



Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Ciências Médicas

Laboratório Interdisciplinar de Biociências- LabIBC

Aspectos imunológicos e moleculares correlacionados às manifestações clínicas da Leishmaniose tegumentar americana

Aluna: Bruna Caroline Vêras de Carvalho

Orientadora: Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo

Coorientadora: Dra. Mariana Machado Hecht

Brasília – DF
2018

Bruna Caroline Vêras de Carvalho

**Aspectos imunológicos e moleculares
correlacionados às manifestações clínicas da
Leishmaniose tegumentar americana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF
2018

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Interdisciplinar de Biociências (LabIBC), Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: FAP-DF / CNPq / CAPES

*Uns confiam em carros, outros, em cavalos;
nós, porém, nos gloriaremos no nome
do SENHOR, nosso Deus.*

(Bíblia, Salmos 20:7)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo e Maria
e à minha irmã Ana Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita graça sobre minha vida.

À minha orientadora, Nadjar Nitz, pela oportunidade, pelo cuidado, pela paciência e por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica.

À minha coorientadora, Mariana Hecht, por estar sempre disposta a ajudar e ensinar, pelas palavras de ânimo e pela dedicação que teve neste trabalho.

Ambas demonstram um amor por seus alunos e pela pesquisa raro de se ver.

Às amigas, Tamires, Aline, Marcelle e Ester, por compartilharem experiências, histórias, aprendizados e risadas. Agradeço pelo apoio, pelo consolo, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, pelos lanches e principalmente pela amizade ao longo desses anos.

Aos queridos, Ana de Cássia Rosa, Bruno Dallago e Luciana Hagström, por todo auxílio prestado, conhecimentos empregados e tempo dedicado para que este trabalho fosse realizado.

Agradeço também aos companheiros de laboratório: Andressa, Carol, Dani, Fernanda, Geysa, Hanid, Isabella, Moisés, Nayra, Nicole, Rosa, Taís Milene, Tayane, Thaís Minuzzi, Thais Veras e Zenilda, que tornaram os dias leves, as noites divertidas e permitiram que esse mestrado fosse possível, seja pela ajuda na bancada ou por dividirem suas experiências comigo.

Faço um agradecimento especial ao Dr. Ciro Martins Gomes e à Jaqueline Osiro que me acolheram e gentilmente permitiram que eu os acompanhasse na rotina do ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília.

Aos estagiários Bárbara, Dimitri, Tatiana e Victória por contribuírem na realização de diversos experimentos.

Ao amigo, Búzios, pelo incentivo e por compartilhar dos bons e maus momentos, mesmo que de longe.

Aos muitos amigos que me apoiaram neste momento, entenderam minha ausência e que oraram e torceram por mim.

Aos meus pais, Paulo e Maria, por todo amor e tempo dedicados na minha formação como pessoa e como profissional.

À minha irmã Ana Paula e ao meu cunhado Heitor, por todo carinho, cuidado e alegria que acrescentam aos meus dias.

Aos pacientes que aceitaram participar da pesquisa.

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença tropical negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas classificadas como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LCDs), leishmaniose cutânea difusa (LCDf) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão das lesões ainda não estão completamente elucidados, sendo essencial conhecer os fatores que atuam na patogênese da doença e como eles contribuem para a diversidade de apresentações dos sintomas para melhor atendimento e tratamento dos pacientes. Neste trabalho, avaliou-se aspectos imunológicos e moleculares da LTA em indivíduos provenientes de áreas endêmicas do Brasil a fim de se verificar como esses aspectos estão associados às diversas manifestações clínicas da doença. A população do estudo foi composta por 30 pacientes provenientes de Corte de Pedra (Bahia) e 45 pacientes de diversas localidades atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HUB) (Distrito Federal). Os indivíduos foram avaliados quanto à sintomatologia, sexo, idade, procedência, carga parasitária, produção de anticorpos e de citocinas. Além disso, foi analisada a influência da diversidade do parasito pela identificação de espécies de *Leishmania* e foi realizada pesquisa do vírus de RNA de *Leishmania* (LRV1) nas amostras. Foram coletadas amostras de sangue e de soro de todos os pacientes e biópsias dos indivíduos que apresentavam lesões ativas. A parasitemia foi determinada por qPCR direcionada ao kDNA do parasito e a presença do LRV1 foi avaliada por qRT-PCR e RT-PCR. A identificação das espécies de *Leishmania* se deu mediante sequenciamento dos produtos de PCR da região espaçadora do gene de RNA ribossomal ITS1. O método sorológico ELISA foi utilizado para a determinação de IgG anti-*Leishmania* e a citometria de fluxo para a dosagem das citocinas. Dos 75 pacientes avaliados, 23 (31%) pacientes eram assintomáticos, 34 (45%) pacientes apresentaram LCL primária, 10 (13%) pacientes apresentavam LCL recidiva e oito (11%) pacientes apresentavam LMC. O diagnóstico sorológico identificou 60 (80%) casos positivos e foi mais sensível para o grupo assintomático. As citocinas TNF, IFN- γ , IL-17A e IL-2 foram diretamente

relacionadas a grupos clínicos específicos. As diferenças nas concentrações de citocinas e sua correlação com os grupos clínicos avaliados reforçam a importância do sistema imune do hospedeiro na manifestação dos sintomas. O teste molecular detectou 45 (60%) pacientes positivos, sendo que a maior carga parasitária foi relatada em pacientes de Corte de Pedra com lesão ativa. As espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* foram identificadas. Não foi demonstrada diferença estatística significativa na titulação de anticorpos e na carga parasitária entre os indivíduos com diferentes manifestações clínicas, não sendo possível relacionar esses fatores à severidade dos sintomas. Ademais, o LRV1 não foi detectado em nenhuma amostra. Isso nos levou a realizar experimentos *in vitro* com a finalidade de avaliar a influência do LRV1 na infectividade e na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente e anfotericina B. Os resultados indicaram que o LRV1 não altera a taxa de infectividade das espécies de *Leishmania*, porém sua presença pode estar relacionada à resistência ao tratamento com antimonial pentavalente. Os resultados obtidos corroboram que múltiplos fatores atuam em associações complexas para resultar no amplo espectro sintomático da LTA, contudo é necessária a realização de novos estudos, com número amostral maior, para que se possa expandir o conhecimento acerca desses fatores.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar, manifestações clínicas, diagnóstico, citocinas, LRV1.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a neglected tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Transmission occurs mainly by the bite of infected female sandflies. ATL presents a wide spectrum of clinical manifestations classified as cutaneous leishmaniasis (CL), disseminated leishmaniasis (DL), diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) and mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The mechanisms involved in the development and progression of the lesions have not yet been fully elucidated and is essential to understand the factors that act in the pathogenesis of the disease and how they contribute to the diversity of presentations of the symptoms for better care and treatment of the patients. In this study, immunological and molecular aspects of ATL were evaluated in individuals from endemic areas of Brazil in order to verify how these aspects are associated with the clinical manifestations of ATL. The study population was 30 patients from Corte de Pedra (Bahia) and 45 patients from different locations attended at the University Hospital of Brasília (UHB) (Federal District). The individuals were evaluated for symptomatology, sex, age, origin, parasite load, production of antibodies and of cytokines. In addition, the influence of parasite diversity on the identification of *Leishmania* species and *Leishmania* RNA virus (LRV1) in the samples was analyzed. Blood and serum samples from all patients and biopsies of individuals with active lesions were collected. Parasitemia was determined by qPCR directed to kDNA of the parasite and the presence of LRV1 was evaluated by qRT-PCR and RT-PCR. Identification of the *Leishmania* species was performed by sequencing the ribosomal RNA gene ITS1. ELISA was used for the determination of anti-*Leishmania* IgG and flow cytometry for cytokine dosing. Of the 75 patients evaluated, 23 (31%) patients were asymptomatic, 34 (45%) patients had primary CL, 10 (13%) patients had recurrent CL, and eight patients (11%) had MCL. The serological diagnosis identified 60 (80%) positive cases and was more sensitive to the asymptomatic group. TNF, IFN- γ , IL-17A and IL-2 cytokines were directly related to specific clinical groups. Differences in cytokine concentrations and their correlation with the clinical groups evaluated reinforce the importance of the host immune system in the manifestation of symptoms. The molecular test detected 45 (60%) positive patients, and the highest parasite load was reported in patients with cutaneous lesion with active lesion. The species *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. guyanensis* were identified. No

significant statistical difference was found in antibody titers and parasite load among individuals with different clinical manifestations, and it is not possible to relate these factors to the severity of the symptoms. In addition, LRV1 was not detected in any sample. This led us to conduct in vitro experiments to evaluate the influence of LRV1 on infectivity and response to treatment with pentavalent antimonial and amphotericin B. The results indicated that LRV1 does not change the infectivity rate of *Leishmania* species, but it is may be related to resistance to pentavalent antimonial treatment. In conclusion, the results obtained corroborate that multiple factors act in complex associations to result in the broad spectrum of symptomatic ATL. It is necessary to carry out new studies, with a larger sample number, so that the knowledge about the factors involved in the pathogenesis of the disease can be expanded.

Keywords: tegumentary leishmaniasis, clinical manifestations, diagnosis, cytokines, LRV1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar, 2015..	23
Figura 2: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.	29
Figura 3: Localização das áreas de coleta das amostras da pesquisa.	44
Figura 4: Fotografias de lesões de alguns pacientes da pesquisa.	45
Figura 5: Quantidade de pacientes do estudo de acordo com a manifestação clínica e por local de coleta das amostras	60
Figura 6: Número de pacientes por estado e de acordo com a manifestação clínica	61
Figura 7: Concentração de anticorpos (IgG) por paciente avaliado e de acordo com as manifestações clínicas.	62
Figura 8: Concentração de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 por paciente e de acordo com as manifestações clínicas.	63
Figura 9: Curva padrão para quantificação da carga parasitária.	65
Figura 10: Número de pacientes positivos na qPCR por tipo de amostra e manifestação clínica.	66
Figura 11: Distribuição dos pacientes por manifestação clínica e tipo de diagnóstico realizado.	67
Figura 12: Determinação da carga parasitária em diferentes tecidos (sangue e biópsia) nos grupos clínicos avaliados.	68
Figura 13: Exemplos de perfil das curvas de <i>melting</i> na qPCR de kDNA.	69
Figura 14: Exemplos de perfil das curvas de <i>melting</i> de qPCR-LRV1.	71
Figura 15: Detecção de LRV1 em amostras de DNA provenientes de sangue dos pacientes.	71
Figura 16: Detecção de LRV1 em amostras de DNA provenientes de biópsias dos pacientes.	72
Figura 17: Comparação, <i>in vitro</i> , entre as taxas de infecção de <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> sem o LRV1 e <i>Leishmania guyanensis</i> LRV1+.	73
Figura 18: Comparação entre as concentrações de citocinas TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 em células infectadas por <i>Leishmania braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> sem	

o	LRV1	e	<i>Leishmania</i>	<i>guyanensis</i>	
LRV1+				74
Figura 19:	Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina em células infectadas com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> spp.				75
Figura 20:	Avaliação da resposta ao tratamento com anfotericina B em células infectadas com diferentes cepas de <i>Leishmania</i> spp.				76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número de pacientes por sexo e faixa etária de acordo com manifestação clínica.	61
Tabela 2: Correlação entre as manifestações clínicas e a concentração das citocinas avaliadas	64
Tabela 3: Correlação entre carga parasitária, concentração de anticorpos e concentração das citocinas	64
Tabela 4: Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas pelo sequenciamento dos produtos de PCR (ITS1).....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide)</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
dNTPs	Desoxiribonucleotídio trifosfato
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IFI	Imunofluorescência Indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i> (Região espaçadora do gene de RNA ribossomal)
kDNA	<i>kinetoplast DNA</i> (DNA do cinetoplasto)
LCDF	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCDs	Leishmaniose cutânea disseminada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LRV	<i>Leishmania</i> RNA vírus
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose Visceral
MS	Ministério da Saúde

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
nDNA	DNA nuclear
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	<i>Open Reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
qPCR	PCR quantitativa
SLA	Antígenos Solúveis de <i>Leishmania</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
Tm	Temperatura de <i>melting</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de necrose tumoral)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	21
1. Leishmanioses	21
1.1 Histórico da doença.....	21
1.2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	22
2. O parasito	23
2.1 Classificação taxonômica.....	25
3. Formas de transmissão	26
3.1 O vetor	27
4. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	28
5. Manifestações clínicas da LTA	29
6. Resposta imune.....	32
7. Vírus de RNA de <i>Leishmania</i>	34
8. Diagnóstico	36
9. Tratamento e Vacinas.....	39
II. JUSTIFICATIVA	42
III. OBJETIVOS	43
1. Objetivo geral.....	43
2. Objetivos específicos	43
IV. METODOLOGIA	44
1. Desenvolvimento do estudo <i>in vivo</i>	44
1.2 Descrição dos locais do estudo	44
1.2.1 Corte de Pedra (BA) e Hospital Universitário de Brasília (DF)	44
1.3 Coleta das amostras	45
1.4 Extração de DNA	46
1.4.1 De células do sangue periférico	46

1.4.2 Das biópsias.....	46
1.4.3 De formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	46
1.5 Quantificação e análise do DNA extraído	47
1.6 Extração de RNA viral.....	47
1.6.1 De células do sangue periférico e de biópsias	47
1.6.2 De formas promastigotas de <i>L. guyanensis</i>	48
1.7 Quantificação do RNA viral extraído e síntese de cDNA	48
1.8 Diagnóstico sorológico.....	49
1.8.1 ELISA	49
1.8.1.1 Preparo de antígenos para ELISA.....	49
1.8.1.2 Sensibilização das placas	49
1.8.1.3 Incubação do primeiro anticorpo	50
1.8.1.4 Incubação do segundo anticorpo	50
1.8.1.5 Revelação e leitura.....	50
1.9 Dosagem de citocinas.....	51
1.10 Diagnóstico Molecular.....	51
1.10.1 PCR em tempo real (qPCR).....	51
1.10.1.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária	51
1.10.1.2 Detecção e quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	52
1.11 Identificação das espécies de <i>Leishmania</i>	52
1.11.1 Amplificação da região ITS1 de <i>Leishmania</i> spp.	52
1.11.2 Sequenciamento dos produtos de cPCR e análise das sequências	53
1.12 Detecção de LRV1	53
1.12.1 PCR da transcrição reversa (RT-PCR)	53
1.12.2 PCR em tempo real da transcrição reversa (qRT-PCR).....	54
1.13 Análise estatística	54

2. Desenvolvimento do estudo <i>in vitro</i> : papel do LRV1 na taxa de infecção e na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente e anfotericina B.....	55
2.1 Cultura de Células e Parasitos	55
2.1.1 Manutenção das células J774.A1.....	55
2.1.2 Manutenção dos parasitos	55
2.2 Comparação das taxas de infecção entre espécies de <i>Leishmania</i>	55
2.2.1 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de <i>Leishmania</i>	55
2.2.2 Extração de DNA dos macrófagos infectados.....	56
2.2.3 Quantificação e análise do DNA	56
2.2.4 PCR em tempo-real (qPCR) para verificação das cargas parasitárias.....	57
2.2.5 Dosagem de citocinas	57
2.3 Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina e anfotericina B.....	57
2.3.1 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de <i>Leishmania</i> e tratamento com antimoniato de meglumina	57
2.3.2 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de <i>Leishmania</i> e tratamento com anfotericina B	57
2.3.3 Extração, quantificação e análise da qualidade do DNA.....	58
2.3.4 PCR em tempo-real (qPCR) para verificação das cargas parasitárias.....	58
2.4 Análise estatística.....	58
V. RESULTADOS.....	60
1. Experimentos <i>in vivo</i>	60
1.1 Perfil do grupo amostral	60
Figura 5: Quantidade de pacientes do estudo de acordo com a manifestação clínica e por local de coleta das amostras.....	60
1.2 Avaliação da resposta imune	61
1.2.1 ELISA	61
1.2.2 Dosagem de citocinas	62

1.3 Diagnóstico Molecular.....	64
1.3.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária	64
Figura 9: Curva padrão para quantificação da carga parasitária. Na equação da reta representada, y é o Ct da amostra; x é a quantidade a ser calculada do produto amplificado; -3,2281 é o coeficiente angular da reta e 19,413 é o coeficiente linear.	65
1.3.2 Detecção e quantificação de DNA de <i>Leishmania</i> spp.....	65
Figura 13: Exemplos de perfil das curvas de <i>melting</i> na qPCR de kDNA. (A) Controle negativo, DNA proveniente de indivíduo negativo para LTA. (B) Controle positivo, DNA proveniente de cultura de <i>Leishmania braziliensis</i> . (C) Amostra negativa, DNA proveniente de paciente da pesquisa. (D) Amostra positiva, DNA proveniente de paciente da pesquisa.	69
1.3.3 Sequenciamento dos produtos de cPCR e análise das sequências	69
Tabela 4: Espécies de <i>Leishmania</i> identificadas pelo sequenciamento dos produtos de PCR (ITS1).....	70
1.4 Detecção do cDNA de LRV1	70
1.4.1 PCR em tempo real da transcrição reversa (qRT-PCR).....	70
Figura 14: Exemplos de perfil das curvas de <i>melting</i> de qPCR-LRV1. (A) Controle negativo, cDNA proveniente de <i>L. infantum</i> . (B) Controle positivo, cDNA proveniente de <i>L. guyanensis</i> positiva para o LRV1 (C) Amostra negativa, cDNA proveniente de biópsia de paciente da pesquisa. (D) Amostra negativa, cDNA proveniente de sangue de paciente da pesquisa.....	71
1.4.2 RT-PCR.....	71
2. Experimentos <i>in vitro</i>	72
2.1 Comparação das taxas de infecção entre espécies de <i>Leishmania</i>	72
2.1.2 Comparação das concentrações de citocinas entre espécies de <i>Leishmania</i>	73
2.2 Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina	74
2.3 Avaliação da resposta ao tratamento com anfotericina B	75
VI. DISCUSSÃO.....	77

1. Perfil dos pacientes	77
2. Avaliação da resposta imune.....	78
2.1 Diagnóstico Sorológico.....	78
2.2 Dosagem de citocinas	79
3. Diagnóstico Molecular.....	80
4. Detecção do cDNA de LRV1 nos pacientes e avaliação dos resultados <i>in vitro</i>	82
VII. CONCLUSÃO	84
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICES.....	101
APÊNDICE A.....	101
APÊNDICE B	104
ANEXOS	107
ANEXO A.....	107
ANEXO B.....	111

I. INTRODUÇÃO

1. Leishmanioses

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Estes apresentam um ciclo de vida heteroxênico, mantendo-se em hospedeiros mamíferos e insetos vetores conhecidos como flebotomíneos, os quais são responsáveis pela transmissão dos parasitos por meio da picada de fêmeas infectadas.

1.1 Histórico da doença

As primeiras observações acerca desses protozoários foram feitas pelo britânico David Douglas Cunningham, em 1885, na Índia, quando este relacionou a presença de formas amastigotas do parasito com casos de leishmaniose visceral (CUNNINGHAM, 1885). Em novembro de 1900, William Boog Leishman reconheceu formas ovoides do protozoário em autópsias e sugeriu que eram formas degeneradas de tripanossomatídeos (LEISHMAN, 1903). Algumas semanas depois, Charles Donovan encontrou formas similares as dos achados de Leishman em amostras de baço e fígado (DONOVAN, 1903). Após análises desses corpos ovoides, o médico Ronald Ross indicou que esses organismos eram protozoários de um novo gênero ao qual ele nomeou *Leishmania* (ROSS, 1903; STEVERDING, 2017).

No ano de 1903, James Homer Wright associou lesões cutâneas em uma criança armênia aos parasitos do mesmo gênero que Cunningham já havia identificado em casos viscerais (WRIGHT, 1903). Tal descoberta permitiu correlatar leishmanioses e dermatoses (VALE; FURTADO, 2005).

No Novo Mundo, as espécies de *Leishmania* foram descritas pelo brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg e pelo italiano Antonio Carini, em trabalhos independentes, no ano de 1909. Ambos estudaram trabalhadores, com lesões na pele, vindos de áreas de desmatamento devido à construção de rodovias na cidade de Bauru, em São Paulo (CARINI, 1909; LINDENBERG, 1909).

Dois anos após os primeiros relatos do parasito no Brasil, o médico Gaspar de Oliveira Vianna concluiu, com base em diferenças morfológicas, que se tratava de uma espécie diferente das observadas no Velho Mundo, denominando-a

Leishmania brasilienses, um *lapsus calami* que foi alterado em 1916 para *Leishmania braziliensis* (FURUSAWA; MAGNO; BORGES, 2014; LAINSON, 2010).

Nos anos que se seguiram, pesquisadores empenharam seus esforços na caracterização do parasito, diferenciação de espécies, associação com as diferentes manifestações clínicas e tentativas de estabelecer a via de transmissão da doença (KILLICK-KENDRICK, 2013).

Apenas em 1921, os irmãos e biólogos Edmond Sergent e Étienne Sergent demonstraram que a exposição de voluntários aos flebotomíneos causava as típicas lesões observadas em pacientes infectados pelo parasito (SERGENT; SERGENT; PARROT; DONATIEN, 1921). Entretanto, a demonstração mais aceita foi feita por Saul Adler, em 1941, quando este infectou com sucesso cinco voluntários utilizando flebótomos infectados em laboratório com *L. tropica* (ADLER, 1941; STEVERDING, 2017).

1.2 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são encontradas em 98 países e em todos os continentes, sendo estimado um milhão de novos casos por ano. A LT é considerada endêmica na África, na Ásia, nas Américas e na região do Mediterrâneo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, são pessoas que vivem em regiões de elevada densidade populacional, especialmente em zonas de guerras e em territórios onde há migração em larga escala. Cerca de 90% de todos os casos de LT estão concentrados nos seguintes países: Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Paquistão, Peru e Síria, como pode ser observado na figura 1 (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; WHO, 2017).

Os aspectos epidemiológicos da LT nas Américas, onde se admite a nomenclatura de leishmaniose tegumentar americana (LTA), são complexos, exibindo variações relativas aos hospedeiros, reservatórios, vetores, manifestações clínicas e espécies de *Leishmania* circulantes nos países. Na América Latina, estimam-se 60.000 novos casos por ano, principalmente locais com altitude de até 1.500 m acima do nível do mar, temperaturas superiores a 20 °C e elevados níveis de precipitação (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

No Brasil, tem-se observado um aumento considerável de casos de LTA nos últimos anos (SOARES *et al.*, 2017). Esta afecção dermatológica é encontrada em todos os estados do país, destacando-se as regiões norte e nordeste com maior quantidade de ocorrências. O boletim mais atual do Ministério da Saúde registrou uma média anual de 25.763 novos casos e coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes entre os anos de 1995 e 2015. Desses casos, o número de óbitos entre os anos de 2007 e 2015 foi de 168 (BRASIL, 2017).

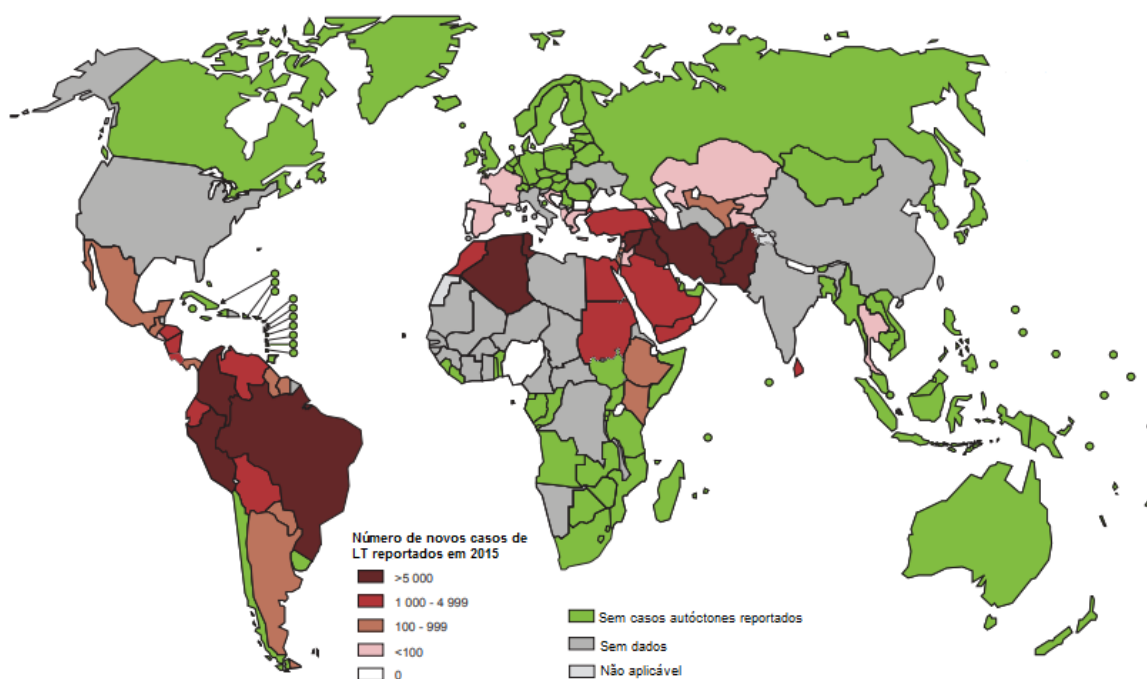


Figura 1: Distribuição mundial da leishmaniose tegumentar, 2015. Adaptado de WHO, 2017.

2. O parasito

Pertencentes ao reino Protista, classe Kinetoplastida, subclasse Metakinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, subfamília Leishmaniinae (LUKEŠ *et al.*, 2014) e gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), esses parasitos apresentam duas morfologias distintas, a forma promastigota e a forma amastigota.

A morfologia celular dos parasitas de *Leishmania* é estabelecida pelo comprimento do flagelo, posição do núcleo e do cinetoplasto e pelas características ultraestruturais, contudo, apesar das diferenças, ambas as morfologias exibem o

mesmo perfil celular com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo que se prolonga a partir do corpo basal (SUNTER; GULL, 2017).

Nos hospedeiros vertebrados verificam-se as formas amastigotas que são redondas ou ovais, medem de 2 a 5 μm e apresentam flagelo imóvel e curto que mal pode ser observado, enquanto que em meios de cultura ou no intestino do flebotomíneo ocorrem as formas promastigotas. Estas são alongadas, medem de 10 a 15 μm e exibem um único flagelo anterior, que é responsável pela motilidade do protozoário (BARI; RAHMAN, 2008).

O genoma das espécies de *Leishmania* é organizado em núcleo e cinetoplasto, sendo que o primeiro compreende DNA epissomal e cromossômico e o segundo apresenta moléculas de DNA cuja replicação é independente (KAZEMI, 2011).

O núcleo das espécies de *Leishmania* do Velho Mundo é composto por 36 cromossomos, já as espécies do Novo Mundo apresentam núcleo com 34 ou 35 cromossomos (WAUGH *et al.*, 2014). O controle da expressão diferencial de genes envolve rearranjos do DNA nuclear e modificações transcricionais e pós-transcricionais, sendo que a maior parte dos genes de *Leishmania* spp. não possuem introns (REQUENA, 2011).

O cinetoplasto, encontrado nas espécies de *Leishmania* e em outros tripanosomatídeos, é uma mitocôndria única. Nele está localizado o DNA extra-cromossomal (kDNA) que corresponde de 10% a 20% do DNA total, composto por grandes moléculas circulares denominadas maxicírculos e outras moléculas circulares menores, em maior quantidade, conhecidas como minicírculos (KAZEMI, 2011; YATAWARA *et al.*, 2008). Os maxi-círculos estão relacionados com a transcrição de genes associados à respiração celular e os minicírculos estão envolvidos na codificação de RNAs-guia, que desempenham função importante na edição dos mRNAs transcritos dos maxicírculos (KHANRA *et al.*, 2017).

Além do núcleo e do cinetoplasto, pode-se constatar a presença de golgiossomo, retículo endoplasmático, lisossomos e glicossomos. Os glicossomos, por sua vez, são comuns aos parasitos com cinetoplasto e apresentam enzimas

relacionadas à via da glicólise que são fundamentais para a viabilidade do parasito (JAMDHADE *et al.*, 2015).

2.1 Classificação taxonômica

As primeiras classificações acerca do parasito apenas diferenciavam o agente etiológico da leishmaniose visceral observada na região do Mediterrâneo (*Leishmania infantum*) daquele visto nos casos de leishmaniose na Índia (*Leishmania donovani*) (LAINSON, 2010). Em 1964, Adler verificou que espécies diferentes do parasito poderiam causar os mesmos sintomas, fossem eles de aspecto visceral ou dermatológico (ADLER, 1964), tal observação causou dificuldades na padronização de uma nomenclatura.

Somente em 1972, os pesquisadores Lainson e Shaw realizaram as primeiras tentativas de classificar o gênero *Leishmania* através do modelo tradicional de espécie e subespécie (LAINSON; SHAW, 1972), o que culminou na proposta de Vickerman de quatro complexos: *braziliensis*, *donovani*, *mexicana* e *tropica* (VICKERMAN, 1976).

Ainda na década de 1970, o estudo de propriedades bioquímicas, imunológicas e moleculares do parasito resultou no refinamento das classificações até que, em 1987, ocorreu a subdivisão em dois grandes subgêneros conhecidos até hoje: *Leishmania*, em que os parasitos se desenvolvem no intestino anterior do flebotomíneo e *Viannia* no qual o desenvolvimento do parasito se dá no intestino posterior do vetor (AKHOUNDI *et al.*, 2016).

Todas essas classificações citadas anteriormente estão sendo revisadas com base em diversos marcadores moleculares, o que deve repercutir em atualizações nos próximos anos (SCHÖNIAN; CUPOLILLO; MAURICIO, 2013; VAN DER AUWERA; DUJARDIN, 2015). Atualmente, são reconhecidas 53 espécies de *Leishmania*, sendo 29 presentes apenas no Velho Mundo, 20 no Novo Mundo e três são encontradas em ambos. De todas as espécies conhecidas, 20 são patogênicas ao homem (MAROLI *et al.*, 2013).

No Brasil, são oito as espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA, sendo seis pertencentes ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lindeberg*, *L. lainsoni*, *L. naiffi* e *L. shawi* e duas pertencentes ao subgênero *Leishmania*: *L.*

amazonensis e *L. infantum*, sendo esta última geralmente associada apenas a casos de leishmaniose visceral (LV) no Brasil (COSTA *et al.*, 2016a; LAINSON, 2010a; LYRA *et al.*, 2015; TELES *et al.*, 2016).

3. Formas de transmissão

A principal forma de transmissão da leishmaniose é por meio da picada das fêmeas de flebotomíneos infectadas, contudo outras vias de transmissão já foram estudadas e podem acontecer ainda que sejam raras, são elas: transmissão sexual, transmissão congênita, transfusão sanguínea, transplante de órgãos, por acidente de trabalho ou mesmo entre usuários de drogas por compartilhamento de agulhas (MAROLI *et al.*, 2013).

A transmissão sexual foi descrita pela primeira vez em um paciente do sexo masculino residente do Reino Unido, onde não havia casos de leishmaniose autóctone. Sua esposa, que nunca havia saído do país, desenvolveu lesão genital com a presença de macrófagos infectados por *Leishmania* spp.. Sabia-se que o marido tinha sido diagnosticado e tratado para LV vários anos antes (SYMMERS, 1960; TURCHETTI *et al.*, 2014). Diversos trabalhos já relataram a presença de DNA de *Leishmania* spp. em sêmen de humanos e também de animais experimentais o que sugere a possibilidade da transmissão venérea da doença (SILVA *et al.*, 2008; VITAL, 2014).

Quanto à transmissão congênita, a maior parte das pesquisas já confirmou a ocorrência desta via em animais, principalmente cães (NAUCKE; LORENTZ, 2012; TOEPP *et al.*, 2017), o que é suportado por evidências tais como a presença do parasito no útero, fluidos fetais e trofoblasto placentário. Em humanos, o primeiro caso foi reportado em 1926, no qual uma paciente apresentou sintomas relacionados à leishmaniose durante a gestação e seu bebê foi diagnosticado com a doença no primeiro ano de vida. Há ainda relatos de recém-nascidos infectados cujas mães viviam em regiões endêmicas para leishmaniose (LOW; COOKE, 1926; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Casos de transmissão por transfusão sanguínea ou transplante de órgãos são menos observados, em parte devido a dificuldades de monitoramento em áreas endêmicas, onde a infecção é adquirida principalmente pela picada dos flebotomíneos, mas também pela falta de informação acerca do doador, componente

sanguíneo ou órgão a ser transplantado (JIMENEZ-MARCO *et al.*, 2016). Além disso, deve-se destacar que um elevado número de doadores são assintomáticos, como já foi observado em trabalhos no Brasil, Espanha, França, Grécia, Índia, Irã, Iraque, Nepal e Turquia (MANSUETO *et al.*, 2014).

A transmissão por meio de agulhas contaminadas pode ocorrer principalmente entre usuários de drogas ou ainda devido a acidentes de trabalho em laboratórios de pesquisa ou ambiente hospitalar. Neste último caso, recomenda-se que todas as pessoas em contato com material potencialmente infeccioso utilizem os equipamentos de proteção individual de acordo com as boas práticas de segurança (SAFAR, 2017).

Deve-se observar que as espécies de *Leishmania* podem sobreviver em uma ampla variedade de condições de temperatura e pH, fato que permitiu a existência de vias de transmissão menos comuns que a vetorial, mas de grande relevância do ponto de vista epidemiológico e de vigilância (AVILA-GARCÍA *et al.*, 2014).

3.1 O vetor

As fêmeas dos flebotomíneos são consideradas os únicos vetores naturais de *Leishmania* ssp. Esses insetos hematófagos pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e são conhecidos popularmente como "asa dura", "birigui", "mosquito-palha", "tatuquira", entre outros, de acordo com a região em que são encontrados (SILVINO *et al.*, 2016).

São insetos de hábitos noturnos, silenciosos, pequenos (1,5 a 3,0 mm), pilosos, castanho-claros, com capacidade limitada de vôo e que são reconhecidos por permanecerem com as asas esticadas e entreabertas durante inatividade (AYHAN; CHARREL, 2017).

Atualmente, são conhecidas 1003 espécies de flebotomíneos (SHIMABUKURO; DE ANDRADE; GALATI, 2017), que podem ser encontradas em todos os continentes exceto na Antártida (BATES *et al.*, 2015). Das espécies descritas, sabe-se que 98 são vetores confirmados ou suspeitos de *Leishmania* spp., sendo 42 do Velho Mundo (subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus* e *Sergentomyia*) e 56 do Novo Mundo (subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia*) (AYHAN; CHARREL, 2017; MAROLI *et al.*, 2013).

Os flebotomíneos são encontrados frequentemente em regiões tropicais e subtropicais, entretanto alterações climáticas recentes têm aumentado a sua distribuição geográfica, ainda que sua capacidade de dispersão seja considerada limitada (FISCHER *et al.*, 2011).

No Brasil, estão presentes em todas as regiões, principalmente em áreas de floresta, porém nos últimos anos esses vetores têm alcançado com facilidade espaços urbanos devido a intervenções humanas tais como atividades agrícolas, construção de usinas hidrelétricas e migração (MACHADO *et al.*, 2017; RAPELLO *et al.*, 2018). As principais espécies de flebotomíneos no país são *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* e *Lutzomyia longipalpis*, vinculados respectivamente à LT e LV (ALMEIDA *et al.*, 2015; TANURE *et al.*, 2015).

4. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. é digenético, passando por um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. O ciclo tem início quando fêmeas de flebotomíneos, ao realizarem repasto sanguíneo em um indivíduo ou animal infectado, ingerem células parasitadas com as formas amastigotas do parasito. No período de zero a dois dias após o repasto, ocorre, no tubo digestivo do inseto a diferenciação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas. Essa diferenciação se dá no intestino posterior para as espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* e no intestino anterior para as do subgênero *Leishmania*. Simultaneamente, há uma intensa multiplicação dos parasitos mediante divisão binária. As formas promastigotas procíclicas ancoram-se por meio do flagelo ao epitélio intestinal do vetor evitando sua expulsão durante liberação do bolo fecal. Posteriormente, há diferenciação em promastigotas metacíclicas que são corpos celulares menores, com longo flagelo e que não se dividem mais. Além disso, não apresentam capacidade adesiva ao epitélio do flebotomíneo, o que torna essas formas livres para se deslocarem para a probóscide do inseto (PIMENTA; DE FREITAS, SECUNDINO, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Neste momento, se houver um novo repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo injeta as formas infectivas no hospedeiro vertebrado. As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos ou outras células mononucleadas, como as células de *Langerhans*. Diversos fatores ativam sinais para o início da

diferenciação de promastigota para amastigota, dentre eles: pH ácido e aumento de temperatura (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017b). As formas amastigotas, por sua vez, também se multiplicam por divisão binária podendo vir a romper a membrana plasmática da célula hospedeira. Diante disso, os parasitos podem ser fagocitados novamente por outras células, migrarem para outros órgãos por via hematogênica ou ainda serem ingeridos junto ao sangue em um novo repasto sanguíneo (SUNTER; GULL, 2017). O esquema do ciclo de vida das espécies de *Leishmania* pode ser observado na figura 2.

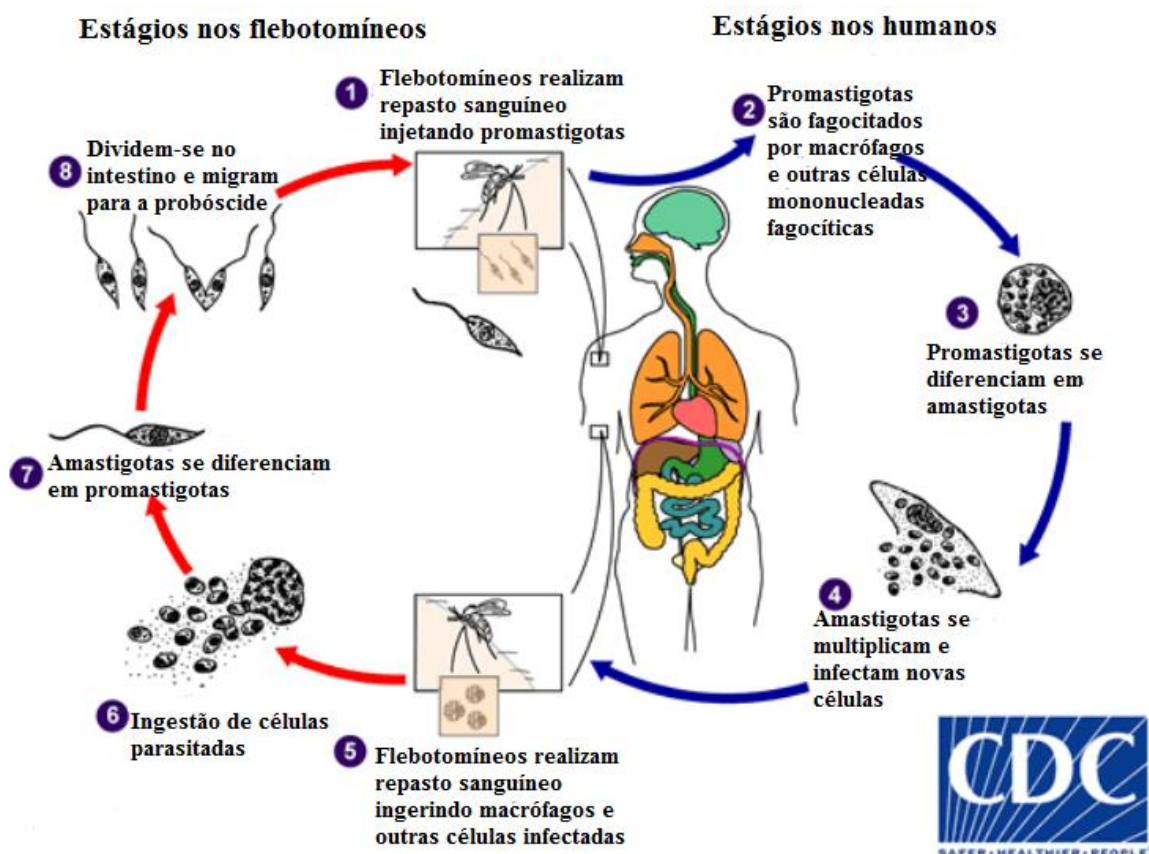


Figura 2: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp.. Adaptado de *Division of Parasitic Diseases and Malaria* (DPDx), Centers of Diseases Control and Prevention (CDC).

5. Manifestações clínicas da LTA

As manifestações clínicas da LTA estão relacionadas com características do parasito e com aspectos genéticos do hospedeiro que determinam a eficácia da resposta imune. Nesse sentido, a LTA pode ser dividida em: leishmaniose cutânea

localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea difusa (LCDf) e leishmaniose cutânea disseminada (LCDs) (CAMPOS *et al.*, 2018; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LCL é a forma mais prevalente e menos severa da doença. Esta é caracterizada por lesões indolores, com bordas bem definidas e formato arredondado. As lesões, usualmente, aparecem em áreas expostas dos corpos dos pacientes, como membros inferiores, membros superiores e face, visto que são os locais mais propícios para a picada do flebotômíneo. É possível que nódulos subcutâneos, únicos ou múltiplos, medindo entre 0,5 e 2,0 cm ocorram próximos às lesões, o que é chamado de disseminação esporotricóide da LCL. (GUIMARÃES *et al.*, 2016a).

As lesões podem apresentar diferenças de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida. Em pacientes infectados por *L. amazonensis*, há um denso infiltrado de macrófagos com grandes quantidades de amastigotas o que confere uma aparência de granuloma macrofágico. Já nos casos de LCL causados por *L. braziliensis* e outras espécies do subgênero *Viannia*, há uma infiltração mais modesta na pele, sendo macrófagos e parasitos mais escassos, contudo linfócitos e plasmócitos estão mais presentes no infiltrado (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A LCL pode ser diferenciada como aguda, quando apresenta menos de seis meses de duração, como crônica, quando persiste por mais de seis meses ou ainda como recidiva. A cura nos casos de LCL acontece frequentemente devido ao tratamento ou mesmo espontaneamente num período que costuma variar de 2 a 15 meses. Em alguns casos, se descobriu que pacientes curados ainda apresentavam esfregaços positivos por 24 meses ou mais, esses casos foram identificados como leishmaniose cutânea crônica não cicatrizante. Tratando-se de pacientes recidivos, estes representam cerca de 30% das ocorrências, apresentando características semelhantes às do episódio original, sendo que as manifestações recorrentes podem até ser mais graves do que as observadas no primeiro momento. Além dos recidivos, é possível que alguns pacientes evoluam para um quadro de manifestação mucocutânea (BARI, 2012; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LMC é uma forma grave da doença, ocorrendo em cerca de 5% a 20% das manifestações tegumentares e encontrada mais frequentemente no Novo Mundo do que no Velho Mundo (EKIZ *et al.*, 2017). Sabe-se que o desenvolvimento de lesões mucocutâneas pode levar de meses a anos após um primeiro diagnóstico de LT e as espécies causadoras são *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Novo Mundo) e *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica* (Velho Mundo) (LESSA *et al.*, 2007).

As lesões na LMC são caracterizadas por afetarem regiões de mucosa oral e nasal, podendo atingir laringe e faringe. Os primeiros sintomas da LMC são edema e eritema em local de mucosa seguidos de ulcerações granulomatosas, contudo a principal marca da manifestação mucocutânea é a presença de infiltrado inflamatório composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos (MARRA; CHIAPPETTA; VINCENTI, 2014). Histopatologicamente, pode-se resumir a LMC em quatro estágios: edema, granuloma, necrose proliferativa e necrose granulomatosa (HANDLER *et al.*, 2015).

O paciente, ao apresentar um quadro de LMC, pode ter seu diagnóstico retardado devido à semelhança das manifestações com outras doenças graves, tais como câncer bucal e infecções fúngicas. A demora para o diagnóstico bem como tratamento não adequado podem desfigurar o paciente levando à destruição total ou parcial do septo nasal, faringe e palato. Em alguns casos, a LMC pode ser fatal (CRUZ *et al.*, 2016).

A LCDf é uma forma invasiva da LT, na qual macrófagos vacuolados encontram-se altamente parasitados em nódulos não ulcerados espalhados pelo corpo. Na LCDf, as lesões se proliferam lentamente e, com exceção de couro cabeludo, axilas, prega inguinal, palmas das mãos e solas dos pés, estas tendem a cobrir o corpo todo do paciente inclusive regiões de mucosa oral e nasal, principalmente em estágios avançados da doença (FARIA; REIS; LIMA, 2012; FERNÁNDEZ-FIGUEROA *et al.*, 2016).

As espécies causadoras de LCDf no Velho Mundo são *L. aethiopica* e *L. major* e, no Novo Mundo, são *L. amazonensis* e *L. mexicana* e assim como na LMC, a LCDf é mais comum no Novo Mundo (HASHIGUCHI *et al.*, 2016). Esta manifestação clínica é rara e está relacionada a um tipo de resposta de

hipersensibilidade tardia, além de estar associada à resistência ao tratamento e deficiência na resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania*. O diagnóstico na LCDf é muitas vezes prejudicado devido aparência clínica similar à hanseníase (COELHO *et al.*, 2014; FRANÇA-COSTA *et al.*, 2015).

Por fim, há a LCDs, a qual tem como principais espécies envolvidas na causa *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (DALY *et al.*, 2014). A LCDs é caracterizada por lesões cutâneas, muitas vezes papulares e em grande quantidade, que podem ser acompanhadas por febre e calafrios. Geralmente, o aparecimento das lesões típicas de LCDs ocorre simultaneamente ou seguidamente a lesões de LCL e está relacionado à resistência ao tratamento padrão (VERNAL *et al.*, 2016).

A LCDs é frequentemente confundida com a LCDf, porém as principais diferenças são que na LCDs há presença de lesões nodulares ulcerativas, baixo número de parasitos nos macrófagos, tendência à cronicidade e recidivação, além dessa manifestação ser menos rara, ainda que represente somente cerca de 2% dos casos de LT reportados no Brasil (HASHIGUCHI *et al.*, 2016; MEMBRIVE *et al.*, 2017).

6. Resposta imune

Há diversos fatores envolvidos na resposta imune das leishmanioses, podendo-se destacar variações genéticas dos hospedeiros, diferenças entre espécies de *Leishmania* e até aspectos menos observados como local e quantidade de picadas realizadas pelo flebotomíneo infectado. Estas diferenças refletem no amplo espectro de manifestações clínicas da doença (DUNNING, 2009).

A resposta imune é iniciada no local de entrada do parasito por meio das células sentinelas, sendo os macrófagos as principais, contudo células dendríticas, monócitos e neutrófilos também podem ser recrutados e infectados, exercendo papel importante na resposta ao parasito. Uma vez reconhecido, patógeno e fagócito se ligam e há a formação do fagossomo que, por sua vez, se fundirá com o lisossomo, formando o fagolisossomo ou vacúolo parasitóforo (NDJAMEN *et al.*, 2010).

Neste momento, ocorrem os dois principais mecanismos da resposta imune inata para o combate das espécies de *Leishmania* que são a produção de espécies

reativas de oxigênio (EROs) e a produção de óxido nítrico (NO), sendo para este último fundamental que IFN- γ e o fator de necrose tumoral (TNF) atuem sinergicamente a fim de promoverem a ótima ativação dos macrófagos e eliminarem o parasito (NOVAIS *et al.*, 2014).

A resposta imune adaptativa à infecção é predominantemente mediada por células, sendo a resposta via Th1 relacionada com a resistência e a resposta via Th2 com a susceptibilidade à doença (SRIVASTAVA *et al.*, 2016). A diferenciação para subpopulações de células Th1 ou Th2 está relacionada principalmente a três aspectos: quais citocinas são estimuladas, o tipo de célula apresentadora de antígeno e a natureza e quantidade de antígeno. As citocinas características de Th1 são INF- γ , IL-2 e TNF e as de Th2 são IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (HAILU *et al.*, 2005).

As células dendríticas viabilizam a resposta antígeno-específica por meio da produção de interleucina-12 (IL-12), as IL-12 promovem a resposta Th1, enquanto suprimem uma resposta via Th2. Células *natural killer* (NK) também são recrutadas e elevam a produção de IL-12, além de ativarem macrófagos devido à produção de IFN- γ . (BAJÉNOFF *et al.*, 2006; IEZZI *et al.*, 2006). Neste ponto, o parasito busca evadir a resposta imune do hospedeiro por meio da inibição da produção de IL-12 e dificultando a apresentação dos antígenos às células T (LIU; UZONNA, 2012). No caso de uma resposta predominantemente via Th2, a IL-4 que promove a diferenciação das próprias células Th2 e inibe a ativação das células Th1 (DE FREITAS; PINHEIRO, 2010).

Nesse sentido, apesar da importância da resposta via Th1 para cura da doença, pacientes com uma resposta Th1 exacerbada, acompanhada por um aumento de células citotóxicas T CD8+, desenvolvem um quadro clínico de LMC. Num outro extremo, pacientes com baixa resposta Th1 apresentam uma maior quantidade de parasitos nas lesões e tendem a manifestar um quadro de LCDf, estes pacientes também apresentam altos títulos de anticorpos. Paralelamente a esses extremos, ocorrem os casos de pacientes que exibem variados níveis de respostas por células T e variada titulação de anticorpos, são pacientes de LCL cujas lesões podem apresentar cura espontânea ou tornarem-se crônicas (SCOTT; NOVAIS, 2016).

A observação do amplo espectro de manifestações clínicas na LTA demonstra que a relação Th1/Th2 não é suficiente para compreender por completo a imunopatogenia da leishmaniose. Trabalhos desenvolvidos nos últimos anos revelam a importância de outras células como as células reguladoras (Tregs) e a resposta Th17. A presença de Tregs, que são caracterizadas pelo fator de transcrição Foxp3, pode favorecer a sobrevivência dos parasitos na pele, levando à persistência dos parasitos e à reativação da doença (EHRlich *et al.*, 2014). Já as citocinas relacionadas à resposta Th17 podem estar associadas à proteção contra a doença. Ghosh e colaboradores (2013) verificaram que a administração de IL-17 e IL-23 produziu quantidades significativas de IFN- γ e NO e causou uma diminuição considerável na carga parasitária em modelo murino.

Receptores *Toll-like* (TLRs) também apresentam função importante no controle da infecção, visto que a ativação de macrófagos é mediada por esses receptores. Os TLRs estão na primeira linha de defesa contra as espécies de *Leishmania*, uma vez que aumentam a fagocitose, desencadeiam a ativação de NF- κ B e diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TUON *et al.*, 2008).

São muitos os fatores envolvidos na resposta imune durante uma infecção causada por *Leishmania* spp. A compreensão da integração entre imunidade inata e adquirida, além do entendimento dos mediadores envolvidos é fundamental para o desenvolvimento de novas drogas, imunoterapias que poderiam dar ao paciente uma melhor qualidade de vida e também para o desenvolvimento de vacinas eficazes (SCOTT; NOVAIS, 2016).

7. Vírus de RNA de *Leishmania*

O vírus de RNA de *Leishmania* (LRV) é um vírus da família Totiviridae, icosaédrico, não envelopado, de aproximadamente 40 nm que está presente em algumas cepas de *Leishmania*. Este vírus apresenta RNA fita-dupla e genoma de comprimento entre 4 e 8 kb, o qual possui duas fases de leitura aberta (ORFs) que codificam uma proteína do capsídeo e uma RNA polimerase dependente de RNA (RDRP) fundamental para a replicação do vírus (DE SOUZA *et al.*, 2014; GUPTA; DEEP, 2007; PATTERSON, 2017).

Os LRVs apresentam duas variantes, LRV1 e LRV2, as quais apresentam organização genômica idêntica, porém homologia inferior a 40% na sequência

nucleotídica. A variante LRV1 foi a primeira a ser caracterizada, sendo identificada nas espécies *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis*, posteriormente a variante LRV2 foi descrita infectando *Leishmania major* e *Leishmania aethiopica*, logo a primeira está presente em espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e a última em espécies do Velho Mundo (SCHEFFTER *et al.*, 1995; ZANGGER *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas, o LRV, principalmente o LRV1, tem sido estudado como um fator de virulência para a LTA, sendo relacionado à metástase das lesões, a uma maior chance de desenvolvimento de LMC, estando associado a falhas terapêuticas e persistência do parasito, aumentando as chances de recidiva (BOURREAU *et al.*, 2016; OLIVIER, 2011).

A literatura tem descrito que a liberação do RNA viral por parasitos mortos logo após a infecção é responsável por desencadear uma resposta imune mediada por receptores do tipo *toll-like* 3 (TLR3), resultando na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF α , IL-6, CXCL10 e CCL5, o que seria o motivo da exacerbação da doença (IVES *et al.*, 2011; SCOTT, 2011).

Embora muitos trabalhos relacionem o LRV1 ao aumento da virulência, ainda há poucos dados epidemiológicos sobre assunto, visto que a frequência do vírus ainda é pouco descrita em amostras clínicas. No geral, todos os estudos concordam que a gravidade e a cronicidade da doença não podem ser associadas somente à presença do LRV1 e que também a presença do vírus por si só não seria suficiente para modular a resposta imune, sendo ainda necessária uma elevada quantidade deste (CANTANHÊDE *et al.*, 2015a; HARTLEY *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2013).

A influência do LRV1 no metabolismo das espécies de *Leishmania* e os mecanismos para transmissão e manutenção do vírus não estão bem estabelecidos, sendo que não se sabe por que algumas cepas são infectadas e outras não. Nesse sentido, ainda não foi relatado um sistema infeccioso capaz de introduzir a forma estável do LRV1 em linhagens deficientes para o mesmo. Uma das hipóteses é que a própria maquinaria de RNA de interferência (RNAi) das espécies de *Leishmania* impeça o estabelecimento viral (HARTLEY *et al.*, 2012; LYE *et al.*, 2010).

Por fim, a descoberta dos LRVs representa uma nova possibilidade de abordagem terapêutica nas leishmanioses metastáticas relacionadas à presença do

vírus. Pesquisas recentes demonstraram ser promissora uma imunização a partir do capsídeo do viral (CASTIGLIONI *et al.*, 2017).

8. Diagnóstico

O diagnóstico da LTA envolve aspectos clínicos, epidemiológicos e técnicas laboratoriais que visam à detecção do parasito ou que determinam sua presença no hospedeiro infectado. No diagnóstico, são utilizados exames parasitológicos, exames imunológicos que incluem teste de Montenegro e testes sorológicos tais como imunofluorescência indireta (IFI) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), além de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (BONI *et al.*, 2017).

Os exames parasitológicos compreendem pesquisa direta pelo parasito, cultura e exame histopatológico. A pesquisa direta pelo parasito é feita por meio da visualização em microscópio de esfregaços de biópsias, escarificação ou punção aspirativa das lesões corados com Giemsa ou hematoxilina-eosina, o que permite o achado das formas amastigotas do parasito. A cultura *in vitro* de parasitos pode melhorar a sensibilidade do diagnóstico, mas é cara e costuma consumir mais tempo do que outros métodos, logo não é habitual seu uso no diagnóstico clínico. Nos últimos anos, modificações têm sido desenvolvidas na cultura de espécies de *Leishmania* o que poderia reduzir o tempo do exame e melhorar a sensibilidade da técnica, essas modificações incluem uso de camada leucocitária e células mononucleares do sangue periférico (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; MAURYA *et al.*, 2010). Os exames histopatológicos associam a observação do parasito com a visualização do infiltrado inflamatório originado durante a infecção. Nestes exames, achados de hiperplasia epitelial, baixa granulação, inflamação crônica intensa das papilas dérmicas e ausência de alterações nos vasos sanguíneos diferenciam as manifestações típicas de LTA da maioria das úlceras cutâneas, contudo o diagnóstico positivo ainda exige a verificação da presença do parasito (GONZÁLEZ *et al.*, 2018). Todos os exames parasitológicos apresentam uma boa especificidade, porém a sensibilidade tende a ser no máximo de 80% mesmo quando realizados em condições ideais (SEVILHA-SANTOS *et al.*, 2018).

O teste de Montenegro é amplamente utilizado no Brasil, sendo a principal forma de diagnóstico na atenção básica visto que é de fácil execução, baixo custo e pode ser realizado imediatamente (GUEDES *et al.*, 2017). Trata-se de um teste que mede a reação de hipersensibilidade tardia, a qual é caracterizada por endureção no local onde se é aplicado uma solução contendo antígenos inativados ou partes destes. Reações cutâneas ao teste de Montenegro ≥ 5 mm são consideradas positivas e <5 mm são consideradas negativas. Este teste é considerado relevante principalmente em casos em que a LTA tem um quadro de mais de dois meses de evolução, ou seja, os parasitos estão escassos ou ausentes e também em situações de levantamento epidemiológico. O teste de Montenegro apresenta sensibilidade que varia de 86,4% a 100% (ANTONIO *et al.*, 2014; SKRABA *et al.*, 2015).

Há diversos testes sorológicos para o diagnóstico da LTA, podendo-se destacar IFI e ELISA. Estes testes baseiam-se na identificação do antígeno ou de anticorpos anti-*Leishmania* nos soros dos pacientes, são pouco invasivos e alcançam valores de sensibilidade superiores a 90%, mas apresentam baixa especificidade já que pacientes infectados podem apresentar baixos títulos de anticorpos e indivíduos advindos de áreas endêmicas para a LTA podem gerar resultados falso-positivos. Além disso, reações cruzadas podem ocorrer em pacientes infectados por outros tripanossomatídeos como é o caso do *Trypanosoma cruzi* (COSTA *et al.*, 2016b; DUARTE *et al.*, 2015; SZARGIKI *et al.*, 2009a).

A biologia molecular tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico da LTA por conseguir associar sensibilidade e especificidade. Nesse sentido, a PCR pode ser empregada detectando a presença de DNA de *Leishmania* ou ainda determinando a carga parasitária, como é o caso da PCR em tempo-real (qPCR) (DOWNING *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, tem sido muito comum a utilização das qPCRs para detecção de DNA de *Leishmania*, quantificação dos parasitos e ainda identificação de espécies. A qPCR é mais rápida que a PCR convencional e apresenta menos chances de contaminação uma vez que não há manipulação dos produtos, pois não há necessidade de eletroforese em gel. Além disso, por ser capaz de quantificar carga parasitária, é ideal para o acompanhamento de pacientes co-infectados e

imunossuprimidos a fim de prever recaídas e identificar falhas no tratamento (DE PAIVA-CAVALCANTI *et al.*, 2015; MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2017).

Ainda dentro das abordagens moleculares, há o *High Resolution Melting* (HRM) que é um método para genotipagem, análise de sequências e de mutações, que não exige nenhum processamento do produto amplificado e é baseado apenas nas análises das curvas de *melting* geradas, por meio do monitoramento da saturação dos fluoróforos utilizados. Este método já demonstrou conseguir diferenciar espécies de *Leishmania*, entretanto alguns trabalhos relatam sobreposição de temperatura de *melting* (T_m) entre espécies, o que limitaria a utilização deste método (HERNÁNDEZ *et al.*, 2014; ZAMPIERI *et al.*, 2016).

As vantagens dos métodos moleculares são várias, a começar pela ampla variedade de tipos de amostras que podem ser utilizadas para extração do material genético a ser analisado: sangue, *swab*, fragmentos de biópsias (frescos, congelados ou conservados em parafina), escarificação da lesão e impressão da lesão em papel filtro. Após a coleta, o DNA pode ser extraído por várias técnicas já bem estabelecidas, inclusive por meio de kits comerciais. Além disso, mesmo que a quantidade inicial de DNA extraído da amostra coletada seja pequena, a PCR e suas variações ainda podem ser consideradas altamente sensíveis devido à capacidade de produzir milhares de cópias de uma sequência alvo (GOMES *et al.*, 2014). Outra vantagem é o grande número de diferentes sequências-alvo que podem ser utilizadas, estas incluem genes de RNA ribossômico, de kDNA, de proteínas de choque térmico como HSP60 e HSP70 e genes envolvidos em processos metabólicos como glicose-6-fosfato-desidrogenase (ELMAHALLAWY *et al.*, 2014; TSUKAYAMA *et al.*, 2013).

O Ministério da Saúde preconiza para o caso de ocorrência de lesões sugestivas de leishmaniose que o diagnóstico seja baseado em critérios clínicos e epidemiológicos. Entretanto, o diagnóstico deve ser complementado por pesquisa direta do parasito ou Teste de Montenegro. Nos casos em que o diagnóstico não for conclusivo pelos métodos anteriores, outros testes diagnósticos devem ser realizados. A utilização de métodos de diagnóstico laboratoriais é importante visto que, além de confirmar os achados clínicos, oferece informações epidemiológicas, como a espécie de *Leishmania* circulante. O diagnóstico de certeza é feito pelo

encontro do parasito, ou de seus produtos, nos tecidos ou fluidos biológicos do paciente, logo recomenda-se a confirmação do diagnóstico por método parasitológico antes do início do tratamento (BRASIL, 2017).

9. Tratamento e Vacinas

Os antimoniais pentavalentes (SbV) são usados desde a década de 1930 e permanecem como a primeira escolha para o tratamento da LTA. No mundo, há duas formulações de antimoniais pentavalentes disponíveis para o tratamento: o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil. Apesar de serem prioridade no tratamento, estes medicamentos podem causar muitos efeitos adversos visto que se acumulam facilmente nos tecidos. Os efeitos adversos vão desde vômitos, náuseas, cefaleia, dores abdominais a casos de arritmia cardíaca fatal. Tantos efeitos adversos somados a um período de tratamento considerado longo por maior parte dos pacientes levam a um grande problema de saúde pública que é o abandono do tratamento e a possibilidade de surgimento de cepas resistentes (DE MENEZES *et al.*, 2015; TIUMAN *et al.*, 2011).

O mecanismo de ação dos compostos SbV ainda não está bem estabelecido. Sabe-se que a conformação SbV é inativa e que em macrófagos é convertida para a forma ativa (Sb III), estas inibem a atividade glicolítica das amastigotas, sendo esta inibição acompanhada por uma inibição dose-dependente na produção de ATP e GTP (PETITTI; VANNI; BARRESI, 2008; ROYCHOUDHURY; SINHA; ALI, 2011).

A anfotericina B é um antimicrobiano indicado no tratamento de micoses sistêmicas. No entanto, desde a década de 1990, a anfotericina B tem sido escolhida como um dos principais tratamentos para leishmanioses (CROFT; OLLIARO, 2011).

A ação bem sucedida da anfotericina B contra leishmanioses é resultado de uma alteração do equilíbrio iônico, por meio de alteração osmótica causada por abertura de poros na membrana do parasito, com conseqüente morte celular (KOTB ELMAHALLAWY; AGIL, 2015; MIGUEL; YOKOYAMA-YASUNAKA; ULIANA, 2008).

Essa droga tem duas apresentações: anfotericina B lipossomal (ABL) e anfotericina B desoxicolato (ABD). Ambas são menos tóxicas que os antimoniais pentavalentes, entretanto são mais caras e demandam ambiente refrigerado para

manterem sua estabilidade, o que pode representar um obstáculo em países em desenvolvimento (DE MENEZES *et al.*, 2015).

A ABD é eficaz e mais barata que a ABL, porém está associada a diversos efeitos colaterais, além disso o parasito desenvolveu resistência a ABD em muitos casos, logo essa forma da anfotericina não é muito indicada, sendo ainda contraindicada em pacientes idosos e gestantes (OLIVEIRA *et al.*, 2011). A ABL, por sua vez, foi desenvolvida a fim de reduzir os efeitos colaterais e melhorar os aspectos farmacocinéticos da droga. Nesse sentido, os lipossomas presentes na fórmula de ABL permitem uma rápida absorção do fármaco e ainda garantem uma acentuada melhora em sua biodisponibilidade por perdurarem mais tempo na corrente sanguínea. O uso de ABL é especialmente indicado em casos de co-infecção leishmaniose/HIV (LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005; PIERSON *et al.*, 2010).

As pentamidinas representam outra possibilidade de tratamento para LT. Estas são utilizadas em regiões endêmicas dos continentes americano, asiático e africano, sendo que a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) recomenda o uso dessa droga como segunda escolha atrás somente dos antimoniais pentavalentes, porém deve-se ressaltar que esta tem eficácia limitada a apenas algumas espécies de *Leishmania* (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006; PAHO, 2013).

Apesar de ser recomendada em alguns casos, essa droga é considerada muito tóxica e seu uso geralmente é indicado quando inserido numa combinação de terapias. Os efeitos adversos incluem náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, hipoglicemia e o mais grave de todos: diabetes mellitus, que pode se manifestar a partir da administração de uma dose total de 2 g. O mecanismo de ação das pentamidinas não é bem conhecido, contudo sabe-se que este medicamento interfere na função mitocondrial, dificultando a replicação e transcrição do parasito a esse nível (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012; SUN; ZHANG, 2008).

Como visto até aqui, a quimioterapia desempenha papel fundamental no tratamento das leishmanioses, entretanto fatores como altos custos, toxicidade e períodos longos de terapia indicam a importância do desenvolvimento de outros fármacos e de vacinas (BEAUMIER *et al.*, 2013).

As vacinas para leishmanioses podem ser divididas em três categorias: vacinas de *Leishmania* spp. atenuadas, vacinas a partir do parasito morto e vacinas recombinantes/ vacinas de DNA (SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Considera-se a vacina ideal para esta doença aquela que seja capaz de conferir imunidade de longa duração e que envolva de maneira equilibrada resposta imune mediada por Th1 e Th2 (GILLESPIE *et al.*, 2016). As vacinas mais promissoras até o momento são: Leish-F1, Leish-F2 e Leish-F3, que são feitas por meio da fusão de proteínas recombinantes e que se encontram em fase clínica II. Muito promissoras também são as vacinas compostas por proteínas de *Leishmania* e antígenos de saliva de flebotomíneos, sendo que estas estão em fase pré-clínica (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 2018).

II. JUSTIFICATIVA

As manifestações clínicas da LTA estão relacionadas a diversos fatores, os quais vão desde características do hospedeiro a particularidades das espécies de *Leishmania* envolvidas na patogênese da doença. Entretanto, ainda são poucos os trabalhos que se propõem a entender como esses fatores estão interligados e como a combinação de aspectos clínicos, imunológicos e moleculares influencia no amplo espectro de sintomas observados na LTA. Ademais, pesquisas recentes sugerem uma participação relevante do LRV1 na metástase das lesões e na contribuição para falhas terapêuticas, logo este vírus seria mais um fator de interesse na compreensão da patogenia. Sendo assim, este trabalho tem como justificativa a necessidade de ampliar o entendimento de como aspectos relativos ao paciente, tais como sexo, idade, produção de citocinas e anticorpos, bem como aspectos relacionados ao parasito, como espécie de *Leishmania* envolvida e carga parasitária, estão correlacionados e associados às manifestações clínicas da LTA. Além disso, o presente estudo buscou aumentar a compreensão do papel do LRV1 na infecção *in vitro*.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O principal objetivo do trabalho foi verificar como aspectos biológicos, imunológicos e moleculares estão relacionados ao amplo espectro de manifestações clínicas da LTA e como estes se correlacionam.

2. Objetivos específicos

- Descrever as características clínicas e imunológicas dos pacientes com LTA em Corte de Pedra e no Distrito Federal no período do estudo;
- Realizar o diagnóstico molecular e sorológico dos pacientes;
- Determinar o perfil de citocinas presente nas diferentes apresentações clínicas da doença;
- Identificar as espécies dos parasitos presentes nos pacientes;
- Investigar a presença do LRV1 nas amostras de sangue e biópsias dos pacientes;
- Verificar, *in vitro*, o papel do LRV1 na taxa de infecção e na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente e anfotericina B.

IV. METODOLOGIA

1. Desenvolvimento do estudo *in vivo*

O presente trabalho foi realizado com 126 amostras biológicas, sendo 75 de sangue e 51 de biópsias. As amostras foram coletadas de 30 indivíduos da região de Corte de Pedra (BA), no mês de setembro de 2016 e de 45 indivíduos atendidos no ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), durante o período de junho de 2017 a fevereiro de 2018. Os pacientes foram informados quanto à pesquisa e aceitaram participar mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A). Os critérios de exclusão foram pacientes menores de 18 anos, população indígena e portadores de HIV. O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/ UnB aprovou o estudo com os pacientes de Corte de Pedra e atendidos no HUB (CAAE: 53157115.5.0000.5558/2016) (Anexo A) e (CAAE: 56709316.3.0000.5558/2016) (Anexo B), respectivamente.

1.2 Descrição dos locais do estudo

1.2.1 Corte de Pedra (BA) e Hospital Universitário de Brasília (DF)

Corte de Pedra é uma região endêmica para LTA localizada no sudeste do estado da Bahia, a 280 km de Salvador. A região compreende 20 municípios e estende-se por uma área de cerca de 10.000 Km², coberta por Mata Atlântica. Os moradores locais trabalham principalmente na agricultura, sendo esta atividade realizada muitas vezes na proximidade de florestas (GUIMARÃES *et al.*, 2016). O outro local de coleta foi o ambulatório de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), que é centro de referência no diagnóstico de LTA, recebendo pacientes de todos os estados do país (figura 3).



Figura 3: Localização das áreas de coleta das amostras da pesquisa. **(A)** Corte de Pedra

(B) Hospital Universitário de Brasília (HUB).

1.3 Coleta das amostras

Na região de Corte de Pedra, a coleta de material biológico foi realizada pelas Dras. Elza Ferreira Noronha e Nadjar Nitz e no HUB os procedimentos foram realizados pela equipe de residência em dermatologia sob a orientação do Dr. Ciro Martins Gomes. O sangue foi coletado por punção venosa em tubo BD VACUETTE[®], contendo Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) K3 jateado na parede interna e também em tubos BD Vacutainer[®] SST[®] II Advance[®] com ativador de coágulo e gel separador para obtenção de soro. Parte do sangue foi imediatamente armazenada em tubo tipo *ependorf* contendo *RNAlater* (Thermo Fischer Scientific, EUA). Os pacientes que apresentavam lesão ativa (figura 4) receberam anestesia local com lidocaína a 2% e realizou-se biópsia da borda da lesão com o auxílio de “punch” 6 mm. De modo semelhante ao realizado com as amostras de sangue, as biópsias foram divididas em fragmentos, sendo que um deles também foi armazenado em *RNAlater*. Todo o material biológico foi transportado para o Laboratório Interdisciplinar de Biociências/UnB (LabIBC/UnB) para realização dos testes laboratoriais.



Figura 4: Fotografias de lesões de alguns pacientes da pesquisa. **(A)** Lesão de paciente de Corte de Pedra com LCL primária **(B)** Lesão de paciente atendido no HUB com LCL primária. **(C)** Lesão de paciente de Corte de Pedra com LCL recidiva e **(D)** Lesão de paciente atendido no HUB LCL recidiva.

1.4 Extração de DNA

1.4.1 De células do sangue periférico

A extração de DNA de células do sangue periférico dos pacientes foi realizada com o kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur, Brasil) e as instruções do fabricante foram seguidas. Inicialmente, separou-se 200 µL de sangue total que foram transferidos para um tubo tipo *ependorf* estéril de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de Tampão de Lise e 20 µL de Proteinase K. Após incubação de 30 minutos à 56°C, foi adicionado 400 µL de Tampão de Ligação. Em seguida, o material foi transferido para o tubo de centrifugação com membrana de sílica e incubado por um minuto à temperatura ambiente. Após centrifugação de 13.000 × g por um minuto, o sobrenadante foi descartado com o tubo inferior e o tubo com sílica foi colocado sobre um novo tubo de coleta. A lavagem da membrana contendo o DNA genômico foi realizada adicionando-se primeiramente 500 µL de Tampão de Lavagem I e centrifugando a 13.000 × g por um minuto e, em seguida, adicionou-se 600 µL de Tampão de Lavagem II e novamente realizou-se centrifugação a 13.000 × g por um minuto. A eliminação do etanol residual presente nas soluções de lavagem foi feita por meio de centrifugação em velocidade máxima por quatro minutos. Por fim, colocou-se o tubo filtro em microtubo de 1,5 mL e o DNA foi ressuscitado em 100 µL de Tampão de Eluição previamente aquecido à temperatura de 56°C. Após incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a 13.000 × g por um minuto, o DNA foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

1.4.2 Das biópsias

A extração de DNA das biópsias dos pacientes também foi realizada com o kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur, Brasil) e as instruções do fabricante foram seguidas conforme descrito no item anterior. Contudo, a fim de melhorar a eficiência da extração, os fragmentos foram previamente macerados com auxílio de bisturi a fim de aumentar a superfície de contato da amostra biológica com o Tampão de Lise e Proteinase K.

1.4.3 De formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*

DNAs de *L. braziliensis* IOC-L 2483 (MHOM/BR/2000/LTCP 13396) e de *L. guyanensis* M44142 também foram extraídos a fim de serem utilizados como controles positivos nas PCRs. Estes foram obtidos de formas promastigotas

crecidas em meio de cultura Difco™ *Liver Infusion Broth* e cultivadas no próprio laboratório. Contou-se 5×10^6 parasitos e realizou-se centrifugação a $1.500 \times g$ por dez minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1x, passando-se por centrifugações a $1.500 \times g$ por cinco minutos. O *pellet* foi ressuspensão em 200 μ L de Tampão de Lise, no qual foi adicionado 20 μ L de Proteinase K e procedeu-se a extração por meio do kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur, Brasil), o qual já teve o protocolo descrito anteriormente.

1.5 Quantificação e análise do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, EUA) com 3 μ L de DNA e a pureza do DNA foi avaliada pela razão entre as absorvâncias 260/280 nm. A qualidade do DNA foi verificada por PCR convencional pela amplificação do gene constitutivo β - actina, os *primers* utilizados foram BAA (5'-ATCTGGCACCACACCTTCCTACAATGAGCTGCG-3') e BAS (5'-CGTACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3') (ROSSI *et al.*, 1994). As condições da PCR foram: 50 ng do DNA molde, tampão de reação 1x (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl) (Invitrogen), 3 mM $MgCl_2$, 0,1 μ M de cada *primer*, 0,2 mM dNTPs (Illustra®, GE, UK) e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA), com um volume final de 25 μ L. A PCR foi realizada com desnaturação inicial de 95°C por cinco minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por um minuto, extensão a 72°C por um minuto, uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Os amplicons foram separados através da corrida eletroforética em gel de agarose a 1,0% (GE Healthcare) corado com brometo de etídio 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1x (Tris acetato 90 mM pH 8,0; EDTA 25 mM).

1.6 Extração de RNA viral

1.6.1 De células do sangue periférico e de biópsias

A extração de RNA viral de amostras de sangue e de biópsia previamente armazenadas em RNAlater foi realizada com o kit comercial *Mini Spin Vírus RNA* (Biopur, Brasil) e as instruções do fabricante foram seguidas. No caso do sangue, separou-se 200 μ L que foram transferidos para um tubo tipo *ependorf* estéril de 1,5 mL. Adicionou-se 600 μ L de Tampão de Lise RV, 20 μ L de Proteinase K e 20 μ L de Carreador RNA. Após incubação de 30 minutos à 56°C foi adicionado 400 μ L de Tampão de Ligação. Em seguida, o material foi transferido para o tubo de

centrifugação com membrana de sílica e incubado por um minuto à temperatura ambiente. Após centrifugação de 5.900 × g por um minuto, o sobrenadante foi descartado com o tubo inferior e o tubo com sílica foi colocado sobre um novo tubo de coleta. A lavagem da membrana contendo o RNA viral foi realizada adicionando-se primeiramente 600 µL de Tampão de Lavagem R1 e centrifugando a 5.900 × g por um minuto e, em seguida, adicionou-se 600 µL de Tampão de Lavagem R2 e novamente realizou-se centrifugação a 5.900 × g por um minuto. A eliminação do etanol residual presente nas soluções de lavagem foi feita por meio de centrifugação em velocidade máxima por quatro minutos. Por fim, colocou-se o tubo filtro em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL e o DNA foi ressuspensionado em 80 µL de Tampão de Eluição previamente aquecido à temperatura de 56°C. Após incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a 5.900 × g por um minuto, o RNA viral foi quantificado e armazenado a -80 °C até a etapa de preparação do DNA complementar (cDNA).

1.6.2 De formas promastigotas de *L. guyanensis*

O RNA viral de *L. guyanensis* IOC-L1398 (MHOM/BR/1989/IM3597), cepa que apresenta o LRV1, foi extraído a fim de ser utilizado como controle positivo nas RT-PCRs. De semelhante modo, foi extraído RNA de *L. infantum* (MCER/BR/79/M6445) para ser utilizado como controle negativo. Contou-se 5x10⁶ parasitos e realizou-se centrifugação a 1.500 x g por dez minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1x, passando-se por centrifugações a 1.500 x g por cinco minutos. O *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de Tampão de Lise, no qual foram adicionados 20 µL de Proteinase K e 20 µL de Carreador RNA e procedeu-se a extração por meio do kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur), o qual já teve o protocolo descrito anteriormente.

1.7 Quantificação do RNA viral extraído e síntese de cDNA

As amostras de RNA viral foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fischer Scientific, EUA) com 2 µL de RNA viral e a pureza do RNA foi avaliada pela razão entre as absorvâncias 260/280 nm. A síntese de cDNA foi realizada por meio do kit *SuperScript™ IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction* (Invitrogen, EUA), as condições utilizadas foram 10 µM do primer reverso gene-específico, 10 mM dNTP mix e a amostra de RNA viral (10 pg–5 µg), chegando num volume total de 13 µL. As amostras passaram por breve centrifugação e

aquecimento a 65°C por cinco minutos. Após aquecimento, foram imediatamente acondicionadas em gelo por um minuto. Em seguida, adicionou-se 5x SSIV Buffer, DTT 100 mM, *Ribonuclease Inhibitor* e *SuperScript™ IV Reverse Transcriptase* (200 U/μL) a cada amostra completando um volume final de 20 μL. As amostras passaram novamente por breve centrifugação e aquecimento de 50°C por 50 minutos e de 80°C por 10 minutos. As etapas de aquecimento foram realizadas em termociclador T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA). O cDNA foi armazenado a -20°C.

1.8 Diagnóstico sorológico

1.8.1 ELISA

A presença de anticorpos contra antígenos de *Leishmania* foi avaliada por ELISA com Antígenos Solúveis de *Leishmania* (SLA) para anti-imunoglobulina G (IgG), de acordo com técnicas padronizadas no laboratório (LAURIA-PIRES *et al.*, 2000).

1.8.1.1 Preparo de antígenos para ELISA

A coleta das formas promastigotas de *L. braziliensis* foi realizada por centrifugação a 2.200 x g por 15 minutos a 4°C, lavadas três vezes com PBS pH 7,4 por igual período e ressuspensas em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento a -20°C/descongelamento a 37°C. As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram lisadas de forma mecânica com auxílio de um triturador a 4°C para rompimento da membrana dos parasitos. O lisado foi centrifugado novamente a 3.600 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido, centrifugado a 10.000 x g por dez minutos e ressuspensão em 2 mL de água destilada. A concentração de proteínas foi determinada e alíquotas dos extratos foram armazenadas a -80°C.

1.8.1.2 Sensibilização das placas

Microplacas de fundo chato com 96 poços foram sensibilizadas separadamente com 50 μL/poço de cada um dos antígenos brutos (antígenos não purificados) dos parasitos diluídos em PBS pH 7,4 de forma a conter 0,1 μg/poço do antígeno de *L. braziliensis*. Após a incubação por 18 horas a 4°C em câmara úmida, o excesso de antígenos foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween-20*. Para bloqueio dos sítios de adesão livres das

proteínas que ainda existiam na superfície dos poços, foram adicionados 100 µL/poço de PBS/leite desnatado a 5%. Deixou-se por mais de 2 horas incubadas a 37°C em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com *Tween-20*. As placas sensibilizadas foram imediatamente envolvidas em papel laminado e guardadas a - 20° C.

1.8.1.3 Incubação do primeiro anticorpo

Para detecção de anticorpos específicos, os soros foram diluídos 1:100 em PBS/leite desnatado 2% e adicionados à placa 50 µL/poço, em triplicata. Após duas horas de incubação a 37°C em câmara úmida o excesso foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com *Tween-20*. Em cada placa, os soros controles positivos e negativos foram adicionados nas mesmas condições. Para controle dos reagentes foram adicionados apenas PBS/leite desnatado 2%.

1.8.1.4 Incubação do segundo anticorpo

O conjugado previamente testado e titulado composto por anticorpos anti-IgG humano e marcado com peroxidase foi diluído 1:500 em PBS/leite desnatado a 2% e adicionado à placa 50 µL/poço. Após duas horas de incubação a 37°C em câmara úmida o excesso foi retirado e as placas novamente lavadas três vezes com *Tween-20*.

1.8.1.5 Revelação e leitura

A revelação dos imunocomplexos utilizou como substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a diluição foi de 2 µL em 5 mL de tampão de citrato de sódio/ácido cítrico pH 5,0, contendo o cromógeno *o-Phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) a 2 mg. Este foi adicionado à placa (50 µL/poço) e incubado por vinte minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, foi adicionado 50 µL/poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) para interromper a reação de H₂O₂. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos na ausência de luz. Passado o tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. O ponto de corte foi determinado a partir da média dos brancos subtraída dos controles negativos de cada placa. As amostras com valor abaixo de 10% do ponto de corte foram consideradas negativas, aquelas com valor acima de 10% do ponto de corte foram consideradas positivas e as amostras com valores intermediários foram consideradas indeterminadas.

1.9 Dosagem de citocinas

Realizou-se a dosagem das citocinas: interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-17A (IL-17A) por meio do kit *CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit* (BD Biosciences) e seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente, adicionou-se 25 μ L dos soros dos pacientes em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL devidamente identificados. Assim como os soros, também foram adicionados em tubos tipo *ependorf* de 1,5 mL, 25 μ L de controles da reação (preparados por meio de diluição seriada a partir do *Top Standard* oferecido no kit). Em seguida, aos tubos já com soro, adicionou-se 25 μ L de *capture beads* e 25 μ L de *Human Th1/Th2/Th17-II PE Reaction Reagent*. Os tubos foram incubados por três horas à temperatura ambiente em local sem exposição de luz. Após o período de incubação, adicionou-se 500 μ L de *Wash Buffer* em cada tubo e centrifugou-se a 200 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se mais 250 μ L de *Wash Buffer* em cada tubo, ressuspensando-se o pellet. 200 μ L do conteúdo total dos tubos foram transferidos para uma placa de 96 poços e a leitura foi realizada em citômetro BD LSRFortessa™. Os dados foram analisados no software FCAP 3.0 (BD Biosciences®, USA).

1.10 Diagnóstico Molecular

1.10.1 PCR em tempo real (qPCR)

1.10.1.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária

Inicialmente, foi estabelecida uma curva padrão tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* spp. para se determinar a carga parasitária das amostras. A curva foi feita através de diluições seriadas de DNA do parasito (1:10), obtendo-se as seguintes concentrações: 500 ng/ μ L, 50 ng/ μ L, 5 ng/ μ L, 0,5 ng/ μ L, 0,05 ng/ μ L e 0,005 ng/ μ L. Os *primers* utilizados foram PPF (5'-GGC CCA CTA TAT TAC ACC AAC CCC-3') e PPR (5'-GGG GTA GGG GCG TTC TGC GAA-3') (PITA-PEREIRA *et al.*, 2012). A reação foi padronizada para um volume final de 20 μ L, com 1X de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 0,2 μ M de cada *primer* e 2 μ L de cada uma das concentrações de DNA. As condições da qPCR foram: 94°C por 12 minutos e 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após a amplificação, a *melting curve* foi

padronizada com desnaturação inicial de 95°C por cinco segundos, seguida por 50°C durante 15 segundos e 95°C durante cinco segundos. As amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®) e em termociclador Applied Biosystems™ QuantStudio 3. Os pontos da curva foram utilizados como controles positivos nas qPCRs com as amostras dos pacientes e o resultado da curva padrão foi armazenado para os cálculos de carga parasitária.

1.10.1.2 Detecção e quantificação de DNA de *Leishmania* spp.

Foi realizada qPCR com amostras de DNA de sangue e de biópsias dos pacientes tendo como alvo kDNA *Leishmania* spp.. Os *primers* e as condições previamente estabelecidos na determinação da curva padrão foram os mesmos utilizados para as amostras, sendo que estas estavam na concentração de 25 ng/μL. Foram incluídos em todas as reações dois controles negativos, um sem DNA (branco) e o outro com DNA de células HEK não infectadas, e dois pontos da curva foram utilizados como controles positivos. As amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®) e em termociclador Applied Biosystems™ QuantStudio 3. As cargas parasitárias foram calculadas com o auxílio do *software* QuantStudio™ Design & Analysis v1. 4.3.

1.11 Identificação das espécies de *Leishmania*

1.11.1 Amplificação da região ITS1 de *Leishmania* spp.

As amostras positivas na qPCR de kDNA foram selecionadas para amplificação da região espaçadora do gene de RNA ribossomal (rRNA) ITS1 utilizando os primers LITSR – (5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3') e L5.8S – (5' TGA TAC CACTTA TCG CAC TT 3') (EL TAI *et al.*, 2000). Os produtos são de aproximadamente 330 pares de base (pb). A amplificação dessa região do nDNA ocorreu nas seguintes condições: 20 ng/μL de DNA molde, tampão de reação 1x (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,25 μM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen/LifeTechnologies/Brazil). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA) com a padronização: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30

segundos e uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Dois controles negativos foram utilizados: um sem DNA (branco) e o outro com DNA de células HEK não infectadas e como controle positivo foi utilizado DNA de *L. braziliensis*. Os produtos da primeira cPCR foram reamplificados a fim de que a reação fosse otimizada para o sequenciamento. O produto da primeira PCR foi diluído na razão 1:10 e com 2 µL da diluição realizou-se a segunda PCR, utilizando os mesmos *primers*, reagentes e condições da primeira amplificação. Todos os produtos de cPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídio a 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1x (Tris acetato 90 mM pH 8,0 e EDTA 25 mM). Após corrida de parte do produto da cPCR em gel de agarose e visualização da banda de tamanho esperado, o restante do produto passou por um processo de purificação para seguir para o sequenciamento. A purificação dos produtos foi realizada por meio do *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, observando-se as instruções do fabricante. O DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE) com 2 µL de DNA e armazenado a -20°C até ser enviado para sequenciamento.

1.11.2 Sequenciamento dos produtos de cPCR e análise das sequências

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados comercialmente pela empresa Genomic Engenharia Molecular, São Paulo. As sequências foram editadas usando o software Geneious (www.geneious.com) e analisadas pelo algoritmo BLASTn disponível no site do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

1.12 Detecção de LRV1

1.12.1 PCR da transcrição reversa (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada com amostras de cDNA de sangue e de biópsias dos pacientes tendo como alvo a região ORF1 do genoma viral a fim de confirmar os resultados obtidos por qRT-PCR. Os *primers* utilizados foram LRV1 F (5'-ATGCCTAAGAGTTTGGATTCG-3') e LRV1 R (5'-ACAACCAGACGATTGCTGTG-3'), sendo os produtos de 240 pb (CANTANHÊDE *et al.*, 2015). A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 5 µL de cDNA, tampão de reação 1x (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl), 1 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase

(Invitrogen/Life Technologies/Brazil), com volume final de 25 μ L . Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo T-100 Thermal Cycler (Bio-Rad, EUA) com a padronização: desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 57°C por 15 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Dois controles negativos foram utilizados: um sem DNA (branco) e o outro com cDNA de *L. infantum* (MCER/BR/79/M6445), e como controle positivo foi utilizado cDNA de *L. guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM35). Os produtos da RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio a 0,5 mg/mL, utilizando tampão TAE 1x (Tris acetato 90 mM pH 8,0 e EDTA 25 mM).

1.12.2 PCR em tempo real da transcrição reversa (qRT-PCR)

Foi realizada qRT-PCR com amostras de cDNA de sangue e de biópsias dos pacientes tendo como alvo a região ORF1 do genoma viral. Os *primers* utilizados foram LRV1 F (5'-ATGCCTAAGAGTTTGGATTTCG-3') e LRV1 R (5'-ACAACCAGACGATTGCTGTG-3') (CANTANHÊDE *et al.*, 2015). A reação foi padronizada para um volume final de 20 μ L, com 1X de Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), 0,2 mM de cada *primer* e 2 μ L de cDNA. As condições da qPCR foram: 95°C por dez minutos e 40 ciclos a 94°C por 15 segundos, 53°C por 40 segundos e 72°C por 10 segundos. Após a amplificação, a *melting curve* foi padronizada com desnaturação inicial de 95°C por 15 segundos, seguida por 60°C durante um minuto e 95°C durante 15 segundos. Foram incluídos em todas as reações dois controles negativos, um sem DNA (branco) e o outro com cDNA de *L. infantum* (MCER/BR/79/M6445), o controle positivo foi o cDNA de *L. guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM35). As amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp[®]) e em termociclador Applied Biosystems[™] QuantStudio 3.

1.13 Análise estatística

Foram realizadas análise de correlação, qui-quadrado e regressão logística utilizando-se o programa SAS[®] v9.4 (North Carolina, EUA) em nível de significância de 5% e considerando a natureza dos dados (se qualitativos ou quantitativos). A análise de correlação considerou as seguintes variáveis: carga parasitária, títulos de IgG anti- *Leishmania* e concentração de cada uma das citocinas alvo do estudo

(IL17A, IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10). O teste do qui-quadrado foi utilizado para averiguar se houve associação entre a manifestação clínica com o sexo e a faixa etária do paciente e a regressão logística relacionou carga parasitária, títulos de IgG anti- *Leishmania* e concentração das citocinas com as manifestações clínicas.

2. Desenvolvimento do estudo *in vitro*: papel do LRV1 na taxa de infecção e na resposta ao tratamento com antimonial pentavalente e anfotericina B

Desenvolveu-se experimentos *in vitro* a fim de verificar diferenças em relação às taxas de infecção e resposta ao tratamento com antimonial pentavalente e anfotericina B entre cepas de *Leishmania* spp. que não apresentam o LRV1 e a cepa que o apresenta.

2.1 Cultura de Células e Parasitos

2.1.1 Manutenção das células J774.A1

A manutenção da cultura de macrófagos J774.A1 foi realizada pela técnica Ana de Cássia Rosa. As células foram mantidas em meio DMEM 5% SFB, pH 7.2 e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas e o repique das células ocorria sempre que se observava alta densidade das células e a formação da monocamada com mais de 80% de confluência.

2.1.2 Manutenção dos parasitos

As formas promastigotas de *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *Leishmania guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (apresenta o LRV1) foram mantidas em meio RPMI 10% SFB em estufa à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). Os repiques foram realizados uma vez por semana.

2.2 Comparação das taxas de infecção entre espécies de *Leishmania*

2.2.1 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de *Leishmania*

Contou-se 1×10^6 macrófagos J774.A1 e estes foram colocados em placa de 12 poços, cada poço com 2 mL de meio RPMI 10%, por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para adesão das células e formação de

monocamada. Depois desse período, realizou-se a infecção dos macrófagos com 5×10^6 parasitos, sendo estes: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *Leishmania guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (apresenta o LRV1). Após 72 horas, retirou-se o sobrenadante para dosagem de citocinas, em seguida as células foram raspadas com auxílio de haste de plástico e cerca de 1 mL foi colocada em tubo *ependorf* de 1,5 mL para extração de DNA. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.2 Extração de DNA dos macrófagos infectados

A extração de DNA dos macrófagos infectados foi realizada com o kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur, Brasil) e as instruções do fabricante foram seguidas. O sedimento foi lavado duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) 1x, passando-se por centrifugações a $1.500 \times g$ por cinco minutos. O pellet foi ressuspenso em 200 μ L de Tampão de Lise, no qual foi adicionado 20 μ L de Proteinase K. Após incubação de 30 minutos à 56°C foi adicionado 400 μ L de Tampão de Ligação. Em seguida, o material foi transferido para o tubo de centrifugação com membrana de sílica e incubado por um minuto à temperatura ambiente. Após centrifugação de $13.000 \times g$ por um minuto, o sobrenadante foi descartado com o tubo inferior e o tubo com sílica foi colocado sobre um novo tubo de coleta. A lavagem da membrana contendo o DNA genômico foi realizada adicionando-se primeiramente 500 μ L de Tampão de Lavagem I e centrifugando a $13.000 \times g$ por um minuto e em seguida adicionou-se 600 μ L de Tampão de Lavagem II e novamente realizou-se centrifugação a $13.000 \times g$ por um minuto. A eliminação do etanol residual presente nas soluções de lavagem foi feita por meio de centrifugação em velocidade máxima por quatro minutos. Por fim, colocou-se o tubo filtro em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL e o DNA foi ressuspendido em 100 μ L de Tampão de Eluição previamente aquecido à temperatura de 56°C . Após incubação à temperatura ambiente por um minuto e centrifugação a $13.000 \times g$ por um minuto, o DNA foi armazenado a -20°C até o momento de sua utilização.

2.2.3 Quantificação e análise do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, EUA) com 3 μ L de DNA e a pureza do DNA foi avaliada pela razão entre as absorbâncias 260/280 nm. A qualidade do DNA foi verificada por PCR

convencional pela amplificação do gene constitutivo β - actina, conforme descrição anterior (item 1.5).

2.2.4 PCR em tempo-real (qPCR) para verificação das cargas parasitárias

Foi realizada qPCR das células infectadas com *L. braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *L. guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *L. guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (apresenta o LRV1) tendo como alvo kDNA de *Leishmania* spp. de acordo com a descrição do item 1.8.1.1.

2.2.5 Dosagem de citocinas

Realizou-se a dosagem das citocinas: IL-2, IL-4, IL-5, TNF e IFN- γ por meio do kit *CBA Mouse Th1/Th2 Cytokine Kit* (BD) e seguindo as instruções do fabricante conforme descrição do item 1.12.

2.3 Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina e anfotericina B

2.3.1 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de *Leishmania* e tratamento com antimoniato de meglumina

Contou-se 1×10^6 macrófagos J774.A1 e estes foram colocados em placas de 24 poços, cada poço com 2 mL de meio RPMI 10%, por 24 horas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ para adesão das células e formação de monocamada. Depois desse período, realizou-se a infecção dos macrófagos com 5×10^6 parasitos, sendo estes: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *Leishmania guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (apresenta o LRV1). Após 72 horas, foi realizado o tratamento com 100 mg/mL de antimoniato de meglumina (Glucantime®), observando-se sempre que houvesse grupos controles (que não recebiam o tratamento). Após 72 horas, as células foram raspadas com auxílio de haste de plástico e cerca de 1 mL foi colocada em tubo *eppendorf* de 1,5 mL para extração de DNA. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.2 Infecção dos macrófagos J774.A1 com espécies de *Leishmania* e tratamento com anfotericina B

Contou-se 1×10^6 macrófagos J774.A1 e estes foram colocados em placas de 24 poços, cada poço com 2 mL de meio RPMI 10%, por 24 horas a 37°C em

atmosfera úmida com 5% de CO₂ para adesão das células e formação de monocamada. Depois desse período, realizou-se a infecção dos macrófagos com 5 x 10⁶ parasitos, sendo estes: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *Leishmania guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (apresenta o LRV1). Após 72 horas, foi realizado o tratamento com 2,5 mg/mL de anfotericina B (*Amphotericin B from Streptomyces*- Sigma), previamente diluída em DMSO, observando-se sempre que houvesse grupos controles (que não recebiam o tratamento). Após 72 horas, as células foram raspadas com auxílio de haste de plástico e cerca de 1 mL foi colocada em tubo *ependorf* de 1,5 mL para extração de DNA. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.3 Extração, quantificação e análise da qualidade do DNA

Semelhantemente ao que foi realizado no experimento para comparação das taxas de infecção citado anteriormente, a extração de DNA dos macrófagos infectados tratados e não-tratados foi realizada com o kit comercial *Mini Spin Plus* (Biopur, Brasil) e as instruções do fabricante foram seguidas. Após extração, as amostras de DNA foram quantificadas e avaliadas quanto à pureza conforme já citado anteriormente (item 2.2.3). A qualidade do DNA foi verificada por PCR convencional pela amplificação do gene constitutivo β- actina de acordo ROSSI *et al.*, 1994 (item 1.5)

2.3.4 PCR em tempo-real (qPCR) para verificação das cargas parasitárias

Foi realizada qPCR das células infectadas tratadas e não-tratadas (grupo controle) tendo como alvo kDNA de *Leishmania* spp.. Os *primers* utilizados foram PPF e PPR (PITA-PEREIRA *et al.*, 2012) e as condições foram as mesmas já citadas no item 1.8.1.1. Foram incluídos dois controles negativos, um sem DNA (branco) e o outro com DNA de células HEK não infectadas. As amplificações foram realizadas em duplicata em placas de 96 poços (Optical 96-Well Reaction Plate, MicroAmp®) e em termociclador Applied Biosystems™ QuantStudio 3.

2.4 Análise estatística

Utilizou-se o aplicativo Microsoft Excel para a realização da análise descritiva dos dados obtidos nos experimentos *in vitro*. Esta análise considerou medidas de tendência central e medidas de dispersão para descrição e avaliação dos resultados.

V. RESULTADOS

1. Experimentos *in vivo*

1.1 Perfil do grupo amostral

Os 75 pacientes do estudo foram classificados quanto à manifestação de sintomas. Sendo assim, foram obtidos 23 (31%) pacientes assintomáticos, 34 (45%) pacientes com LCL primária, 10 (13%) pacientes com LCL recidiva e oito (11%) pacientes com LMC. Não houve indivíduos com LMC em Corte de Pedra, assim como o HUB não atendeu indivíduos assintomáticos (figura 5).

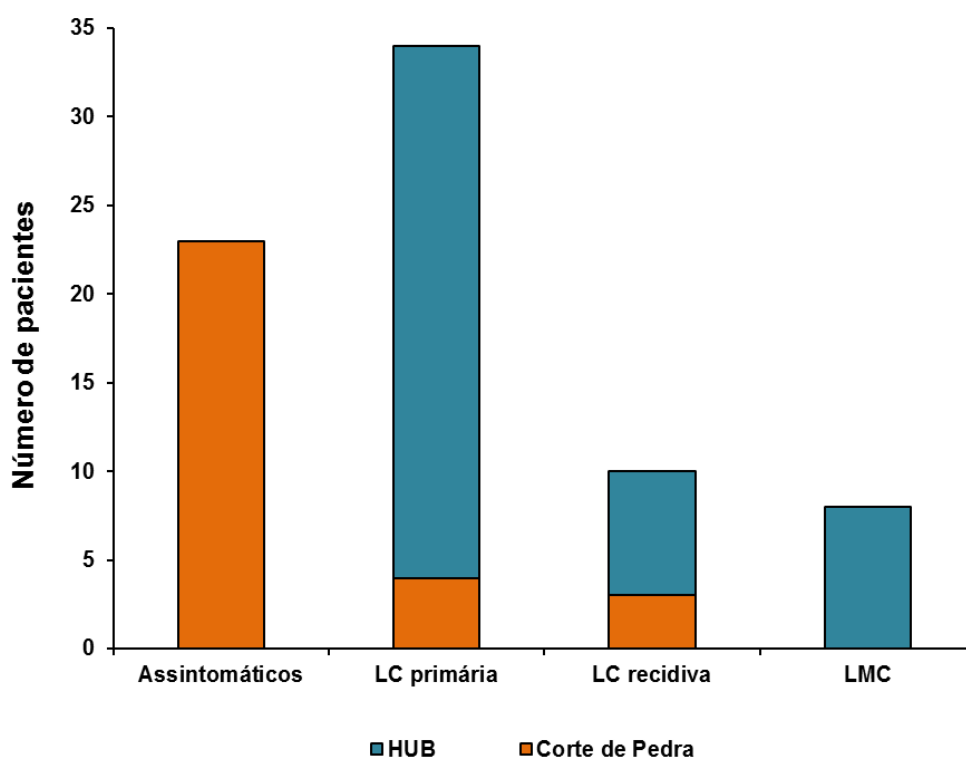


Figura 5: Quantidade de pacientes do estudo de acordo com a manifestação clínica e por local de coleta das amostras

Os pacientes também foram divididos quanto ao sexo, sendo 47 (63%) do sexo masculino e 28 (37%) do sexo feminino. Em relação à faixa etária, 11 pacientes (15%) tinham de 18 a 29 anos, 44 pacientes (59%) apresentavam idades de 30 a 59 anos e 20 pacientes (27%) tinham 60 anos ou mais (tabela 1).

Tabela 1: Número de pacientes por sexo e faixa etária de acordo com manifestação clínica.

	Assintomáticos	LC primária	LC recidiva	LMC	p-value
Sexo					0.154
Masculino (%)	10 (21)	25 (53)	7 (15)	5 (11)	
Feminino (%)	13 (46)	9 (32)	3 (11)	3 (11)	
Faixa etária					0.156
18 a 29 anos (%)	1 (9)	6 (54)	1 (9)	3 (28)	
30 a 59 anos (%)	13 (28)	23 (52)	6 (15)	2 (5)	
≥ 60 anos (%)	9 (43)	5 (29)	3 (14)	3 (14)	

Quanto à origem desses pacientes, 30 eram provenientes de Corte de Pedra (BA) e os outros 45 eram pacientes de diversas localidades e foram atendidos no HUB (DF), sendo os estados representados: Alagoas, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso e Pará. A distribuição desses pacientes por local pode ser observada na figura 6.

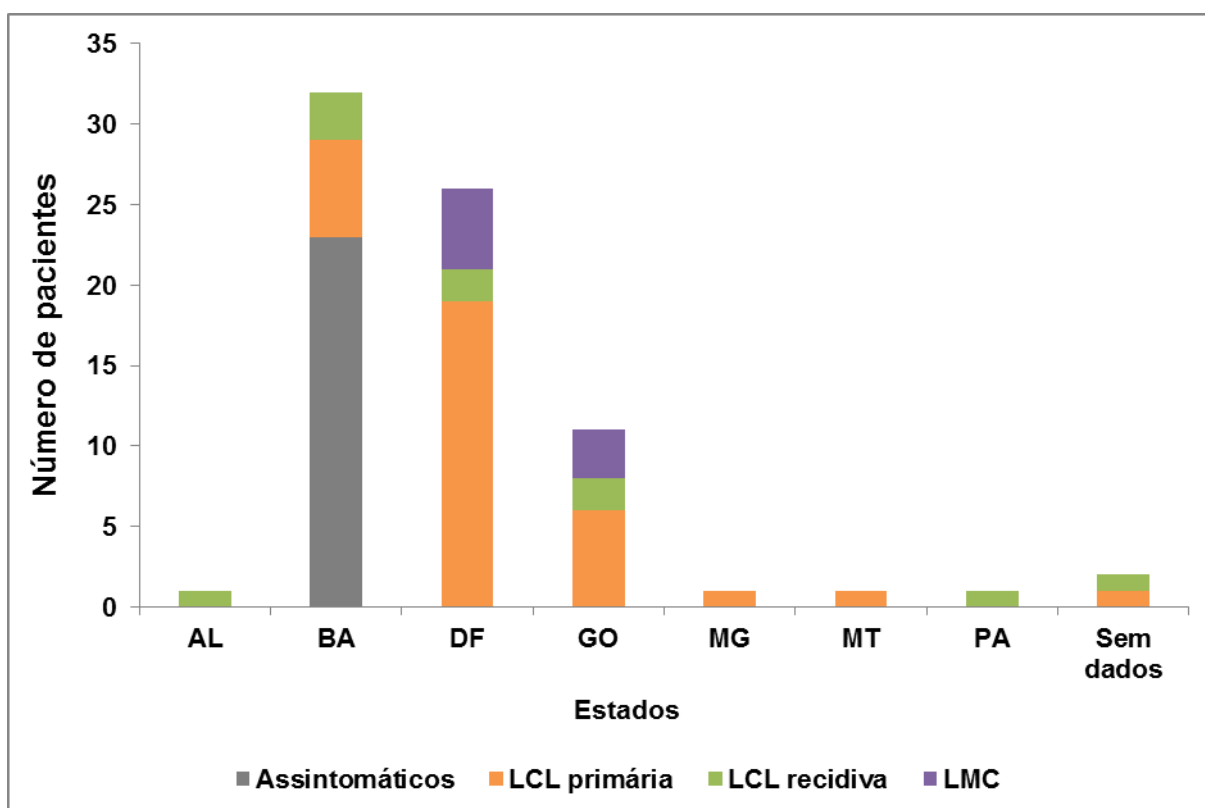


Figura 6: Número de pacientes por estado e de acordo com a manifestação clínica. Os estados representados são: AL- Alagoas, BA- Bahia, DF- Distrito Federal, GO-Goiás, MG- Minas Gerais, MT- Mato Grosso, PA- Pará.

1.2 Avaliação da resposta imune

1.2.1 ELISA

O diagnóstico sorológico de cada indivíduo foi realizado pela técnica de ELISA (anti-IgG). A partir da validação com controles negativos e positivos, chegou-se ao

valor de titulação de 0,388 U/ μ L, sendo que foram considerados positivos pacientes com titulação superior a 10% desse valor, ou seja, 0,426 U/ μ L e foram considerados negativos pacientes com titulação inferior a 10% do mesmo valor, ou seja, 0,350 U/ μ L. Pacientes com títulos de anticorpos intermediários tiveram seu diagnóstico considerado indeterminado.

Visto isso, dentre os 75 pacientes avaliados, 60 (80%) foram positivos. Em relação ao total dos pacientes de cada grupo, a positividade foi de 96% nos pacientes assintomáticos, 73% nos pacientes com LCL primária, 70% nos pacientes com LCL recidiva e 75% nos pacientes com LMC.

A média da concentração de anticorpos nos pacientes assintomáticos foi de $0,99 \pm 0,30$ U/ μ L, nos pacientes com LCL primária foi de $1,09 \pm 0,20$ U/ μ L, nos pacientes com LCL recidiva foi de $1,58 \pm 0,50$ U/ μ L e nos pacientes com LMC, a concentração de anticorpos foi de $1,96 \pm 0,46$ U/ μ L. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos clínicos. A figura 7 ilustra a concentração de anticorpos (IgG) por paciente de modo que possa se observar mais claramente o desvio entre amostras.

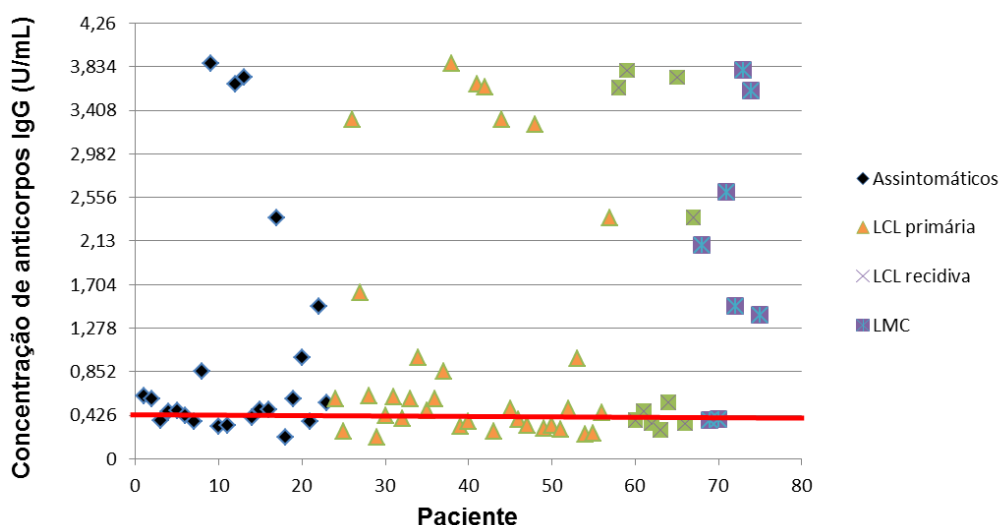


Figura 7: Concentração de anticorpos (IgG) por paciente avaliado e de acordo com as manifestações clínicas. Legenda: LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea. A linha vermelha representa onde foi realizado o ponto de corte.

1.2.2 Dosagem de citocinas

Realizou-se a dosagem das citocinas: interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-17A (IL-17A) (figura 8). Verificou-se um padrão similar na produção das citocinas IL-2 e IL-6 entre os pacientes de todos os grupos

clínicos. Além disso, houve diferença estatística significativa na produção de TNF nos pacientes assintomáticos, de IFN- γ e IL-17A nos pacientes com LCL primária e de IL-2 nos pacientes com LMC. Pacientes com LCL recidiva não apresentaram diferença significativa para nenhuma citocina avaliada (tabela 2).

A análise de correlação indicou haver uma relação direta entre IL-10 e carga parasitária; além disso, foi verificado que a produção de anticorpos correlacionou-se com a concentração de IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-4. Entre as citocinas, relacionaram-se diretamente entre si: IFN- γ e IL-17A, TNF e IL-2, TNF e IL-4, IL-2 e IL-4 (tabela 3).

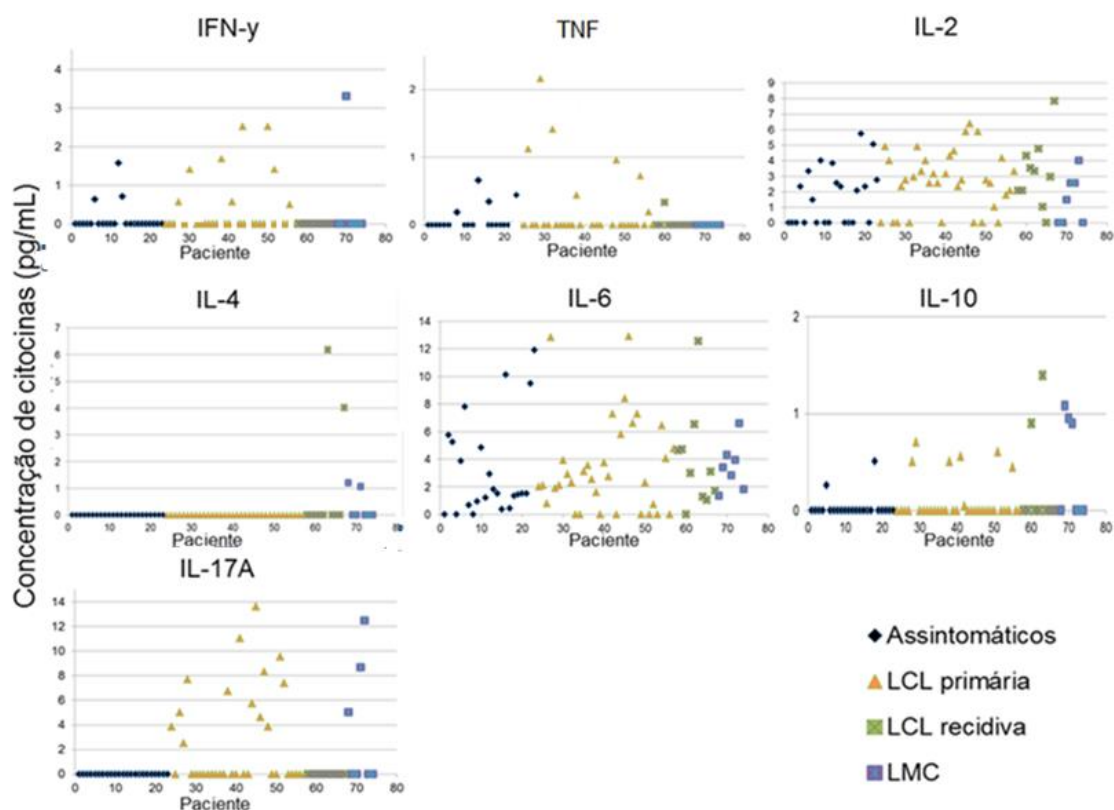


Figura 8: Concentração de IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 por paciente e de acordo com as manifestações clínicas. Legenda: IFN- γ - interferon- γ , TNF- fator de necrose tumoral, IL-2- interleucina-2, IL-4- interleucina-4, IL-6 interleucina-6. IL-10- interleucina-10, IL-17A - interleucina-17A, LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea

Tabela 2: Correlação entre as manifestações clínicas e a concentração das citocinas avaliadas- IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF.

	Assintomáticos	LCL primária	LCL recidiva	LMC
[] IL-2	ns	ns	ns	*
[] IL-4	ns	ns	ns	ns
[] IL-6	ns	ns	ns	ns
[] IL-10	ns	ns	ns	ns
[] IL-17A	ns	**	ns	ns
[] IFN- γ	ns	*	ns	ns
[] TNF	*	ns	ns	ns

Legenda: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ns- não significante, IL-2- interleucina-2, IL-4- nterleucina-4, IL-6 interleucina-6. IL-10- interleucina-10, IL-17A - interleucina-17A, IFN- γ - interferon- γ , TNF- fator de necrose tumoral, CL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea, []- concentração.

Tabela 3: Correlação entre carga parasitária, concentração de anticorpos e concentração das citocinas: IL-17A, IFN- γ , TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2

	Carga parasitária	IgG anti- <i>Leishmania</i>	[]IL-17A	[]IFN- γ	[]TNF	[]IL-10	[]IL-6	[]IL-4
IgG anti- <i>Leishmania</i>	0,04 ns							
[] IL-17A	0,01 ns	0,11 ns						
[] IFN- γ	-0,02 ns	0,25 **	0,31 ***					
[] TNF	-0,02 ns	0,19 *	0,05 ns	0,00 ns				
[] IL-10	0,23 **	0,02 ns	0,14 ns	-0,05 ns	-0,04 ns			
[] IL-6	0,03 ns	-0,13 ns	0,09 ns	-0,02 ns	-0,10 ns	0,01 ns		
[] IL-4	-0,02 ns	0,24 **	0,00 ns	-0,01 ns	0,94 ***	-0,02 ns	-0,06 ns	
[] IL-2	-0,04 ns	0,22 *	0,04 ns	0,00 ns	0,98 ***	-0,03 ns	-0,10 ns	0,94 ***

Legenda: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ns- não significante, IL-17A - interleucina-17A, IFN- γ - interferon- γ , TNF- fator de necrose tumoral, IL-10- interleucina-10, IL-6 interleucina-6, IL-4 nterleucina-4. IL-2- interleucina-2, CL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea, []- concentração.

1.3 Diagnóstico Molecular

1.3.1 Curva padrão para determinação da carga parasitária

A curva padrão tendo como alvo o kDNA de *Leishmania* spp. foi utilizada para quantificação da carga parasitária dos pacientes. Esta curva apresentou R^2 de 0,970, *slope* de -3,2281 e eficiência de 104%, sendo esta considerada aceitável quando entre 90% e 110%. A equação da reta gerada foi $y = -3,2281x + 19,413$, na

qual y é o Ct da amostra; x é a quantidade a ser calculada do produto amplificado; -3,2281 é o coeficiente angular da reta e 19,413 é o coeficiente linear (figura 9).

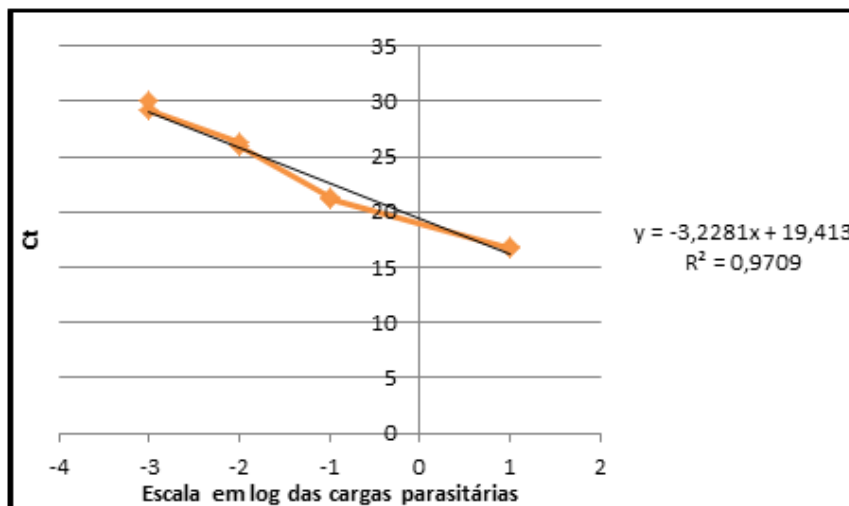


Figura 9: Curva padrão para quantificação da carga parasitária. Na equação da reta representada, y é o Ct da amostra; x é a quantidade a ser calculada do produto amplificado; -3,2281 é o coeficiente angular da reta e 19,413 é o coeficiente linear.

1.3.2 Detecção e quantificação de DNA de *Leishmania* spp.

A qPCR tendo como alvo kDNA de *Leishmania* spp. foi realizada com amostras de DNA provenientes de sangue de todos os pacientes e de lesão dos pacientes sintomáticos. Foram 46 (61%) os pacientes positivos para pelo menos um dos tipos amostrais. Os indivíduos que tiveram resultados negativos para qPCR foram mantidos no trabalho por terem sido positivos no teste sorológico (ELISA).

Dentre as 75 amostras de sangue analisadas, 27 (36%) foram positivas de acordo com as condições padronizadas. Em relação aos grupos clínicos, foram positivos: um (4%) indivíduo assintomático, 15 (44%) indivíduos com LCL primária, seis (60%) indivíduos com LCL recidiva e cinco (62%) com LMC.

Da mesma forma, realizou-se a qPCR a partir do DNA extraído de biópsias dos pacientes que apresentavam lesão, ou seja, pacientes com LCL, com LCL recidiva e com LMC. No total, foram 51 biópsias, sendo que 27 (53%) foram positivas de acordo com as condições padronizadas. Em relação aos grupos clínicos, foram

positivos: 17 (50%) indivíduos com LCL primária, seis (60%) indivíduos com LCL recidiva e quatro (50%) indivíduos com LMC (figura 10).

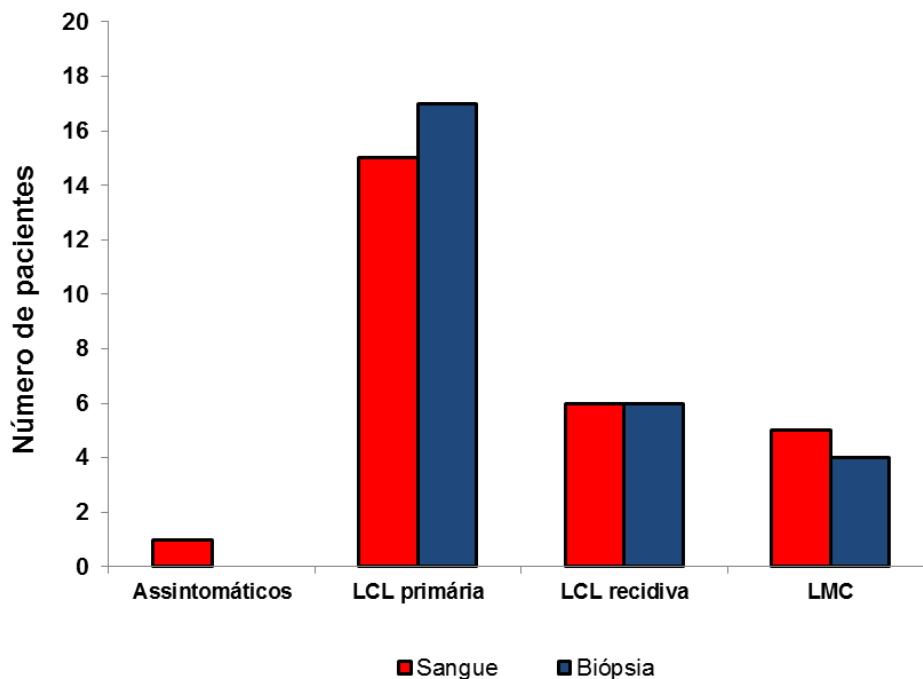


Figura 10: Número de pacientes positivos na qPCR por tipo de amostra e manifestação clínica. Legenda: LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea.

A concordância entre o diagnóstico molecular (qPCR) e o diagnóstico sorológico (ELISA) foi de 30 indivíduos (40%). Os resultados encontram-se no apêndice B. Não houve diferença estatística significativa entre os testes diagnósticos e os grupos clínicos, com exceção dos pacientes assintomáticos, em que o ELISA demonstrou ser mais sensível (figura 11).

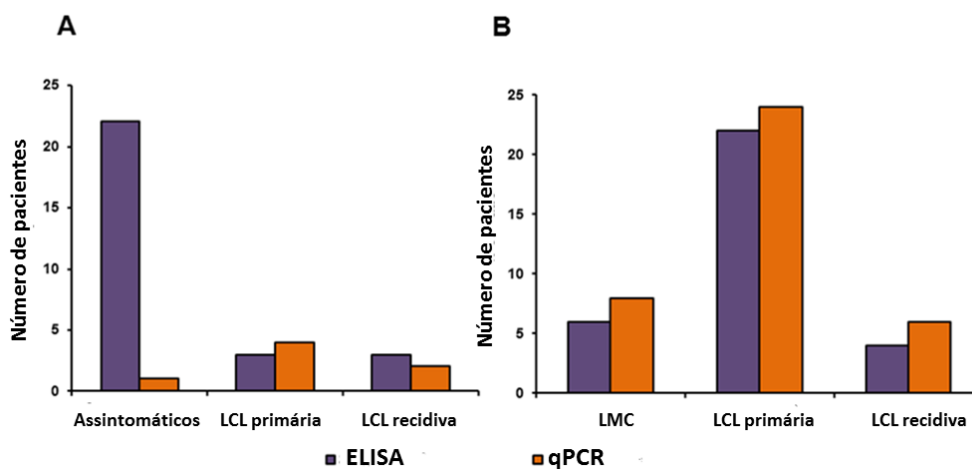


Figura 11: Distribuição dos pacientes por manifestação clínica e tipo de diagnóstico realizado. (A) Pacientes de Corte de Pedra. (B) Pacientes do HUB. Legenda: LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea.

Em relação à carga parasitária, esta apresentou um perfil diferente entre a população de Corte de Pedra e a população atendida no HUB. Em Corte de Pedra, apenas uma amostra de sangue foi positiva na qPCR, sendo esta de um indivíduo assintomático, enquanto todos os pacientes sintomáticos apresentaram biópsias positivas. A carga parasitária na amostra de sangue foi estimada em 0,008 parasitos equivalentes por 50 ng de DNA. Nas biópsias, a média de parasitos por 50 ng de DNA foi estimada em 109, variando de 0,005 a 371 parasitos equivalentes por 50 ng de DNA (Figura 12A). Em relação aos pacientes do HUB, a média de parasitos observada nas amostras de sangue foi de 0,158 parasitos equivalentes por 50 ng de DNA, variando de 0,005 a 1,473 e para as biópsias, a média da carga parasitária foi de 0,102 parasitos equivalentes por 50 ng de DNA, variando de 0,005 a 0,268 (Figura 12B). Pacientes de Corte de Pedra com lesão ativa demonstraram carga parasitária aproximadamente 1000 vezes maior do que os pacientes com lesão ativa atendidos no HUB. Ainda assim, a parasitemia não apresentou relação com a gravidade dos sintomas.

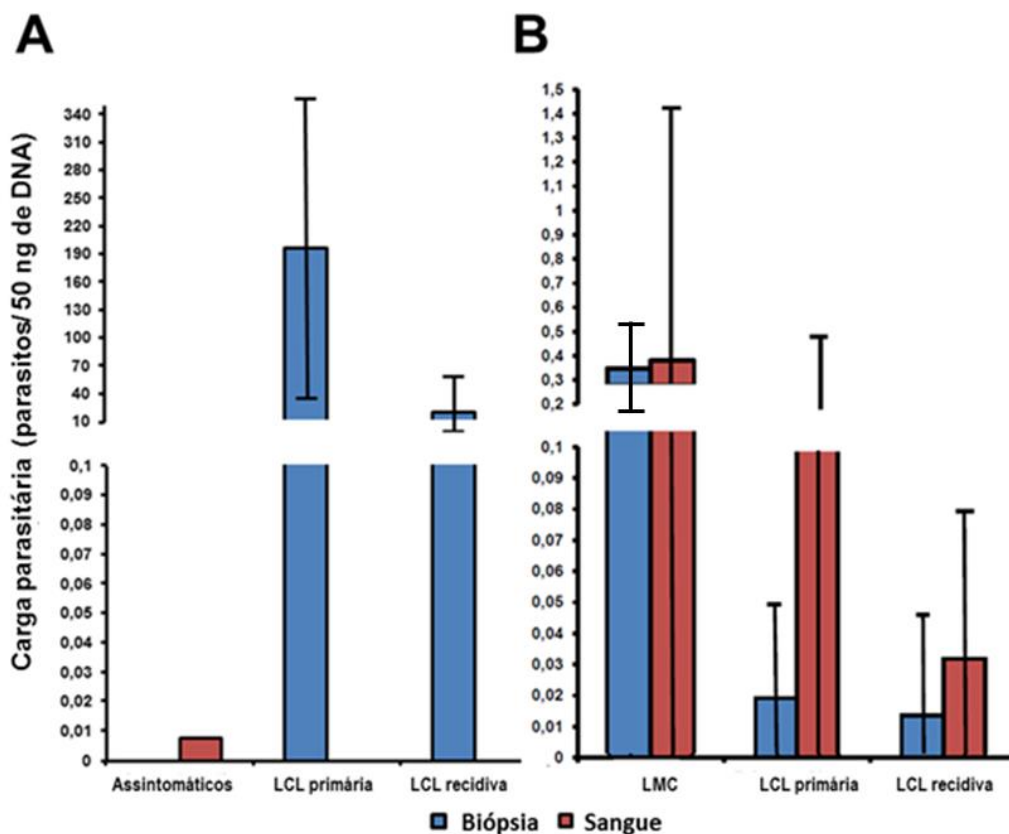


Figura 12: Determinação da carga parasitária em diferentes tecidos (sangue e biópsia) nos grupos clínicos avaliados. (A) Carga parasitária (parasitos/ 50 ng DNA) por manifestação clínica dos pacientes de Corte de Pedra. (B) Carga parasitária (parasitos/ 50 ng DNA) por manifestação clínica dos pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília. Legenda: LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea.

Na figura 13, pode-se observar o perfil da curva de *melting* de um controle negativo, um controle positivo, uma amostra negativa e uma amostra positiva.

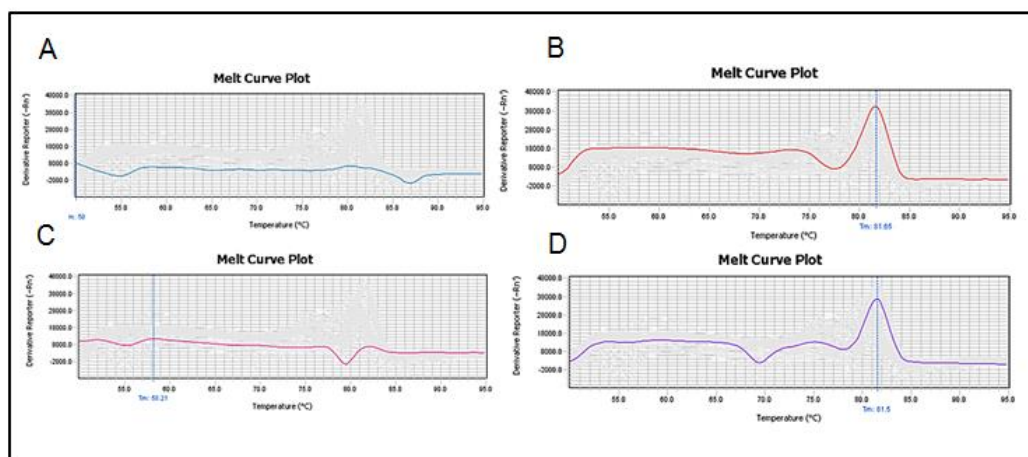


Figura 13: Exemplos de perfil das curvas de *melting* na qPCR de kDNA. (A) Controle negativo, DNA proveniente de indivíduo negativo para LTA. **(B)** Controle positivo, DNA proveniente de cultura de *Leishmania braziliensis*. **(C)** Amostra negativa, DNA proveniente de paciente da pesquisa. **(D)** Amostra positiva, DNA proveniente de paciente da pesquisa.

1.3.3 Sequenciamento dos produtos de cPCR e análise das sequências

Os produtos de PCR amplificados pelos *primers* LITSR/L5.8S utilizando-se amostras de sangue e de biópsia foram purificados e enviados para o sequenciamento automático. O sequenciamento dos fragmentos amplificados permitiu identificar as espécies de *Leishmania* presentes em 19 indivíduos da população estudada.

A análise das sequências identificou a presença de *L. amazonensis* em cinco indivíduos, todos com LCL primária. *L. braziliensis* foi detectada em oito indivíduos, cinco deles com LCL primária, dois com LMC e um com LCL recidiva. *L. guyanensis* foi identificada em seis indivíduos. Em Corte de Pedra, apenas a espécie *L. braziliensis* foi detectada, enquanto as três espécies foram identificadas nas amostras provenientes do HUB (tabela 4).

Tabela 4: Espécies de *Leishmania* identificadas pelo sequenciamento dos produtos de PCR (ITS1).

Paciente	Manifestação clínica	Local	Locus	Espécie	E-value	Identidade
13	LCL primária	Bahia	KU550594.1	<i>L. braziliensis</i>	5e ⁻⁹⁵	100%
23	LCL recidiva	Bahia	KU550593.1	<i>L. braziliensis</i>	1e ⁻⁸⁹	98%
26	LCL primária	Bahia	HG512940.1	<i>L. braziliensis</i>	1e ⁻⁸³	98%
28	LCL primária	Bahia	FN398338.1	<i>L. braziliensis</i>	1e ⁻⁸⁹	97%
33	LCL primária	Distrito Federal	FJ753388.1	<i>L. guyanensis</i>	8e ⁻¹¹⁸	99%
34	LCL primária	Goiás	FJ753373.1	<i>L. amazonensis</i>	3e ⁻¹⁴⁴	100%
35	LCL primária	Distrito Federal	KP274862.1	<i>L. amazonensis</i>	4e ⁻⁸⁵	98%
39	LCL primária	Goiás	KP274862.1	<i>L. amazonensis</i>	5e ⁻⁹⁰	98%
44	LMC	Distrito Federal	JQ397604.1	<i>L. braziliensis</i>	1e ⁻¹⁰⁹	97%
46	LCL primária	Goiás	KP274862.1	<i>L. amazonensis</i>	3e ⁻¹³⁷	99%
48	LCL primária	Distrito Federal	KP274862.1	<i>L. amazonensis</i>	5e ⁻¹⁴⁰	100%
49	LCL primária	Distrito Federal	FN398335.1	<i>L. braziliensis</i>	9e ⁻¹²⁴	100%
52	LCL primária	Distrito Federal	FN398335.1	<i>L. braziliensis</i>	3e ⁻¹¹⁷	99%
53	LMC	Distrito Federal	FN398335.1	<i>L. braziliensis</i>	3e ⁻¹¹⁶	99%
54	LCL primária	Distrito Federal	JN671917.1	<i>L. guyanensis</i>	9e ⁻¹¹¹	98%
55	LCL recidiva	Distrito Federal	FJ753387.1	<i>L. guyanensis</i>	2e ⁻¹¹⁸	99%
56	LCL recidiva	Distrito Federal	JN671917.1	<i>L. guyanensis</i>	2e ⁻¹²⁰	99%
57	LCL primária	Distrito Federal	JN671917.1	<i>L. guyanensis</i>	3e ⁻¹²³	99%
59	LCL primária	Distrito Federal	FJ753387.1	<i>L. guyanensis</i>	9e ⁻⁸¹	90%

Legenda: LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea.

1.4 Detecção do cDNA de LRV1

1.4.1 PCR em tempo real da transcrição reversa (qRT-PCR)

Foi realizada qRT-PCR com amostras de cDNA de sangue (75) e de biópsias (51) dos pacientes tendo como alvo a região ORF1 do genoma viral. Após análise, observando-se os controles da reação, verificou-se que nenhum paciente apresentava o LRV1. Na figura 14, pode-se observar o perfil da curva de *melting* de um controle negativo (cDNA de *L. infantum* MCER/BR/79/M6445), um controle positivo (cDNA de *L. guyanensis*- cepa que apresenta o LRV1- MHOM/BR/1989/IM35), uma amostra cujo cDNA foi proveniente de biópsia e uma amostra cujo cDNA foi proveniente de sangue.

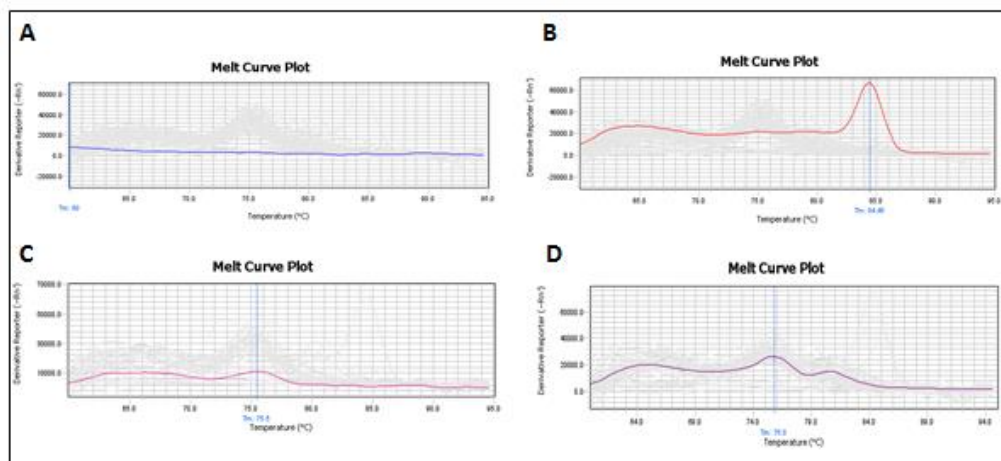


Figura 14: Exemplos de perfil das curvas de *melting* de qPCR-LRV1. (A) Controle negativo, cDNA proveniente de *L. infantum*. **(B)** Controle positivo, cDNA proveniente de *L. guyanensis* positiva para o LRV1 **(C)** Amostra negativa, cDNA proveniente de biópsia de paciente da pesquisa. **(D)** Amostra negativa, cDNA proveniente de sangue de paciente da pesquisa.

1.4.2 RT-PCR

Também se realizou RT-PCRs convencionais com amostras de cDNA de sangue (75) e de biópsias (51) dos pacientes tendo como alvo a região ORF1 do genoma viral. Após análise, observando-se os controles da reação, confirmou-se que nenhum paciente apresentava o LRV1 (figuras 15 e 16).

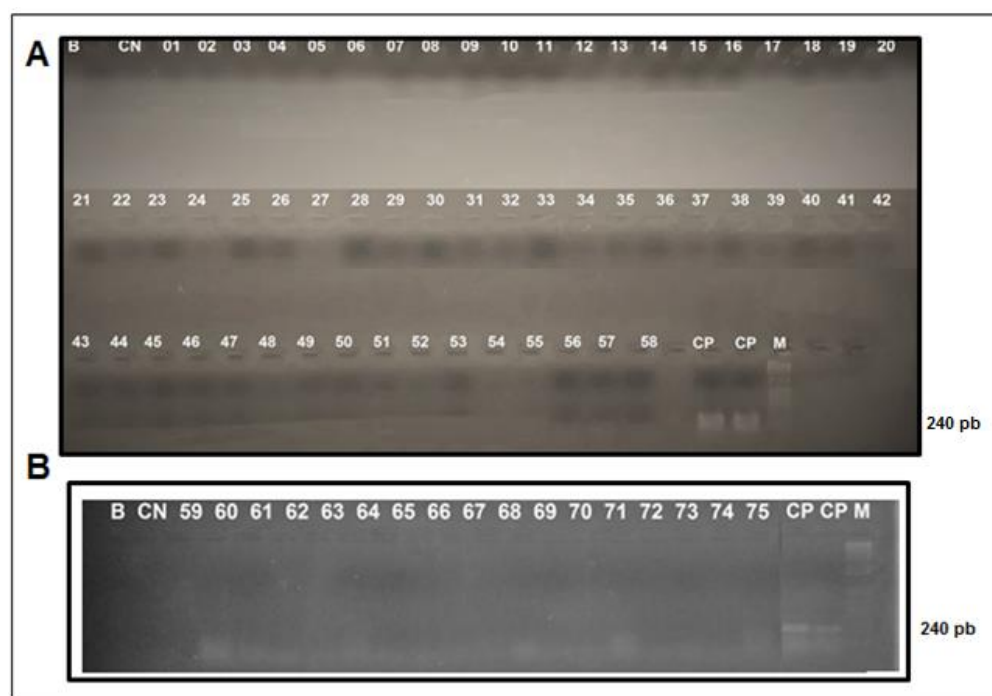


Figura 15: Detecção de LRV1 em amostras de DNA provenientes de sangue dos pacientes. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. **(A)** Amostras dos pacientes 1 a 58, B: branco, CN: controle negativo, CP: controle positivo, M: marcador molecular. **(B)** Amostras dos pacientes 59 a 75, B: branco, CN: controle negativo, CP: controle positivo, M: marcador molecular.

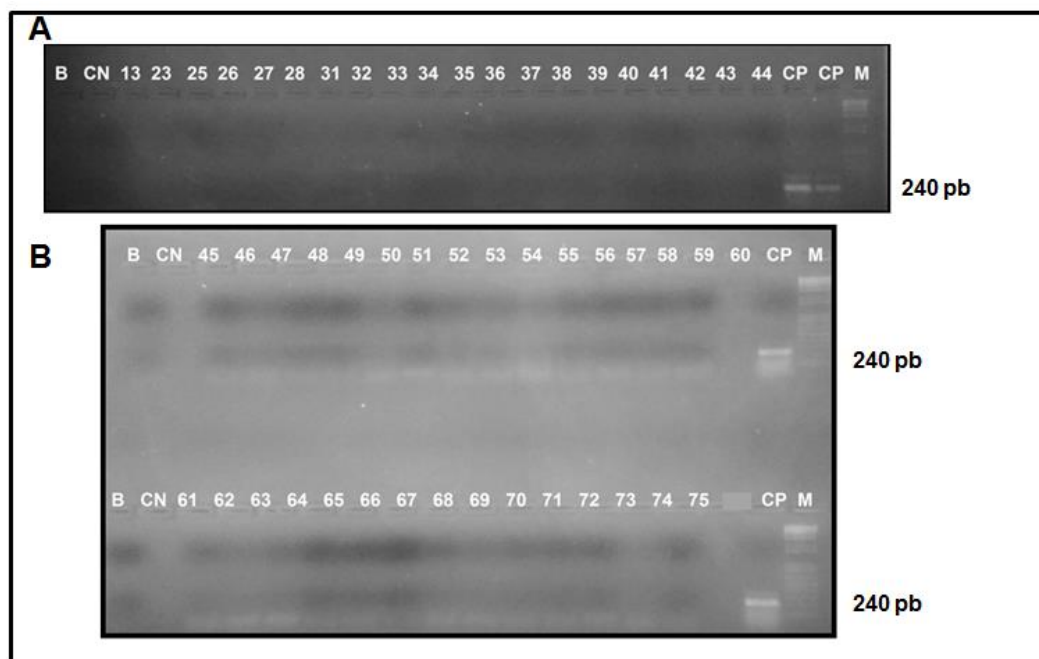


Figura 16: Detecção de LRV1 em amostras de DNA provenientes de biópsias dos pacientes. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. **(A)** Amostras dos pacientes 13, 23, 25, 26, 27, 28 e 31 ao 44, B: branco, CN: controle negativo, CP: controle positivo, M: marcador molecular. **(B)** Amostras dos pacientes 45 ao 75, B: branco, CN: controle negativo, CP: controle positivo, M: marcador molecular.

2. Experimentos *in vitro*

2.1 Comparação das taxas de infecção entre espécies de *Leishmania*

Observou-se que a *L. guyanensis* sem o vírus apresentou uma taxa de infecção muito superior às espécies de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* com a presença do LRV1, sendo que, entre estas últimas, não houve diferença significativa na taxa de infecção. As médias das cargas parasitárias entre as triplicatas do experimento foram: 1,32 parasitos equivalentes/ 50 ng DNA para *L.braziliensis*, 17,15 parasitos equivalentes/ 50 ng DNA para *L. guyanensis* sem o LRV1 e 1,35 parasitos equivalentes/ 50 ng DNA para *L.guyanensis* LRV1+ (figura 17).

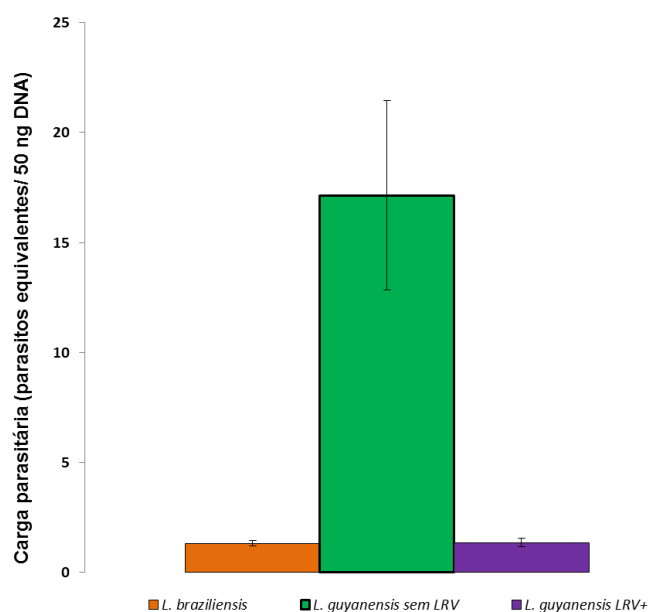


Figura 17: Comparação, *in vitro*, entre as taxas de infecção de *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* sem o LRV1 e *Leishmania guyanensis* LRV1+.

2.1.2 Comparação das concentrações de citocinas entre espécies de *Leishmania*

Observou-se que as citocinas TNF e IL-2 não foram detectadas nas células infectadas por nenhuma das cepas e que IL-4 só foi detectada nos macrófagos infectados por *L. braziliensis*. IFN- γ e IL-5 foram verificados em todas as células, entretanto não houve diferença estatística significativa entre as concentrações destas citocinas e as cepas utilizadas (figura 18).

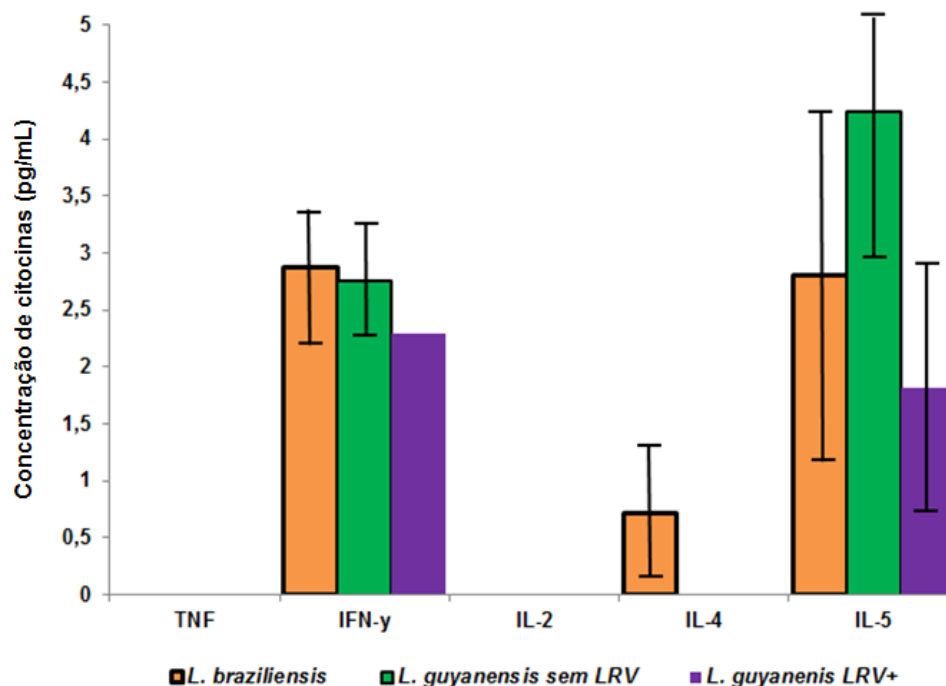


Figura 18: Comparação entre as concentrações de citocinas TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-5 em células infectadas por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis* sem o LRV1 e *Leishmania guyanensis* LRV1+. Legenda: TNF- fator de necrose tumoral, IFN- γ - interferon- γ , IL-2- interleucina-2, IL-4- nterleucina-4, IL-5- interleucina-5

2.2 Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina

Observou-se diferença significativa na diminuição da carga parasitária apenas nas células infectadas pela cepa *L. guyanensis* que não apresentava o LRV1, essa diminuição foi de aproximadamente 18 vezes, enquanto para as células infectadas com *L. braziliensis*, a redução da carga parasitária foi de aproximadamente 5 vezes e nas células infectadas com *L. guyanensis* LRV1+, a redução da carga parasitária foi de aproximadamente 3,5 vezes (figura 19).

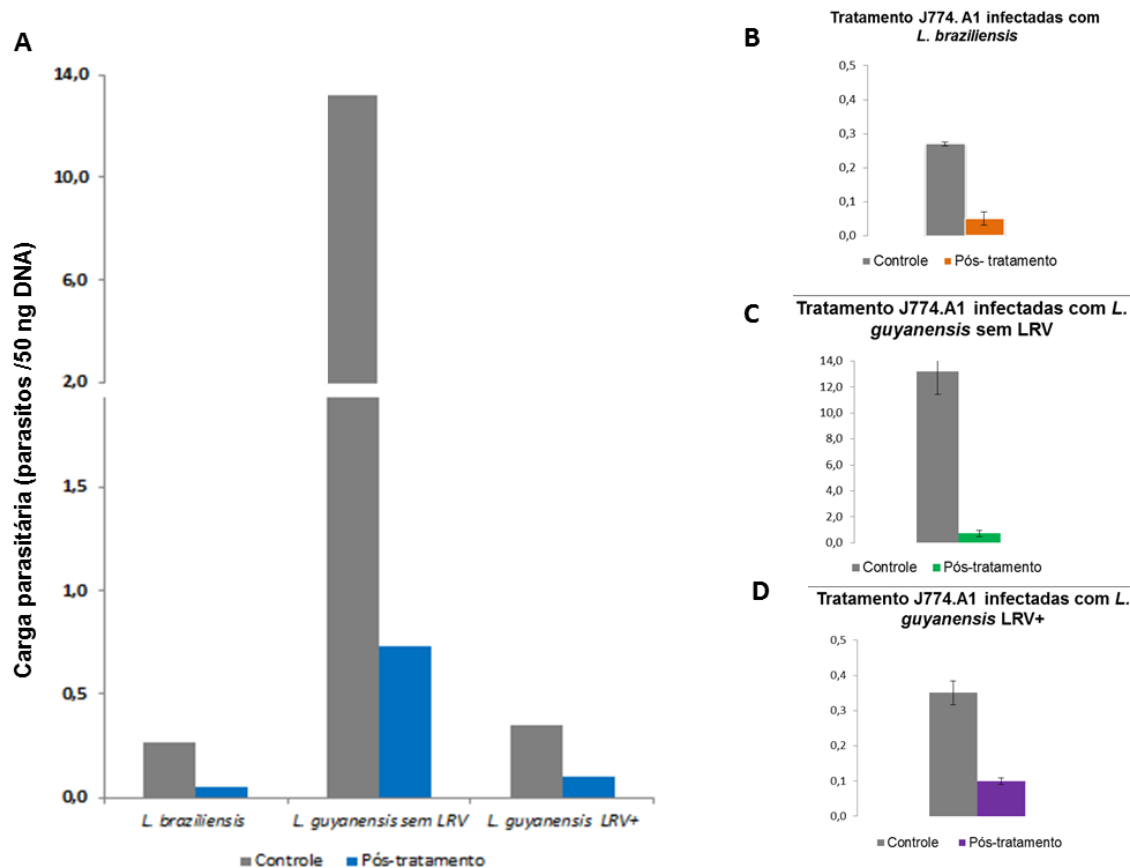


Figura 19: Avaliação da resposta ao tratamento com antimoniato de meglumina em células infectadas com diferentes cepas de *Leishmania* spp.. (A) Comparação entre as cepas utilizadas. (B) Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania braziliensis*, (C) Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania guyanensis* sem LRV1. (D) Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania guyanensis* LRV1+.

2.3 Avaliação da resposta ao tratamento com anfotericina B

Após infecção de macrófagos J774.A1 com *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/2000/LTCP 13396), *Leishmania guyanensis* M44142 (não apresenta o LRV1) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1989/IM3597) (LRV1+) e tratamento com 2,5 mg/mL de anfotericina B (*Amphotericin B from Streptomyces*- Sigma) por 72 horas, não se observou diferença significativa na diminuição da carga parasitária entre as células infectadas com as três cepas, ainda que o tratamento tenha sido menos eficaz para as células infectadas com *L. guyanensis* LRV1+ (figura 20). Curiosamente, este foi o único experimento realizado *in vitro* em que os macrófagos infectados com *L. guyanensis* LRV1+ apresentaram carga parasitária maior que naqueles infectados com as outras cepas, no entanto essa diferença não foi estatisticamente significativa.

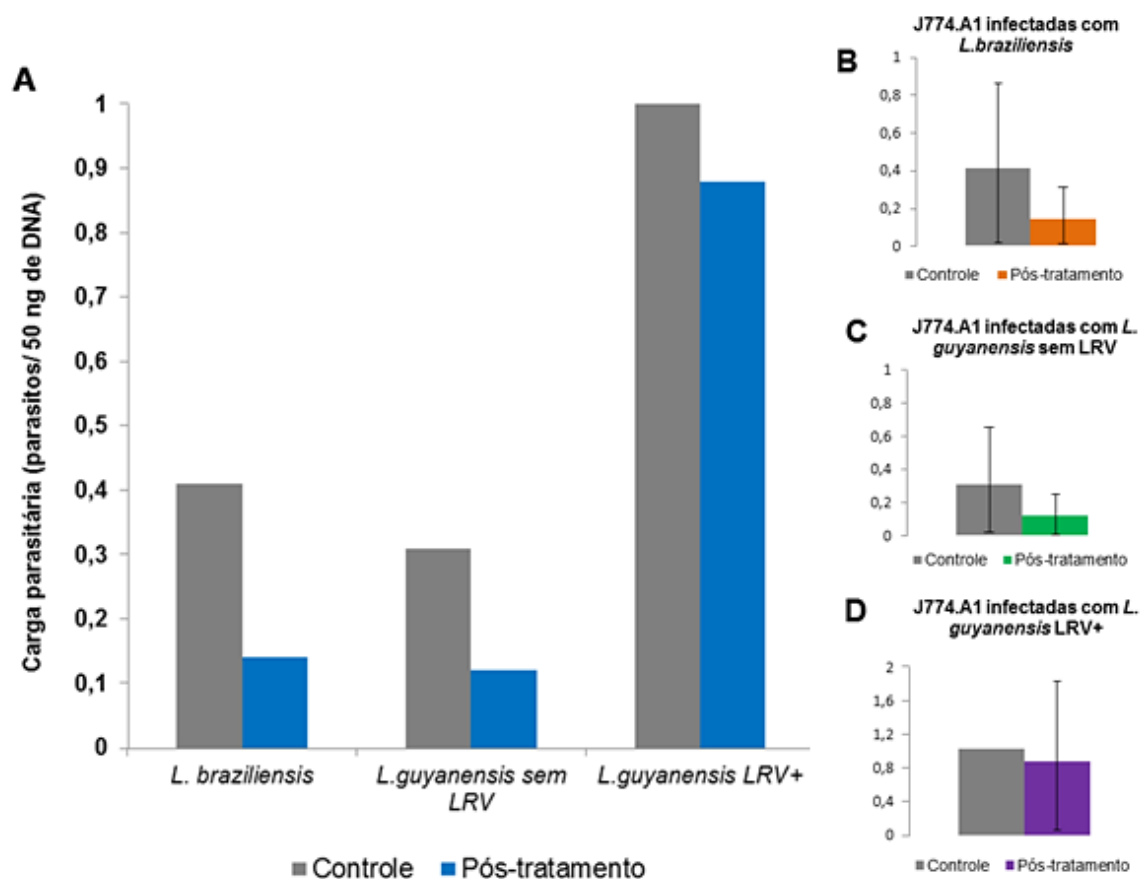


Figura 20: Avaliação da resposta ao tratamento com anfotericina B em células infectadas com diferentes cepas de *Leishmania* spp.. **(A)** Comparação entre as cepas utilizadas. **(B)** Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania braziliensis*. **(C)** Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania guyanensis* sem LRV1. **(D)** Relação entre controle e tratamento de células infectadas com *Leishmania guyanensis* LRV1+.

VI. DISCUSSÃO

1. Perfil dos pacientes

A maior parte dos pacientes avaliados neste trabalho apresentavam LCL primária, o que era previsto já que esta é a manifestação mais comum da LTA (SCARISBRICK *et al.*, 2006). O grupo de indivíduos assintomáticos foi o segundo mais prevalente, apesar da dificuldade de se obter pacientes positivos para LTA que não apresentem sintomas, visto que essas pessoas geralmente não procuram atendimento médico específico. Este número elevado de pacientes assintomáticos já foi também observado em outros trabalhos (ANDRADE-NARVAEZ *et al.*, 2016; CARRANZA-TAMAYO *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2014).

Os pacientes com LCL recidiva representaram um total de 11% do total de pacientes e, embora não haja dados a respeito da incidência de indivíduos recidivos para LTA no Brasil, este trabalho verificou uma incidência de LCL recidiva aproximadamente 10 vezes maior que Gomes e colaboradores encontraram no mesmo local de atendimento (HUB) no período de 1994 a 2011. Tal fato pode estar associado a um aumento na resistência aos tratamentos disponíveis (GOMES *et al.*, 2015). O presente trabalho também detectou maior número de pacientes com LMC (11%) do que é usualmente verificado na literatura, sendo que a incidência dessa manifestação no Brasil varia de 0,4% a 2,7%, dependendo da região estudada (GOTO; LINDOSO, 2010)

A maioria dos pacientes foi do sexo masculino e apresentou idades entre 30 e 59 anos, isso se deve muitas vezes à atividade profissional que estes desempenham, sendo que muitos trabalham com agricultura ou pecuária, em áreas rurais, em contato direto com o vetor (DINIZ; COSTA; ESCALDA, 2012), entretanto fatores fisiológicos como diferenças hormonais também podem contribuir para este achado (Guerra-Silveira; Abad-Franch, 2013). Ainda assim, neste trabalho não houve relação entre a severidade dos sintomas com o sexo ou idade dos pacientes, não corroborando achados de Diniz, Costa, Escalda e Gaur Dixit e colaboradores que sugerem, respectivamente, que a idade e o sexo têm influência na apresentação clínica da LTA (DINIZ; COSTA; ESCALDA, 2012; GAUR DIXIT *et al.*, 2018).

2. Avaliação da resposta imune

2.1 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico sorológico demonstra alta variabilidade quanto à sensibilidade e especificidade de acordo com o método escolhido e também da manifestação clínica da LTA, sendo que o ELISA ainda é considerado um bom teste diagnóstico, principalmente quando combinado com outros métodos (REIS *et al.*, 2008).

Neste trabalho, o ELISA detectou 60 pacientes (80%) como positivos, apresentando maior sensibilidade que a qPCR. Este resultado deveu-se principalmente ao grupo dos assintomáticos, como já mencionado anteriormente, contrariando achados de Moreno e colaboradores, que concluíram que testes sorológicos eram ineficientes para o diagnóstico desses pacientes (MORENO *et al.*, 2009).

Há pesquisas com LV que indicam haver uma forte relação entre a progressão da doença e o aumento no título de anticorpos, contudo tal relação ainda não foi observada nas manifestações da LTA (HASKER *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2014), assim como este trabalho verificou, pois não houve diferença estatística significativa na produção de anticorpos entre os grupos clínicos estudados.

O fato de poucos pacientes terem sido sequenciados não permitiu uma melhor observação no que diz respeito à relação entre a espécie e a sensibilidade do ELISA. Szargiki e colaboradores apontaram que os testes sorológicos tendem a ser mais sensíveis para infecções quando o agente etiológico é *L. braziliensis* do que quando é *L. amazonensis* (SZARGIKI *et al.*, 2009), o que não pôde ser concluído neste trabalho uma vez que não houve diferença significativa no diagnóstico sorológico dos pacientes infectados por essas duas espécies. Dentre os pacientes infectados por *L. braziliensis*, apenas um foi negativo para ELISA, enquanto todos os pacientes infectados por *L. amazonensis* foram positivos.

Uma das desvantagens dos métodos sorológicos é que a execução prematura destes testes pode resultar em falso-negativos, inclusive até mesmo após três meses do início da forma cutânea (GOMES *et al.*, 2014). Além disso, como a maior parte do pacientes, mesmo sintomáticos, apresenta baixos títulos de

anticorpos, os resultados falso-negativos podem permanecer durante todo o desenvolvimento da doença (SALLES *et al.*, 2018).

Por fim, embora haja chances de ocorrência de reações cruzadas, estas chances foram minimizadas na pesquisa, visto que o antígeno utilizado foi homólogo de *L. braziliensis*, enquanto a literatura relata que a maior parte de reações cruzadas, principalmente com doença de Chagas, ocorre ao se usar o antígeno homólogo de *L. amazonensis* (GIL *et al.*, 2011; SZARGIKI *et al.*, 2009).

2.2 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas demonstrou um padrão similar na produção de IL-2 e IL-6 em todos os grupos clínicos avaliados, o que reforça o papel ambíguo que essas citocinas desempenham na resposta imune (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Entretanto deve-se enfatizar que a concentração de IL-2 apenas foi correlacionada com a manifestação clínica no caso dos pacientes com LMC, achado não comum na literatura, uma vez que esta citocina geralmente está associada à proteção ao agravamento da LTA (OLIVEIRA *et al.*, 2015a; SCOTT; NOVAIS, 2016).

No caso dos pacientes assintomáticos, houve um aumento estatisticamente significativo na produção de TNF, o que não era esperado visto que esta citocina pró-inflamatória usualmente encontra-se em maiores concentrações em pacientes com lesões ativas (ANTONELLI *et al.*, 2004). Os indivíduos com LCL primária apresentaram aumento de IFN- γ e IL-17A, ambas relacionadas à imunoproteção da LCL (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016), sendo que a IL-17A também pode atuar na exacerbação da doença (BANERJEE *et al.*, 2016). Além disso, verificou-se que essas citocinas (IFN- γ e IL-17A) estão diretamente correlacionadas, o que não foi observado por Newcomb e colaboradores que sugeriram que IFN- γ impedia a diferenciação de IL-17A (NEWCOMB *et al.*, 2009).

Outras citocinas que este trabalho verificou como diretamente correlacionadas foram TNF e IL-2, TNF e IL-4, IL-2 e IL-4. A relação entre TNF e IL-4 surpreendeu uma vez que TNF é conhecida por promover uma resposta do tipo Th1. No caso da IL-2, como já descrito, esta pode contribuir na susceptibilidade ou resistência à LTA, o que explicaria sua correlação tanto com TNF quanto com IL-4, ou seja, esta citocina pode estar associada à promoção de uma resposta tipo Th1 assim como

TNF, mas também pode estimular a proliferação de células Th2 por meio da produção de IL-4 (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

A análise de correlação também indicou que a carga parasitária está relacionada aos aumentos de dos níveis de IL-10, o que já havia sido observado em estudos com LV (BHATTACHARYA *et al.*, 2016; DE F MICHELIN; PERRI; DE LIMA, 2011; VERMA *et al.*, 2010). O presente trabalho não identificou nenhum grupo clínico com concentração de IL-10 estatisticamente maior que os outros, o que pode ser explicado, dentre outros fatores, pelas baixas cargas parasitárias que, de maneira geral, todos os grupos estudados apresentaram.

Observou-se também por meio da análise de correlação, relação direta entre títulos de anticorpos e a concentração de IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-4, contudo esta relação não foi considerada um bom parâmetro para prognóstico da manifestação clínica dos pacientes, pois inclui citocinas descritas na resposta Th1 (IFN- γ e TNF), na resposta Th2 (IL-4) e ainda uma citocina que pode desempenhar um papel duplo (Th1 ou Th2) a depender de outros fatores da resposta imune (IL-2) (HURDAYAL; BROMBACHER, 2014).

3. Diagnóstico Molecular

O diagnóstico molecular é considerado uma técnica sensível e específica que apresenta como uma das vantagens o fato de poder utilizar diversos tipos de amostras biológicas, tais como sangue, tecidos, *swabs* (conjuntivais, nasais, orais), sêmen e urina (GALLUZZI *et al.*, 2018). O tipo de amostra biológica utilizado para o diagnóstico de LTA é frequentemente crítico para o sucesso do teste, principalmente no caso de pacientes assintomáticos, os quais não possibilitam a coleta de biópsia (MOREIRA; YADON; CUPOLILLO, 2017). Neste trabalho, o diagnóstico molecular foi realizado a partir de amostras de sangue e de biópsias das lesões dos pacientes suspeitos de apresentarem LTA.

Os resultados da qPCR demonstraram que, nos indivíduos sintomáticos, não houve diferença estatística significativa entre número de pacientes positivos para biópsia ou para sangue, contrariando pesquisas que consideram a biópsia o tipo de amostra biológica ideal para realização do diagnóstico molecular (BONI *et al.*, 2017; SEVILHA-SANTOS *et al.*, 2018; TSOKANA *et al.*, 2014). Nesse sentido, o sangue poderia ser usado para o diagnóstico de LTA, uma vez que a coleta das biópsias é

um procedimento delicado, que demanda anestesia e é desconfortável ao paciente (MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010). Apesar disso, no caso dos indivíduos assintomáticos, em que apenas era possível a coleta de sangue, a qPCR não se demonstrou um teste sensível, o que pode estar relacionado ao maior tempo de infecção desses pacientes, logo, para esses casos, o diagnóstico sorológico é o mais indicado (BHATTARAI *et al.*, 2009).

Em relação às cargas parasitárias, observou-se um perfil diferente entre as populações estudadas (pacientes de Corte de Pedra e pacientes atendidos no HUB). Os indivíduos sintomáticos de Corte de Pedra apresentaram uma elevada parasitemia nas biópsias, aproximadamente 1000 vezes maior que a observada nas biópsias dos pacientes atendidos no HUB. Este fato pode estar relacionado às características genéticas da cepa de *L. braziliensis* encontrada em Corte de Pedra (GUIMARÃES *et al.*, 2016), no entanto esta elevada carga parasitária não pôde ser relacionada à severidade dos sintomas como já verificado por Pereira e colaboradores (PEREIRA *et al.*, 2017).

Após o diagnóstico molecular, foi realizado o sequenciamento das amostras. Determinar as espécies circulantes é crucial no entendimento da patogênese da LTA, principalmente quando há manifestações clínicas variadas numa mesma região (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). A presença de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* já havia sido descrita na região Centro-Oeste (SOUZA CASTRO *et al.*, 2018), contudo foi a primeira vez que se averiguou a presença de *L. guyanensis* no DF. Este resultado deve ser interpretado com cautela, uma vez que o DF é uma área de constante migração e que muitos pacientes atendidos no HUB fornecem o endereço de parentes a fim de usufruírem do Sistema Único de Saúde (SUS), que só permite a consulta de residentes locais. Sendo assim, torna-se difícil a confirmação de casos autóctones. Entretanto a presença destes indivíduos infectados por *L. guyanensis* no DF chama a atenção para a circulação desta espécie nesta localidade e para a possibilidade do surgimento de casos acertadamente autóctones no futuro.

No caso das amostras sequenciadas provenientes de Corte Pedra, a única espécie detectada foi *L. braziliensis*, o que já era esperado, visto que já é bem conhecido ser essa a única espécie presente naquela região (SILVA *et al.*, 2017).

Quanto às manifestações clínicas, *L. braziliensis* foi a única espécie relacionada a todos os grupos sintomáticos, sendo identificada em todos os pacientes com LMC sequenciados, corroborando dados da literatura que indicam ser esta a espécie mais prevalente e mais associada a casos de LMC no Brasil (CRUZ *et al.*, 2016; DI LELLA *et al.*, 2006). *L. guyanensis* foi identificada em dois dos três pacientes com LCL recidiva, sendo esta espécie, no Brasil, associada à falha terapêutica (GOTO; LINDOSO, 2010).

4. Detecção do cDNA de LRV1 nos pacientes e avaliação dos resultados *in vitro*

O presente trabalho verificou que nenhum paciente apresentou o LRV. Tal fato pode estar relacionado com as regiões estudadas que, de maneira geral, se resumiram ao Distrito Federal, Bahia e Goiás, sendo este o primeiro trabalho a investigar a presença do vírus no Centro-Oeste. Outras pesquisas conduzidas no Brasil que encontraram pacientes positivos para o LRV1 foram realizadas, em sua maioria, na região Norte, principalmente no estado do Acre (CANTANHÊDE *et al.*, 2015; ITO *et al.*, 2015). Trabalhos que incluíram pacientes provenientes do Sudeste (Rio de Janeiro e Minas Gerais) e do Nordeste (Bahia e Paraíba) só detectaram a presença do vírus em 12 pacientes de Minas Gerais (12/47) e em dois pacientes da Bahia (2/8), representando 25% dos casos analisados nos dois estados, o que é considerada uma baixa frequência e confirma que a circulação desse vírus pode estar restrita geograficamente (MACEDO *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2013).

Há pesquisas que relacionam o LRV1 com o aumento do risco de desenvolvimento de lesão mucocutânea e com a falha terapêutica (BOURREAU *et al.*, 2016; HARTLEY *et al.*, 2014), entretanto a não identificação do LRV1 em nenhuma amostra deste trabalho reforça que a presença do vírus não é o único fator determinante para a gravidade das manifestações clínicas bem como para a resistência ao tratamento uma vez que a nossa pesquisa contemplou pacientes com quadro de LMC e de recidiva. Tal observação corrobora achados de outros trabalhos (ITO *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2013).

Para melhor investigar a importância do LRV1 na patogênese da LTA, foram realizados experimentos *in vitro* para se comparar cepas com e sem o LRV1 em relação à taxa de infectividade, produção de citocinas e resistência ao tratamento.

No primeiro experimento, referente à comparação entre as espécies de *Leishmania* quanto taxa de infecção, verificou-se que a cepa de *L. guyanensis* sem o vírus apresentou maior taxa de infecção que a *L. guyanensis* com o LRV1 e também que *L. braziliensis*, sendo assim, não é possível relacionar a presença do vírus com o aumento de infectividade da cepa. Este resultado não corroborou trabalhos anteriores que, em modelo murino, verificaram que a presença do vírus conduzia a uma resposta imune mediada por TLR-3 que aumentava não só a metástase das lesões, mas também a parasitemia (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; IVES *et al.*, 2011).

A dosagem de citocinas demonstrou que o período de infecção das células com as espécies de *Leishmania* (72h) foi suficiente para produzir apenas IFN- γ e IL-5. Já foi verificado, também *in vitro*, que a concentração de IFN- γ pode auxiliar no entendimento para prever susceptibilidade à LTA e que a modulação desta citocina pode ter relação direta com a espécie de *Leishmania* envolvida (CARNEIRO *et al.*, 2016). No entanto, como o presente trabalho não observou diferença estatística significativa entre as cepas na produção de IFN- γ , não foi possível chegar à essa conclusão. De modo semelhante, não houve diferença entre as cepas na produção de IL-5. Ainda assim, a cepa que apresentou maior concentração desta citocina foi a *L. guyanensis* sem o vírus LRV1, o que também explicaria a maior parasitemia observada anteriormente, uma vez que IL-5 está relacionada a um aumento da replicação parasitária (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Novamente, a presença do vírus não foi um fator determinante na resposta imune.

Quanto à comparação entre as cepas em relação à resposta ao tratamento, constatou-se que o tratamento com antimoniato de meglumina apresentou eficácia significativa apenas na espécie *L. guyanensis* sem o LRV1. A espécie *L. guyanensis* com o LRV1 foi aquela em que houve menor redução da carga parasitária após o tratamento, sugerindo que a presença do vírus pode estar relacionada à falha terapêutica, o que também foi observado por outros pesquisadores (ADAUI *et al.*, 2016; KUHLMANN *et al.*, 2017; PONTE-SUCRE *et al.*, 2017). No entanto, o mesmo não foi observado em relação ao tratamento com anfotericina B, visto que a redução da carga parasitária foi semelhante em todas as cepas avaliadas, o que pode sugerir que a resistência ao tratamento por parte das cepas LRV1+ esteja apenas associada 'a droga de primeira escolha nas Américas (o antimoniato de meglumina) (BOURREAU *et al.*, 2016).

VII. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram descritas as características clínicas e imunológicas dos pacientes avaliados, sendo estes pertencentes a quatro grupos clínicos: assintomáticos, LCL primária, LCL recidiva e LMC.

O diagnóstico sorológico e molecular foi realizado para todas as amostras e todos os pacientes foram positivos para pelo menos um deles. O ELISA foi mais sensível que a qPCR e isto se deveu principalmente ao grande número de pacientes assintomáticos.

Três espécies de *Leishmania* foram identificadas: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, sendo a primeira vez que esta última foi descrita no Distrito Federal.

Em relação ao LRV1, este foi o primeiro trabalho a pesquisar sua presença na região Centro-Oeste. Este vírus não foi encontrado em nenhum paciente, podendo-se concluir que o mesmo não é um fator determinante na patogênese da LTA, visto que o trabalho contemplou pacientes com diversas manifestações clínicas, inclusive pacientes recidivos e de LMC. Além disso, a circulação deste vírus pode estar restrita geograficamente a determinadas regiões do país.

Ademais, os experimentos *in vitro* demonstraram que o vírus não está relacionado com o aumento da taxa de infectividade das espécies de *Leishmania*, uma vez que a espécie *L. braziliensis* (sem o LRV1) e a espécie *L. guyanensis* (LRV1+) apresentaram taxas de infectividade muito semelhantes. Quanto ao tratamento com antimonial, a *L. guyanensis* (LRV1+) foi aquela que menos teve sua carga parasitária diminuída pós-terapia, indicando que a presença do vírus pode estar relacionada à resistência ao tratamento. O mesmo não foi verificado para o tratamento com anfotericina B.

Apesar da grande quantidade de pesquisas acerca de todos os fatores anteriormente mencionados, existe um consenso de que o entendimento conclusivo de como eles atuam ainda está em construção. A realização de trabalhos com mais pacientes e a avaliação de marcadores genéticos na população bem como nas espécies de *Leishmania* permitirá uma compreensão mais ampla da influência desses fatores no processo de cura, de manutenção ou de reativação da LTA.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAUI, V. *et al.* Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 112–121, 1 jan. 2016.

ADLER, S. Leishmania. **Advances in parasitology**, v. 2, p. 35–96, 1964.

ADLER, S. The transmission of *Leishmania tropica* by the bite of *Phlebotomus papatasi*. **Ind J Med Res.**, n. 29., p. 803–9, 1941.

AKHOUNDI, M. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Sci J**, v. 11, n. 4, 2017.

ALMEIDA, P. S. DE *et al.* Geographic distribution of phlebotomine sandfly species (Diptera: Psychodidae) in Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 551–559, jun. 2015.

ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. In: **Advances in parasitology**, v. 61p. 223–274, maio 2006.

ANDRADE-NARVAEZ, F. J. *et al.* Asymptomatic infection with American cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 10, p. 599–604, out. 2016.

ANTONELLI, L. R. V *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and experimental immunology**, v. 136, n. 2, p. 341–8, maio 2004.

ANTONIO, L. DE F. *et al.* Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 5, p. 375–380, set. 2014.

AVILA-GARCÍA, M. *et al.* Transmission to Humans. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. Chapter 2. InTech, 2014.

AYHAN, N.; CHARREL, R. N. Of phlebotomines (sandflies) and viruses: a comprehensive perspective on a complex situation. **Current Opinion in Insect Science**, v. 22, p. 117–124, 1 ago. 2017.

BACELLAR, O. *et al.* Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 1 jul. 2009.

BAJÉNOFF, M. *et al.* Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 3, p. 619–631, 20 mar. 2006.

BANERJEE, A. *et al.* Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 1 nov. 2016.

BARI, A. U. Clinical spectrum of cutaneous leishmaniasis: An overview from Pakistan. **Dermatology Online Journal**, v. 18, n. (2):4, 2012.

BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Cutaneous leishmaniasis: an overview of parasitology and host-parasite-vector inter relationship. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists : JPAD.**, n. 18, p. 42–48, 2008.

BATES, P. A. *et al.* Recent advances in phlebotomine sand fly research related to leishmaniasis control. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 131, 27 fev. 2015.

BEAUMIER, C. M. *et al.* New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144–155, set. 2013.

BHATTACHARYA, P. *et al.* Induction of IL-10 and TGF β from CD4+CD25+FoxP3+ T Cells Correlates with Parasite Load in Indian Kala-azar Patients Infected with *Leishmania donovani*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004422, 1 fev. 2016.

BHATTARAI, N. R. *et al.* PCR and direct agglutination as *Leishmania* infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Tropical Medicine & International Health**, v. 14, n. 4, p. 404–411, 1 abr. 2009.

BOAVENTURA, V. S. *et al.* Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, out. 2010.

BONI, S. M. *et al.* Efficiency of noninvasive sampling methods (swab) together with Polymerase Chain Reaction (PCR) for diagnosing American Tegumentary Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 0, 2017.

BOURREAU, E. *et al.* Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 1, p. 105–111, 1 jan. 2016.

BRASIL. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. **Ministério da Saúde**. 2^a ed. Brasília, 2017.

CAMPOS, M. B. *et al.* Toll-like receptors 2, 4, and 9 expressions over the entire clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (V.) braziliensis* and *Leishmania (L.) amazonensis*. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194383, 15 mar. 2018.

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

CARINI A, P. U. Identification de l' «Ulcers de Bauru» avec le bouton d'Orient. **Bull Soc Path Exot.**, v. 2, p. 255–6, 1909.

CARNEIRO, M. W. *et al.* Gene Expression Profile of High IFN- γ Producers Stimulated with *Leishmania braziliensis* Identifies Genes Associated with Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. e0005116, 21 nov. 2016.

CARRANZA-TAMAYO, C. O. *et al.* Are opossums a relevant factor associated with asymptomatic *Leishmania* infection in the outskirts of the largest Brazilian cities? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 2, p. 119–126, mar. 2016.

CASTELLUCCI, L. *et al.* IL6-174 G/C Promoter Polymorphism Influences Susceptibility to Mucosal but Not Localized Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 15 ago. 2006.

CASTIGLIONI, P. *et al.* Exacerbated Leishmaniasis Caused by a Viral Endosymbiont can be Prevented by Immunization with Its Viral Capsid. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 1, p. e0005240, 18 jan. 2017.

CECCARELLI, M. *et al.* Detection and Characterization of *Leishmania* (*Leishmania*) and *Leishmania* (*Viannia*) by SYBR Green-Based Real-Time PCR and High Resolution Melt Analysis Targeting Kinetoplast Minicircle DNA. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88845, 13 fev. 2014.

COELHO, A. C. *et al.* In Vitro and In Vivo Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2999, 17 jul. 2014.

COSTA, C. H. N. *et al.* Risk Profiles for *Leishmania infantum* Infection in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1276–1281, 1 jun. 2016a.

COSTA, L. E. *et al.* New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. **Journal of Immunological Methods**, v. 434, p. 39–45, 1 jul. 2016b.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478–1483, 1 out. 2011.

CRUZ, A. F. *et al.* Mucosal leishmaniasis in Brazilian patients: two case reports with similar clinical presentation and different approaches. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 122, n. 6, p. e199–e203, 1 dez. 2016.

CUNNINGHAM, D. D. On the relation of cholera to schizomycete organisms ; On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil - NLM Catalog - NCBI. **Scientific memoirs by medical officers of the army of India.**, v. 1, p. 21–31, 1885.

DALY, K. *et al.* Intermediate cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* successfully treated with fluconazole. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 39, n. 6, p. 708–712, 1 ago. 2014.

DE ALMEIDA, M. E. *et al.* Detection and Differentiation of *Leishmania* spp. in Clinical Specimens by Use of a SYBR Green-Based Real-Time PCR Assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 1, p. 281–290, 1 jan. 2017.

DE FREITAS, J. C. C.; PINHEIRO, D. C. S. N. Cellular and molecular aspects of immune response to *Leishmania* spp. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 105, p. 11–20, 2010.

DE MENEZES, J. P. B. *et al.* Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed research international**, v. 2015, p. 815023, 11 maio 2015.

DE F MICHELIN, A.; PERRI, S. H. V; DE LIMA, V. M. F. Evaluation of TNF- α , IL-4, and IL-10 and parasite density in spleen and liver of *L. (L.) chagasi* naturally infected dogs. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 373–383, 22 jul. 2011.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. *et al.* Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 17 dez. 2015.

DE SILVA, L. D. G. G. *et al.* **Analysis of clinical features with microscopy of cutaneous leishmaniasis suspected patients attending the dermatology clinic at General Hospital Hambanthota.** Disponível em: <<http://www.ou.ac.lk/ours/wp-content/uploads/2017/04/B401-E.pdf>>. 2016.

DE SOUZA, M. M. *et al.* An improved purification procedure for *Leishmania* RNA virus (LRV). **Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 45, n. 2, p. 695–8, 2014.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 17 abr. 2015.

DI LELLA, F. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 35, n. 9, p. 870–872, set. 2006.

DINIZ, D. S.; COSTA, A. S. V.; ESCALDA, P. M. F. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 597–600, out. 2012.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. 1903. **The National medical journal of India**, v. 7, n. 4, p. 196, 201–2, 1903.

DOS SANTOS, P. L. *et al.* The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004375, 27 jan. 2016.

DOWNING, T. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1–29, 1 out. 2017.

DUARTE, M. C. *et al.* Proteins Selected in Leishmania (Viannia) braziliensis by an Immunoproteomic Approach with Potential Serodiagnosis Applications for Tegumentary Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 11, p. 1187–1196, nov. 2015.

DUNNING, N. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. **Bioscience Horizons**, v. 2, n. 1, p. 73–82, 17 fev. 2009.

EHRlich, A. *et al.* The immunotherapeutic role of regulatory T cells in Leishmania (Viannia) panamensis infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 193, n. 6, p. 2961–70, 15 set. 2014.

EKIZ, O. *et al.* Mucocutaneous leishmaniasis with marked facial disfigurement. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 83, n. 1, p. 91–93, 2017.

EL TAI, N. O. *et al.* Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 575–9, 2000.

ELMAHALLAWY, E. K. *et al.* Diagnosis of leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-Like Receptors in *Leishmania* Infections: Guardians or Promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1–12, 15 mar. 2012.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A. *et al.* Down-Regulation of TLR and JAK/STAT Pathway Genes Is Associated with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: A Gene Expression Analysis in NK Cells from Patients Infected with *Leishmania mexicana*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004570, 31 mar. 2016.

FISCHER, D. *et al.* Combining Climatic Projections and Dispersal Ability: A Method for Estimating the Responses of Sandfly Vector Species to Climate Change. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. e1407, 29 nov. 2011.

FRANÇA-COSTA, J. *et al.* Arginase I, Polyamine, and Prostaglandin E₂ Pathways Suppress the Inflammatory Response and Contribute to Diffuse Cutaneous

Leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 1 fev. 2015.

FURUSAWA, G. P.; MAGNO, E.; BORGES, F. História da medicina colaboração para o conhecimento do histórico da leishmaniose tegumentar americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na Vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880. **Rev Patol Trop**, v. 43, n. 1, p. 7–25, 2014.

GAUR DIXIT, U. *et al.* Epidemiological and Experimental Evidence for Sex-Dependent Differences in the Outcome of *Leishmania infantum* Infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 142–145, 10 jan. 2018.

GALLUZZI, L. *et al.* Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 273, 2 dez. 2018.

GHOSH, K. *et al.* Successful Therapy of Visceral Leishmaniasis With Curdlan Involves T-Helper 17 Cytokines. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016–1025, 15 mar. 2013.

GIL, J. *et al.* El rol de tres pruebas de ELISA con antígenos de promastigotes de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. guyanensis* en el diagnóstico de leishmaniasis tegumentaria. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 71, n. 5, p. 420–428, 2011.

GILLESPIE, P. M. *et al.* Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 3 jun. 2016.

GOMES, C. M. *et al.* Accuracy of mucocutaneous leishmaniasis diagnosis using polymerase chain reaction: systematic literature review and meta-analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 157–165, abr. 2015.

GOMES, C. M. *et al.* Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–9, 2014.

GOMES, C. M. *et al.* The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 1, p. 109–114, jan. 2015.

GONZÁLEZ, K. *et al.* Histopathological characteristics of cutaneous lesions caused by *Leishmania Viannia panamensis* in Panama. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, n. 0, 15 fev. 2018.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 10 abr. 2010.

GUEDES, D. C. *et al.* New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 6, p. 788–794, dez. 2017.

Guerra-Silveira F, Abad-Franch F. Sex Bias in Infectious Disease Epidemiology: Patterns and Processes. **PLoS ONE** 8(4): e62390, 2013.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005100, 1 dez. 2016.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis. **Advances in applied microbiology**, v. 82, p. 155–84, 2013.

GUPTA, V.; DEEP, A. An insight into the *Leishmania* RNA virus. **Indian journal of medical microbiology**, v. 25, n. 1, p. 7–9, jan. 2007.

HAILU, A. *et al.* T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 182–191, nov. 2005.

HANDLER, M. Z. *et al.* Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, dez. 2015.

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

HARTLEY, M .A. *et al.* *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 99, 12 jul. 2012.

HASHIGUCHI, Y. *et al.* Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, v. 44, n. 1, p. 2, 14 dez. 2016.

HASKER, E. *et al.* Strong Association between Serological Status and Probability of Progression to Clinical Visceral Leishmaniasis in Prospective Cohort Studies in India and Nepal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. e2657, 23 jan. 2014.

HERNÁNDEZ, C. *et al.* Identification of Six New World *Leishmania* species through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 501, 14 dez. 2014.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 161, n. 2, p. 179–183, 1 out. 2014.

IEZZI, G. *et al.* Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania* major infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 2, p. 1250–6, 15 jul. 2006.

ITO, M. M. *et al.* Correlation between presence of Leishmania RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 5, p. 533–540, set. 2015.

IVES, A. *et al.* Leishmania RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. **Science**, v. 331, n. 6018, p. 775–778, 11 fev. 2011.

JAMDHADE, M. D. *et al.* Comprehensive Proteomics Analysis of Glycosomes from *Leishmania donovani*. **Omics-a Journal of Integrative Biology**, v. 19, n. 3, p. 157–170, 2015.

JARA, M. *et al.* Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 1 jun. 2013.

JIMENEZ-MARCO, T. *et al.* Transfusion-transmitted leishmaniasis: a practical review. **Transfusion**, v. 56, n. S1, p. S45–S51, 1 mar. 2016.

KAZEMI, B. Genomic organization of leishmania species. **Iranian journal of parasitology**, v. 6, n. 3, p. 1–18, ago. 2011.

KHANRA, S. *et al.* Leishmania genomics: a brief account. **The Nucleus**, v. 60, n. 2, p. 227–235, 12 ago. 2017.

KILLICK-KENDRICK, R. The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903–1942. **Bulletin de la Société de pathologie exotique**, v. 106, n. 2, p. 131–137, 20 maio 2013.

KLING, J. *et al.* Redundancy of interleukin-6 in the differentiation of T cell and monocyte subsets during cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 3, p. 270–276, nov. 2011.

KOTB ELMAHALLAWY, E.; AGIL, A. Treatment of Leishmaniasis: A Review and Assessment of Recent Research. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 17, p. 2259–2275, 2015.

KUHLMANN, F. M. *et al.* Antiviral screening identifies adenosine analogs targeting the endogenous dsRNA *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) pathogenicity factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 5, p. E811–E819, 31 jan. 2017.

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

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **British medical bulletin**, v. 28, n. 1, p. 44–8, jan. 1972.

LAURIA-PIRES, L. *et al.* Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-trypanosoma cruzi nitroderivatives. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 63, n. 3, p. 111–118, 2000

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in india. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2213, p. 1252, 1903.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, 9 ago. 2005.

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

LINDENBERG, A. L'ulcère de Bauru ou le bouton d'Orient au Brésil. **Bull Soc Path Exot.**, v. 2, p. 252–4, 1909.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 83, 2012.

LOW, G. C.; COOKE, W. E. A Congenital Case of Kala-Azar. **Lancet**, 1926.

LUKEŠ, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115–122, 1 jul. 2014.

LYE, L.-F. *et al.* Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 10, p. e1001161, 28 out. 2010.

MACEDO, D. H. *et al.* Low frequency of LRV1 in Leishmania braziliensis strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 210, n. 1–2, p. 50–54, nov. 2016.

MACHADO, T. D. O. *et al.* The role of gallery forests in maintaining Phlebotominae populations: potential Leishmania spp. vectors in the Brazilian savanna. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 10, p. 681–691, out. 2017.

MANSUETO, P. *et al.* Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 617–627, 1 nov. 2014.

MAROLI, M. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 27, n. 2, p. 123–147, jun. 2013.

MARRA, F.; CHIAPPETTA, M. C.; VINCENTI, V. Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 85(1), p. 3–7, 2014.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de Leishmania braziliensis em pacientes de leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 571–574, jun. 2010.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and global health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, set. 2016.

MAURYA, R. *et al.* Evaluation of Blood Agar Microtiter Plates for Culturing Leishmania Parasites To Titrate Parasite Burden in Spleen and Peripheral Blood of Patients with Visceral Leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1932–1934, 1 maio 2010.

MCGEACHY, M. J. *et al.* TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. **Nature Immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 11 dez. 2007.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM : monthly journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7–14, jan. 2014.

MEMBRIVE, N. A. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 0, 2017.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen Is Effective in the Treatment of Leishmania amazonensis Infections in Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, p. e249, 11 jun. 2008.

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

MORENO, E. C. *et al.* Inaccuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Soluble and Recombinant Antigens to Detect Asymptomatic Infection by Leishmania infantum. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 10, p. e536, 20 out. 2009.

NAUCKE, T. J.; LORENTZ, S. First report of venereal and vertical transmission of canine leishmaniosis from naturally infected dogs in Germany. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 67, 1 abr. 2012.

NDJAMEN, B. *et al.* Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 10, p. 1480–94, out. 2010.

NEWCOMB, D. C. *et al.* A functional IL-13 receptor is expressed on polarized murine CD4+ Th17 cells and IL-13 signaling attenuates Th17 cytokine production. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 9, p. 5317–21, 1 maio 2009.

NOVAIS, F. O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of Leishmania braziliensis by reactive oxygen species. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288–96, 15 abr. 2014.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, maio 2011.

OLIVEIRA, P. R. S. *et al.* IL2RA genetic variants reduce IL-2-dependent responses and aggravate human cutaneous leishmaniasis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 6, p. 2664–72, 15 mar. 2015.

OLIVEIRA, V. V. G. DE *et al.* Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals. **Ciência Rural**, v. 45, n. 9, p. 1622–1628, set. 2015.

OLIVEIRA, W. N. *et al.* The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, abr. 2014.

OLIVIER, M. Culprit within a culprit. **Nature**, v. 471, n. 7337, p. 173–174, 10 mar. 2011.

PAHO, Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de las enfermedades infecciosas 2013-2014. **Organización Panamericana de la Salud**, Washington, DC, 2013.

PATTERSON, J. L. Role of LRV1 and RNAi in the Pathogenesis of Leishmania. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 76–78, fev. 2017.

PEREIRA, L. DE O. R. *et al.* Severity of tegumentary leishmaniasis is not exclusively associated with Leishmania RNA virus 1 infection in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 665–667, ago. 2013.

PEREIRA, L. DE O. R. *et al.* Is Leishmania (Viannia) braziliensis parasite load associated with disease pathogenesis? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 57, p. 132–137, 1 abr. 2017.

PETERS, N. C. *et al.* Evaluation of recombinant Leishmania polyprotein plus glucopyranosyl lipid A stable emulsion vaccines against sand fly-transmitted Leishmania major in C57BL/6 mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 189, n. 10, p. 4832–41, 15 nov. 2012.

PETITTI, M.; VANNI, M.; BARRESI, A. A. Controlled release of drug encapsulated as a solid core: Theoretical model and sensitivity analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 86, n. 11, p. 1294–1300, nov. 2008.

PIERSON, J. *et al.* Liposomal Amphotericin B for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, 5 nov. 2010

PIMENTA, P. F. P.; DE FREITAS, V. N.; SECUNDINO, N. F. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. A Interação do Protozoário Leishmania com seus Insetos Vetores. **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular**. 2012.

PITA-PEREIRA, D. *et al.* SYBR Green-based Real-Time PCR targeting kinetoplast DNA can be used to discriminate between the main etiologic agents of Brazilian cutaneous and visceral leishmaniases. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 15, 12 jan. 2012.

PONTE-SUCRE, A. *et al.* Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017.

RANAWAKA, R.; ABEYGUNASEKARA, P.; WEERAKOON, H. Correlation of clinical, parasitological and histopathological diagnosis of cutaneous leishmaniasis in an endemic region in Sri Lanka. **Ceylon Medical Journal**, v. 57, n. 4, p. 149, 4 jan. 2013.

RAPELLO, A. *et al.* An updated list of sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) in the Federal District of Brazil. **Check List**, v. 14, n. (1), p. 213–224, 2018.

REIS, L. DE C. *et al.* Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 439–443, out. 2008.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 2069–85, 1 jun. 2011.

ROSSI, G. *et al.* Gene expression, localization, and characterization of endothelin A and B receptors in the human adrenal cortex. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1226–1234, 1 set. 1994.

ROYCHOUDHURY, J.; SINHA, R.; ALI, N. Therapy with Sodium Stibogluconate in Stearylamine-Bearing Liposomes Confers Cure against SSG-Resistant *Leishmania donovani* in BALB/c Mice. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17376, 10 mar. 2011.

SAFAR. Laboratory-acquired blood-borne parasites from accidental exposure. **Journal of The Arab Society for Medical Research**, v. 12, n. 1, p. 1, 2017.

SALLES, B. C. S. *et al.* Potential application of small myristoylated protein-3 evaluated as recombinant antigen and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Immunobiology**, set. 2018.

SCARISBRICK, J. J. *et al.* Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 4, n. 1, p. 14–21, jan. 2006.

SCHEFFTER, S. M. *et al.* The Complete Sequence of *Leishmania* RNA Virus LRV2-1, a Virus of an Old World Parasite Strain. **Virology**, v. 212, n. 1, p. 84–90, 10 set. 1995.

SCHÖNIAN, G.; CUPOLILLO, E.; MAURICIO, I. Molecular Evolution and Phylogeny of Leishmania. In: **Drug Resistance in Leishmania Parasites**. Vienna: Springer Vienna, 2013. p. 15–44.

SCOTT, P. Leishmania — A Parasitized Parasite. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 18, p. 1773–1774, 5 maio 2011.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 18 set. 2016.

SERGENT ED, SERGENT ÉT, PARROT L, DONATIEN A, B. M. Transmission du clou de Biskra par le phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop.). **C R Hebd Séances Acad Sci**, n. 173, p. 1030–2, 1921.

SEVILHA-SANTOS, L. *et al.* Accuracy of qPCR for quantifying Leishmania kDNA in different skin layers of patients with American tegumentary leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, maio 2018.

SHIMABUKURO, P. H. F.; DE ANDRADE, A. J.; GALATI, E. A. B. Checklist of American sand flies (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae): genera, species, and their distribution. **ZooKeys**, v. 660, n. 660, p. 67–106, 8 mar. 2017.

SILVA, F. L. *et al.* Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with Leishmania chagasi. **Veterinary Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 86–90, 25 jan. 2008.

SILVA, J. *et al.* Dynamics of American tegumentary leishmaniasis in a highly endemic region for Leishmania (Viannia) braziliensis infection in northeast Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006015, 2 nov. 2017.

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

SILVINO, C. S. *et al.* Frequency and night activity of sand flies (Diptera: Psychodidae) in the locality of Boqueirão, Sobral, Ceará, Brazil. **Revista Biociências**, v. 22, n. 1, p. 68–77, 2016.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, jun. 2012.

SKRABA, C. M. *et al.* Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 4, p. 437–444, ago. 2015.

SOARES, V. B. *et al.* Epidemiological surveillance of tegumentary leishmaniasis: local territorial analysis. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, 2017.

SOUZA CASTRO, L. *et al.* Characterization of Leishmania species from Central-West Region of Brazil. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p. 1839–1845, 20 jun. 2018.

SRIVASTAVA, S. *et al.* Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 12 dez. 2016.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 82, 15 fev. 2017.

SUÁREZ, M. *et al.* Quantification of Leishmania (Viannia) Kinetoplast DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Inter-sampling Variability in Parasite Load. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003936, 23 jul. 2015.

SUN, T.; ZHANG, Y. Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 5, p. 1654–1664, mar. 2008.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 1 set. 2017.

SYMMERS, W. Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain. **The Lancet**, v. 275, n. 7116, p. 127–132, 16 jan. 1960.

SZARGIKI, R. *et al.* Comparison of serological and parasitological methods for cutaneous leishmaniasis diagnosis in the state of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 47–52, fev. 2009.

TANURE, A. *et al.* Identification of sandflies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) blood meals in an endemic leishmaniasis area in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 321–324, ago. 2015.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TELES, C. B. G. *et al.* Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their Leishmania DNA in a hot spot of American Cutaneous Leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 7, p. 423–432, jul. 2016.

THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Recent Advances in Vaccines Against Leishmania Based on Patent Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 21–32, 22 mar. 2018.

TIUMAN, T. S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525–e532, ago. 2011.

TOEPP, A. J. *et al.* Leishmania incidence and prevalence in U.S. hunting hounds maintained via vertical transmission. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 10, p. 75–81, 1 dez. 2017.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017.

TSOKANA, C. *et al.* Molecular Diagnosis of Leishmaniasis, Species Identification and Phylogenetic Analysis. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. [s.l.] InTech, 2014.

TSUKAYAMA, P. *et al.* A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e1956, 3 jan. 2013.

TULADHAR, R. *et al.* Ox40L–Ox40 pathway plays distinct roles in regulating Th2 responses but does not determine outcome of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* and *Leishmania major*. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 49–55, jan. 2015.

TUON, F. F. *et al.* Toll-like receptors and leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 866–72, 1 mar. 2008.

TURCHETTI, A. P. *et al.* Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 4, p. 403–407, 2014.

VALE, E. C. S. DO; FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 4, p. 421–428, ago. 2005.

VAN DER AUWERA, G.; DUJARDIN, J.-C. Species typing in dermal leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 265–94, 1 abr. 2015.

VERNAL, S. *et al.* Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. ofv184, 12 jan. 2016.

VICKERMAN, K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. **Biology of the Kinetoplastida**, p. 1–34, 1976.

VITAL, T. E. **Detecção de DNA de Leishmania spp. no sangue e em esperma de indivíduos residentes na região Amazônica.** Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2014.

WAUGH, B. *et al.* In silico work flow for scaffold hopping in Leishmania. **BMC research notes**, v. 7, p. 802, 17 nov. 2014.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: Epidemiological situation.** Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 1 maio. 2018.

WRIGHT, J. H. Protozoa in a Case of Tropical Ulcer ("Delhi Sore"). **The Journal of medical research**, v. 10, n. 3, p. 472–482.7, dez. 1903.

YATAWARA, L. *et al.* Maxicircle (mitochondrial) genome sequence (partial) of *Leishmania major*: Gene content, arrangement and composition compared with *Leishmania tarentolae*. **Gene**, v. 424, n. 1–2, p. 80–86, 15 nov. 2008.

ZANGGER, H. *et al.* Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites.

APÊNDICES

APÊNDICE A



Universidade de Brasília
Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

TERMO DE CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM PROJETO DE PESQUISA

O (a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa **“Presença do RNA Vírus de Leishmania está associada ao aumento de mestástase e comprometimento das mucosas na Leishmaniose Tegumentar Americana?”** O objetivo do projeto é estudar a associação entre a presença do RNA vírus de Leishmania (LRV) e as formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana.

Pesquisadores Responsáveis:

- Prof. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo- Professora Adjunta Faculdade Medicina/Laboratório Interdisciplinar de Biociências. Telefone e WhatsApp: (61)- 81770308 – (61) 31071899. E-mail: nnitz@unb.br
- Prof. Dra. Elza Ferreira Noronha- Professora Adjunta Faculdade Medicina/Núcleo de Medicina Tropical. Telefone e WhatsApp: (61)- 96097531 – (61) 31071899. E-mail: elzafer@gmail.com
- Prof. Dr. Gustavo Adolfo Romero- Professor Associado Faculdade Medicina/Núcleo de Medicina Tropical. Telefone e WhatsApp: (61)- 99678759 – (61) 31071899. E-mail: romgustavo@gmail.com

Eu, _____, com _____ anos de idade, abaixo assinado, declaro ter compreendido o que está escrito neste documento, por meio do qual do meu consentimento para participação como voluntário(a) nessa pesquisa médica, que diz o seguinte:

Termo de Consentimento para participação em Projeto de Pesquisa

1. Estou participando por minha vontade, de uma pesquisa para estudar melhor a Leishmaniose Tegumentar Americana.

2. Fui informado que sou portador da Leishmaniose Tegumentar Americana. Foi-me explicado como adquirir a doença e de suas várias formas de apresentação.
3. Para participar da pesquisa, terei que me submeter a consulta e realização de exames no Posto de saúde de Corte de Pedras (BA), ao exame físico geral, a exames como teste intradérmico de Montenegro, biópsia de pele da área lesionada, além de coleta de sangue, duas coletas, para confirmação do diagnóstico da doença e exames laboratoriais comuns feitos para minha doença.
4. Os exames laboratoriais serão solicitados pela médica pesquisadora e realizados no Laboratório Interdisciplinar de Biociências da UnB.
5. Todos os exames são rotineiramente realizados para a confirmação da minha doença e para que ela seja melhor conhecida e para observar o efeito dos remédios.
6. Nenhum destes exames oferece qualquer tipo de perigo ou de incômodo maior.
7. Nenhum tipo de pagamento será feito e nenhum benefício a mais será obtido por mim pela participação nessa pesquisa, a não ser o melhor conhecimento da minha doença e a possibilidade do seu melhor tratamento de acordo como que for descoberto. Não terei, também, qualquer despesa financeira pela minha participação que esteja diretamente relacionada com a pesquisa.
8. Os pesquisadores declaram guardar segredo dos meus dados e informações pessoais e que os resultados da pesquisa somente serão informados para mim e para outros médicos pesquisadores.
9. Se eu quiser, tenho o direito de deixar de participar dessa pesquisa a qualquer momento, bastando comunicar aos pesquisadores. Neste caso, não terei qualquer prejuízo ou problema para continuar com o meu atendimento, com meus exames e com meu tratamento, que continuarão sendo feitos normalmente.
10. Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. A este comitê cabe a solução ou o encaminhamento de quaisquer questões éticas implicadas nesta pesquisa, de interesse do Sujeito Voluntário ou dos Pesquisadores responsáveis.

TERMO DE GUARDA DE AMOSTRA BIOLÓGICA

Concordo com o armazenamento da minha amostra no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, localizado na Faculdade de Medicina da UnB, podendo ser utilizada, juntamente com as informações do meu prontuário, em pesquisas futuras coordenadas pelas profas Dra Nadjar Nitz e Dra Elza Noronha. Se eu quiser, a minha amostra e prontuário poderão ser retirados da pesquisa em qualquer momento, sem qualquer prejuízo, bastando comunicar aos pesquisadores.

 Autorizo Não autorizo

_____, _____ de _____ de _____.

Local e data

Voluntário

Testemunha

Prof. Dra. Elza Ferreira Noronha

Telefone para contato - 61- 96097531 e 31071899

N.B.: Com cópia para Voluntário.

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

Campus Universitário Darcy Ribeiro, Asa Norte - CEP 70910-900 - Brasília, DF

Tel.: (61) 3107-1918, cepfm@unb.br

APÊNDICE B

Lista dos resultados de qPCR e ELISA por paciente e tipo de amostra

Número do paciente	Idade	Sexo	Tipo de amostra	Manifestação	qPCR kDNA	ELISA
1	84	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
2	70	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
3	63	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
4	58	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Negativo
5	69	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
6	69	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
7	43	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
8	69	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
9	29	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
10	77	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
11	54	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
12	33	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
13	27	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
13T	27	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
14	41	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
15	58	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
16	58	F	Sangue	Assintomático	Positivo	Negativo
17	60	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
18	32	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
19	70	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
20	44	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
21	49	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
22	31	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
23	54	M	Sangue	LCL recidiva	Negativo	Positivo
23T	54	M	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Positivo
24	48	M	Sangue	LCL recidiva	Negativo	Positivo
25	77	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
25T	77	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Negativo
26	18	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
26T	18	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
27	54	M	Sangue	LCL recidiva	Negativo	Positivo
27T	54	M	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Positivo
28	57	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
28T	57	F	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
29	30	F	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
30	34	M	Sangue	Assintomático	Negativo	Positivo
31	45	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
31T	45	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
32	66	M	Sangue	LMC	Positivo	Positivo

32T	66	M	Tecido	LMC	Negativo	Positivo
33	52	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Negativo
33T	52	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Negativo
34	25	F	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
34T	25	F	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
35	52	F	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
35T	52	F	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
36	20	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
36T	20	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
37	24	F	Sangue	LMC	Positivo	Positivo
37T	24	F	Tecido	LMC	Negativo	Positivo
38	23	M	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Positivo
38T	23	M	Tecido	LCL recidiva	Negativo	Positivo
39	37	F	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
39T	37	F	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
40	40	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
40T	40	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
41	67	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
41T	67	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
42	64	M	Sangue	LMC	Positivo	Negativo
42T	64	M	Tecido	LMC	Negativo	Negativo
43	60	F	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Negativo
43T	60	F	Tecido	LCL recidiva	Negativo	Negativo
44	46	F	Sangue	LMC	Negativo	Positivo
44T	46	F	Tecido	LMC	Positivo	Positivo
45	47	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
45T	61	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
46	57	M	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Positivo
46T	57	M	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Positivo
47	56	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
47T	56	F	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
48	20	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
48T	20	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
49	56	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
49T	56	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
50	56	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
50T	56	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Negativo
51	49	M	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Negativo
51T	49	M	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Negativo
52	68	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
52T	68	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
53	18	M	Sangue	LMC	Positivo	Positivo
53T	18	M	Tecido	LMC	Positivo	Positivo
54	58	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
54T	58	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Negativo

55	73	F	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Negativo
55T	73	F	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Negativo
56	76	F	Sangue	LCL recidiva	Positivo	Positivo
56T	76	F	Tecido	LCL recidiva	Positivo	Positivo
57	40	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Negativo
57T	40	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Negativo
58	81	F	Sangue	LMC	Positivo	Positivo
58T	81	F	Tecido	LMC	Negativo	Positivo
59	59	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
59T	59	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
60	39	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
60T	39	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
61	53	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
61T	53	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
62	56	M	Sangue	LMC	Negativo	Positivo
62T	56	M	Tecido	LMC	Positivo	Positivo
63	50	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
63T	50	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
64	21	M	Sangue	LMC	Negativo	Positivo
64T	21	M	Tecido	LMC	Positivo	Positivo
65	43	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
65T	43	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
66	57	M	Sangue	LCL recidiva	Negativo	Negativo
66T	57	M	Tecido	LCL recidiva	Negativo	Negativo
67	44	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
67T	44	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
68	65	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
68T	65	F	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
69	31	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
69T	31	F	Tecido	LCL primária	Negativo	Negativo
70	44	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
70T	44	F	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
71	71	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
71T	71	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
72	33	M	Sangue	LCL primária	Positivo	Positivo
72T	33	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Positivo
73	57	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
73T	57	M	Tecido	LCL primária	Negativo	Negativo
74	54	F	Sangue	LCL primária	Negativo	Positivo
74T	54	F	Tecido	LCL primária	Positivo	Positivo
75	50	M	Sangue	LCL primária	Negativo	Negativo
75T	50	M	Tecido	LCL primária	Positivo	Negativo

Legenda: T- tecido, F- feminino, M- masculino LCL- Leishmaniose cutânea localizada, LMC- Leishmaniose mucocutânea

ANEXOS

ANEXO A

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Presença do RNA Virus de Leishmania está associada ao aumento de metástase e comprometimento das mucosas na Leishmaniose Tegumentar Americana?

Pesquisador: Nadjar Nitz Silva Locks de Araújo

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 53157115.5.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA DO DISTRITO FEDERAL FAPDF

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.521.541

Apresentação do Projeto:

Vide parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Vide parecer anterior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um projeto de pesquisa prospectivo, interessante e bem delineado. A pesquisadora, em carta endereçada ao CEP, esclarece que "A pesquisa prevê a coleta e o armazenamento de amostras biológicas de 100 pacientes com leishmaniose tegumentar, que serão mantidas no Laboratório Interdisciplinar de Biotecnologias da FM/UNB e poderão ser utilizadas exclusivamente para pesquisas futuras do mesmo grupo, caracterizando o biorepositório e atendendo as normas vigentes na portaria 2.201, de 14 de setembro de 2011."

Os critérios de exclusão foram definidos e compreendem "pacientes que não concordarem em participar da pesquisa e não assinarem o termo de livre esclarecido". Depreende-se, portanto, que não haverá a presença de menores de idade ou outros grupos vulneráveis, mas isso não está

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61) 3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.641

explicitado.

O TCLE foi corrigido e, ao final, após as assinaturas, foi anexado parágrafo solicitando ao participante a autorização para consulta ao prontuário, armazenamento da amostra no Laboratório Interdisciplinar de Biociências, da Faculdade de Medicina da UnB, e utilização em pesquisas futuras coordenadas pelas profas Dra Nadjar Niltz e Dra Elza Noronha. Apesar de mais adequado, a pesquisadora responsável deverá acrescentar esse último parágrafo antes das assinaturas necessárias, ou após o parágrafo em questão, solicitar novamente a assinatura do paciente em sinal de concordância. Além disso, o cronograma deverá ser refletido, uma vez que prevê o início da identificação, avaliação clínica dos pacientes, coleta das amostras e cultivo dos parasitos para 30/04/2016 e extração de DNA e RNA em 02/05/2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Após o parecer inicial do CEP, foram incluídos no processo Carta endereçada ao CEP, Projeto inserido na Plataforma Brasil, TCLE corrigido e Declaração de Manuseio de Material Biológico, Biomepositório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de um projeto de pesquisa prospectivo, interessante, factível e bem delineado. Praticamente todas as pendências foram corrigidas, no entanto, os critérios de exclusão da pesquisa, o TCLE e cronograma deverão ser adequados. Este é o meu parecer, salvo melhor juízo dos membros do CEP-FM.

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto foi avaliado na 4ª Reunião Ordinária deste CEP. Após apresentação pelo relator e discussão pelos membros do Colegiado o projeto foi aprovado. Sugere-se ao pesquisador principal que apresente sob a forma de Notificação os seguintes itens:

- 1 - Critérios de exclusão da pesquisa;
- 2 - Atualização do cronograma;
- 3 - Ajuste no TCLE, seguindo as considerações apresentadas acima.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.641

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_377947.pdf	04/04/2016 18:15:33		Aceito
Outros	TCLEmodificado.pdf	04/04/2016 18:15:10	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CARTAOCEPFM.pdf	04/04/2016 18:14:51	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	DECLARACAObIORREPOSITORIO.pdf	04/04/2016 18:14:22	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	ProjetoLRVmodificado.pdf	04/04/2016 18:10:53	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	FICHADECOLHEITADEDADOS.pdf	03/03/2016 10:53:54	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/02/2016 15:28:05	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Folha de Rosto	FolhaderoStoCEP.pdf	12/02/2016 15:26:56	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CartadeencaminhamentoCEPFM.pdf	04/02/2016 15:22:24	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CurriculoLattesElzaNoronha.pdf	03/02/2016 11:36:11	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CurriculoLattesGustavoRomero.pdf	03/02/2016 11:35:06	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CurriculoLattesMarianaHecht.pdf	03/02/2016 11:33:59	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	CurriculoLattesNadjarNitz.pdf	03/02/2016 11:32:03	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Outros	Termoconcordancianmt.pdf	03/02/2016 11:26:41	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaraçaoresponsabilidade.pdf	03/02/2016 11:24:15	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AceiteInstitucional2015.pdf	16/11/2015 10:07:35	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	DeclaraçaoBiobanco.pdf	16/11/2015 10:05:07	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoLRVdetalhado.pdf	13/11/2015 12:19:44	Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmed@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.521.641

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

BRASÍLIA, 29 de Abril de 2016

Assinado por:

Fiorino Figueredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

ANEXO B

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Quantificação do kDNA de Leishmania Viannia por qPCR em diferentes profundidades de lesões cutâneas

Pesquisador: Laís Sevilha dos Santos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 56709316.3.0000.5558

Instituição Proponente: Hospital Universitário de Brasília - HUB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.635.976

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa que pretende utilizar o PCR em tempo real (qPCR) em amostras das camadas da pele (epiderme, derme e na hipoderme) de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) confirmado, com a intenção de quantificar o parasito em profundidade na pele. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é caracterizada por uma doença infecciosa responsável por causar lesões cutâneas e mucosas. O diagnóstico é realizado por exames parasitológicos e imunológicos, porém essas técnicas apresentam limitações com relação à sensibilidade e especificidade respectivamente. Com a necessidade de tornar o diagnóstico de LTA mais eficaz, as técnicas de biologia molecular começaram a ser utilizadas em estudos e se mostraram muito promissoras. Também influenciam na acurácia dos resultados, a forma e o local onde a coleta é realizada nas lesões.

Os pacientes serão recrutados no Hospital Universitário de Brasília – HUB, onde será realizada a biópsia. As amostras serão processadas no Laboratório de Dermatocologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (FM-UnB). A separação das camadas da pele será feita pela técnica de salt-split skin e a extração do DNA mitocondrial de cinetoplastos (kDNA) pelo Kit comercial NucleoSpin® Tissue. As reações de PCR em tempo real serão realizadas com iniciadores específicos para as sequências do kDNA da Leishmania do subgênero Viannia, MP1L e MP3H,

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.635.076

resultando em um produto amplificado de 70 pares de base (pb). Serão incluídas, consecutivamente, amostras de pele de pacientes com diagnóstico de LTA e que realizaram previamente os exames diagnósticos para inclusão. Os critérios diagnósticos de LTA seguirão especificações previamente descritas por Gomes e colaboradores em 2014, por meio da definição do padrão composto de referência (diagnóstico clínico, sorológico, parasitológico e molecular). Serão excluídos pacientes menores de 18 anos, pertencentes a comunidades indígenas ou que não assinem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), bem como pacientes com suspeitas de outras doenças que simulem Leishmaniose Tegumentar Americana, como micoses profundas e tuberculose. O estudo prevê amostra de 40 participantes.

A biópsia incisional será realizada após assepsia, antissepsia e anestesia local com solução de lidocaína a 2%. O local escolhido para obtenção da amostra será a periferia da lesão de LTA. Este fragmento será coletado por biópsia incisional de 0,5x0,5cm. Esta coleta já é realizada como rotina para o diagnóstico da LTA no serviço de dermatologia do Hospital Universitário de Brasília-HUB, portanto, o paciente não realizará biópsia adicional para este estudo, apenas as camadas da pele serão divididas e o exame será feito em separado por cada camada dividida.

Dessa forma, os pesquisadores esperam conseguir descrever a melhor profundidade da lesão para se realizar a coleta das amastigotas de Leishmania, melhorando assim tanto o diagnóstico quanto a verificação da eficácia do tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Realizar uma quantificação relativa de protozoários em lesões de LTA nas diferentes camadas da pele.

Objetivos específicos:

1. Quantificação relativa de protozoários na porção epidérmica das bordas de úlceras cutâneas.
2. Quantificação relativa de protozoários na porção dérmica de úlceras cutâneas.
3. Quantificação relativa de protozoários no tecido subcutâneo de lesões de LTA.
4. Relacionar a quantificação do parasito com as características clínicas da LTA como gravidade da doença e resposta ao tratamento.
5. Desenvolver comentários sobre a técnica de biópsia mais adequada (profundidade necessária) para o diagnóstico da LTA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O risco à participação do estudo consiste nos problemas inerentes ao manuseio de

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.635.976

amostras laboratoriais como perdas, trocas e inviabilização por erros de processamento, uma vez que o fragmento já coletado para exame de reação em cadeia da polimerase será usado. A biópsia já coletada para este exame será apenas dividida e o mesmo exame será realizado em camadas separadas da pele.

Benefícios: Espera-se conseguir descrever a melhor profundidade da lesão para se realizar a coleta das amastigotas de Leishmania, melhorando assim tanto o diagnóstico quanto a verificação da eficácia do tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma proposta de desenvolvimento de pesquisa como pré-requisito para obtenção de título de mestrado acadêmico junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB, tendo como orientador a Profa. Dra. Raimunda Nonata Ribeiro Sampaio. O projeto está bem fundamentado, apresenta o cronograma de atividades factível, previsão orçamentária de R\$10.203,20 sem especificação de fonte de recurso.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos estão adequados.

Recomendações:

Sugiro que a pesquisadora especifique a fonte de recursos de financiamento da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está adequado e apresenta relevância. No entanto, sugiro que a pesquisadora especifique a fonte de recursos de financiamento da pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto apreciado na Reunião Extraordinária do CEP-FM-UnB. Após apresentação do parecer do Relator, aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado por unanimidade.

Recomenda-se à pesquisadora apresentar fontes de financiamento do seu projeto.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_690790.pdf	03/06/2016 13:55:21		Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA -
UNB



Continuação do Parecer: 1.635.076

Outros	TermodeConcordancia.pdf	03/06/2016 13:52:43	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	03/06/2016 13:52:04	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	Cartadeencaminhamento.pdf	20/05/2016 00:06:06	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	Termoderesponsabilidade.pdf	10/05/2016 17:42:04	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculoLattesRaimundaNonataRibeiro Sampaio.pdf	10/05/2016 17:41:14	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculosLattesLaisSevilhadossantos.pdf	10/05/2016 17:36:49	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Outros	CurriculoLattesCiroMartinsGomes.pdf	10/05/2016 17:31:29	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoQuantificacaoVS.pdf	09/05/2016 20:36:02	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termodeciencia.pdf	09/05/2016 19:42:23	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	09/05/2016 19:35:26	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	25/04/2016 20:04:30	Lais Sevilha dos Santos	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	25/04/2016 20:04:20	Lais Sevilha dos Santos	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 14 de Julho de 2016

Assinado por:

Florêncio Figuelredo Cavalcanti Neto
(Coordenador)

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900
 UF: DF Município: BRASÍLIA
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: fmd@unb.br