas variações de pH e sobrevivência do parasito contra fatores tóxicos provenientes dos macrófagos (FOLGUEIRA & REQUENA, 2007; MAYER, 2013; SANTOS, 2019).

Inicialmente, o gene hsp70 foi utilizado para a caracterização de espécies de *Leishmania* através da análise de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) (AUWERA, 2013; GARCIA et al., 2004).

O gene hsp70 possui algumas vantagens, sendo de fácil comparação em todas as espécies de *Leishmania*, pelo fato de não haver variação no tamanho do gene, discriminando os dois subgêneros (*Viannia*) e (*Leishmania*). O gene não possui quase nenhuma variação de sequências por ser organizado como uma unidade de repetição *in tandem*, ou seja, as cópias repetidas são adjacentes e em mesma orientação (AUWERA et al., 2013).

Auwers e colaboradores padronizaram a técnica de sequenciamento de DNA de fragmentos amplificados por PCR do gene da proteína hsp70. Eles utilizaram os primers descritos na figura abaixo (Figura 1.6).

Figura 1.6: Posição dos primers de PCR e produtos utilizados para sequenciamento na região de codificação de hsp70. Neste estudo amplificamos o fragmento PCR-N com 593 bp utilizando os primers hsp70 F-25 e hsp70 R-617.



Fonte: AUWERA et al (2013).

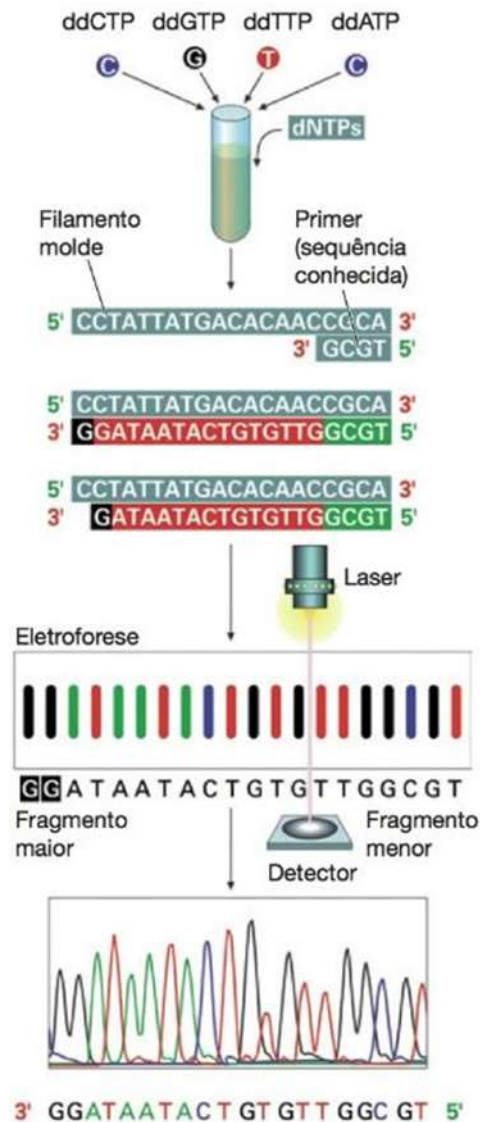
O sequenciamento de DNA desempenha a função de leitura dos nucleotídeos presentes nas moléculas de DNA ou RNA (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Dois tipos de tecnologia são usados, o sequenciamento de Sanger e sequenciamento de nova geração (FIETTO; MACIEL, 2016).

A técnica de Sanger, a que foi utilizada neste estudo, consiste em que a enzima DNA polimerase estenda a cadeia polinucleotídica a partir de um oligonucleotídeo iniciador ancorado por complementaridade em uma das fitas (fita molde). Como as fitas de DNA são complementares (A:T e C:G), a partir deste molde, a enzima vai adicionando o nucleotídeo complementar necessitando do grupo hidroxila livre (OH) na posição 3', componente do desoxiribonucleotídeo anterior (dNTP). Para interrupção da sequência é necessário adicionar a essa reação altas concentrações de nucleotídeos que interrompam a polimerização da cadeia, que são denominados didesoxiribonucleotídeos (ddNTPs) em que a pentose perdeu o grupo hidroxila da posição 3' (OH), necessário à continuidade da polimerização da cadeia. Durante os ciclos de polimerização, os ddNTPs vão sendo incorporados aleatoriamente, produzindo fragmentos de tamanhos diferentes (AZAMBUJA et al., 2014). As cadeias terminadas são então reveladas por eletroforese (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Atualmente existem sistemas automatizados para sequenciamento de DNA baseadas no método de Sanger. Esses sistemas usam diferentes marcadores fluorescentes para marcar cada nucleotídeo (como HEX 6- carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína, FAM 6- carboxifluoresceína, ROX carboxi-X-rodamina ou TET 4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína) permitindo correr as reações em uma coluna só e realizar a leitura pela cor do nucleotídeo. A leitura se baseia no fato de que os marcadores fluorescentes adicionados aos nucleotídeos, quando estimulados por raio laser, emitem diferentes comprimentos de onda determinados pelos fluoróforos (AZAMBUJA et al., 2014).

Figura 1.7: Modelo esquemático dos procedimentos necessários para realização de sequenciamento de Sanger.



Fonte: ORGES-OSÓRIO, M L, ROBINSON, W M, 2013.

O sequenciamento pode ser realizado a partir do DNA genômico, que contém a maior parte da informação genética, como também pode ser realizado a partir de outras moléculas, como DNA mitocondrial, cloroplastídico, plasmidial, entre outros. A Técnica de Sanger ou Método de Terminação de Cadeia é comumente utilizada para sequências de até 900 bp (FIETTO; MACIEL, 2016).

Ainda são desconhecidos os mecanismos que causam o potencial metastático, embora fatores como as vulnerabilidades ambientais e imunológicas e a filogenia de diversos parasitos tenham sido associados ao surgimento de metástases infecciosas.

É possível que este processo dependa de interações complexas entre os parasitos, hospedeiros, fatores ambientais, fatores genéticos e não genéticos. Diversas diferenças fisiológicas foram descritas onde os parasitos metastáticos podem ter aprimorado suas capacidades de sobrevivência relacionada a uma resistência ao estresse oxidativo e drogas anti-*Leishmania*, como o antimônio (HARTLEY et al., 2014).

A biodiversidade é definida como uma variedade do mundo natural ao qual todos os indivíduos apresentam diferenças e semelhanças, variando no tempo, espaço, forma e função. E com toda essa diversidade, se fez necessário a criação de métodos de classificação. A filogenia é um método utilizado para resgatar o conhecimento acerca das relações de parentesco entre as espécies (LOPES; VASCONCELOS, 2012). Este estudo foi realizado visando comparar as características genótípicas dos isolados parasitários de lesões de pacientes com LDi com isolados de pacientes com LCL atendidos no INI / Fiocruz, a fim de avaliar se existiam diferenças entre os parasitos que pudessem auxiliar na compreensão do desenvolvimento destas manifestações clínicas tão diversas na LTA.

2. JUSTIFICATIVA

Após confirmação diagnóstica, várias questões necessitam de respostas: por que alguns pacientes apresentam a forma disseminada da doença? Existem diferenças genóticas entre os parasitos isolados de lesões cutâneas de pacientes com LDi em comparação com isolados de pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL)?

Podemos indagar se a resposta imune do hospedeiro é determinante, já que estudos mostraram que a *L. (V.) braziliensis* circulante no Rio de Janeiro é bastante homogênea (BAPTISTA et al, 2009). No entanto, esta relação de causa e efeito ainda não está completamente estabelecida. Diferenças genóticas dos parasitos nos pacientes apresentando LDi poderiam contribuir para a disseminação de lesões.

Deste modo, o estudo molecular dos parasitos auxiliaria no estabelecimento de parâmetros para um melhor conhecimento do comportamento da enfermidade nos pacientes com LCL e LDi.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar comparativamente características genotípicas dos parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com LCL atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses (LaPClinVigiLeish), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), entre 1989 e 2018.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Descrever os pacientes estudados e seus controles quanto à procedência, características clínicas, exames relacionados com o diagnóstico (sorologia; IDRM; cultura; exame direto – escarificação e impressão em lâmina; histopatológico e imunohistoquímica por ocasião do diagnóstico, além do desfecho depois do primeiro tratamento com antimonial.
- 2- Caracterizar genotipicamente através dos alvos de kDNA e hsp70 os parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com LCL atendidos no LaPClinVigiLeish entre 1989 e 2018.
- 3- Realizar análise filogenética através dos alvos de kDNA e hsp70 dos parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com LCL por sequenciamento.
- 4- Comparar genotipicamente os parasitos isolados de pacientes com LDi com os de pacientes com LCL através das técnicas de PCR utilizando dos alvos região variável do minicírculo de kDNA e hsp70 por sequenciamento.

4. METODOLOGIA

4.1 Casuística

Os pacientes elegíveis para o estudo foram atendidos no ambulatório, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) relacionado ao “Estudo para a sistematização do atendimento de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana no Centro de Referência em LTA - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas – Fiocruz” (anexo III), não possuíam comorbidades que influenciassem na imunidade (como coinfeção com HIV), e tiveram suas lesões cutâneas biopsiadas, sendo os fragmentos obtidos enviados para diagnóstico por cultura em meios para crescimento de *Leishmania* spp.

Para o estudo os pacientes foram divididos em dois grupos:

- Grupo I / casos: isolados de pacientes que possuíam 10 ou mais lesões
- Grupo II / controles: isolados de pacientes com menos de 10 lesões

4.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

4.1.1.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos isolados de pacientes atendidos no LaPClinVigiLeish entre 01/1989 e 12/2018, que puderam ser recuperados da criopreservação em nitrogênio líquido para obtenção de massa parasitária, extração de DNA e caracterização por isoenzimas.

4.1.1.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os isolados que não puderam ser caracterizados por isoenzimas. Isolados obtidos a partir de lesões de pacientes com comorbidades que influenciam a resposta imune, como coinfeção com HIV, também foram excluídos.

4.1.1.3. Cálculo amostral

Tratou-se de um estudo de caso-controle com amostra de conveniência. Os pacientes foram selecionados dentre todos os pacientes atendidos no LaPClinVigiLeish no período, que se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão, com isolados de pacientes com LDi e isolados de pacientes com LCL. No período de janeiro de 1989 a dezembro de 2018, foram atendidos no LaPClinVigiLeish 929 pacientes, dos quais 37 pacientes tinham 10 ou mais lesões. Aplicando os critérios

de inclusão e exclusão foram selecionados ao final 11 casos com LDi e 21 controles com LCL (pacientes com uma ou poucas lesões).

4.2. Análises laboratoriais

4.2.1. Seleção dos isolados parasitários.

Foram utilizados isolados parasitários previamente criopreservados e caracterizados por isoenzimas no LaPClinVigiLeish de acordo com protocolo interno padronizado. Após seleção dos participantes, foi realizada uma busca em banco de dados do laboratório para verificar a existência de material criopreservado destes pacientes, e selecionados aqueles que atendiam aos critérios de inclusão do estudo.

Os isolados criopreservados selecionados foram recuperados e preparados de acordo com Miranda e colaboradores (2019) conforme descrito no item 4.5.2.

4.2.2. Recuperação das amostras do nitrogênio líquido e preparo das massas parasitárias

As amostras de *Leishmania (V.) braziliensis* foram retiradas do N₂L e semeadas em tubos contendo meio de cultura bifásico (NNN + Schneider, contendo 10% de SFB e antibióticos). O repique para expansão foi iniciado repassando dos tubos para as garrafas contendo 3 mL de meio líquido (BHI ou Schneider), nessa garrafa inoculou-se cerca de 0,5 mL da amostra a ser expandida, em fase exponencial do crescimento até a obtenção de cerca de 40 mL de meio de cultura em fase estacionária e incubadas em estufas em uma temperatura de 26-28°C. Após centrifugação, o *pellet* obtido foi submetido a lavagens em tampão de cloreto de sódio e ácido etilenodiamino tetra-acético (8,5g de cloreto de sódio e 3,72g de ácido etilenodiamino tetra-acético em um litro de tampão) para obtenção de massa parasitária, a qual foi armazenada em freezer (-20°C) até a extração de DNA para a realização das técnicas moleculares.

4.2.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o Reagente DNAzol® (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi extraído com volume final de 25 ou 50 µL, dependendo do tamanho do pellet, e quantificado no espectrofotômetro (Eppendorf Biophotometer) em um volume de 60 µL (55 µL de água ultrapura + 5 µL do DNA extraído) e estocado a - 20°C até o momento do uso.

4.2.4 Análise da variabilidade genética

4.2.4.1 Técnicas de PCR

Foram utilizadas técnicas baseadas na PCR para amplificação do minicirculo do kDNA utilizando os primers B1 B2 (DE BRUIJN; BARKER, 1992; OLIVEIRA et al., 2011) e amplificação dos genes da proteína hsp70 utilizando os primers hsp70 F-25 e hsp70 R-617 (AUWERA et al, 2013) (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Sequência dos primers utilizados no estudo

Primer	Sequência
B1	5'-GGGGTTGGTGTAAATATAGTGG-3'
B2	5'-CTAATTGTGCACGGGGAGG-3'
hsp70 – F25	5'-GGACGCCGGCACGATTKCT-3'
hsp70 - R617	5'-CGAAGAAGTCCGATACGAGGGA-3'

Fonte: Sequências de iniciadores B1B2 OLIVEIRA et al (2011) e sequências de iniciadores hsp70 – F25 e hsp70 - R617: AUWERA et al (2013).

Para a amplificação da região do gene hsp70 foram utilizados 10 picomoles (pmol) de cada primer (hsp70 F25 e hsp70 R617), dNTPs a 2 milimolar (mM) (Invitrogen), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), como cofator da enzima (Applied Biosystemems - Roche), 1 unidade (U) de enzima Taq Polimerase (Applied Biosystemems – Thermo Fisher Scientific), acrescido de 5 µL de DNA e água q.s.p. 50µL. A mistura foi incubada em termociclador (Thermal Cycler T960) com o seguinte programa de amplificação: desnaturaçãõ a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos com um ciclo final de extensão de 72°C por 8 minutos.

Para amplificação do minicírculo do kDNA foram utilizados 100 picomoles de cada *primer* (B1B2), dNTPs a 200mM (Invitrogen), 0,5 – 2,5mM de MgCl₂, como cofator da enzima (Applied Biosystems - Roche), 0,4 - 1U de enzima Taq Polimerase (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific), acrescido de 5 µL de DNA e água q.s.p. 50µL. A mistura foi incubada em termociclador (Thermal Cycler T960) com o seguinte programa de amplificação: desnaturaçãõ a 94°C por 3 minutos seguidos por 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 94°C por 45 segundos, com um ciclo final de extensão de 72°C por 10 minutos.

As duas amplificações foram reveladas em gel de agarose a 2%, corado com 5 µL de gel red (Biotium).

4.2.4.2 Sequenciamento

Para a realização do sequenciamento foi necessário realizar purificação dos produtos amplificados utilizando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. Do produto purificado foi feito um gel de agarose a 2%, corado com 5 µL de gel red. Foram utilizados o corante azul de bromofenol para acompanhar a corrida e marcador molecular 100bp para referenciar o tamanho da banda e o produto foi estocado a - 20°C até o momento do uso. O sequenciador utilizado foi o de 96 capilares modelo ABI3730XL na Plataforma de Sequenciamento de DNA (RPT01) do programa PDTIS/FIOCRUZ (Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ).

Foi feita a análise dos cromatogramas, pareamento das sequências, criação do reverso complemento, alinhamento das sequências, criação da fita consenso e edição utilizando o software Bioedit Sequence Alignment Editor (Informer Technologies, Inc, time multinacional de programadores). As sequências foram salvas no formato FASTA e armazenadas para a análise filogenética, a qual foi realizada comparando-se com as sequências de cepas de referência de *Leishmania* spp. disponíveis no banco de dados do GenBank®. Ocasionalmente é observada a presença de dois diferentes alelos de hsp70 na amostra, e por esse motivo é recomendado o uso de códigos de ambiguidade IUPAC (W / S / R / Y / M / K) para indicar a presença desses 2 nucleotídeos, quando estes são observados na mesma posição (AUWERA et al., 2013).

Para a análise filogenética com cálculo de distância entre as amostras e as cepas de referência, a construção da árvore filogenética e a construção do índice de similaridade foi utilizado o software Mega 6 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis, desenvolvido por time multinacional de programadores). Para análise filogenética das amostras e das referências utilizou-se o programa de busca de sequências, Basic Alignment Search Tool (BLAST). Deste modo, foi avaliado o perfil genético das amostras de *L. (V.) braziliensis* utilizando as técnicas acima referidas, comparando-se o perfil genético dos grupos de isolados em cultura de pacientes com LDi e LCL.

4.3 Aspectos éticos

Os isolados de pacientes com LDi foram comparados com isolados de pacientes com LCL, diagnosticados no LaPClinVigiLeish/INI/Fiocruz no mesmo período. Sempre que possível foram incluídos isolados de pacientes participantes do estudo imunológico *in situ* aprovado pelo CEP/Fiocruz em 26/11/2015 (CAAE 49604215.1.0000.5262) e já em andamento no INI e no IOC / Fiocruz, visando possíveis correlações entre a resposta imune *in situ* e características dos isolados parasitários.

Os parasitos isolados dos fragmentos teciduais ficaram estocados sob a guarda do responsável técnico do LaPClinVigiLeish. Nenhum material adicional foi necessário e nenhum paciente foi submetido a outro procedimento além daqueles de rotina para diagnóstico. Foi assinado um termo de confidencialidade pelas pesquisadoras responsáveis (Anexo I). Este projeto foi aprovado pelo CEP/INI pelo parecer consubstanciado de número 3.845.376 datado de 18 de fevereiro de 2020 (Anexo II).

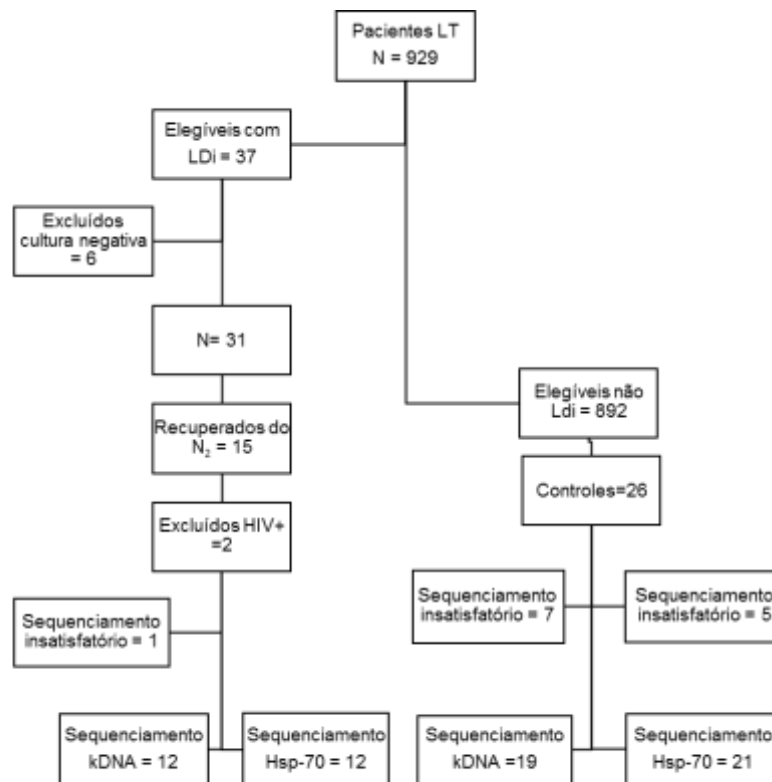
Foi solicitada ao CEP/INI e concedida dispensa de TCLE específico para o estudo, devido à dificuldade de conseguir que os pacientes comparecessem ao INI, por serem geralmente de áreas rurais ou periurbanas, além do atendimento da maioria dos pacientes há vários anos, sendo que os registros de endereço e telefone nos prontuários poderiam estar desatualizados.

5. RESULTADOS

A figura 5.1 descreve quantos pacientes deram entrada no ambulatório, quantos foram selecionados e quantos foram analisados no período do estudo.

Muitas amostras não puderam ser recuperadas após a etapa de criopreservação ou possuíam cultura negativa no momento do diagnóstico, tendo sido diagnosticados por outros métodos que não a cultura.

Figura 5.1: Desenho esquemático com o total de pacientes e respectivas amostras selecionadas para o estudo.



Fonte: Elaboração própria, LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

A tabela 5.1 descreve os pacientes dos quais foram obtidos os isolados analisados e cujo sequenciamento foi bem-sucedido (n=33), com os parâmetros utilizados para o pareamento entre casos e controles.

Tabela 5.1. Características clínicas e demográficas dos pacientes com leishmaniose disseminada cujos isolados parasitários estavam disponíveis (casos) ou com leishmaniose cutânea localizada que foram selecionados (controles) para estudo genotípico.

Grupo de pacientes (Caso ou controle)	Sexo	Idade	Nº de lesões	Forma clínica	Área endêmica provável
Caso A	M	59	11	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle A.1	M	58	5	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle A.2	M	59	5	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso B	M	42	11	Cutânea	Teresópolis (RJ)
Controle B.1	M	41	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso C	M	38	14	Cutaneomucosa	Itaguaí (RJ)
Controle C.1	M	38	1	Cutânea	Paracambi (RJ)
Controle C.2	M	38	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso D	M	24	14	Cutânea	Wenceslau Guimarães (BA)
Controle D.1	M	25	1	Cutânea	Itabuna (BA)
Controle D.2	M	23	1	Cutânea	Presidente Tancredo Neves (BA)
Caso E	M	46	18	Cutânea	Carmo (RJ)
Controle E.1	M	46	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso F	M	23	19	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle F.1	M	23	5	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle F.2	M	22	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso G	M	42	54	Cutaneomucosa	Rio de Janeiro (RJ)
Controle G.1	M	41	6	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle G.2	M	41	2	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso H	M	52	Incontáveis	Cutaneomucosa	Rio de Janeiro (RJ)
Controle H.1	M	51	1	Cutânea	São Fidelis (RJ)
Controle H.2	M	51	1	Cutânea	Teresópolis (RJ)
Caso I	M	7	Incontáveis	Cutaneomucosa	Rio de Janeiro (RJ)
Controle I.1	M	7	2	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle I.2	M	8	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)

Caso J	M	41	117	Cutaneomucosa	Araruama (RJ)
Controle J.1	M	40	2	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso K	M	54	Incontáveis	Cutaneomucosa	Rio de Janeiro (RJ)
Controle K.1	M	54	1	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Controle K.2	M	52	4	Cutânea	Rio de Janeiro (RJ)
Caso L	M	49	Incontáveis	Cutânea	São Fidelis (RJ)
Controle L.1	M	48	3	Cutânea	São Fidelis (RJ)
Controle L.2	M	50	1	Cutânea	São Fidelis (RJ)

M = masculino; F = feminino; RJ = estado do Rio de Janeiro; BA = estado da Bahia
 Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz, 2000 a 2018

Todos os casos e, conseqüentemente, todos os controles pareados foram do sexo masculino. A idade mínima dentre os casos foi de sete anos e a idade máxima de 59 anos. A idade mínima dentre os controles foi de sete anos e a idade máxima de 59 anos.

Dentre os 12 casos estudados, seis tinham LC e seis tinham LCM. Dos 21 controles, todos apresentavam LC.

O número de lesões entre os casos variou de 11 a incontáveis, sendo que em dois casos havia mais de 200 lesões. Dentre os controles, o número de lesões variou de uma a seis lesões, com média de 2,1 lesões.

Outras informações clínicas, laboratoriais e de desfecho do tratamento constam da Tabela 5.2.

O tempo de evolução médio entre os casos foi de 3,1 meses, e entre os controles foi de 2,3 meses.

Quanto às comorbidades, dentre 10 casos para os quais esta informação estava disponível, seis (60%) tiveram comorbidades. Para os controles, em quatro pacientes esta informação não estava disponível. Para os 17 restantes, nove (52,9%) tinham comorbidades.

A visualização de amastigotas no exame histopatológico foi possível em sete casos (58,3%). Quanto aos controles, foi possível visualização de amastigotas em oito deles (38,0%).

A informação sobre o exame direto estava disponível para nove casos, dos quais foi positivo em três (33,3%). Esta informação estava disponível para nove controles, tendo sido positivo em apenas um deles (11,1%).

PCR foi realizada em seis casos, e em todos eles foram positivos. Foi realizada em seis controles, e em todos eles foram positivos.

A sorologia (reação de imunofluorescência indireta ou ensaio imunoenzimático) foi positiva nos 12 casos (100%). Foi realizada em 20 controles, tendo sido positiva em 18 (90%).

IDRM foi realizada em oito casos, tendo sido positiva em sete (87,5%). Foi realizada em 19 controles, e foi positiva em 18 deles (94,7%).

Para 11 casos havia informação sobre o desfecho após tratamento inicial, tendo ocorrido cura sem história de recidiva em 8 (72,7%) deles. Para 19 controles a informação sobre o desfecho após tratamento inicial estava disponível, com cura em 17 (89,5%) deles.

Os controles B.2 e E.2 e J.2 foram retirados das tabelas 5.1 e 5.2 porque as sequências genéticas não ficaram adequadas para análise.

Tabela 5.2: Características clínicas, laboratoriais e desfecho após tratamento inicial com antimoniato de meglumina em pacientes com leishmaniose disseminada (casos) e leishmaniose cutânea localizada (controles), pareados segundo idade e sexo.

	Tempo evolução (meses)*	Comorbidades	Histopatologia (amastigotas)	Exame direto **	PCR	Sorologia	IDRM	Desfecho #
Casos								
A	2	Sim	Não	N	NR	P	P	C
B	3	IGN	Sim	NR	P	P	P	C
C	6	Não	Sim	N	NR	P	N	C
D	2	Não	Não	N	NR	P	NR	C
E	2	Não	Não	N	P	P	P	C
F	3	Não	Sim	NR	NR	P	P	AB
G	3	Sim	Sim	P	P	P	NR	C
H	4	Sim	Não	P	NR	P	NR	R##
I	1	IGN	Sim	N	NR	P	P	C
J	3	Sim	Sim	N	P	P	P	C
K	3	Sim	Sim	P	P	P	P	R
L	5	Sim	Não	NR	P	P	NR	R
Controles								
A.1	2	Sim	Não	NR	NR	P	P	C
A.2	1	Não	Não	NR	P	P	P	C
B.1	1	Sim	Não	NR	P	P	P	C
C.1	4	IGN	Não	N	NR	P	P	R
C.2	4	Não	Não	NR	NR	P	P	C
D.1	3	Não	Sim	NR	P	NR	NR	AB
D.2	2	Sim	Não	N	NR	P	P	AB
E.1	3	Sim	Não	NR	P	N	P	C
F.1	4	IGN	Não	N	NR	P	P	C
F.2	5	Não	Sim	N	P	P	P	C
G.1	2	Sim	Sim	IGN	NR	P	P	C
G.2	3	Sim	Sim	IGN	NR	P	P	C
H.1	1	IGN	Não	NR	P	P	P	C
H.2	3	IGN	Sim	NR	NR	N	P	C
I.1	1	Não	Não	N	NR	P	P	C
I.2	1	Não	Não	N	NR	P	P	C
J.1	1	Não	Sim	N	NR	P	P	R
K.1	3	Sim	Não	N	NR	P	NR	C
K.2	1	Não	Sim	P	NR	P	N	C
L.1	2	Sim	Não	NR	NR	P	P	C
L.2	1	Sim	Sim	NR	NR	P	P	C

*Tempo de evolução (meses) até o diagnóstico; **Exame direto: impressão em lâmina de fragmento de lesão cutânea ou escarificação de lesão cutânea; PCR = reação em cadeia da polimerase; IDRM = intradermoreação de Montenegro; #Desfecho após tratamento inicial com antimoniato de meglumina; LC = leishmaniose cutânea; LCM = leishmaniose cutaneomucosa; IGN = ignorado; Sim = presentes; Não = ausentes; P = positivo; N = negativo; NR = não realizado; C = cura; R = recidiva; AB = Abandono de seguimento antes de constatação de cura; INC = incontáveis; ##Tratamento inicial ignorado.

Fonte: LaPClinVigiLeish,INI/Fiocruz, 1989 a 2018.

Para todos os casos e controles selecionados, os isolados foram recuperados da criopreservação e foi obtida massa parasitária para extração de DNA e análise molecular.

Para a realização da PCR com alvo hsp70 foi realizada a padronização da metodologia com duas alíquotas da mesma cepa de referência de *Leishmania (V) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram utilizadas para padronização da PCR com alvo hsp70. Após a amplificação, os produtos foram purificados e enviados para o sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento da Fiocruz.

Após a padronização com as amostras de referência, foram iniciados os ensaios em todas as 39 amostras iniciais do estudo. Todas as amostras foram purificadas e enviadas para a plataforma de sequenciamento.

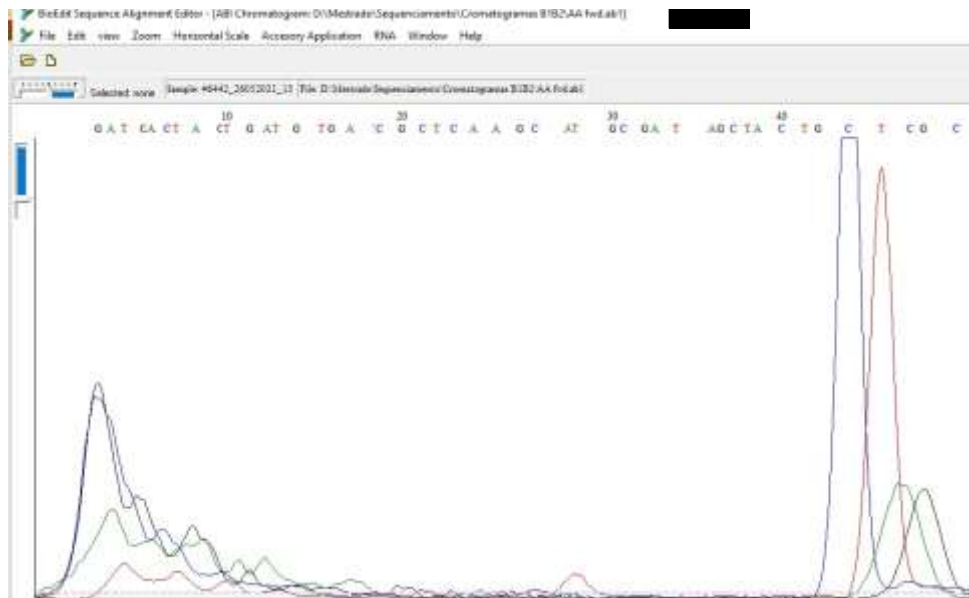
A figura 5.2 mostra um cromatograma do produto amplificado do gene hsp70 de boa qualidade e adequado para a análise do sequenciamento. Já a figura 5.3 mostra um cromatograma ruim, com picos sobrepostos e de baixa qualidade.

Figura 5.2: Cromatograma adequado para a análise do sequenciamento.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

Figura 5.3: Cromatograma inadequado para a análise do sequenciamento.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

As referências de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *Leishmania naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *Leishmania shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), *Leishmania lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426) e *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8) também foram sequenciadas. Os resultados também foram comparados com as sequências obtidas do GenBank®.

Para o alvo de kDNA as sequências dos casos A, C, D e J não possuíam similaridade relevante com nenhum dos seus respectivos controles (Tabela 5.3). Já para o alvo de hsp70 a similaridade foi importante na maior parte das sequências, não sendo bem-sucedida no caso A e no caso C com o controle C.2 (Tabela 5.4).

A sequência do controle H.2 não ficou adequada para análise no alvo de hsp70.

Tabela 5.3: Sequências do alvo de minicírculo de kDNA dos casos pareados com seus respectivos controles.

Sequências	Query Cover*	E-valor**	% identidade
Caso B			
Controle B.1	14%	7e-33	89.69%
Caso E			
Controle E.1	16%	5e-21	77.60%
Caso F			
Controle F.2	19%	3e-23	82.08%
Caso G			
Controle G.2	17%	3e-31	86.14%
Caso H			
Controle H.2	15%	5e-29	83.48%
Caso K			
Controle K..1	12%	7e-19	82.56%
Caso K			
Controle K.2	13%	1e-17	80.65%
Caso L			
Controle .2	13%	5e-16	80.00%

*Porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento; **Parâmetro de confiança.

Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

Tabela 5.4: Sequências do alvo hsp70 dos casos pareadas com seus respectivos controles.

Sequências hsp70	Query Cover	E-valor	% identidade
Caso B			
Controle B.1	85%	0.0	97.77%
Caso B			
Controle B.2	99%	0.0	98.27%
Caso C			
Controle C.1	57%	2e-63	81.27%
Caso D			
Controle D.1	98%	0.0	97.22%
Caso D			
Controle D.2	95%	0.0	95.44%
Caso E			
Controle E.1	94%	0.0	95.07%
Caso F			
Controle F.1	100%	0.0	98.81%
Caso F			
Controle F.2	100%	0.0	99.05%
Caso G			
Controle G.1	100%	0.0	97.74%
Caso G			
Controle G.2	79%	0.0	98.35%
Caso H			
Controle H.2	91%	5e-144	98.58%
Caso I			
Controle I.1	64%	3e-62	79.01%
Caso I			
Controle I.2	43%	9e-43	79.84%
Caso J			
Controle J.1	99%	0.0	98.34%
Caso K			
Controle K.1	79%	0.0	99.29%
Caso K			
Controle K.2	99%	0.0	98.87%
Caso L			
Controle L.1	100%	0.0	100%
Caso L			
Controle L.2	100%	0.0	100%

*Porcentagem da sequência submetida ao programa que é coberta pelo alinhamento; **Parâmetro de confiança.

Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

A tabela 5.5 mostra o número de substituições de base por local sobre todos os pares de sequência entre grupos. As estimativas de erro padrão são mostradas acima da diagonal. As análises foram realizadas utilizando-se o modelo Tamura-Nei. Esta análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Houve um total de 892 posições no conjunto de dados final. As análises de variabilidade genética foram realizadas no software MEGA X. A variabilidade genética sobre pares de sequência entre grupos foi maior no grupo de casos do que nos controles em comparação às cepas referência.

Tabela 5.5: Estimativas de variabilidade genética sobre pares de sequência entre os grupos.

	Casos	Controles
Casos		1,44 (EP= 0,05)
Controles	1,44 (EP= 0,05)	
Referências	1,52 (EP= 0,12)	1,36 (EP=0,09)

EP= erro padrão

Fonte: LaPClinVigiLeish, INI,Fiocruz.

A tabela 5.6 mostra o número médio de substituições de base sobre todos os pares de sequência dentro de cada grupo. As estimativas de erro padrão são mostradas acima da diagonal. As análises de variabilidade genética foram realizadas utilizando-se o modelo Tamura-Nei. Esta análise envolveu 34 sequências de nucleotídeos. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequência (opção de exclusão em pares). Houve um total de 892 posições no conjunto de dados final. Análises de variabilidade genética foram realizadas no software MEGA X.

Tabela 5.6: Estimativas de variabilidade genética média sobre pares de sequência dentro de cada grupo.

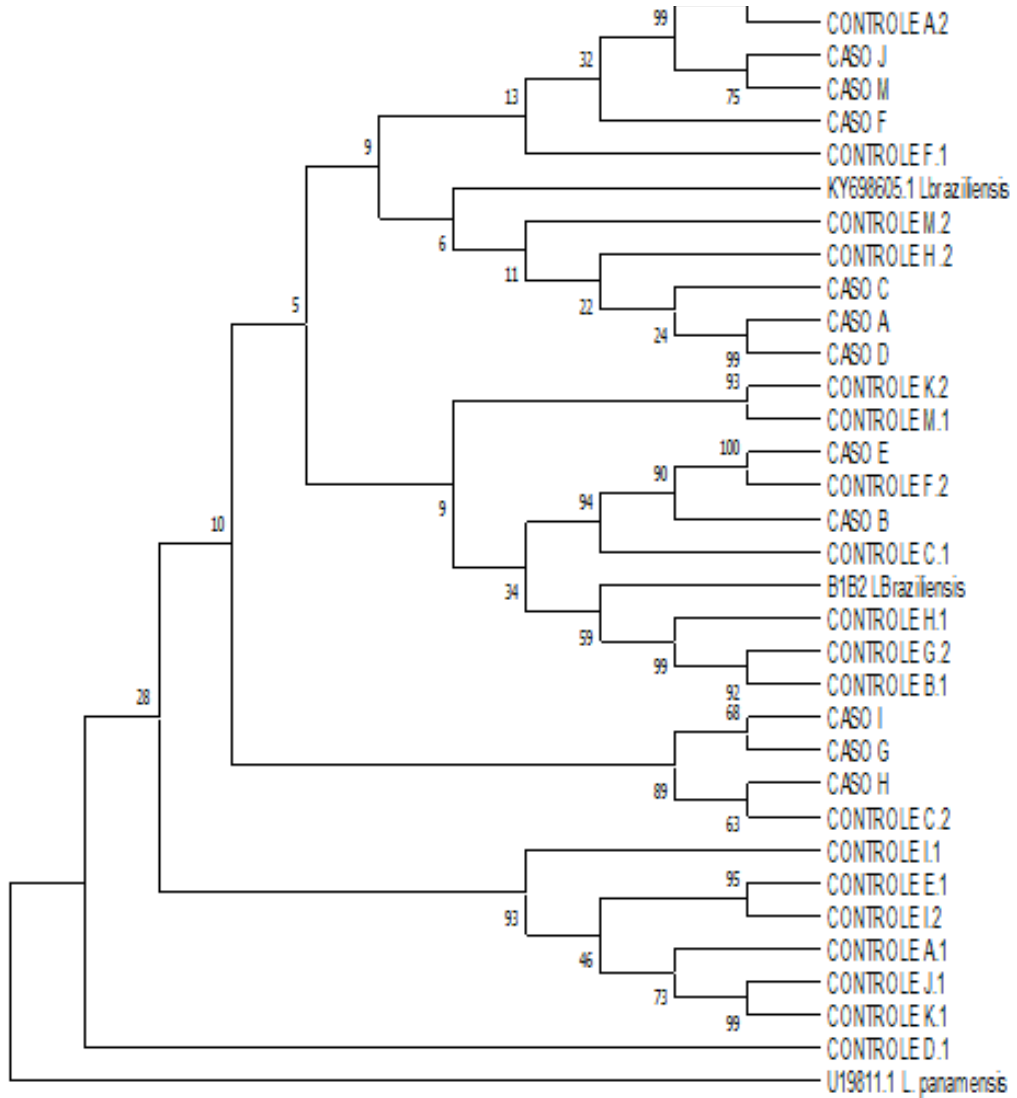
	Estimativa** Média	Erro Padrão
Casos	1,441954	0,085374
Controles	1,290141	0,049286

**Estimativa de variabilidade genética média

Fonte: LaPClinVigiLeish, INI,Fiocruz.

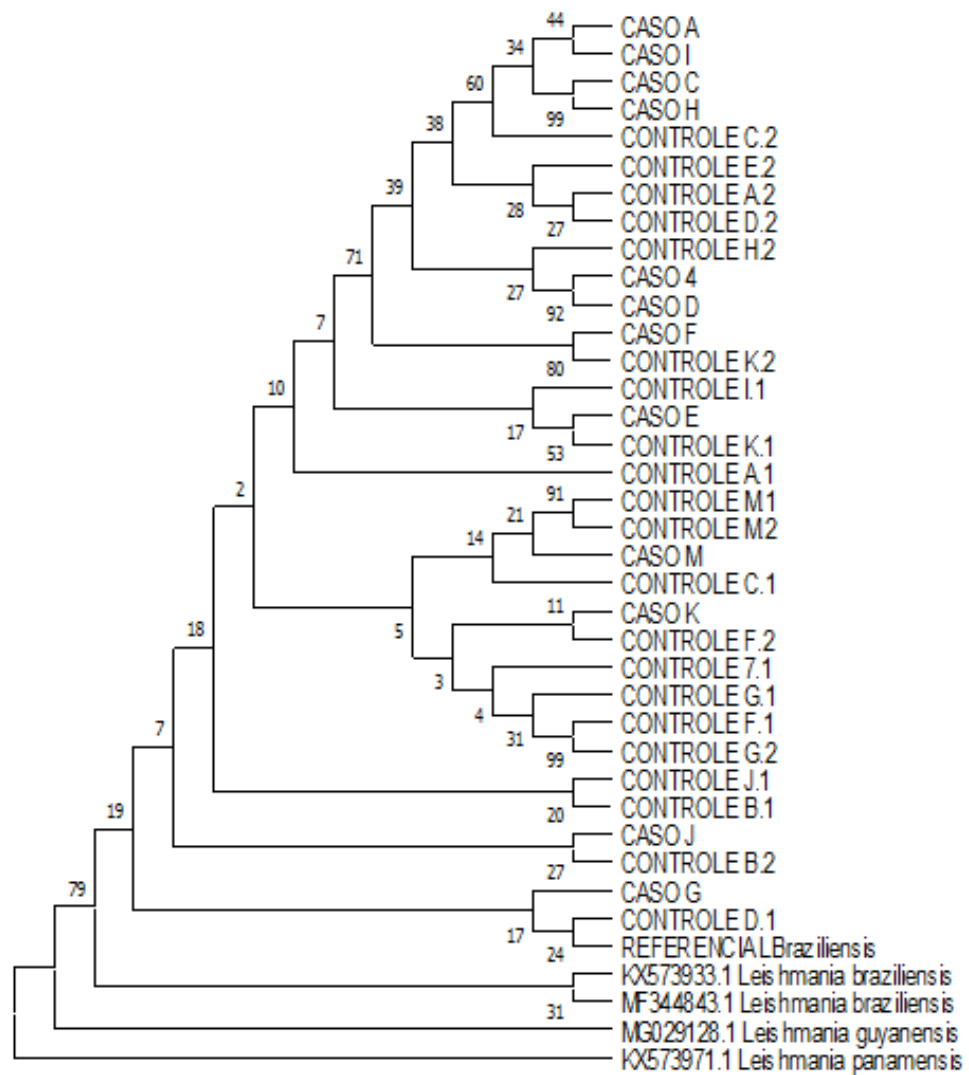
As árvores filogenéticas tanto do minicírculo de kDNA quanto de hsp70 mostram que não houve um agrupamento entre os casos com seus respectivos controles, o que indica que as variáveis sexo e idade não influenciaram na similaridade entre as sequências (Figuras 5.4 e 5.5).

Figura 5.4: Árvore obtida através do programa MEGA 6 da região variável do minicírculo de kDNA, comparando as amostras dos pacientes do grupo dos casos com o grupo dos controles



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz

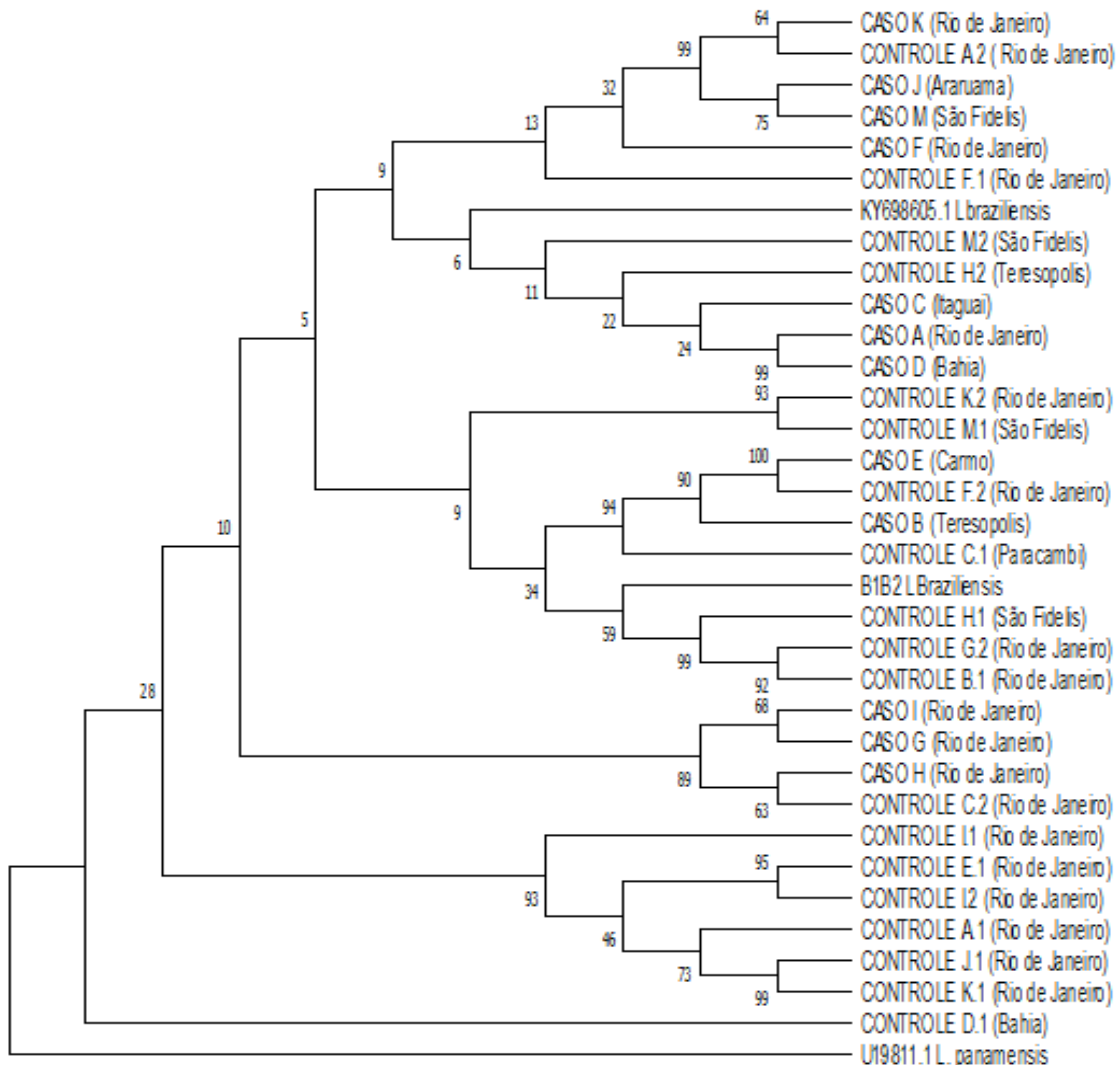
Figura 5.5: Árvore filogenética obtida através do programa MEGA 6 do gene hsp70, comparando as amostras dos pacientes do grupo dos casos com o grupo dos controles.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz

Um cluster na análise pelo alvo de kDNA agrupa casos e controles que são predominantemente do município do Rio de Janeiro: Caso G, caso H, caso I, controle C.2, caso F, controle E.1, controle I.2, controle A.1, controle I.1, controle J.1 e controle K.1, mostrando similaridade entre os parasitos isolados destes pacientes. Neste cluster também se agrupou um isolado de paciente com LCL proveniente da Bahia. Nos demais clusters, os pacientes com LDi e com LCL se distribuíram sem que houvesse predomínio em relação à procedência (Figura 5.6).

Figura 5.6: Árvore filogenética dos alvos de kDNA demonstrando a procedência de cada um dos casos e controles.



Fonte: LaPClinVigiLeish, INI, Fiocruz.

6. DISCUSSÃO

A LDi é uma forma emergente e grave de infecção por *L. (V.) braziliensis* (CARDOSO et al., 2019; MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; MACHADO et al., 2015; TURETZ et al., 2002). Caracteriza-se pelo aparecimento de dezenas a centenas ou milhares de lesões cutâneas polimórficas em diversas regiões do corpo, e frequentemente apresenta acometimento da mucosa das vias aéreas e digestivas superiores ou da mucosa genital (CARVALHO, et al., 1994; LYRA et al., 2020; MACHADO, PRATES, MACHADO, 2019; TURETZ et al., 2002). Existem poucos estudos sobre esta forma de leishmaniose na literatura.

LDi é manifestação rara, geralmente relacionada a uma falha da resposta imune inata ao parasito na prevenção da infecção. Quando o parasito consegue superar os mecanismos de defesa da imunidade inata, adere à superfície dos macrófagos e é internalizado por fagocitose mediada por receptores. O parasito no interior dos macrófagos transforma-se em amastigota, o que facilita sua migração e sobrevivência. As células Th1 são responsáveis pela resposta aos antígenos parasitários e produzem IFN- γ e IL-12 associadas à proteção contra patógenos intracelulares (MORGADO et al., 2008; MORGADO et al., 2018). A imunidade adaptativa é caracterizada por resposta Th1 reduzida e uma resposta Th2 normal com a liberação de IL-4, IL-5 e IL-10. O equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 é essencial para controlar a doença. O desequilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 permite que as formas amastigotas proliferem nos macrófagos infectados dentro de seus fagolisossomos, desencadeando, eventualmente, sua função lítica e levando à disseminação hematológica (COUPPIE et al, 2004; DIAZ et al., 2002; ESPINOZA-MORALES et al, 2017; SILVEIRA, 2009). A produção *in vitro* de IFN- γ parece ser maior pelas células mononucleares de sangue periférico de pacientes com LCL se comparadas às de pacientes com LDi quando expostas a antígenos de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo uma resposta imune mais eficiente nos pacientes com LCL (LEOPOLDO et al, 2006). Entretanto, uma avaliação de marcadores imunológicos *in situ* com pacientes com LDi e com LCL (incluindo alguns dos pacientes do presente estudo) não conseguiu evidenciar diferenças no microambiente das lesões que distinguisse de modo claro ambas as formas clínicas (PEREIRA, 2017).

Encontrou-se um percentual apenas ligeiramente maior de comorbidades entre os pacientes com LDi do que com LCL. Esses achados não nos permitem avançar na discussão do papel das comorbidades na ocorrência de LDi, entretanto sabe-se que comorbidades como diabetes mellitus podem influenciar na apresentação clínica da LC (LAGO et al., 2020).

Nesse estudo, houve maior porcentagem de pacientes com visualização de amastigotas no exame histopatológico nos pacientes com LDi do que nos pacientes com LCL. A porcentagem de pacientes com LCL em que foi possível a visualização de amastigotas está de acordo com os dados da literatura para a histopatologia convencional (QUINTELLA et al., 2009). Entretanto, também existem relatos na literatura de poucos parasitos visualizados em lesões de LDi (MACHADO et al., 2011). A variação de concentração de parasitos no tecido pode não ser reflexo da carga parasitária total, mas sim variar em função do local de realização da biópsia (PEREIRA, 2017).

O exame direto (impressão em lâmina e/ou escarificação de lesão cutânea) teve maior porcentagem de positividade entre os pacientes com LDi, o que também poderia sugerir indiretamente um pior controle tecidual da quantidade de parasitos quando comparados aos pacientes com LCL. O exame direto quando feito com ambos os métodos pode alcançar resultados positivos em porcentagens expressivas na LTA, de 59,4% (SILVEIRA et al., 1999) ou até 77,5% (MELLO et al., 2011). Entretanto, o exame direto não foi realizado em grande parte dos pacientes com LCL no presente estudo, o que prejudicou a qualidade da análise desta variável.

Todos os pacientes estudados com LDi (casos) tiveram sorologia positiva para leishmaniose tegumentar (RIFI ou ELISA), enquanto dentre os pacientes com LCL (controles) 90% tiveram sorologia positiva. A produção de anticorpos com altos níveis de IgG e de IgG2 anti-*Leishmania* parecem se correlacionar com a ocorrência de LDi, sugerindo que a IgG pode ser um marcador desta forma clínica (MAGALHÃES et al., 2021).

Quanto à IDRM, houve positividade semelhante entre os pacientes com LDi e com LCL, embora com porcentagem ligeiramente maior no segundo grupo. Estes achados são semelhantes aos de estudo na Argentina, que encontrou porcentagem de positividade similar na LCL e na LDi, embora esta última forma clínica tenha ocorrido em apenas 4 dentre 733 casos (KROLEWIECKI et al., 2017).

A LDi é muitas vezes associada na literatura a uma pior resposta terapêutica (MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; TURETZ et al., 2002), e o insucesso após terapia inicial poderia chegar a 76% dos casos (MACHADO et al., 2011). Nesse estudo, encontramos maior ocorrência de insucesso terapêutico após tratamento inicial nos pacientes com LDi do que naqueles com LCL, o que parece corroborar com este ponto de vista. As falhas terapêuticas podem estar associadas ao agente etiológico, fato observado por Carvalho e colaboradores (1994), em que as falhas foram observadas em pacientes com LDi causada por *L. amazonensis*. O Ministério da Saúde brasileiro, em suas diretrizes mais recentemente publicadas para manejo da leishmaniose tegumentar, recomenda tratamento preferencial em centro de referência para a LDi, além de um tempo maior de tratamento – 30 dias – quando for utilizado o antimoníato de meglumina como primeira escolha (BRASIL, 2017). Existem relatos de má resposta terapêutica na LDi com anfotericina B lipossomal (SCHRANER et al., 2005), entretanto este medicamento é também considerado de primeira escolha para tratamento da LDi em nosso país (BRASIL, 2017).

Estudos de variabilidade genética de *Leishmania* realizados a partir do banco de isolados do LaPClinVigiLeish mostraram pouca variabilidade genética e falta de associação entre a composição genética do parasito e a resposta terapêutica ao antimoníato de meglumina, bem como a não associação da variabilidade genética entre formas cutâneas e mucosas da LTA (BAPTISTA et al., 2012; GAGINI et al., 2017 e OLIVEIRA et al., 2013).

O polimorfismo genético de *L. braziliensis* obtida a partir de pacientes com dez ou mais lesões cutâneas ou cutaneomucosas foi descrito por outros autores (GUIMARÃES et al., 2009), utilizando diferentes marcadores genéticos, mas sem ainda o encontro de um biomarcador preditivo de virulência. Os alvos moleculares utilizados neste estudo foram escolhidos pela reprodutibilidade dos resultados, seja para o diagnóstico (kDNA) ou caracterização molecular do parasito (hsp70), e também pela facilidade de execução em nosso laboratório, já que todos os reagentes se encontravam disponíveis mesmo com as dificuldades operacionais decorrentes da pandemia da doença provocada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), denominada Covid-19 por ter início em 2019. Optamos pelo sequenciamento dos produtos de PCR pela facilidade operacional da plataforma de sequenciamento existente na Fiocruz, pois, no contexto provocado pela pandemia de

Covid-19, não foi possível a realização do protocolo da técnica da reação em cadeia da polimerase com primer único em condições de baixa estringência (LSSP-PCR) que estava previsto inicialmente no estudo. Uma limitação do estudo em relação ao sequenciamento do alvo kDNA é que este geralmente é utilizado para diagnóstico (FAGUNDES et al., 2010). Os estudos de variabilidade genética com esse alvo utilizam a metodologia de LSSP-PCR (BAPTISTA et al., 2012).

A maior parte dos produtos amplificados foi sequenciado com sucesso, permitindo a análise dos cromatogramas e a obtenção de sequências viáveis para a análise. Algumas sequências, no entanto, apresentaram picos sobrepostos, sem que fosse possível serem identificados como polimorfismos genéticos ou artefatos do processo de sequenciamento, tendo sido retiradas da análise final. Após a edição de cada sequência, a mesma foi lançada no sistema BLASTN para a identificação de similaridade entre alguma outra previamente depositada no GenBank® e, embora várias sequências similares tenham sido encontradas, nenhuma delas pertencia a paciente de forma disseminada nem apresentava mais de 95% de similaridade com as sequências do banco. Considerando o polimorfismo das duas regiões genômicas analisadas, esse resultado está dentro do esperado.

O pareamento CASOS-CONTROLES mostrou similaridade significativa para apenas alguns isolados, indicando que mesmo pacientes do mesmo sexo e idade, com tempo de evolução de doença similar e desfecho favorável ao tratamento apresentavam diversidade genética considerável. A escolha da plataforma BLASTN para o alinhamento par a par foi feita pela facilidade de leitura e interpretação dos resultados bem como pelas informações que a plataforma oferece relativas à qualidade do sequenciamento. Os resultados foram diferentes para os dois alvos moleculares analisados.

Nos casos em que foi encontrada similaridade importante entre casos e controles no sequenciamento do kDNA pelos *primers* B1B2, a cobertura do alinhamento foi de apenas uma pequena parte da molécula de DNA amplificado, e não houve associação entre a similaridade das sequências com o tempo de evolução da doença, presença de comorbidades, desfecho terapêutico, procedência de casos e controles e localização das lesões cutâneas, bem como com a presença de lesão mucocutânea nos pacientes estudados. Esse resultado contrasta com outros estudos de nosso laboratório (BAPTISTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013) que mostraram

polimorfismo do kDNA de *Leishmania* em pacientes de lesões mucosas e cutâneas do mesmo paciente e em parasitos isolados antes e depois de episódios de recidivas. Os resultados variados poderiam ser explicados pela técnica utilizada naqueles estudos (LSSP-PCR) ser diferente das técnicas utilizadas no presente estudo.

Por outro lado, as sequências amplificadas pelos primers direcionados ao gene HSP 70 se mostraram mais homogêneas e a similaridade entre cada caso e seus controles foi maior. Esse resultado é compatível com os dados de Auwera et al e Graça et al, que desenvolveram os protocolos de identificação e diagnóstico de *Leishmania* com essa região do genoma.

Após a análise de cada caso com seus controles específicos, foi realizada a análise filogenética e os cálculos de similaridade de todos os casos e controles agrupados, das cepas de referência sequenciadas pelos iniciadores do estudo e das sequências depositadas no GenBank®. Foi escolhida como outgroup sequência de *Leishmania panamensis* disponível no GenBank®.

Pacientes procedentes do município do Rio de Janeiro, tanto com LDi quanto com LCL, mostraram similaridade genética e agrupamento em um cluster quando analisado o alvo de kDNA. Alguns estudos mostraram uma correlação entre polimorfismos genéticos e dados eco-epidemiológicos de isolados de *Leishmania* (CUPOLILLO et al., 2003; GOMES et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2013). Estes estudos reforçam a clonalidade estrutural do parasito (TIBAYRENC et al., 1990). Nas espécies que circulam naturalmente como um grupo de subpopulações heterogêneas foi demonstrada a policlonalidade do inóculo inicial de múltiplas cepas (OLIVEIRA et al., 2013; PACHECO et al., 1990). Estas características poderiam influenciar o prognóstico clínico da doença e a eficiência das estratégias terapêuticas (OLIVEIRA et al., 2013).

Nossos resultados mostraram uma maior variabilidade genética dos parasitos isolados de pacientes com dez ou mais lesões (CASOS) quando comparados aos com menor número de lesões (CONTROLES), utilizando DNA genômico (hsp70) e mitocondrial (minicírculo de kDNA). Considerando que o estudo foi descritivo, não foi realizada análise estatística que permitisse afirmar que a diferença observada entre casos e controles foi significativa, apenas as análises padrão do programa MEGA incluindo mil “bootstraps”.

A infecção humana por *L. (V.) braziliensis* produz uma ampla variedade de manifestações clínicas que podem ser associadas à variabilidade intraespecífica do parasito. A heterogeneidade intraespecífica entre membros dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania* foi detectada por estudos genéticos e moleculares (OLIVEIRA et al., 2013; PACHECO et al., 1986; PACHECO et al., 2000). Estudos realizados previamente por nosso grupo em pacientes oriundos do estado do Rio de Janeiro mostraram uma pequena variabilidade genética do parasito em diferentes formas clínicas (BAPTISTA et al., 2009). Entretanto, houve variabilidade genética em isolados antes do tratamento e após insucesso terapêutico (BAPTISTA et al., 2012), inclusive em pacientes oriundos apenas do estado do Rio de Janeiro (GAGINI et al., 2017). Por outro lado, nosso grupo também demonstrou variabilidade genética entre isolados provenientes de diferentes pacientes e também entre diferentes lesões do mesmo paciente com acometimento mucoso ou cutaneomucoso (OLIVEIRA et al., 2013). Estudos na região de Corte de Pedra (Bahia) mostraram que *L. (V.) braziliensis* tem uma estrutura populacional multiclonal, em que diferentes genótipos estão associados a diferentes manifestações, incluindo a forma disseminada da doença. Neste estudo, uma forte associação entre LDi e cepas específicas de *L. (V.) braziliensis* foi documentada, sugerindo que cepas geneticamente distintas podem ser responsáveis pelo surgimento de LDi em várias áreas da região. Portanto, a utilização de marcadores moleculares poderia ser útil para a compreensão da forma clínica da doença (MACHADO, PRATES, MACHADO, 2019; QUEIROZ et al, 2012). Não conseguimos identificar no GeneBank® sequências de isolados oriundos de pacientes com leishmaniose disseminada que permitissem a comparação com os resultados obtidos no nosso estudo.

O gene *hsp70* é facilmente comparável nas espécies de *Leishmania*, pois não há variação de tamanho, tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo. Possui um grande poder discriminatório em ambos os subgêneros *Viannia* e *Leishmania*. O grau de conservação impede a amplificação de outros membros da mesma família de genes e sua natureza de múltiplas cópias permite a amplificação direta da maioria das amostras clínicas (AUWERA et al., 2013).

As limitações do estudo foram principalmente a dificuldade de recuperação dos isolados parasitários da criopreservação com obtenção das massas parasitárias. Dos 37 pacientes com LDi elegíveis para o estudo, não foi possível a recuperação dos

isolados de 24 deles. As razões incluíram o resultado negativo no cultivo, a não recuperação após o processo de criopreservação e a falta de dados nos registros de isolados. Nos estudos filogenéticos após sequenciamento dos alvos estudados houve perda adicional de um caso que não ficou adequado para análise e de seus respectivos controles, e de dois controles adicionais pelo mesmo motivo.

Inicialmente foi escolhida a amplificação dos genes da proteína GP63, seguida das técnicas LSSP e AFLP, porém decidimos utilizar o alvo kDNA já usado em estudos anteriores (AKHOUNDI et al., 2017; FAGUNDES et al., 2010). Sequenciamos também uma região mais polimórfica do gene hsp70, já utilizado em estudo de variabilidade (AUWERA et al., 2013; FRAGA et al., 2010) por se tratar de uma região genômica bastante conhecida. Este estudo mostrou que os isolados parasitários de pacientes com LDi apresentaram maior variabilidade genética em relação aos pacientes com LCL, embora não tenha sido possível demonstrar agrupamento distinto (clusters) entre casos com LDi e controles com LCL através dos alvos genéticos estudados (minicírculo do kDNA e gene codificador de hsp70). Futuros estudos com alvos distintos poderão ser realizados para aprimorar a verificação a respeito da existência de diferenças genéticas entre os parasitos isolados de casos com LDi e com LCL que possam auxiliar a compreender estas variadas expressões clínicas.

7. CONCLUSÕES

1 – O estudo de variáveis clínicas (tempo de evolução), laboratoriais (visualização de amastigotas no exame histopatológico e no exame direto; resultados positivos no PCR, sorologia e IDR) e de desfecho após tratamento inicial (cura ou recidiva) mostrou algumas diferenças, embora não significativas, entre os pacientes com LDi e LCL incluídos em nossa amostra por pareamento segundo sexo, idade e procedência.

2 - Apesar de algumas perdas nas análises de sequenciamento, foi possível realizar a caracterização genotípica das amostras isoladas de pacientes com LDi e LCL, utilizando como alvos regiões genômicas do minicírculo do DNA mitocondrial (kDNA) ou do DNA genômico (hsp70).

3 – A análise filogenética através dos alvos selecionados não mostrou diferenças entre os pacientes com LDi e com LCL em relação aos parâmetros clínicos estudados. Houve agrupamento genotípico em um cluster de isolados de pacientes (com LDi e com LCL) procedentes do município do Rio de Janeiro, mostrando similaridade entre eles.

4 – Os parasitos isolados de pacientes com LDi apresentaram maior variabilidade genética para o alvo de hsp70 e para o minicírculo de kDNA do que os pacientes com LCL.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8ª ed. Rio de Janeiro, 2015.

ANTONIO, L. F. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–380, set. 2014.

ARAÚJO PF. Herança vertical de sequências de minicírculos de kDNA de *Trypanosoma cruzi* integradas no genoma de células germinativas humanas. (Dissertação Mestrado em Patologia Molecular) Faculdade de medicina, Universidade de Brasília. Brasília, p.103. 2008.

AKHOUNDI, M. et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol. Aspects Med**, v. 57, p. 1-29, 2017.

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

AZAMBUJA de OJ et al. Mitochondrial DNA sequencing for assessment of genetic differences in sheep (*Ovis aries*). **J Selva Andina Anim Sci.**; 1(1):11-20, 2014.

AZEREDO-COUTINHO, R. B. et al. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 101, p. 735 –7, 2007.

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; TIBAYRENC, M. Evolutionary genetics and molecular diagnosis of *Leishmania* species. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. S9-S13, 2002.

BAPTISTA, C. et al. *Leishmania (V.) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. **Exp. Parasitol.**, v.121, n. 4, p. 317-22, 2009.

BAPTISTA, C. et al. Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. **J. Trop. Med.**, v. 2012, p. 808132, 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 10, p. 1097-1106, 2007.

BRAZ L. M. A. Tegumentary leishmaniasis diagnosis: what happened with MST (Montenegro Skin Test) in Brazil? **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 61, p. e17, 2019.

BRITO M. E. et al. Species diversity of *Leishmania* (V.) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. **Trop. Med. Int. Health**, v. 14, p. 1278–1286, 2009.

BEZERRA, J. M. T. et al. Burden of leishmaniasis in Brazil and federated units, 1990-2016: Findings from Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 12, n. 9, p. e0006697, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília, Editora do Ministério da Saúde, p. 190, 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf Citado em 01 de junho de 2020.

BRASIL, Ministério da Saúde. 2020a. **Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018**. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Casos.pdf> Acesso em 05/05/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde 2020b. **Coeficiente de detecção de casos de Leishmaniose Tegumentar por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2018**. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/25/LT-Coef-Detec---o.pdf> Acesso em 05/05/2021.

CAMPOS RM. Caracterização molecular de antígenos de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* potencialmente úteis no controle da Leishmaniose visceral. (Dissertação de mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife, p. 116. 2007.

CANTACESSI, C. et al. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 3, p. 100–108, 2015.

CARDOSO, T. et al. *Leishmania braziliensis* isolated from disseminated leishmaniasis patients downmodulate neutrophil function. **Parasite Immunol.**, v. 41, n. 5, p.e12620, 2019.

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

CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol.**, v. 135, p. 4144-4148, 1985.

CASGRAIN, P. A. et al. Cysteine peptidase B regulates *Leishmania mexicana* virulence through the modulation of GP63 Expression. **Plos Pathogens**, v. 12, n. 5, p. e1005658, 2016.

CASTRO NETO A. L. et al. In silico characterization of multiple genes encoding the GP63 virulence protein from *Leishmania braziliensis*: identification of sources of

variation and putative roles in immune evasion. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, p. 118, 2019.

CASTRO, S. V. et al. Proteínas de choque térmico HSP 70: Estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterin. Brasilica**, v.7, n.4, p.261-271, 2013.

CATALDO, J. I. et al. Immunoenzymatic assay for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis using soluble and membrane-enriched fractions from infectious *Leishmania (V.) braziliensis*. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 24, n. 5, p. 289-294, 2010.

CATAÑO, J. C.; PINZÓN, M. A. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a patient infected by *Leishmania panamensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 3, p. 489-490, 2019.

CAVALCANTI, M. P. et al. Quantitative real time PCR assays for the detection of *Leishmania (V.) braziliensis* in animals and humans. **Mol. Cel. Probes**, v. 27, n. 3-4, p. 122-128, 2013.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **J. Global Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, p. 111-167, 2010.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. **Acta Trop.**, v. 72, n. 3, p. 295-308, 1999.

CLAYTON, C. et al. Protein trafficking in Kinetoplastid Protozoa. **Microbiological reviews**, Washington, v. 59, n. 3, p. 325-344, 1995.

CORTES S et al. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l. - specific kinetoplastid primers. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 98: 12-17, 2004.

COUPPIÉ, P. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, n. 5, p. 558-560, 2004.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (V.) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3126-32, 2003.

DANTAS, M. L. et al. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 202-9, 2014.

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

DEGRAVE W, FERNANDES O., CAMPBELL D, BOZZA M., LOPES U. Use of molecular probes and detection and typing of *Leishmania* – a mini-review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 89(3): 463-469, 1994.

DIAZ, N. L. et al. In-intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. **Exp. Dermatol.**, v. 11, n. 1, p. 34-41, 2002.

ESPINOZA-MORALES, D. et al. An atypical case of disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania peruviana* in the Valleys of Ancash-Peru. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 10, n. 11, p. 1101-1103, 2017.

FAGUNDES, A. et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 109-112, 2010.

FERREIRA, L. T.; GOMES, A. H. S.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L. Genotype characterization of *Leishmania (V.) braziliensis* isolated from human and canine biopsies with American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 57, n. 3, p. 257-262, 2015.

FIETTO, J. L. R.; MACIEL, T. E. F. Sequenciando genomas. *In*: SLUYS MAV. Viagem pelo mundo genômico. **Editora Cubo**. 2016. P 27-64.

FOLGUEIRA, C. & REQUENA, J.M. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. **FEMS Microbiol Rev**31, 359–377, 2007.

FURTADO, T. Critérios para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 55, n. 2, p. 81-86, 1980.

FRAGA, J. et al. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infect. Genet. Evol.**, v. 10, n. 2, p. 238–245, 2010.

FRAGA TL et al. Polymerase chain reaction of peripheral blood as a tool for the diagnosis of visceral leishmaniasis in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 105(3): 310-313, May 2010.

GAGINI, T. et al. Genotypic profiles of *Leishmania (V.) braziliensis* strains from cutaneous leishmaniasis patients and their relationship with the response to meglumine antimoniate treatment: a pilot study. **Parasite**, v. 24, p. 34, 2017.

GALVÃO, C. E. et al. Leishmaniose cutânea disseminada produzida por *Leishmania Viannia braziliensis* no Estado do Maranhão - Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 26, n. 2, p. 121-123, 1993.

GARCIA L, KINDT A, BERMUDEZ H, LLANOS-CUENTAS A, DE DONCKER S, ARÉVALO J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for

clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **J Clin Microbiol.**;42(5):2294-7, 2004.

GOLLOB, K. J.; ANTONELLI, L. R. V.; DUTRA, W. O. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. **Trends Parasitol.**, v. 21, p. 347-350, 2005.

GOMES, R. F. et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Exp. Parasitol.**, v. 80, p. 681–687, 1995.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR- based for diagnosis of American cutaneous *Leishmaniasis* and identification of the parasite species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664-674, 2012.

GUEDES, D. C. et al. New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 50, n. 6, p. 788–794, 2017.

GUERBOUJ, S. et al. Evaluation of a gp63–PCR based assay as a molecular diagnosis tool in canine leishmaniasis in Tunisia. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105419, 2014.

GUERRA, J. A. et al. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, n. 3, p. 524 – 527, 2011.

GUERRA, J. A. O. et al. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 48, supl. I, p. 12-19, 2015.

GUIMARÃES LH et al. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. **Gaz. Méd Bahia**, v. 75, p. 66-74, 2005.

GUIMARÃES LH et al. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 103(7): 712–715, 2009.

HARTLEY MA et al., The immunological, environmental, and phylogenetic perpetrators of metastatic leishmaniasis. **Trends Parasitol.**; 30(8): 412–422. doi:10.1016/j.pt.2014.05.006. August 2014.

HOYA, R. et al. *Leishmania panamensis*: a 44bp deletion in gp63 gene is found in cDNA and genomic libraries. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 641–643, 1999.

INBAR, E. et al. Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*. **Plos Genetics**, v. 15, n. 5, p. e1008042, 2019.

ISHIKAWA, E. A. Y. et al. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, p. S111–S121, 2002.

JIRMANUS, L. et al. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, n. 3, p. 426-433, 2012.

KAUFMANN, S. H. E. Heat shock proteins and the immune response. **Immunology today**, Cambridge, v. 11, n. 4, p. 129–136, 1990.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G.C. Heat Shock Protein 70 kDa: Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology. **Pharmacology and therapeutics**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 183–201, 1998.

KLINGBEIL MM, ENGLUND PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. **PNAS**, vol. 101 no. 13, p. 4333–4334, March 30, 2004.

KOBETS, T.; GREKOV, I; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Current Medic. Chem.**, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

KREGEL. K. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. **J. Applied Physiol.**, v. 92, n. 5, p. 2177–2186, 2002.

KROLEWIECKI, A. J. et al. Reappraisal of leishmanin skin test (LST) in the management of American cutaneous leishmaniasis: a retrospective analysis from a reference center in Argentina. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 10, p. e0005980, 2017.

KUHLS, K. et al. Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania (V.)*. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 10, p. e2490, 2013.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., and TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35:1547-1549, 2018.

LACHAUD L et al. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral leishmaniasis using peripheral blood. **J Clin Microbiol** 39: 613-617, 2001.

LACHAUD, L. et al. Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40 p. 210–215, 2002.

LAGO, L. H. G. et al. Diabetes modifies the clinic presentation of cutaneous leishmaniasis. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 7, n. 12, p. ofaa491, 2020.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, KillickKendrick R, editors. **The leishmaniasis in Biology and Medicine**. London, Academic Press, p. 12-120, 1987.

LEOPOLDO, P. T. et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, p. 75, 2006.

LLANOS-CUENTAS, E. A. et al. Leishmaniasis cutanea diseminada asociada a metastasis en mucosas, causada por *Leishmania braziliensis braziliensis*: fracaso en el hallazgo de parasitos circulantes. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 271-272, 1985.

LINDOSO, J. A. et al. Unusual manifestations of tegumentar leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Br. J. Dermatol.**, v. 160, n. 2, p. 311 – 318, 2009.

LOPES, M. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). **Biotechn. Ciência Des.**, v. 5, n. 29, p. 56–60, 2002.

LOPES WR. VASCONCELOS SD. Representação e distorções conceituais do conteúdo “filogenia” em livros didáticos de biologia do ensino médio. **Ens. Pesqui. Educ. Ciênc.** (Belo Horizonte) 14 (3). Dez 2012.

LUZ, Z. M. P. et al. Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania* spp. from patients with cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 1, p. 62-66, 2009.

LYRA, M. R. et al. Clinical and epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis with genital involvement. **An. Bras. Dermatol.**, v. 95, n. 5, p. 641 – 644, 2020.

MACHADO, E. S. et al. Disseminated American muco-cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in a patient with AIDS: a case report. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 487 – 492, 1992.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **An. Bras. Dermatol.**, v. 94, n. 1, p. 9-16, 2019.

MACHADO P.R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 105, n. 8, p. 438-444, 2011.

MACHADO, P. R. et al. Treatment of disseminated leishmaniasis with liposomal amphotericin B. **Clin. Infect. Dis.**, v. 61, n. 6, p. 945-949, 2015.

MAGALHÃES, A. et al. Anti-*Leishmania* IgG is a marker of disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 106, p. 83-90, 2021.

MARIZ, B. A. L. A. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis with oral involvement in a patient of Northern Mexico. **Trop. Doct.**, v. 49, n. 4, p. 303-6, 2019.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detection of *Leishmania braziliensis* DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 3, 2010.

MARCUSSI et al. *Leishmania (V.) braziliensis*: New primers for identification using polymerase chain reaction. **Exp. Parasitol.**, v 120, p. 300–305, 2008.

MARZOCHI, M. C. DE A.; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Cad. Saúde Públ.**, v. 10, n. suppl 2, p. S359–S375, 1994.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. HSP70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cel. Molec. Life Sci.**, v. 62, p. 670-684, 2005.

MAYER, M.P. HSP70 chaperone dynamics and molecular mechanism. **Trends in Biochemical Sciences**, Vol.38, No.10, october 2013.

MELLO, C. X. et al. Comparison of the sensitivity of impressão em lâmina and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol. Res.**, v. 109, p. 927, 2011.

MELLO C. X.; MADEIRA M. F. Skin scraping is the most accessible technique for the parasitological diagnosis of American tegumentary leishmaniasis **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 5, p. 1082, 2015.

MEMBRIVE, N. A. ET AL. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 59, p. e37, 2017.

MIRANDA L. F. C. et al. Geospatial analysis of tegumentar leishmaniasis in Rio de Janeiro state, Brazil from 2000 to 2015: Species typing and flow of travelers and migrants with leishmaniasis. **PLoS Negl Trop. Dis.**, v. 13, n. 11, p. e0007748, 2019.

MORGADO, F. N. et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? **Br. J. Dermatol.**, v. 158, p. 50-58, 2008.

MORGADO, F. N. et al. Unbalanced inflammatory reaction could increase tissue destruction and worsen skin infectious diseases – a comparative study of leishmaniasis and sporotrichosis. **Scient. Rep.**, v. 8, p. 2898, 2018.

MUKHOPADHYAY, I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). **Environ. Health Persp.**, v. 111, n. 16, p. 1926-1932. 2003.

ODIWUOR, S. et al. Leishmania AFLP: Paving the way towards improved molecular assays and markers of diversity. **Infect. Genet. Evol.**, v. 11, n. 5, p. 960–967, 2011.

OLIVEIRA, D. M. et al. Comparison of different primers for PCR-based diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 204-210, 2011.

OLIVEIRA GM. Uso de técnicas moleculares na detecção de DNA parasitário e no estudo de variabilidade genética em diferentes fragmentos teciduais de cães naturalmente infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*. (Dissertação Mestrado em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 41. 2013.

OLIVEIRA, P. R. D. et al. Análise da diversidade genética por AFLP e identificação de marcadores associados à resistência a doenças em videira. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 27, n. 3, p. 454–457, 2005.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C. et al. Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study. **BMC Infect. Dis.**, v. 17, p. 559, 2017.

OLIVEIRA, F. S. et al. American tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis*: assessment of parasite genetic variability at intra- and inter-patient levels. **Parasit. Vect.**, v. 6, p.189, 2013.

OLIVEIRA-NETO et al. Leishmaniasis recidiva cútis in New World cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v. 37, n. 11, p. 646-849, 1998.

ORGES-OSÓRIO, M L, ROBINSON, W M. Genética Humana. **ArtMed.**, pg. 574, 2013.

PACHECO RS, LOPES UG, MOREL CM, GRIMALDI G JR, MOMEN H. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. In *Leishmania. Taxonomy and Phylogeny*. Edited by Rioux JA. Montpellier: IMEEE; p. 57–65, 1986.

PACHECO, R. S. et al. Population heterogeneity among clones of New World *Leishmania* species. **Parasitol.**, v. 100, p. 393-8, 1990.

PACHECO, R. S. et al. Intraspecific heterogeneity in the mini-exon gene localization of *Leishmania (V.) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* from Colombia. **J. Parasitol.**, 86:1250–1253, 2000.

PANDEY BD et al. Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. **Am J Trop Med Hyg.** 80: 580-582. 2009.

PEDRAL-SAMPAIO, G. et al. Detection of IgG anti-*Leishmania* antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **Plos ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162793, 2016.

PEREIRA, R.P. Estudo comparativo das características clínicas e da resposta imune in situ entre pacientes com forma cutânea localizada e forma cutânea disseminada da Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica

e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2014. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017.

PORFIRIO-PASSOS, G. et al. Métodos para diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana - Revisão. **Encicl. Biosfera**, v. 8, n. 15, p. 1233, 2012.

QUEIROZ, A. et al. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (V.) braziliensis* strain polymorphisms. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 12, p. 4028-34, 2012.

QUINTELLA, L. P., et al. Immunoperoxidase technique using an anti-*Leishmania (l.) chagasi* hyperimmune serum in the diagnosis of culture-confirmed American tegumentary leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 51, n. 2, p. 83-6, 2009.

RAFATI, S. et al. *Leishmania major* heat shock protein 70 (Hsp70) is not protective in murine models of cutaneous leishmaniasis and stimulates strong humoral responses in cutaneous and visceral leishmaniasis patients. **Vaccine**, v. 25, n. 21, p. 4159-4169, 2007.

RAMAMOORTHY, R. et al. Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 3, p. 1888-1895, 1992.

RASTI, S. et al. Comparison of molecular, microscopic, and culture methods for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 30, n. 5, p. 610-5, 2016.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Rev. Entomol.**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.

RÊGO, F. D. et al. Genetic variant strains of *Leishmania (V.) braziliensis* exhibit distinct biological behaviors. **Parasitol. Res.**, v. 117, p.3157–3168, 2018.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

REITHINGER R, DUJARDIN JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. **Jour. Of Cinic. Microb.**, p. 21-25, jan. 2007.

RESTREPO, C. M. et al. AFLP polymorphisms allow high resolution genetic analysis of American tegumentary leishmaniasis agents circulating in Panama and other members of the *Leishmania* genus. **Plos ONE**, v. 8, n. 9, e73177, 2013.

ROBERT, J. Evolution of heat shock protein and immunity. **Developmental and comparative immunology**, Elmsford, v. 27, p. 449–464, 2003.

ROCHA, R. D. R. et al. Clinical value of anti-live *Leishmania (V.) braziliensis* immunoglobulin G subclasses, detected by flow cytometry, for diagnosing active

localized cutaneous leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health**, v. 11, n. 2, p. 156–166, 2006.

RODGERS MR, POPPER SJ, WIRTH DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. **Exp Parasitol**; 71: 267-275, 1990.

ROUGERON, V.; DE MEEUS, T.; BANULS, A. L. A primer for *Leishmania* population genetic studies. **Trends Parasitol.**, v. 31, n. 2, p. 52–9, 2015.

ROUGERON, V. et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 106, p. 10224–10229, 2009.

SÁ, B. S. L. F. et al, Identification of divergent *Leishmania (V.) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 13. n. 6, p. e0007382, 2019.

SALES, K. G. S. et al. Home sweet home: sand flies find a refuge in remote indigenous villages in north-eastern Brazil, where leishmaniasis is endemic. **Parasites Vectors**, v. 12, n. 1, p. 118, 2019.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS YS. Detecção e caracterização de *Leishmania* em espécimes clínicos por amplificação do gene hsp70 e análise dos perfis de restrição enzimática dos produtos amplificados. (Dissertação de mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 73. 2019.

SARKARI, B. et al. Performance of an ELISA and indirect immunofluorescence assay in serological diagnosis of zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. **Interdiscipl. Persp. Infect. Dis.**, v. 2014, p. 505134, 2014.

Sequenciamento por eletroforese de capilar (Sanger) – RPT01A - Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ.

SCHNEIDER, P. et al. *Leishmania major*. Differential regulation of the surface metalloprotease in amastigote and promastigote stages. **Exp. Parasitol.**, v. 75, n. 2, p. 196–206, 1992.

SCHRANER, C. et al. Successful treatment with miltefosine of disseminated cutaneous leishmaniasis in a severely immunocompromised patient infected with HIV-1. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 12, p e120-e124, 2005.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 8, p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, T. G. et al. The laboratory diagnosis and epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Paraná State, southern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 4, p. 413-423, 1999.

SIMPSON L. The mitochondrial genome of Kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Ann Rev Microbiol**; 41: 363-382, 1987.

SINGH, S.; DEY, A.; SIVAKUMAR, R. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. **Expert Rev. Mol Diagn.**, v. 5, n. 2, p. 251-265, 2005.

SNEATH, P H; SOKAL, R R. Numerical taxonomy: The principle and practice of numerical classification. **W H Freeman**. San Francisco, USA, 1973.

SOLCA, M. S. et al. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) for detection of *Leishmania* in spleen samples from naturally infected dogs. **Vet. Parasitol.**, v. 184, p. 133–140, 2012.

SOUSA, A. Q., et al. Press imprint smear: a rapid, simple, and cheap method for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 5, p. 905–7, 2014.

SOUSA AQ., et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis and alcohol misuse, northeast Brazil, 2015–2018. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 27, No. 9, September 2021.

SOUZA, A. P. et al. Towards a more precise serological diagnosis of human tegumentar leishmaniasis using *Leishmania* recombinant proteins. **PLoS ONE**. v. 8, n. 6, p. e66110, 2013.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites Vectors**. v. 9, n. 1, p. 277, 2016.

STARK D et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. **J Clin Microbiol** 44: 1178-1180, 2006.

SZARGIKI. R et al. Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 1, p.47-52, 2009.

TAMURA K. and NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molec. Biol. Evol.** 10:512-526, 1993.

TIBAYRENC, M. et al. *Leishmania* and the clonal theory of parasitic protozoa. **Arch. Inst. Pasteur Tunis.**, v. 70, p. 375–382, 1993.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.87, p. 2414–2418, 1990.

TSUKAYAMA, P. et al. A FRET-based real-Time PCR assay to identify the main causal agents of New World tegumentary leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 7, n. 1, p. e1956, 2013.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 12, p. 1829-1834, 2002.

VERGEL, C.; WALKER, J.; SARAVIA, N. G. Amplification of human DNA by primers targeted to *Leishmania* kinetoplast DNA and post-genome considerations in the detection of parasites by a polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 72, n. 4, p. 423-429, 2005.

VIEIRA-GONÇALVES, R. et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. **Int. J. Dermatol.**, v. 47, n. 9, p. 926-932, 2008.

VITA, G. F., et al. Status of the American tegumentary leishmaniasis in the state of Rio de Janeiro, Brazil, from 2004 to 2013. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 58, p. 71, 2016.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 21, p. 4407–4414, 1995.

WINNICK K. DNA Sequencing Industry Sets its Sights on the Future. Website last modified on September 27, 2004. Disponível em: <http://www.thescientist.com/?articles.view/articleNo/15939/title/DNA-Sequencing-Industry-Sets-its-Sights-on-the-Future/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical report series 949. **Control of leishmaniases**. Geneva, WHO press, 2010, 186 p.

WHO [HOMEPAGE NA INTERNET]. **Leishmaniasis**. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 Acesso em 01/07/2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Status de endemidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2019. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/leishmaniasis/leishmaniasis-cl-2019.pdf?sfvrsn=7b1eedab_7 Acesso em 01/07/2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Acesso a medicamentos e tratamento antileishmanial essenciais. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/research/en/> . Acesso em 17/07/2020.

ZÜGEL, U.; KAUFMANN, S. H. E. Role of Heat Shock Proteins in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. **Clin. micróbio. ver.**, Washington, v. 12, n. 1, p. 19–39, 1999.

ANEXO I: TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Nós, Elizabeth Cristina Araújo Ferreira da Silva, aluna de doutorado, Maria Inês Fernandes Pimentel, orientadora, e Aline Fagundes da Silva, orientadora do projeto de pesquisa intitulado "Estudo molecular comparativo entre parasitos isolados de pacientes com formas cutânea localizada e disseminada da leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2018", comprometemo-nos a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto serão mantidos em um banco de dados sob a responsabilidade dos orientadores.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando abertos novos protocolos.

Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2019.


Elizabeth Cristina Araújo Ferreira da Silva


Maria Inês Fernandes Pimentel


Aline Fagundes da Silva

ANEXO II - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/INI

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo molecular comparativo entre parasitos isolados de pacientes com formas cutânea localizada e disseminada da leishmaniose tegumentar americana, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, 1989 a 2018

Pesquisador: Maria Inês Fernandes Pimentel

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 28575220.4.0000.5262

Instituição Proponente: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

Patrocinador Principal: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS - INI/FIOCRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.845.376

Apresentação do Projeto:

Sgundo o arquivo PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1453315.pdf:

A leishmaniose disseminada (LDi) caracteriza-se por um número elevado (10) de lesões cutâneas polimórficas, provavelmente devido à disseminação hemática dos parasitos, atingindo partes distintas do tegumento, podendo ou não ser acompanhada de acometimento de mucosas. Pode ser causada por espécies distintas de Leishmania e é relativamente infrequente no contexto da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Sua resposta ao tratamento específico é alvo de controvérsia: pode responder bem ao tratamento convencional com antimoniais pentavalentes, entretanto existem casos descritos de resistência medicamentosa. Questões relativas aos parasitos isolados destes casos permanecem a serem respondidas. O objetivo deste estudo é a comparação do perfil genético dos parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com forma cutânea localizada da doença, atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica e Vigilância em Leishmanioses, que constitui um centro de referência para atendimento de casos de LTA no estado do Rio de Janeiro. Serão estudados isolados de Leishmania spp. de pacientes atendidos entre 1989 e 2018. Será realizado um estudo genotípico dos isolados derivados de fragmentos de lesões cutâneas obtidos através de procedimento de biópsia, antes do tratamento, comparando-se isolados dos pacientes com LDi com isolados daqueles com forma cutânea localizada unilesional de LTA. Serão

Endereço: Avenida Brasil 4365

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3865-9585

E-mail: cep@ini.fiocruz.br

INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ



Continuação do Parecer: 3.845.376

utilizadas técnicas moleculares, como AFLP e sequenciamento, para genes mitocondriais (minicirculos do kDNA) de produtos amplificados dos genes referidos acima. Espera-se esclarecer aspectos genotípicos dos isolados parasitários, que possam auxiliar na elucidação do comportamento diferenciado da doença nos pacientes com LDi, quando comparados aos que desenvolvem formas localizadas de leishmaniose cutânea.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar comparativamente características genotípicas dos parasitos isolados de pacientes com LDi e de pacientes com LCL atendidos no laboratório de pesquisa clínica e vigilância em leishmanioses (LaPClinVigiLeish), Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), entre 1989 e 2018. Objetivo Secundário: 1- Descrever genotipicamente os parasitos isolados dos pacientes com LDi e dos pacientes com LCL, atendidos no LaPClinVigiLeish entre 1989 e 2018. 2- Comparar genotipicamente os parasitos isolados dos pacientes com LDi com os de pacientes com LCL, pareados segundo sexo, idade e possível local de infecção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Como serão utilizadas informações do prontuário dos pacientes, o risco principal é o risco de confidencialidade. Este risco será minimizado pelo acesso dos bancos de dados em computadores institucionais mediante senha pessoal. Adicionalmente, foi assinado um termo de compromisso e responsabilidade pela aluna de mestrado e suas orientadoras.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos para os participantes. Os benefícios serão indiretos, pelo aumento do conhecimento acerca das formas clínicas disseminadas e do possível papel das diferenças genotípicas dos parasitos no estabelecimento de formas clínicas típicas e formas disseminadas da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Vide campo Conclusões e Pendências.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo Conclusões e Pendências.

Recomendações:

Vide campo Conclusões e Pendências.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto sem impedimentos éticos.

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

**INSTITUTO NACIONAL DE
INFECTOLOGIA EVANDRO
CHAGAS - INI / FIOCRUZ**



Continuação do Parecer: 3.845.376

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1453315.pdf	31/01/2020 17:16:10		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMolecularLTADisseminada.doc	31/01/2020 17:14:26	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	31/01/2020 17:04:36	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Outros	DeclaracaoCompromissoResponsabilidade.pdf	21/10/2019 14:36:42	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito
Outros	PedidoDispensaTCLE.pdf	21/10/2019 14:34:22	Maria Inês Fernandes Pimentel	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 18 de Fevereiro de 2020

Assinado por:
Mauro Brandão Carneiro
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Brasil 4365
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3865-9585 E-mail: cep@ini.fiocruz.br

ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido¹

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS – FIOCRUZ

COORDENADOR DA PESQUISA: ARMANDO DE OLIVEIRA SCHUBACH

ENDEREÇO: Av. Brasil 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - CEP 21040-900

TELEFONES (0xx21) 3865-9525 / 3865-9609 / FAX (0xx21) 3865-9541

NOME DO PROJETO DE PESQUISA: ESTUDO PARA A SISTEMATIZAÇÃO DO ATENDIMENTO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NO CENTRO DE REFERÊNCIA EM LTA - INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS - FIOCRUZ

NOME DO VOLUNTÁRIO:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença que atinge seres humanos e animais, incluindo o cão, causada por parasitos chamados Leishmanias. A doença é transmitida pelo "mosquito palha", que vive em regiões de mata, plantações de banana, manga etc. localizadas próximas às moradias humanas, onde costuma entrar para se alimentar de sangue de pessoas e animais domésticos. A LTA se apresenta como feridas na pele de difícil cicatrização. Algumas vezes, a LTA pode se tornar mais grave, envolvendo as mucosas de revestimento interno do nariz e da garganta, mesmo vários anos após a cicatrização da ferida na pele. Atualmente, não temos como saber qual paciente adoecerá de novo e qual permanecerá curado definitivamente.

Outras doenças como infecções por bactérias, tuberculose, sífilis, esporotricose, outras micoses, tumores etc. podem se manifestar de forma parecida com a leishmaniose e precisam

¹ 1ª via: Prontuário Médico

2ª via: Paciente

ser diferenciadas para que se possa iniciar o tratamento correto. Entretanto, com os exames existentes atualmente, nem sempre se consegue ter certeza absoluta sobre qual a doença em questão.

No momento, várias perguntas precisam ser respondidas como: de que outras maneiras a LTA pode se manifestar? Como se comportam os exames de laboratório antes, durante e após o tratamento? Quais pacientes, mesmo após o tratamento, irão reabrir suas cicatrizes ou irão desenvolver doença dentro do nariz ou na garganta? Que outras doenças parecidas estão sendo confundidas com a LTA e quais exames devem ser utilizados para esclarecimento? Qual o papel dos seres humanos como reservatórios da doença? Quais as melhores formas de tratamento? Que medidas devem ser tomadas para controlar o problema?

Pelo presente documento, você está sendo convidado (a) a participar de uma investigação clínica a ser realizada no IPEC-Fiocruz, com os seguintes objetivos:

- ✓ Descrever aspectos da LTA: manifestações clínicas e exames de laboratório, tentando estabelecer padrões de apresentação da doença e seu modo de evolução, comparando com outras doenças.
- ✓ Avaliar o uso dos antimoniais e outras drogas utilizadas no tratamento da LTA levando em consideração o tempo de tratamento, toxicidade, facilidade de administração, custo e ausência de envolvimento das mucosas do nariz e da garganta.
- ✓ Isolar, identificar e comparar as leishmanias causadoras da LTA provenientes de diversas localidades.

Este documento procura esclarecê-lo sobre o problema de saúde em estudo e sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, detalhando os procedimentos e exames, benefícios, inconvenientes e riscos potenciais.

A sua participação neste estudo é voluntária. Você poderá recusar-se a participar de uma ou todas as etapas da pesquisa ou, mesmo, se retirar dela a qualquer momento, sem que este fato lhe venha causar qualquer constrangimento ou penalidade por parte da Instituição. O seu atendimento médico não será prejudicado caso você decida não participar ou caso decida sair do estudo já iniciado. Os seus médicos poderão também interromper a sua participação a qualquer momento, se julgarem conveniente para a sua saúde.

A sua participação com relação ao Projeto consiste em autorizar a realização de uma série de exames para o diagnóstico da sua doença, e que parte deste material, assim como os resultados destes exames de rotina, sejam utilizados neste estudo. Também será necessária a

sua autorização: 1) para a utilização de documentação fotográfica ou filmagem de suas lesões para estudo 2) para que parte do material coletado periodicamente para a realização de exames para acompanhamento da evolução da sua doença, assim como os resultados destes exames de rotina e do seu tratamento sejam utilizados neste estudo 3) para que parte das amostras coletadas seja estocada a fim de servir para outros estudos que tenham como finalidade a melhor compreensão da doença, o desenvolvimento e avaliação de novos métodos diagnósticos; avaliação da resposta ao tratamento etc., desde que tal estudo seja previamente analisado e autorizado por um Comitê de Ética em Pesquisa.

Os exames e procedimentos aplicados lhe serão gratuitos. Você receberá todos os cuidados médicos adequados para a sua doença.

Participando deste estudo você terá algumas responsabilidades: seguir as instruções do seu médico; comparecer à unidade de saúde nas datas marcadas; relatar a seu médico as reações que você apresentar durante o tratamento, tanto positivas quanto negativas.

Caso você necessite de atendimento médico, durante o período em que estiver participando do estudo, procure o Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz, mesmo fora do seu agendamento. Em caso de necessidade ligue para a Dra Cláudia Maria Valete Rosalino, Dra. Maria Inês Pimentel, Dr. Marcelo Rosandiski Lyra, Dra. Mariza Salgueiro ou Dr. Armando de Oliveira Schubach nos telefones acima. Caso você apresente qualquer quadro clínico que necessite de internação, a equipe médica providenciará seu leito no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas - Fiocruz.

Sua identidade será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo poderão ser publicados sem revelar a sua identidade e suas imagens poderão ser divulgadas desde que você não possa ser reconhecido. Entretanto, se necessário, os seus registros médicos estarão disponíveis para consulta para a equipe envolvida no estudo, para o Comitê de Ética em Pesquisa, para as Autoridades Sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do estudo, assim como a qualquer momento durante o tratamento. O seu médico deverá oferecer todas as informações necessárias relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, e a eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo.

Procedimentos, exames e testes que serão utilizados:

Antes do tratamento haverá coleta de informações sobre a doença; exame médico geral e exame da pele com descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões; exame

interno do nariz e da garganta com um aparelho chamado fibra ótica, que permite ver lesões pequenas ou em locais de difícil acesso, para descrição e documentação fotográfica ou filmagem das lesões (se necessário será aplicado "spray" anestésico local). Retirada, com anestesia local, de um pequeno fragmento de "íngua", de pele ou de mucosa (lesadas ou aparentemente saudáveis) para realização de exames tanto para diagnóstico (aspecto microscópico do tecido e culturas para tentativa de isolamento de possíveis agentes de doença como fungos, bactérias e leishmanias) quanto para pesquisa (identificação de células e outros componentes da resposta inflamatória, assim como novos métodos de identificação dos possíveis agentes da doença). Outros materiais também poderão ser coletados na tentativa de isolamento do agente causador da doença: aspiração com seringa e agulha do bordo da lesão e de secreções em lesões de pele fechadas.

Outros exames também serão realizados para diagnosticar outras doenças possíveis de serem confundidas com a LTA, para classificar a gravidade da doença e avaliar os efeitos dos medicamentos a serem utilizados durante o seu tratamento: um a quatro testes cutâneos (injeção da décima parte de um mililitro de um reativo para determinada doença na pele da região anterior do antebraço, a qual deverá ser revista entre 2 a 3 dias após a injeção); exames de sangue (quantidade equivalente a aproximadamente três colheres de sopa), exame de saliva (coletada com um tipo de cotonete), radiografia dos pulmões e da face (se necessário complementada por tomografia computadorizada); exames da audição e do equilíbrio (se necessários); exames fonoaudiológicos para testar motricidade oral, fala e deglutição (se necessários); exame odontológico (se necessário); acompanhamento fonoaudiológico (se necessário); avaliação nutricional e dietética (se necessário); e eletrocardiograma.

O tratamento da LTA em pacientes humanos costuma ser com o medicamento glucantime por via intramuscular (IM), intravenosa (IV) uma injeção ao dia, geralmente, durante um período de 30 dias contínuos ou com intervalos de descanso. Excepcionalmente, para idosos, pacientes com doenças graves ou que não tolerem o tratamento normal, poderá ser utilizada a via intralesional (IL). O tempo do tratamento poderá ser diminuído ou aumentado conforme a necessidade. Outras opções de tratamento são a anfotericina B (IV) e a pentamidina (IM), ambas injetáveis e necessitando medidas de acompanhamento parecidas com as do glucantime.

Após o início do tratamento, você deverá comparecer a aproximadamente três consultas dentro de 10, 20 e 30 dias. Caso as lesões não cicatrizem totalmente, o tratamento poderá ser continuado pelo período de tempo necessário. Ao se atingir a cura clínica, você deverá retornar

para consulta de reavaliação em 1, 3, 6, 9 e 12 meses após o término do tratamento. E, a partir de então, pelo menos uma vez por ano durante um prazo indefinido (no mínimo 5 anos).

A cada retorno deverão ser realizados avaliação médica e exames de sangue (na quantidade aproximada de uma ou duas colheres de sopa) para avaliar os efeitos dos medicamentos utilizados no seu tratamento e/ou para avaliar a evolução da doença. Outros exames, como o eletrocardiograma durante o tratamento, poderão ser realizados quando indicados.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos até os dias atuais:

A coleta de sangue poderá causar alguma dor no momento da punção venosa e, eventualmente, poderá haver a formação de uma área arroxeadada no local, que voltará ao normal dentro de alguns dias.

Ocasionalmente, os testes na pele poderão apresentar uma reação forte com inflamação do local, formação de bolhas e, mais raramente, formação de ferida. Todo o processo costuma regredir dentro de alguns dias a poucas semanas.

Tanto os testes na pele quanto o anestésico injetado no momento da biópsia (retirada de um pequeno fragmento de pele para exame) poderão causar alergia, geralmente limitada ao aparecimento de áreas vermelhas, empoladas e com coceira na pele e que respondem bem a medicamentos anti-alérgicos. Mais raramente poderá haver uma reação mais severa com dificuldade de respirar e necessidade de cuidados mais intensos, existentes no IPEC.

No local da biópsia poderá ocorrer inflamação e dor, acompanhados ou não de infecção por bactérias. Caso isso ocorra, poderá ser necessário o uso de medicamentos para dor e antibióticos.

Os medicamentos glucantime e pentamidina costumam causar efeitos indesejáveis, não devem ser utilizados na gravidez e seu uso em mulheres em idade reprodutiva deve ser acompanhado de uso de método anticoncepcional eficaz como preservativo de látex masculino ou feminino ("camisinha"), diafragma feminino ou anticoncepcional oral ("pílula"). Quando o tratamento não puder ser adiado, a anfotericina B poderá ser utilizada na gravidez. Os exames com raios-x também não devem ser realizados em grávidas.

Formas de ressarcimento:

Sempre que necessário, nos dias de seu atendimento, poderá ser fornecida alimentação conforme rotina do Serviço de Nutrição e Serviço social do IPEC para pacientes externos.

Benefícios esperados:

Espera-se que, ao final do tratamento, você esteja curado da LTA, embora as consultas de retorno por vários anos após o tratamento sejam necessárias para a confirmação da cura. Os resultados deste estudo poderão ou não o beneficiar diretamente, mas no futuro, poderão beneficiar outras pessoas, pois espera-se também que este estudo contribua para que o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de pacientes com LTA possa ser feito de forma mais eficaz e segura.

Caso a sua investigação demonstre outro diagnóstico diferente de LTA, você será devidamente orientado a buscar o tratamento mais adequado para o seu caso.

Declaro que li e entendi todas as informações referentes a este estudo e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica, a qual estará à disposição para responder minhas perguntas sempre que eu tiver dúvidas.

Recebi uma cópia deste termo de consentimento e pelo presente consinto, voluntariamente, em participar deste estudo de pesquisa.

_____	_____
Nome paciente:	Data
_____	_____
Nome médico:	Data
_____	_____
Nome testemunha ² :	Data

² Apenas no caso de pacientes impossibilitados de manifestar o seu consentimento por escrito.

No caso de menores de 18 anos, deverá ser assinado pelo pai, mãe ou responsável legal.

Nome testemunha²:

—

Data