



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

ADRIANO QUEIROZ SILVA

**O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis*
NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES
PARASITOS**

Orientador: Prof. Dr. Albert B. Schriefer

**Salvador-Bahia
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

ADRIANO QUEIROZ SILVA

**O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis*
NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA
DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES
PARASITOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Albert B. Schriefer

**Salvador-Bahia
2012**

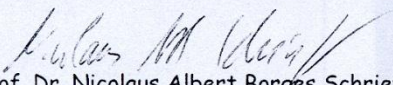


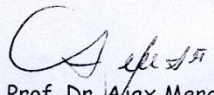
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

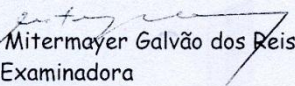


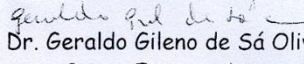
ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DO DOUTORANDO Adriano Queiroz Silva.

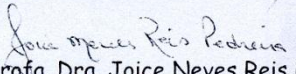
Aos dez do mês de setembro do ano de 2012 às 14 horas no auditório do quarto andar no Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer orientador, Dr. Ajax Mercês Atta, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira, Dra. Joice Neves Reis Pedreira, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS" do doutorando, Adriano Queiroz Silva. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o Doutorando teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, dez de setembro do ano de dois mil e doze.

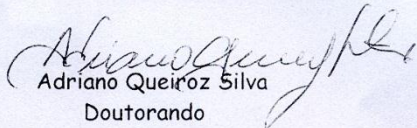

Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer
Orientador

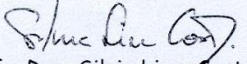

Prof. Dr. Ajax Mercês Atta
Banca Examinadora


Prof. Dr. Mitermayer Galvão dos Reis
Banca Examinadora


Prof. Dr. Geraldo Gileno de Sá Oliveira
Banca Examinadora


Profa. Dra. Joice Neves Reis Pedreira
Banca Examinadora


Adriano Queiroz Silva
Doutorando


Profa. Dra. Silvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm
ICS/UFBA

13º TABELIONATO DE NOTAS DE SALVADOR-BA
Av. Leovigildo Filgueiras, 112, Garcia - Telefone: Fone: (71) 3036-7500
BELª CRISTINA MARIA ROCHA DE ALMEIDA - TABELIONA


AUTENTICAÇÃO

Confere com o original apresentado, dou fé
Salvador-BA 03 de Outubro de 2012
ANGELA CRISTINA ALMEIDA SEIXAS-ESCREVENTE AU
Emolumentos: R\$ 3,00



Agradecimentos

- Ao meu orientador Dr. Albert Schriefer pela orientação, por ter me permitido realizar as atividades de doutorado com um projeto tão instigante e inovador, e por ter compartilhado comigo suas idéias e conhecimentos;
- Ao Dr. Edgar Carvalho por todo seu apoio durante o período de realização desse trabalho e pelas inspiradoras discussões científicas durante as viagens à Corte de Pedra;
- À Rosana Sousa, a realização desse trabalho só foi possível graças aos estudos conduzidos por ela durante o seu mestrado;
- Às mestrandas Lilian Medina, Juliana Almeida e Silvana, a ajuda delas nas análises de laboratório foram imprescindíveis à realização desse trabalho;
- Aos amigos do serviço de imunologia, todos contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho e mais importante que isso, o agradável ambiente de trabalho criado por todos, tornou a nossa tarefa muito mais fácil de ser realizada;
- À Mike Sundberg por sua ajuda na revisão do inglês do segundo artigo dessa tese;

- Ao amigo Luiz Henrique pela ajuda com os aspectos clínicos da leishmaniose e pela agradável companhia na sala de estudos;
- À toda equipe de Corte de Pedra, o trabalho que é conduzido no campo é que permite que os nossos estudos sejam realizados;
- À Ednaldo Lago pelo incansável trabalho no posto de saúde e pela coleta dos dados de GPS dos pacientes que fizeram parte do nosso estudo;
- À todos os pacientes que fizeram parte do estudo por terem aceitado participar desse trabalho. A eles eu dedico este trabalho.

APOIO FINANCEIRO

- NIH Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02

I. RESUMO

O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS. ADRIANO QUEIROZ SILVA. As leishmanioses constituem um espectro de doenças que ocorrem, sobretudo, em regiões tropicais e subtropicais do globo. Mais de 15 *Leishmania spp.* estão relacionadas a infecções, cujas manifestações vão desde úlceras localizadas, muitas vezes auto-limitadas, até as formas metastáticas, podendo afetar o baço, as mucosas nasofaríngeas ou causar lesões, papulosas ou ulceradas, que se espalham por todo o corpo do paciente. O ciclo de vida desses protozoários inclui a transmissão entre flebotomíneos e uma variedade de mamíferos silvestres ou peridomésticos, e entre os flebotomíneos e o homem. A diversidade genética desses parasitas parece ter influência no desfecho da doença e está relacionada com a interação dos parasitas e seus vetores e reservatórios. Na região que compreende a área endêmica de Corte de Pedra, a *Leishmania braziliensis* é a espécie dominante e causa de três formas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose disseminada (LD). Além disso, em Corte de Pedra, a *L. braziliensis* é multiclonal e há uma associação com a compartimentalização da doença na região. Os principais objetivos desse trabalho foram: 1 - Desenvolver um método de tipagem, baseado na análise de sequência de DNA que seja capaz de distinguir sub-populações *Leishmania braziliensis* isolados de pacientes com LC, LM ou LD; 2 - Avaliar as distribuições temporais e espaciais da LC, LM e LD na região que compreende a área endêmica de Corte de Pedra. No manuscrito 1, foram comparadas as sequências de 6 segmentos de DNA (Loci) inicialmente identificados em um ensaio de amplificação randômica para identificar genótipos de *L. braziliensis* obtidos de pacientes com LC, LM e LD. As variações alélicas foram definidas pela presença de *Single nucleotide Polymorphisms* (SNPs) e INDELS nos seis loci avaliados, os quais foram associadas com as três formas da doença. Foram encontrados 27 polimorfismos distribuídos nos seis loci da *L. braziliensis*; destes, 5 apresentaram uma associação com a forma disseminada da doença e com razões de risco que variaram entre 4,4 até 10,7. Os SNPs e INDELS de cada locus foram organizados em 15 haplótipos, destes, 6

apresentaram associação estatisticamente significantes com LD e com razões de risco variando entre 3,0 até 8,5. No manuscrito 2, foram apresentadas as coordenadas geográficas dos locais de residência dos casos de LC, LM e LD da região de Corte de Pedra no período de 2008 até 2011. O estudo foi feito com base na distribuição dos casos de LC, LM e LD em cada um dos três anos de estudo. A análise de agregação dos casos de LD e LM mostrou que não há diferença nas suas distribuições. Os casos de LC tiveram o mesmo padrão de distribuição dos casos de LM e LD no primeiro ano, e um padrão distinto a partir do segundo ano. Esses resultados sugerem que a forma como a leishmaniose se apresenta no hospedeiro humano é influenciada pela cepa parasitária e também que a doença está constantemente mudando o padrão de distribuição na área endêmica. Os fatores que promovem essas mudanças não estão totalmente claros. Talvez, conciliar as informações das distribuições dos casos com a genotipagem dos parasitas, permita um melhor entendimento da dinâmica da leishmaniose em Corte de Pedra.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana; *Leishmania braziliensis*; polimorfismos parasitários; distribuição geográfica.

II. ABSTRACT

THE ROLE OF *Leishmania braziliensis* STRAIN POLYMORPHISM ON DISEASE OUTCOME AND DISTRIBUTION. ADRIANO QUEIROZ SILVA.

Leishmaniasis are the spectrum of diseases that occurs, specially, in tropical and subtropical areas. More than 15 *Leishmania spp.* are associated with infections ranging from, self-resolving or not, located ulcers to metastatic forms, which can affect the spleen, nasopharyngeal mucosal, or cause scattered papular or ulcerated lesions for all patient body. The protozoan life cycle includes the transmission between the sandflies and several wild and peridomestics mammals, and between the sandflies and the men. The genetic diversity of these parasites seems to influence the disease outcome and it determines the relationship between the parasite and their vectors and reservoirs. On the region that comprise the endemic area of Corte de Pedra, the *Leishmania braziliensis* is the dominant specie and it is responsible by the three forms of the American Tegumentary Leishmaniasis (ATL): the cutaneous leishmaniasis (CL), the mucosal leishmaniasis (ML) and the disseminated leishmaniasis (DL). Furthermore, on Corte de Pedra, the *L. braziliensis* population is multiclonal and its populational structure is associated with disease compartmentalization. The main aims of this work are: 1 – To develop a sequencing-typing based method able to distinguish *L. braziliensis* sub-populations isolated from patients with CL, ML and DL; 2 – To evaluate the temporal and spatial distributions of the CL, ML and DL on Corte de Pedra area. In the first manuscript, we compared the sequences of 6 random amplified markers to identify the *L. braziliensis* genotypes recovery from patients with CL, ML and DL. The allelic variations were defined by the presence of *Single nucleotide Polymorphisms* (SNPs) and INDELS in six evaluated loci, which were associated with the three diseases forms. We found 27 polymorphisms distributed in six *L. braziliensis* loci; 5 of them reveled associations with DL and showed risk ratio that vary from 4.4 to 10.7. The SNPs and INDELS of each locus were organized in 15 haplotypes, of which 6 presented statically significant associations with DL and with risk ratio ranging from 3.0 to 8.5. In the second manuscript are described the geographic coordinates from local residences of the CL, ML and DL cases over Corte de Pedra region from the period between 2008

and 2011 years. The study was conducted based in the distribution of the CL, ML and DL cases on each one of the three years study period. The aggregation analyses showed similarity distribution between ML and DL cases. The CL cases presented the same distribution pattern on the first year, but a distinct distribution was observed from the second year. These results showed that the LTA are defined by parasitic strains and also the leishmaniasis are constantly changing their distribution pattern over endemic area. The factors which drive these changes are not completely clear, maybe, coupling the information regarding the distribution with those obtained from parasite genotyping may help us to understand the dynamic of leishmaniasis over Corte de Pedra.

Key words: American tegumentary leishmaniasis; *Leishmania braziliensis*; strains polymorphisms; geographical distribution.

III. LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Manuscrito 1

Table 1. Chromosomal position of the six polymorphic loci identified in *L. V. braziliensis* of Corte de Pedra. The *Leishmania Viannia braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 complete genome, accessed on the web site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, was used.

Table 2. List of SNPs / Indels found per *L. V. braziliensis* locus studied and frequencies of their alleles in the sample.

Table 3. List of haplotypes found in at least ten percent of the parasite isolates for each *L. V. braziliensis* locus studied.

Table 4. Association between SNP / indel haplotypes in *L. V. braziliensis* investigated loci and disseminated leishmaniasis phenotype.

Table 5. Levels of association between *L. V. braziliensis* SNP / indel haplotypes, which showed association with DL (table 4), and mucosal leishmaniasis phenotype.

Table 6. Levels of association between *L. V. braziliensis* SNP / indel haplotypes, which showed association with DL (table 4), and localized cutaneous leishmaniasis phenotype.

Table 7. Association between SNPs and combinations of SNPs in *L. V. braziliensis* and risk to develop localized cutaneous or mucosal leishmaniasis phenotype.

Table 8. Association between combined SNPs in *L. V. braziliensis* and risk to develop disseminated leishmaniasis phenotype.

Figure 1. Electrophoretic patterns (A, B and C) of *Leishmania braziliensis* genomic DNA amplicons generated using three random amplified polymorphic DNA (RAPD) protocols previously described [12]. Marked bands were excised, cloned and sequenced, then aligned among nine *L. V. braziliensis* isolates from Corte de Pedra to detect polymorphisms. The following polymorphic loci were detected among parasites of Corte de Pedra: (B1) CHR 24/3074 (chromosome 24, starting at position 3074), (B2) CHR 26/765, (B3) CHR 28/195696, (B4) CHR 28/425451, (B5) CHR 32/1356278 and (B6) CHR 35/335652. The locus CHR 26/765 was found duplicated on chromosome 33 starting at position 1476284. (L1) Molecular weight marker, (L2, L3) examples of *L. V. braziliensis* isolates. (bp) estimated nucleic acid length in base pairs.

Manuscrito 2

Figure 1. Satellite view of distribution of patients with cutaneous leishmaniasis (CL), patients with disseminated leishmaniasis (DL) and patients with mucosal leishmaniasis (ML) in Corte de Pedra, Brazil, 2008-2011. A) White circles indicate patients with CL. B) Red circles indicate patients with DL. C) Yellow circles indicate patients with ML. Vertical lines divides the region into inland (left) and coastal (right) areas of similar size. Horizontal lines divides the region into north (up) and south (down) areas of similar size.

Table 1. Comparison between disease forms on North, South, East and West of Corte de Pedra, Brazil.

Figure 2. Frequency of CL, DL and ML cases on regions Northwest, Northeast, Southwest and Southeast of Corte de Pedra during the period of 2008-2011.

Table 2. Association between different forms of American tegumentary leishmaniasis on different regions of Corte de Pedra, Brazil.

Figure 3. Satellite view of progressive distributions of patients with cutaneous leishmaniasis (CL), patients with disseminated leishmaniasis (DL) and patients with mucosal leishmaniasis (ML) in Corte de Pedra, Brazil, 2008-2011. Blue circles indicate cases of CL. Red circles indicate cases of DL. Yellow circles indicate cases of ML. A1, B1, C1) Year 1. A2, B2, C2) Year 2. A3, B3, C3) Year 3. Vertical lines divides the region into inland (left) and coastal (right) areas of similar size. Horizontal lines divides the region into north (up) and south (down) areas of similar size.

Table 3. Comparisons between temporal distributions of cutaneous leishmaniasis, disseminated leishmaniasis and mucosal leishmaniasis.

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

ATL: *American tegumentary leishmaniasis*

CL: *Cutaneous leishmaniasis*

CMSP: Células mononucleares de sangue periférico

DL: *Disseminated leishmaniasis*

IFN- γ : Interferon gamma

IL-1: Interleucina 1

IL-4: Interleucina 4

IL-5: Interleucina 5

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

INDEL: Inserção ou deleção de nucleotídeo

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Leishmaniose disseminada

LM: Leishmaniose mucosa

LTA: Leishmaniose tegumentar americana

LV: Leishmaniose visceral

ML: *Mucosal leishmaniasis*

MLEE: *Multilocus enzyme electrophoresis*

MLST: *Multilocus sequencing typing*

MLMT: *Multilocus microsatellite typing*

NK: Célula natural killer

PB: Pares de base

PCR-RFLP: *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*

RAPD: *Random amplification of polymorphic DNA*

SNP: *Single nucleotide polymorphisms*

TH1: Linfócitos T auxiliares tipo1

Th2: Linfócitos T auxiliares tipo2

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

V. SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 – Os aspectos gerais da leishmaniose	16
1.2 - A relação do parasita com o hospedeiro	17
1.2.1 - A resposta imune do hospedeiro	19
1.2.1.1 – Mecanismos imunológicos e lesão tecidual na leishmaniose	20
1.2.1.2 – Células hospedeiras da <i>Leishmania</i>	21
1.2.2 - Os aspectos genéticos do hospedeiro que influenciam o desfecho da infecção	22
1.2.3 - Os fatores ambientais que interferem na leishmaniose	24
1.2.3.1 - Os vetores	25
1.2.3.2 - Os reservatórios	26
1.2.3.3 - A leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra	27
1.2.4 - O papel da cepa parasitária na LTA	29
2. Justificativa	34
3. Objetivos	37
4. Manuscrito 1	38
5. Manuscrito 2	76
6. Discussão	97
7. Conclusão	110
8. Referências bibliográficas	111
9. Anexos	120

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Aspectos gerais da Leishmaniose

As leishmanioses constituem um espectro de doenças parasitárias que ocorrem, sobretudo, em regiões tropicais e subtropicais do globo (Desjeux *et al.*, 1992). Os primeiros relatos da doença foram feitos em 1885 por Cunningham, e, em 1903, quando, de forma independente, Leishman e Donovan descreveram um protozoário, atualmente conhecido como *Leishmania donovani*, em tecido do baço de pacientes com Calazar na Índia (Bailey e Bishop, 1959). Na América do Sul, o primeiro relato de doença cutânea foi feito por Lindenberg em 1909 (Oumeish *et al.*, 1999). Em 1911, Vianna, no Brasil, atribuiu a enfermidade a uma nova espécie, a qual nomeou *Leishmania braziliensis* (Oumeish *et al.*, 1999).

As manifestações clínicas da leishmaniose variam de lesões ulceradas na pele até as formas disseminadas. O espectro de apresentações clínicas nos humanos inclui: a leishmaniose visceral, que é causada por espécies do complexo *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum* no velho mundo e *L. chagasi* no novo mundo); e leishmaniose tegumentar, que é causada pelas espécies *Leishmania trópica*, *L. major*, *L. aethiopica* no velho mundo e pelas espécies do complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) ou espécies do sub-gênero *Viannia* (*L. [V] panamensis*, *L. [V] guyanensis*, *L. [V] peruviana* e *L. [V] braziliensis*) no novo mundo. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é causada pelos parasitas do complexo *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* no novo mundo. As duas formas clínicas clássicas de LTA humana são: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM). A leishmaniose disseminada (LD) é a terceira forma, emergente, de LTA

causada por *L. braziliensis*, que ocorre, principalmente, no Nordeste do Brasil. As leishmanioses cutânea, mucosa e disseminada são entidades distintas, apresentando aspectos clínicos diferentes. A LC é usualmente limitada a uma ou poucas úlceras de pele, normalmente encontrada(s) em membro(s) inferior(es) e/ou superior(es) (Azulay *et al.*, 1995). Na LD, múltiplas lesões, ulceradas ou não, de pele, são, frequentemente, encontradas disseminadas pelo corpo do paciente, as quais podem ser precedidas por um período curto e transitório de febre baixa (Costa *et al.*, 1986; Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). A LM é a forma mais grave da LTA, afetando, principalmente, a boca, o nariz e a mucosa da faringe. Isso pode causar lesões faciais desfigurativas e deformações potencialmente letais nos indivíduos afetados (Marsden, 1986).

A transmissão da leishmaniose ocorre através da picada de flebotomíneos dos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (de Almeida *et al.*, 2003), que inoculam a forma promastigota do parasita na pele. Na pele, as formas promastigotas são internalizadas de maneira ativa ou são fagocitadas por uma variedade de células do hospedeiro, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Uma vez internalizadas, a forma que exibe o flagelo exposto externamente se diferencia em amastigota que é a forma que apresenta flagelo contido na bolsa flagelar e que é capaz de se replicar dentro dos fagolisossomos dos fagócitos. As formas amastigotas escapam das células fagocíticas e são internalizadas por outros macrófagos em local próximo ou em tecidos distantes, podendo ocorrer assim a sua disseminação (Murray *et al.*, 2005).

1.2 – A relação do parasita com o hospedeiro

O desfecho da infecção depende de fatores do hospedeiro, do próprio parasito e do meio ambiente (discutidos com mais detalhes nos capítulos 1.2.1 até 1.2.4). Na leishmaniose, esses fatores podem determinar, por exemplo, se o paciente desenvolverá uma infecção assintomática, a forma cutânea, mucosa ou disseminada da leishmaniose.

Após a inoculação da leishmania, o sistema imune do hospedeiro vai usar todos os seus componentes para tentar eliminar o agente infeccioso. O primeiro deles é a imunidade inata, a primeira linha de defesa do hospedeiro que dispõe de células fagocíticas, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. No caso da infecção não ter sido controlada pela resposta natural, entra em ação a imunidade adquirida. Nessa situação, os linfócitos T têm um papel fundamental no direcionamento da resposta imune (Abbas *et al.*, 2008). Por outro lado, a resposta imune parece ser fortemente influenciada pelo perfil genético do hospedeiro (Alcais *et al.*, 1997; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 2005; Castellucci *et al.*, 2011).

O ambiente é o segundo fator e tem um papel importante na doença, principalmente no que diz respeito à distribuição da doença numa área endêmica. Os fatores ambientais determinam a distribuição dos vetores numa região afetada pela leishmaniose (Cupolillo *et al.*, 2003; Shimabukuro *et al.*, 2010; Hamarsheh, 2011, Kassem *et al.*, 2012). Além disso, o tamanho do inóculo de parasitas no hospedeiro e os reservatórios que participam do ciclo da leishmania podem ser fatores importantes para o entendimento de como a doença evolui numa determinada região e como isso pode influenciar no desfecho da infecção.

O terceiro aspecto é o próprio agente etiológico. Diferentes espécies de leishmania são responsáveis pelas formas visceral e tegumentar da leishmaniose, demonstrando o papel do parasita no desenvolvimento de doenças com lesões localizadas e metastáticas (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993; Herwaldt, 1999; Ashford, 2000). A capacidade de modular a resposta imune e a habilidade de disseminar-se pelo corpo do hospedeiro podem ser características inerentes à cepas parasitárias em particular e que, talvez, não sejam encontradas nas cepas menos virulentas. A identificação dos mecanismos microbianos de virulência que promovem as diferenças na patogenicidade das cepas parasitárias permitirá grande avanço no entendimento da leishmaniose, contudo essa seria uma abordagem muito mais complexa. É possível, no entanto, identificar marcadores genéticos capazes de distinguir as cepas, possibilitando uma melhor compreensão da patogenicidade da *Leishmania*.

1.2.1 – A resposta imune do hospedeiro

Clinicamente, a leishmaniose tegumentar americana pode apresentar-se em diversas formas, incluindo a cutânea, mucosa e disseminada. A diversidade de apresentação clínica depende de uma interação complexa entre o parasito e o hospedeiro. A resposta imune celular do tipo Th1 (mediados por IL-2, IFN- γ e TNF- α) é importante para eliminação do parasita, mas pode gerar uma intensa reação inflamatória que está associada à destruição tecidual na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa (Carvalho *et al.*, 1988). Na ausência da ativação de células Th1, a produção de IFN- γ é baixa ou ausente, os macrófagos não apresentam a capacidade de destruir leishmanias, e formas metastáticas da leishmaniose são observadas, como as leishmanioses visceral, cutânea difusa e disseminada (Carvalho *et al.*, 1988; Bomfim

et al., 1996). Todavia, nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar, a despeito de existir uma resposta imune protetora, os pacientes evoluem para o desenvolvimento da doença com um processo inflamatório mais intenso do que aqueles observados na forma disseminada. Do ponto de vista histopatológico, a lesão é caracterizada por um processo inflamatório com linfócitos e plasmócitos e com raros ou, até mesmo, ausência de parasitas (Bittencourt e Barral, 1991). Na realidade, evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Os pacientes com LC e LM produzem níveis altos de IFN- γ e TNF- α (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998), mas, ao invés de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas; 2) Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM, quando estimuladas com antígenos de *L. braziliensis in vitro*, não regulam a produção de IFN- γ e TNF- α nesses pacientes, mesmo após a adição exógena da IL-10 (Bacellar *et al.*, 2002); 3) Embora IL-10 seja expressa em células no local da lesão em pacientes com LM e LC, em células da lesão mucosa, há uma menor expressão do receptor de IL-10 do que em células da lesão cutânea (Faria *et al.*, 2005); 4) Os níveis de TNF- α e IFN- γ no soro e em sobrenadantes de culturas de células, estimuladas com o antígeno de *Leishmania*, diminuem significativamente após o tratamento (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Da-Cruz *et al.*, 1996).

1.2.1.1 - Mecanismos imunológicos e lesão tecidual na leishmaniose

A destruição celular e tecidual que leva ao aparecimento da lesão é a responsável pela formação da úlcera leishmaniótica. Estudos prévios têm mostrado a importância da resposta inflamatória na destruição tecidual na leishmaniose tegumentar e a

incapacidade de IL-10 modular essa resposta na leishmaniose mucosa (Barcellar *et al.*, 2002). Por exemplo, existe uma associação entre produção de IFN- γ e TNF- α e tamanho da lesão, assim como com o aparecimento de formas mais graves da doença (Antonelli *et al.*, 2005). O uso da pentoxifilina, um inibidor de TNF- α associado ao antimônio, cura pacientes com LC e LM que são refratários ao tratamento com antimonial (Lessa *et al.*, 2001; Bafica *et al.*, 2003) e acelera a cura de pacientes virgens de tratamento (Machado *et al.*, 2007). Também tem sido identificada uma grande atividade de células citotóxicas em lesões de pacientes com LC (Faria *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2002).

1.2.1.2 – Células hospedeiras da Leishmania

Leishmanias são patógenos intracelulares obrigatórios de macrófagos, contudo estudos recentes têm demonstrado que diversas células hospedeiras, além dos macrófagos, podem ser infectadas pela *Leishmania* (Kaye e Scott, 2011). Um dos maiores desafios encontrados pelas formas promastigotas, após a sua inoculação no hospedeiro mamífero, é estabelecer residência em macrófagos sem, no entanto, ativar as suas defesas antimicrobianas inatas. Laskay *et al.*, (2003) sugeriram que os neutrófilos poderia agir como “cavalos de troia” favorecendo o estabelecimento da infecção em macrófagos. Estudando a *Leishmania major*, os autores observaram que formas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos *in vitro* e sobrevivem no interior dos seus fagossomos. Os neutrófilos infectados podem ser induzidos a sofrer apoptose, e, em seguida, serem fagocitadas por macrófagos sem que os mecanismos de defesa dessas células sejam ativados, favorecendo a sobrevivência da *Leishmania*.

Embora os parasitas sejam prontamente encontrados nos neutrófilos, várias evidências sugerem que a replicação, bem como à sobrevivência a longo prazo da *Leishmania*, predominantemente ocorre dentro de fagócitos mononucleares (Kaye e Scott, 2011). Estudos *in vitro* mostram que células dendríticas dérmicas fagocitam a *L. major* dentro de poucas horas de inoculação (Ng *et al.*, 2008). Macrófagos residentes dérmicos também são rapidamente invadidos ou fagocitam os parasitos inoculados e tornam-se a população de células predominantemente parasitada no local da picada do vetor após 24h da inoculação (Peters *et al.*, 2008).

1.2.2 – Os aspectos genéticos do hospedeiro que influenciam o desfecho da infecção

O estabelecimento da infecção causada pela *L. braziliensis* depende do tipo de relação que o hospedeiro estabelece com o parasito. Caso o hospedeiro não seja capaz de montar uma resposta imune inata e/ou adquirida com intensidade e qualidade apropriados, a leishmaniose pode resultar em uma cura espontânea ou causar lesões localizadas ou metastáticas no hospedeiro (Kaye e Scott, 2011). Têm sido acumuladas evidências de que os fatores genéticos do hospedeiro influenciam a resposta imune e, conseqüentemente, o desfecho da doença (Alcais *et al.*, 1997; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998; Cabrera *et al.*, 1995; Castellucci *et al.*, 2005; Castellucci *et al.*, 2011).

Estudos experimentais realizados em camundongos mostraram que um único gene autossômico, localizado no cromossomo 1, o qual controla a resistência natural a diferentes patógenos intracelulares, também regula a resistência de camundongos à infecção pela *L. donovani* (Bradley *et al.*, 1979), que é responsável pela leishmaniose visceral. Em humanos, um estudo de caso-controle realizado na Venezuela

demonstrou associação entre a leishmaniose mucocutânea e o fator de necrose tumoral. A homoziguidade em um alelo no gene *TNF-β* está associada a um risco relativo de 7,5 no desenvolvimento de leishmaniose mucocutânea, e um alelo no gene *TNF-α* tem associação com um risco relativo de 3,5 para desenvolver a mesma forma de doença (Cabrera *et al.*, 1995).

Os dados acima deixam claro o papel de alelos de genes relacionados à resposta imune com a susceptibilidade dessas pessoas em desenvolverem leishmaniose. Os indivíduos que desenvolvem a leishmaniose, no entanto, estão expostos a uma série de fatores ambientais e intrínsecos do parasita que podem, juntamente com sua carga genética, definir a progressão da doença. Na região de Corte de Pedra, que é uma área predominantemente rural localizada no sudeste da Bahia, os indivíduos que têm membros da família que já tiveram leishmaniose mucosa têm um risco aumentado de desenvolver leishmaniose mucosa ou cutânea, se comparados às pessoas que nunca tiveram parentes afetados por essa doença (Castellucci *et al.*, 2005). Os próprios autores desse trabalho, entretanto, deixam claro que essas pessoas compartilham não só os fatores genéticos, como ambientais e que ambos podem interferir no desfecho da doença.

Mesmo indivíduos geneticamente susceptíveis ao desenvolvimento de leishmaniose, os fatores ambientais, incluindo a presença de vetores e reservatórios apropriados para a disseminação da doença e a virulência de cepa infectante, pode determinar a evolução da doença. Em Corte de Pedra, há informações suficientes para uma boa compreensão da história natural da leishmaniose. Os estudos realizados em pacientes dessa região permitiram a percepção, por exemplo, da resposta imune do

hospedeiro durante a infecção por *L. braziliensis* (Bacellar *et al.*, 2002), da influência da cepa de *L. braziliensis* no desfecho da doença (Schriefer *et al.*, 2004), além dos fatores genéticos da população, mencionados anteriormente. Os aspectos imunopatológicos e genéticos da leishmaniose são extremamente importantes para o entendimento da doença, mas são os fatores ambientais que promovem os eventos que precedem a infecção e que vão, portanto, definir onde e quando a doença vai ocorrer.

1.2.3 – Os fatores ambientais que interferem na leishmaniose

Os aspectos ambientais que influenciam o curso da leishmaniose numa população são, em parte, determinados pelos componentes que participam do ciclo de vida da *Leishmania*. Este ciclo inclui as formas promastigotas metacíclicas infectantes que são inoculadas por flebotomíneos em reservatórios ou hospedeiros vertebrados susceptíveis e as formas amastigotas - capazes de proliferar dentro de células do hospedeiro. A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre quando o flebotomíneo ingere o sangue contendo células infectadas com formas amastigotas ao realizar o seu repasto sanguíneo em um indivíduo infectado ou animal reservatório. No aparelho digestivo do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, que se multiplicam intensamente, passam a colonizar o epitélio digestivo, sob a forma de promastigota procíclica, e a faringe sob a forma infectante metacíclica. Essas são extremamente móveis e se alojam, em parte, no aparelho bucal do inseto, a partir do qual serão inoculadas em animais vertebrados durante novos repastos sanguíneos (Awasthi *et al.*, 2004). Entre os aspectos ambientais mais importantes para a disseminação da leishmaniose, certamente, os vetores e os reservatórios são aqueles que merecem uma maior atenção.

1.2.3.1 – Os vetores

Os flebotomíneos (Classe Insecta; Ordem Diptera; Família Psychodidae; Subfamília Phlebotominae) são os insetos que transmitem ao homem os parasitas causadores das leishmanioses; dois gêneros têm importância médica e veterinária: *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África, e *Lutzomyia*, nas Américas.

Esses insetos apresentam ampla distribuição geográfica, sendo encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientais (silvestre, rurais e urbanos) (Barral e Costa, 2011). Os flebotomíneos estão adaptados a viverem em abrigos úmidos e escuros, em condições de temperaturas moderadas em geral. A maioria das espécies habita florestas de vários tipos ou vive em cavernas ou cavidades entre pedras, mas pode habitar domicílios e anexos, ou mesmo, invadi-los em busca da alimentação sanguínea. Os flebotomíneos possuem hábitos crepusculares e noturnos para realizarem a hematofagia, embora, no interior das matas, algumas espécies possuam, também, hábitos matutinos e vespertinos. A maioria dos flebotomíneos é silvestre e ataca o homem e os animais domésticos quando as habitações estão próximas à mata, pois possui um poder de voo limitado. Algumas espécies são consideradas ecléticas quanto ao local de abrigo e devido às modificações do habitat pelo homem, adaptam-se ao domicílio e ao peridomicílio (Barral e Costa, 2011).

Um dos maiores legados ao se entender os aspectos ambientais envolvidos na leishmaniose é que isso nos permite reconhecer os fatores que, provavelmente, estão promovendo a disseminação da doença numa área endêmica (Cupolillo *et al.*, 2003; Bhunia *et al.*, 2010; Shimabukuro *et al.*, 2010). A ocorrência de surtos de leishmaniose, em uma determinada área, pode ser justificada pela presença de condições favoráveis

à proliferação dos vetores (Bhunja *et al.*, 2010) e pela presença de reservatórios para que o ciclo de vida da *Leishmania* seja completado (Cupolillo *et al.*, 2003). Cepas de *Leishmania* molecularmente distintas podem estar associadas a diferentes formas de doença (Schriefer *et al.*, 2004) e também estar adaptadas a diferentes vetores (Cupolillo *et al.*, 2003). A distribuição de casos de leishmaniose, em uma área endêmica, é uma poderosa ferramenta para que medidas de controle possam ser focalizadas nas regiões mais afetadas pela doença (Schriefer *et al.*, 2009; Shimabukuro *et al.*, 2010). A compreensão dos fatores ambientais que justifiquem o aumento no número de casos numa determinada região, permitirá o estabelecimento das ações necessárias ao combate da infecção.

1.2.3.2 – Os reservatórios

O conceito básico ou preliminar de hospedeiro reservatório de uma doença transmissível consiste na espécie que representa uma fonte de infecção para determinado patógeno e que permite sua manutenção por um longo período, mas também a transmissão para outros hospedeiros, incluindo o homem, nos diferentes ciclos de transmissão envolvidos. De maneira geral, os hospedeiros reservatórios da *Leishmania* são mamíferos silvestres e sinantrópicos, embora alguns animais domésticos sejam suspeitos de atuarem como reservatórios secundários (Barral e Costa, 2011).

Em áreas endêmicas para a LTA nas Américas, dentre as dezenas de espécies de mamíferos silvestres encontradas naturalmente infectadas por alguma espécie de *Leishmania* predominam roedores, marsupiais, edentados, poucos primatas e carnívoros. Particularmente, para *L. braziliensis*, investiga-se a importância de animais

domésticos, especialmente cães e equinos, como potenciais fontes de infecção nas áreas endêmicas, quer pela frequência com que esses animais são encontrados infectados, quer pela proximidade do homem e, também, pela atratividade que exercem sobre os flebotomíneos (Barral e Costa, 2011). Embora, no Brasil, os cães sejam, tradicionalmente, associados à leishmaniose visceral, é cada vez mais frequente a associação desses animais como importantes reservatórios ou hospedeiros de espécies de *Leishmania*, incluindo a *L. braziliensis*, que estão relacionadas à leishmaniose tegumentar (Dantas-Torres, 2007; Velez *et al.*, 2012; Quaresma *et al.*, 2012; Cortes *et al.*, 2012; Tanczos *et al.*, 2012). Em Corte de Pedra, tem sido cada vez mais comum o relato de moradores quanto à ocorrência de cães apresentando feridas espalhadas pelo corpo. Essas informações ainda não foram documentadas em um estudo científico, mas, certamente, uma investigação sobre o papel dos cães e de outros animais peridomésticos, como importantes reservatórios para a LTA, precisa ser realizada.

1.2.3.3 – A leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra

Corte de Pedra é uma área rural do sudeste da Bahia, composta por 20 municípios que, no passado, já foi coberta pela Mata Atlântica. Os flebotomíneos *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmany* e *Lu.* (*Nyssomyia*) *intermedia* transmitem a *L. braziliensis* e são endêmicos na fauna local. Seres humanos residentes dessa área, trabalham, principalmente, na agricultura (Schriefer, 2009). No município de Tancredo Neves, está localizado o posto de saúde de Corte de Pedra que é um centro de referência para o atendimento de pessoas com leishmaniose e recebe cerca de 500 a 1.300 pacientes com essa doença anualmente (Jirmanus *et al.*, 2012).

Em Corte de Pedra, três formas distintas de LTA podem ser encontradas: as leishmanioses cutânea, mucosa e disseminada, todas causadas pela *L. braziliensis* (Schriefer *et al.*, 2004). Menos de 5% dos casos de LC desenvolvem a LM (Marsden, 1986). Contudo, essa cifra vem progressivamente diminuindo, segundo dados de Jirmanus *et al.*, (2012). A leishmaniose disseminada é a forma emergente na região; no início da década de 70, apenas 0,2% do total de pacientes com leishmaniose tinham essa forma de doença. Esse número aumentou para 1,9% na década de 90 (Turetz *et al.*, 2002) e, atualmente, 2,3% dos pacientes com leishmaniose, em Corte de Pedra, desenvolvem a forma disseminada da doença (Jirmanus *et al.*, 2012).

A leishmaniose tegumentar americana em Corte de Pedra tem se mostrado extremamente dinâmica, tendo ocorrido importantes mudanças nos últimos 20 anos. Enquanto que o número total de casos de leishmaniose dobrou, o número de casos da forma clínica mucosa diminuiu e da forma disseminada aumentou. O número de pessoas com lesões grandes diminuiu, enquanto que o número de pessoas com lesões menores aumentou. Os casos de leishmanioses mucosa e disseminada estão associados a pessoas do sexo masculino, mais velhas e, frequentemente, trabalhadores do campo. Já as lesões cutâneas têm sido encontradas, principalmente, nas pessoas mais jovens (Jirmanus *et al.*, 2012).

Um dos aspectos mais importantes da leishmaniose em Corte de Pedra, do ponto de vista de controle e prevenção, é saber como a doença se distribui no tempo e no espaço. Essas informações são cruciais para que as medidas de prevenção e controle sejam adotadas nas regiões mais afetadas e para a definição de fatores que favorecem a disseminação da leishmaniose na região.

Jirmanus *et al.*, (2012), mostraram que nos últimos 20 anos a LTA tem se deslocado da parte mais central de Corte de Pedra para a área mais costeira. Até 2003, os casos de LM eram mais concentrados na região central de Corte de Pedra, enquanto que os casos de LD eram bem distribuídos por toda a área endêmica (Schriefer *et al.*, 2009). Até 1996, os casos de LD também se concentravam na região central. Nos anos seguintes, houve uma expansão da forma LD para toda a região. Esses dados mostram que a distribuição dos casos de leishmaniose em Corte de Pedra tem mudado ao longo dos anos (Schriefer *et al.*, 2009).

A população da *L. braziliensis* em Corte de Pedra é complexa, sendo composta por cepas multiclonais e tem um papel importante no desfecho da doença (Schriefer *et al.*, 2004). Usando o método de tipagem baseado em análise de gel de eletroforese, DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), Schriefer *et al.*, (2004), construíram uma árvore fenética com 45 isolados de *L. braziliensis*, estratificados em cinco clados diferentes. Destes, os clados A e D eram, predominantemente, enriquecidos com cepas isoladas de pacientes com LD, e o clado C com cepas recuperadas de pacientes com LM. A distribuição dos casos de LD e LM era, respectivamente, equivalente à distribuição dos casos de onde foram recuperadas as cepas pertencentes aos clados A e D, e C. Esses resultados sugerem que a distribuição dos casos de LTA , em Corte de Pedra, reflete a distribuição das cepas na área endêmica (Schriefer *et al.*, 2009).

1.2.4 – O papel da cepa parasitária na LTA

As investigações epidemiológicas e de patogenicidade de microorganismos têm utilizado uma grande variedade de técnicas derivadas da imunologia, bioquímica e

genética; esses estudos têm sido amplamente referidos como epidemiologia molecular (Maslow *et al.*, 1993).

Uma premissa básica inerente ao sistema de tipagem é que isolados epidemiologicamente relacionados são derivados da expansão clonal de um único precursor e, conseqüentemente, compartilham características que diferem daqueles isolados epidemiologicamente não-relacionados. A utilidade de uma característica em particular para a tipagem está relacionada à sua estabilidade dentro da cepa e à sua diversidade dentro da espécie. A última reflete a divergência genética evolutiva derivada de mutações randômicas não letais que se acumularam ao longo do tempo. Com o desenvolvimento de ferramentas moleculares mais discriminatórias, tem aumentado, substancialmente, a habilidade em se reconhecer variações mais sutis (Maslow *et al.*, 1993).

Os sistemas de tipagem molecular podem ser aplicados no estudo de amostras com grande número de isolados e de várias origens, visando determinar a estrutura populacional e, a partir dessa informação, estabelecer hipóteses filogenéticas. Esse conhecimento básico pode ser útil em aplicações práticas, como a detecção de clones em investigação de surtos, e pode prover informações sobre a distribuição de microorganismos na população humana no tempo e espaço a nível local, regional, nacional e global e monitorar marcadores associados à patogenicidade, imunogenicidade ou resistência a drogas (Struelens, 1996).

Estudos têm demonstrado que a *Leishmania* é capaz de modular a resposta imune do homem a fim de garantir a sua permanência dentro das células envolvidas na

defesa do hospedeiro (Kaye e Scott 2011) e que macrófagos infectados *in vitro* por cepas de *L. braziliensis* isoladas de pacientes com LC, LM e LD, apresentam expressão gênica diferente (Sousa *et al.*, submetido para publicação), sugerindo que diferentes cepas são capazes de induzir uma expressão diferenciada dos genes nos macrófagos. Além disso, a diversidade genética dos patógenos permite a eles serem mais generalistas quanto à sua capacidade de infectar diferentes espécies de animais (Cupolillo *et al.*, 2003). Parece que a cepa parasitária exerce um papel central na dinâmica da leishmaniose, modulando a resposta do hospedeiro, adaptando-se a diferentes reservatórios (ou vetores) e, teoricamente, influenciando a distribuição dos casos de LTA. Avaliar complexidade da população de *L. braziliensis*, em Corte de Pedra, parece ser um passo importante no estudo da leishmaniose na região, e vai, indubitavelmente, dar uma importante contribuição para a compreensão dessa doença a nível mundial.

A variabilidade genética entre as diferentes espécies de *Leishmania* é amplamente reconhecida (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993) e a diversidade de formas clínicas que essas espécies causam no homem sugere um papel importante da composição genética do parasita no desfecho da doença. O método-padrão ouro para a caracterização de *Leishmania sp.* é o *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) ou, simplesmente, eletroforese de isoenzimas, em que o padrão de mobilidade de 15 loci enzimáticos em gel de agarose permite a identificação de uma série de zimodemos denominados de MON 1 até MON 274 (Rioux *et al.*, 1990). Esta técnica tem sido utilizada desde a sua introdução na década de 80 e foi aplicada, por exemplo, na caracterização intraespecífica da *L. braziliensis*. A partir do uso do MLEE foi detectada

uma importante associação do zimodemo 1.1 com a leishmaniose mucosa (Saravia *et al.*, 1998). O uso dessa ferramenta também revelou a existência de polimorfismos genéticos entre cepas de *L. braziliensis*, isoladas de diferentes hospedeiros e áreas geográficas no Brasil (Cupolillo *et al.*, 2003).

Embora a eletroforese de isoenzimas continue sendo amplamente utilizada na caracterização intraespecífica de *Leishmania*, o método é laborioso, requer a manutenção de um painel de isolados de referência para a sua execução e tem um poder discriminatório restrito, o que limita o seu uso (Kuhls *et al.*, 2007). Como consequência disso, tem sido observada a aplicação de outras ferramentas moleculares na subtipagem de espécies de *Leishmania*, como: *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), usada na identificação e caracterização de espécies de *Leishmania* do novo mundo (Rotureau *et al.*, 2006); análise de restrição de minicírculos de DNA do cinetoplasto usada no estudo da epidemiologia da *L. tropica* no Paquistão (Noyes *et al.*, 1998); PCR e sequenciamento de segmentos repetitivos de DNA de espécies de *Leishmania* do velho mundo (Gangneux *et al.*, 2003); e RAPD, usado na tipagem de *L. infantum* (Toledo *et al.*, 2002) e de *L. braziliensis* no novo mundo (Schriefer *et al.*, 2004).

Mais recentemente, tem sido observado o emprego de diversos métodos de tipagem, baseados em análise de sequências de nucleotídeos, na caracterização de espécies de *Leishmania*. Por exemplo, em alguns trabalhos foi realizado o sequenciamento de genes codificadores de cinco das enzimas originalmente estudadas no MLEE (Rioux *et al.*, 1990) com o propósito de explorar esses alvos no desenvolvimento de um método de tipagem baseado no sequenciamento de múltiplos

loci (*Multilocus sequence typing* - MLST) e aplicá-lo à subtipagem de *L. donovani*, *L. major*, *L. tropica* e *L. gerbilli* (Mauricio *et al.*, 2006; Zemanová *et al.*, 2007). Embora promissor, esse método só permite a distinção de cepas de regiões geográficas bem diferentes entre si.

Embora as ferramentas moleculares descritas acima sejam capazes de evidenciar diferenças genotípicas entre cepas de uma mesma espécie, nenhuma foi desenvolvida com o propósito de distinguir isolados derivados de um surto epidêmico daqueles que são endêmicos em uma determinada região, ou que tenham um poder discriminatório suficiente para diferenciar isolados recuperados de pacientes de uma mesma região, mas que apresentem formas clínicas ou resposta terapêutica diferente. Na verdade, o papel da cepa, do hospedeiro e do ambiente com relação às questões mencionadas acima ainda não foi esclarecido. O uso de ferramentas moleculares adequadas pode ser um passo importante para o entendimento da relação complexa entre o parasita, o hospedeiro e o ambiente.

A partir da década de 2000, o método de tipagem de múltiplos loci baseada em microsátélites (*Multilocus Microsatellite Typing* - MLMT) começou a ser usado como ferramenta de tipagem de diferentes espécies de *Leishmania*. Embora promissora quanto à sua capacidade de discriminar cepas de uma mesma espécie, essa ferramenta não foi capaz de distinguir isolados de *L. donovani* resistentes e susceptíveis ao antimônio no Nepal (Laurent *et al.*, 2007); e de *L. braziliensis* no Perú (Aduai *et al.*, 2011). Schwenkenbecher, 2006, investigou 27 isolados de *L. tropica* de casos de LC em 1995 em Sanliurfa, Turquia, durante um surto epidêmico, usando 21 marcadores polimórficos de microsátélites. Embora *L. tropica*, em geral, seja conhecida

por ser geneticamente heterogênea, o conjunto dos isolados do surto apresentou um único perfil de sequências de microsátélites, sugerindo que a emergência de uma nova cepa virulenta foi responsável pelo surto. Por outro lado, isolados de *L. donovani*, obtidos durante e depois de um surto epidêmico em Libo Kemkem, mostraram-se geneticamente diversos. Segundo os autores (Gelanew *et al.*, 2011), os resultados obtidos sugerem a introdução independente de várias cepas de *Leishmania* na região.

Assim, fica cada vez mais evidenciada a diversidade genética de cada espécie de *Leishmani*. Essa diversidade pode estar relacionada às formas de doença (Schriefer *et al.*, 2004), a respostas terapêuticas (Laurent *et al.*, 2007), a uma melhor adaptação aos vetores ou a um reservatório específico e a áreas geográficas específicas (Cupolillo *et al.*, 2003). As ferramentas moleculares mais sofisticadas, como MLEE, MLST e MMLT são baseadas na avaliação de 5 a 15 loci diferentes, podem, ou não, revelar a individualidade de uma cepa. Por outro lado, a simples comparação entre sequências de um ou dois alvos mais polimórficos, encontrados nos genes que codificam as proteínas de superfície ou nas regiões intergênicas, pode mostrar mutações de ponto como *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) e INDELS que sejam marcadoras de um fenótipo específico.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses correspondem a um espectro de doenças, que ocorrem nas faixas tropicais e subtropicais do globo, com prevalência anual de 12 milhões de casos, e uma população sob risco de 400 milhões, distribuídos em 88 países (Desjeux, 1992). Infecções produtivas resultam em desordens viscerais ou tegumentares com desfechos potencialmente desfigurantes ou fatais (Marsden, 1985; Azulay, 1995).

O espectro de apresentações clínicas nos humanos incluem: leishmaniose visceral, que é causada por espécies do complexo *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*); e leishmaniose tegumentar, normalmente causada por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*; espécies do complexo *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. venezuelensis*) e espécies do sub-gênero *Viannia* (*L. [V] panamensis*, *L. [V] guyanensis*, *L. [V] peruviana* e *L. [V] braziliensis*). A LTA é causada pelos parasitas do complexo *L. mexicana* e *L. braziliensis*. As três formas de doença associadas à *L. braziliensis* são: as leishmanioses cutânea, mucosa e disseminada. A forte associação entre *Leishmania* sp. e forma de doença sugere um papel proeminente do conteúdo genético do microorganismo sobre as manifestações clínicas e possivelmente prognósticos das infecções.

A despeito de haverem inúmeros trabalhos descrevendo a variabilidade genética intra-específica, apenas um grupo limitado conseguiu demonstrar a relação entre diferentes cepas de leishmania e as formas de doença (Reiner *et al.*, 1989; Saravia *et al.*, 1998; Schonian *et al.*, 2001). Em Corte de Pedra, uma área endêmica para a leishmaniose, diferentes cepas de *L. braziliensis* mostraram-se complexas e estatisticamente associadas à LC, LM e LD (Schriefer *et al.*, 2001). Embora os dados desse trabalho tenham se mostrado reveladores, a técnica de RAPD, utilizada na tipagem dessas cepas, apresenta baixa reprodutibilidade, tem poder discriminatório reduzido e não permite uma caracterização genotípica mais refinada do parasita. O método de tipagem baseado em análise de sequências de DNA, pode superar essas limitações, além de prover uma ferramenta prognóstica, que seja capaz de identificar

os pacientes cujo parasita infectante esteja associado a um risco elevado de indução das formas mais graves da doença, como a LM e a LD.

Estudos prévios realizados em Corte de Pedra, mostraram que os casos de leishmaniose mucosa e disseminada apresentavam distribuições distintas na região. Enquanto que os casos de LD ocupavam praticamente toda a área endêmica, os casos de LM se distribuíam mais a oeste da região. A avaliação da distribuição dos casos de LD em períodos distintos mostrou que os casos de LD eram originalmente concentrados mais a oeste da área endêmica e que, só entre 1993 e 2002, é que esses casos passaram a ocupar toda a região (Schriefer *et al.*, 2009). Os dados acima sugerem que a leishmaniose em Corte de Pedra é dinâmica e que os casos das diferentes formas de doença estão se movimentando de forma distinta. Esses resultados reforçam a necessidade de que a avaliação da distribuição dos casos de leishmaniose na região seja avaliada novamente e, com isso, poderemos acompanhar o movimento da doença na região. Essas informações provêm um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na migração/distribuição dos casos de leishmaniose numa área de alta endemicidade, além de possibilitar a identificação das áreas onde estão concentradas as formas mais graves da doença. Esse conhecimento viabilizarão um acompanhamento mais cuidadoso dos pacientes que adquirirem a doença nessas localidades.

3. OBJETIVOS

1. Identificar e caracterizar loci polimórficos entre as cepas de *L. braziliensis* da região que compreende a área endêmica de Corte de Pedra;
2. Desenvolver um método de tipagem baseado na análise da sequência de DNA que seja capaz de distinguir sub-populações *L. braziliensis* isoladas de moradores da área de Corte de Pedra e com LC, LM ou LD;
3. Avaliar a associação entre os genótipos de *L. braziliensis* e as formas de LTA usando as ferramentas desenvolvidas;
4. Avaliar as distribuições temporais e espaciais da LC, LM e LD na área endêmica de Corte de Pedra.

4. MANUSCRITO 1

TITLE: Association Between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* Strain Polymorphisms.

AUTHORS: Adriano Queiroz¹, Rosana Sousa¹, Claudia Heine¹, Manuela Cardoso¹, Luiz Henrique Guimarães^{1,2}, Paulo Roberto Lima Machado^{1,2}, Edgar M. Carvalho^{1,2}, Lee W. Riley³, Mary E. Wilson⁴, Albert Schriefer^{1,2,5#}

AUTHOR AFFILIATIONS: ¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil; ³Division of Infectious Diseases, School of Public Health, UC-Berkeley, Berkeley, CA, USA; ⁴ Departments of Internal Medicine and Microbiology, University of Iowa and the VA Medical Center, Iowa City, IA, USA; ⁵Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

#Corresponding Author. Mailing address: Albert Schriefer, M.D., Ph.D., Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas, s/n, Hosp. Univ. Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, Salvador, Bahia, Brazil, 40.110-160; Phone 55-71-3237-7353; Fax 55-71-3245-7110; aschriefer@globo.com.

Running title: Parasite strain role in leishmaniasis.

Wordcounts: Abstract=148, Text=3,341.

Type of article: Full-Length Paper

Key Words: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, leishmaniasis, genotype, single nucleotide polymorphism, indel, mucocutaneous leishmaniasis, disseminated leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis.

ABSTRACT: *Leishmania (Viannia) braziliensis* causes three main types of American tegumentary leishmaniasis (ATL): localized cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated leishmaniasis (DL). All forms are observed amongst individuals of Corte de Pedra, Brazil. We previously used random amplified markers to identify a multiclonal population among *L. (V.) braziliensis* from ATL patients, defining parasite clades associated with different clinical syndromes. Herein we compared sequences of random amplified markers to identify genotypes of *L. (V.) braziliensis* recovered from lesions of CL, ML and DL patients. Six polymorphic genomic loci were sequenced from thirty five parasite isolates. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) and insertions-deletions (indels) at each locus allowed us to segregate the *L. (V.) braziliensis* population according to haplotypes. Several SNPs, indels and haplotypes were significantly associated with increased risk for DL. Molecular genotyping may provide markers to identify *L. (V.) braziliensis* strains likely to cause this emerging, hard-to-treat form of ATL.

INTRODUCTION

Leishmaniasis constitutes a spectrum of human diseases caused by protozoa belonging to the genus *Leishmania*, divided into two subgenera: *Leishmania*, present in both the Old and the New Worlds, and *Viannia*, restricted to the New World. Productive infections may be either asymptomatic or lead to different clinical syndromes involving internal organs, skin and/or mucosal surfaces (3). *Leishmania (Viannia) braziliensis* is endemic in Latin America and causes at least three distinct clinical types of American tegumentary leishmaniasis (ATL): localized cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated leishmaniasis (DL) (3, 4, 6, 9, 29). The most striking feature differentiating CL from either ML or DL is the degree of metastasis of lesions from the original inoculation site. CL lesions are restricted to the entry site of the parasites, whereas ML is defined by spread to mucosal surfaces of upper digestive and airways tracts. DL is characterized by wide dissemination to distant cutaneous sites. Some individuals with DL develop hundreds of lesions throughout their body surfaces.

Many reports cite ML as the most common metastatic form of disease caused by *L. (V.) braziliensis*. It was previously more common, but currently ML develops in 4-5% of individuals with CL (2, 7, 18). Recently in our study area, DL has emerged as the most prevalent metastatic form of *L. (V.) braziliensis* infection (26). The current study is based on the hypotheses that different strains of *L. (V.) braziliensis* are prone to cause the different forms of ATL, and it is the spread of a DL-predisposing strain that is responsible for the increasing incidence of this new cutaneous syndrome.

Individuals living in the region of Corte de Pedra in the state of Bahia, Northeast Brazil, can be afflicted by any of the three forms of ATL due to *L. (V.) braziliensis*. However, DL has only recently been recognized in Corte de Pedra (6, 9). Careful longitudinal study of this form of

leishmaniasis has revealed a recent increase in the absolute numbers of DL cases, an increase in the relative proportion of DL compared to total ATL, and a pattern of geographic spread of the disease across a wider region of Corte de Pedra over the past two decades (17, 26, 29). Indeed, the geographic distribution of DL cases differs from that of ML in Corte de Pedra, leading us to investigate the regional risks for these two forms of *L. (V.) braziliensis* disease (26).

One of the first clues that parasite strain may contribute to the different ATL forms was in vitro evidence showing that total antigen from *L. (V.) braziliensis* isolated from a DL patient caused PBMCs to release higher amounts of the pro-inflammatory cytokines IFN- γ and TNF- α than total antigen of a parasite from a subject with CL (15). Parallel investigations revealed that parasites isolated from ATL patients could be distinguished according to randomly amplified polymorphic genetic markers. These markers were used to define separate subpopulations or clades of *L. (V.) braziliensis* from Corte de Pedra. Of the five subpopulations described, parasites from individuals with DL were significantly enriched in clades A and D, while clade B contained mostly isolates from CL subjects, and isolates from subjects with ML were significantly more frequently associated with clade C (27). These observations led to our hypothesis that genetically distinct strains of *L. (V.) braziliensis* may determine clinical outcomes of *L. (V.) braziliensis* infection.

Here, to strengthen the molecular evidence for the above hypothesis, we compared the sequences of several markers distinguishing clades in our prior study. PCR amplicons generated by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) from genomic DNA of thirty five *L. (V.) braziliensis* isolates from ATL patients of Corte de Pedra were cloned, sequenced and compared. Using this strategy we identified six polymorphic loci among parasite strains. Tests for association of single nucleotide polymorphisms (SNPs), insertion-deletions (indels) and SNP

/indel - based haplotypes in those loci with each ATL form were performed. The findings indicated a strong association between DL and particular strains of *L. (V.) braziliensis*. These data suggest not only that genetically distinct parasite strains are partly responsible for the emerging spread of DL, but that the progression of these strains through the region can be tracked using molecular markers.

METHODS

Study area. Corte de Pedra is composed of 20 municipalities in a rural area located in the South east region of the state of Bahia, in the Northeast of Brazil. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmany* and *Lu. (Nyssomyia) intermedia* sandflies that transmit *L. (V.) braziliensis* are endemic in Corte de Pedra. Residents in this area work mostly in agriculture, often carried out in primary or secondary forests. There is little population migration in or out of this region. Study participants' mean time of residence at their addresses at the time of diagnosis and parasite sampling was 17 years; 90% of the study participants lived on farms.

Parasites. Thirty five *L. (V.) braziliensis* isolates were derived from 17 individuals with CL, 9 with ML or 9 with DL diagnosed in the medical clinic in Corte de Pedra, Bahia, Brazil. The three types of leishmaniasis were defined as follows. CL consisted of an ulcerated skin lesion at a single body site with no more than two secondary or satellite lesions, without clinical evidence of mucosal involvement. ML was defined as the presence of an inflamed or ulcerated mucosal lesion at a site that was non-contiguous with any cutaneous lesion. DL was defined as ten or more skin lesions of mixed types (acneiform, papular, nodular, and/or ulcerated) located in two or more body parts (head, trunk, arms and legs). In addition to these clinical criteria, cases had 2-3 of the following: positive delayed type hypersensitivity skin response to leishmania antigen

(Montenegro test), positive serology, and/or parasites identified in tissue biopsies by histopathology.

L. (V.) braziliensis isolates used in the present study were cultured from aspirates of the borders of skin or mucosal lesions. Aspirate material was immediately suspended in biphasic LIT/NNN medium and incubated at 26°C for one to two weeks. Then the suspension was transferred to Schneider's medium complemented with 10% heat inactivated fetal calf serum and 2 mM L-glutamine, and incubated at 26°C for up to two weeks. Species determination was based upon HSP70 PCR-RFLP (11, 19) and later confirmed by a serial real time qPCR assay system (31). Parasites were frozen without further subculture in 10% DMSO, 90% growth medium in liquid nitrogen, and thawed prior to testing for genotypes.

Selection of genomic *L. (V.) braziliensis* targets. For sequence-based typing method development, several RAPD-generated bands that had been useful for subtyping *L. (V.) braziliensis* isolates from Corte de Pedra were chosen to be analyzed further (Fig.1). These loci were re-amplified by RAPD from each of nine isolates of *L. (V.) braziliensis*, using the previously described primers and protocols (27). The resulting DNA bands were cloned into the pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen Inc.) according to manufacturer's instructions. Plasmids were prepared from five representative bacterial clones from each transformation reaction, then their inserts were sequenced. After alignment of homologous sequences, six polymorphic loci were identified, which were used in the remainder of the study.

PCR amplification of selected targets and cloning. Based on the sequences generated with the above preliminary assays, six primer pairs were newly designed (table 1) and were used to amplify the selected loci from thirty five *L. (V.) braziliensis* isolates. In these reactions, 3 ng template genomic DNA were incubated with 1 pMol of each reverse and forward primers. MgCl₂

concentration and annealing temperatures are listed in table 1. Amplification conditions were 5 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 1 min at the annealing temperature listed in table 1 (55-58°C), and 2 min at 72°C, then followed by a final extension at 72°C for 10 min. Amplicons were electrophoresed and then their corresponding bands were extracted from agarose gels and cloned into pCR 2.1-TOPO. Plasmids containing each of the six amplicons from each of the thirty five isolates of *L. (V.) braziliensis* were transformed into competent DH5α *Escherichia coli*. Plasmid mini-preps were generated from six representative bacterial clones per locus (12).

Sequence analysis. Plasmid inserts were sequenced with a primer complementary to the M13 vector sequence, followed by custom designed primers, which were necessary due to large sizes of some original amplicons. Sequencing was performed at Macrogen Inc. (Seoul, S. Korea). The data were analyzed by Mega 4.0 software package (28) to determine the consensus sequence at each locus and to compare alleles at homologous loci from different *L. (V.) braziliensis* isolates. Sequences from each of the six loci were analyzed for the occurrence of SNPs and/or indels uniquely present in isolates from either the CL, ML or DL phenotypes.

Location of polymorphic loci within *L. (V.) braziliensis* chromosomes. In order to locate the detected polymorphic loci within the parasite's genome, the consensus sequence of each locus, obtained as outlined above, was blasted to the sequences of each of the chromosomes listed in the *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 complete genome, accessed on the web site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. This allowed, first, the identification of the chromosome(s) containing the loci, then the determination of the starting point for each locus within these chromosomes.

Human subjects approvals. Studies were approved by Institutional Review Boards of the Federal University of Bahia and the University of Iowa. Protocols were approved by the NIH in the USA, and by CONEP in Brazil. The Brazilian IRB is registered with the US NIH. Written consent was obtained from all subjects that participated in the study.

Statistical analyses. Differences in the distribution frequencies of each polymorphism among CL, ML and DL cases were analyzed by Fisher`s exact test, and the relative risk was calculated with confidence level of 95%. All comparisons were considered significant at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed with STATA 10.0 software package (Statacorp LD, USA).

RESULTS

Identification of polymorphism among randomly selected loci of *L. (V.) braziliensis* from Corte de Pedra.

We previously described the complex population structure of *L. (V.) braziliensis* obtained from individuals living in Corte de Pedra. Different subpopulations or clades of parasites were identified based on genotypes defined by RAPD data (27). In order to determine specific molecular sequences that would refine our ability to detect different strains among parasites isolated from ATL patients in that region, bands from the RAPD electrophoretic profiles of nine isolates were cloned and sequenced. Polymorphisms were found in six genomic sequences amplified by three RAPD protocols from the *L. (V.) braziliensis* isolates. The electrophoretic patterns of the sequences amplified with these three protocols are shown in figure 1 panels A, B and C. The loci generating the six polymorphic amplicons fell into distinct chromosomes at diverse locations within these chromosomes. Their distributions and genes contained within or overlapping with amplicons are shown in table 1.

In order to more specifically amplify the targeted loci than using the RAPD strategy, new PCR primer sets were designed, which were complementary to sequences flanking the polymorphic stretches found at each locus (table 1). Using these primer pairs each locus was re-amplified from genomic DNA of *L. (V.) braziliensis* isolates, yielding amplicons that ranged from 400 to 800 base pairs in length. These amplicons were cloned into pCR2.1-TOPO and the sequences of six clones representing each amplicon (i.e. locus) from each *Leishmania* isolate were determined.

The analysis of the thirty five *L. (V.) braziliensis* isolates from different forms of ATL revealed a total of twenty seven SNPs and indels within the six polymorphic loci. Because some lesions may have harbored two or more parasite strains, we could not formally determine the allele frequencies. However based upon the number of samples from which alleles were identified, we were able to determine major and minor alleles for each polymorphic chromosomal position (table 2). Usually a predominant nucleotide could be found in the sample with substitutions or insertions-deletions occurring in a smaller subset of the isolates. The strategy of sequencing cloned amplicons allowed us to identify haplotypes containing SNPs and indels at each locus. The frequencies of the most common haplotypes found are indicated in table 3. We identified seventeen different haplotypes distributed in the six loci, which could be detected in at least 10% of the *L. (V.) braziliensis* isolates.

Association of SNPs, indels and haplotypes with form of ATL.

The sequence differences identified in those loci enabled us to more precisely define parasite strains, and re-examine our hypothesis that genetically distinct *L. (V.) braziliensis* strains are significantly associated with different disease syndromes. The frequencies of CL, ML and the rapidly emerging DL were determined among individuals infected with parasites containing each

of the single nucleotide polymorphisms, deletions or haplotypes. The risk of having a particular clinical disease type given a particular genotype of the parasite (expressed as risk ratios) was evaluated (tables 4-6).

Several SNPs, indels and haplotypes were significantly associated with DL. Seven of the seventeen haplotypes that were present in at least ten percent of the *L. (V.) braziliensis* isolates in the sample associated with DL (table 4). The locus most often associated with DL was CHR28/425451. Isolates with haplotypes cc-, cct and tt- at that locus were associated with risk ratios between 1.6 and 7.5 for DL. Isolates containing CHR28/425451 cct combined with CHR28/195696 cga, but lacking CHR24/3074 agtaact comprised 100% of the DL cases and had a risk ratio of 9.5 for this form of ATL. Further strengthening the link between parasite genetic background and form of disease, the estimated fraction of the ATL patients who developed DL associated with these haplotypes was above 80%. Interestingly, some of the haplotype combinations that showed significantly increased risk for DL (table 4) conversely displayed significantly decreased risks (i.e. $RR < 1.0$) for ML and CL outcomes (table 5). This suggests a high specificity of these molecular markers for disseminated leishmaniasis.

Associations between parasite genotypes and increased risk for ML and CL did not reach significance in the study sample. The associations that were closest to significance are displayed in table 6. The SNP that approached significance with the highest risk ratio for ML was SNP32/1356500c, in isolates where no other allele could be found for that position (i.e. c only isolates). This SNP revealed a risk ratio of 3.1 (CI 0.9 – 10.2; $p = 0.06$) to this form of ATL (table 6). The only haplotype that approached significant risk for ML was CHR 24/3074 agtaact (RR of 2.7; CI 0.9 – 7.7; $p = 0.09$).

Given the emerging nature of DL and the fact that it is more refractory to treatment than other forms of tegumentary leishmaniasis in the study area, combinations of SNPs from different loci were tested for increased association with disseminated leishmaniasis. Only combinations of SNPs / indels that approached significant ($p < 0.1$) risk ratios of greater than two when tested individually were used in this analysis. Eight combinations of polymorphisms that were significantly ($0.03 > p > 0.0008$) associated with DL were detected. These were associated with risk ratios between 4.4 and 10.7 (table 7). These associations of SNPs may be candidates to be explored in diagnostic tools for identifying patients with increased risk of developing this severe and difficult to treat form of leishmaniasis.

DISCUSSION

Previous studies have directly or indirectly underscored the influences of both parasite and host in the clinical manifestations of disease caused by *L. (V.) braziliensis* (5, 7, 8, 13, 23-27). In the present report, we tested whether genotypes of *L. (V.) braziliensis* isolated from ATL patients would associate with a form of disease, indicating a cause-effect relationship between strain of the infecting parasite and outcome of the infection. Polymorphic loci discovered using RAPD in our previous study (27) were analyzed for their nucleotide sequences. We compared these sequences between isolates that were derived from individuals from Corte de Pedra, Brazil with the three common forms of disease caused by *L. (V.) braziliensis*. Our study revealed single nucleotide polymorphisms and insertions-deletions within six polymorphic loci in the parasite's genome, which associated with disseminated leishmaniasis. Strong associations indicating increased risks towards localized cutaneous and mucosal leishmaniasis were not detected.

DL has been rapidly emerging with increasing spread and incidence in the vicinity of Corte de Pedra over the past two decades (6, 9, 17, 26, 29). We previously noted differences

between the geographic distributions of DL versus that of ML, the other disseminated form of ATL due to *L. (V.) braziliensis* (26). We also reported that new DL cases tend to occur in clusters with recent cases of the disease (26). These observations suggest that DL may result predominantly from infection with a particular strain or group of related strains of the parasite. The large number of SNPs, indels and haplotypes found associated with DL in the current study reinforces this hypothesis and suggests that this parasite subpopulation may have recently emerged in the Corte de Pedra region.

ML has long been described as a disease determined by several factors, amongst which are length of cutaneous disease (16), nutritional status (16) and genetic background of the human host (8, 21). The detection of few near-significant associations between *L. (V.) braziliensis* genotypes and ML likely reflects its multi-factorial nature as well as the small sample size, which decreased the power of the current study to detect such associations. ML has been diagnosed in Corte de Pedra for many decades, and it is plausible that the population of strains predisposing to this form of disseminated disease is more diverse than that for the recently emerged DL. Thus, a greater number of ML derived parasite isolates may be needed to detect strains of parasites causing increased risk of this disease.

Localized skin ulcers constitute the most common presentation of ATL caused by any strain of *L. (V.) braziliensis*. Their long-standing presence in the region may reflect a diverse group of parasites causing CL. Furthermore, given that a single or a few skin ulcers usually precede the more severe metastatic ATL outcomes, early diagnosis of infection may cause some patients infected with strains associated with either DL or ML to be treated before dissemination occurred. Thus, parasite isolates and strains from the subgroup of patients classified as CL are

expected to be more heterogeneous than those labeled as ML and DL. As discussed above for ML, a greater number of CL derived parasite isolates may be needed to detect associations.

It should be noted that each *L. (V.) braziliensis* isolate used in this study consisted of a first-pass culture of promastigotes isolated from patients' specimens. The *Leishmania* spp., and particularly the visceralizing species, notoriously lose virulence characteristics rapidly in culture (14, 22). In order to preserve parasites as close as possible to the true infection-induced parasites, there was no attempt to clone the isolates. Because some lesions may have harbored two or more parasite strains, this strategy would minimize difficulties due to differential growth of one isolate over others, and minimize the chromosomal rearrangements that can occur during *Leishmania* culture (10). Recent experimental and natural evidence has shown that there is genetic exchange in the *Leishmania* species, and this most likely occurs within the sand fly vector (1, 20).

Although advisable to minimize artifacts, the characterization of whole isolates rather than clones complicates the interpretation of the number of alleles identified in each parasite. Many isolates presented with two alleles at single loci. This could indicate heterozygosity of a single strain, or the presence of two or more homozygous or heterozygous strains within the isolates. There were only seven instances in which more than two alleles could be detected. This affected seven different isolates (i.e. 20%) in the study sample. In six of the isolates there were three different haplotypes either in locus CHR 28/425451 or in locus CHR 32/1356278. In only one isolate four haplotypes could be found in locus CHR 32/1356278. Such findings indicate either co-infections with multiple strains, or the presence of a single strain that was aneuploid within these isolates, or both (30). Hence the data in table 2 are presented as the frequency of alleles in cultured isolates, and cannot imply the true allele frequencies in the total population.

Nonetheless, it is noteworthy that in the vast majority of the isolates tested, only one or two haplotypes could be found at each locus. We speculate that this may indicate that either most human infections are caused by single strains of *L. (V.) braziliensis*, or by combinations of the parasite within which there may be dominant strains.

Although several significant associations between genotypes of *L. (V.) braziliensis* and form of DL could be detected, no single SNP displayed significant risk ratio for any form of ATL. This probably reflects the small sample employed in the study, which lacked power to discriminate the nucleotides that would be more common at single polymorphic sites among different clinical phenotypes. Nevertheless, the significantly increased risks that several haplotypes presented for DL helps shed light into the still elusive role of the parasite strains in determining the outcome of ATL, while the detected associations between combinations of as few as two SNPs at different loci and DL offer targets that may be tested in simple PCR based tools, which may prove useful in the diagnostic management of ATL.

Our previous studies of tegumentary leishmaniasis in the Corte de Pedra region revealed that: (1) different subpopulations or clades of *L. (V.) braziliensis* determined by RAPD were associated with distinct clinical outcomes (27); (2) whole antigen of *L. (V.) braziliensis* isolated from distinct ATL forms, namely CL and DL, caused distinct in vitro reactivity from peripheral blood mononuclear cells of ATL patients (15); and (3) different forms of severe ATL (i.e. ML and DL) displayed distinct geographic distribution (26). The current findings reflect these previous studies and suggest that certain strains in that complex *L. (V.) braziliensis* population may constitute major risks for DL.

Future studies will focus on the stability of the detected SNPs / indels, haplotypes, and association with outcome of ATL in a replication sample of *L. (V.) braziliensis* from Corte de

Pedra. Genotypes that show consistent and stable association with the more severe forms of disease may be good candidates to be explored in the development of tools for the improved diagnosis and management of human leishmaniasis cases.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to deeply thank all personnel in the health post of Corte de Pedra, Bahia / Brazil, for their careful help with patient management, and Ms. Kátia Salgado for laboratory support with parasite isolation and management.

This work was supported by the Brazilian Council for Scientific and Technological Development (CNPq), through the action plan Brazil-Switzerland, process number 590016/2010-5; by the National Institutes of Health (NIH), USA, through grants NIH P50-AI30639-16 and NIH R03 A167663-01; and by the Fogarty International Clinical Research Scholars and Fellows (FICRS-F) Program, through National Institute of Health/Fogarty International Center grant R24 TW007988. AQ was the recipient of a CAPES PhD scholarship.

Conflict of interest. The authors of the manuscript do not present any conflict of interests, commercial or otherwise, that might interfere with the study, its results and analyses.

REFERENCES

1. **Akopyants, N. S., N. Kimblin, N. Secundino, R. Patrick, N. Peters, P. Lawyer, D. E. Dobson, S. M. Beverley, and D. L. Sacks.** 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* **324**:265-268.
2. **Amato, V. S., F. F. Tuon, H. A. Bacha, V. A. Neto, and A. C. Nicodemo.** 2008. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop* **105**:1-9.
3. **Azulay, R. D., and D. R. Azulay Junior.** 1995. Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol* **34**:303-307.
4. **Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, A. Ribeiro de Jesus, W. O. Dutra, K. J. Gollob, and E. M. Carvalho.** 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* **70**:6734-6740.
5. **Cabrera, M., M. A. Shaw, C. Sharples, H. Williams, M. Castes, J. Convit, and J. M. Blackwell.** 1995. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* **182**:1259-1264.
6. **Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden.** 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* **56**:315-325.
7. **Castellucci, L., L. H. Cheng, C. Araujo, L. H. Guimaraes, H. Lessa, P. Machado, M. F. Almeida, A. Oliveira, A. Ko, W. D. Johnson, M. E. Wilson, E. M. Carvalho, and D. E. J. AR.** 2005. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **73**:69-73.

8. **Castellucci, L., E. Menezes, J. Oliveira, A. Magalhaes, L. H. Guimaraes, M. Lessa, S. Ribeiro, J. Reale, E. F. Noronha, M. E. Wilson, P. Duggal, T. H. Beaty, S. Jeronimo, S. E. Jamieson, A. Bales, J. M. Blackwell, A. R. de Jesus, and E. M. Carvalho.** 2006. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis* **194**:519-527.
9. **Costa, J. M., P. D. Marsden, E. A. Llanos-Cuentas, E. M. Netto, E. M. Carvalho, A. Barral, A. C. Rosa, C. C. Cuba, A. V. Magalhaes, and A. C. Barreto.** 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* **89**:319-323.
10. **Cruz, A. K., R. Titus, and S. M. Beverley.** 1993. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in *Leishmania* by targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:1599-1603.
11. **Garcia, L., A. Kindt, H. Bermudez, A. Llanos-Cuentas, S. De Doncker, J. Arevalo, K. Wilber Quispe Tintaya, and J. C. Dujardin.** 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol* **42**:2294-2297.
12. **J. Sambrook, E. F. F., T. Maniatis (ed.).** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
13. **Kahl, L. P., J. E. Byram, J. R. David, S. A. Comerford, and F. Von Lichtenberg.** 1991. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* **44**:218-232.

14. **Katakura, K., and A. Kobayashi.** 1985. Enhancement of infectivity of *Leishmania donovani* promastigotes by serial mouse passages. *J Parasitol* **71**:393-394.
15. **Leopoldo, P. T., P. R. Machado, R. P. Almeida, A. Schriefer, A. Giudice, A. R. de Jesus, J. L. Ho, L. H. Guimaraes, O. Bacellar, and E. M. Carvalho.** 2006. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis* **6**:75.
16. **Machado-Coelho, G. L., W. T. Caiaffa, O. Genaro, P. A. Magalhaes, and W. Mayrink.** 2005. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **99**:55-61.
17. **Machado, P. R., M. E. Rosa, D. Costa, M. Mignac, J. S. Silva, A. Schriefer, M. M. Teixeira, O. Bacellar, and E. M. Carvalho.** 2011. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **105**:438-444.
18. **Marsden, P. D.** 1994. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* L(V)b in Tres Bracos, Bahia-Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* **27**:93-101.
19. **Montalvo, A. M., J. Fraga, L. Monzote, I. Montano, S. De Doncker, J. C. Dujardin, and G. Van der Auwera.** 2010. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology* **137**:1159-1168.
20. **Nolder, D., N. Roncal, C. R. Davies, A. Llanos-Cuentas, and M. A. Miles.** 2007. Multiple hybrid genotypes of *Leishmania (viannia)* in a focus of mucocutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **76**:573-578.

21. **Ramasawmy, R., E. Menezes, A. Magalhaes, J. Oliveira, L. Castellucci, R. Almeida, M. E. Rosa, L. H. Guimaraes, M. Lessa, E. Noronha, M. E. Wilson, S. E. Jamieson, J. Kalil, J. M. Blackwell, E. M. Carvalho, and A. R. de Jesus.** 2010. The -2518bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Infect Genet Evol* **10**:607-613.
22. **Roberts, S. C., M. E. Wilson, and J. E. Donelson.** 1995. Developmentally regulated expression of a novel 59-kDa product of the major surface protease (Msp or gp63) gene family of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* **270**:8884-8892.
23. **Salhi, A., V. Rodrigues, Jr., F. Santoro, H. Dessein, A. Romano, L. R. Castellano, M. Sertorio, S. Rafati, C. Chevillard, A. Prata, A. Alcais, L. Argiro, and A. Dessein.** 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* **180**:6139-6148.
24. **Saravia, N. G., I. Segura, A. F. Holguin, C. Santrich, L. Valderrama, and C. Ocampo.** 1998. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania* (*Viannia*) in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* **59**:86-94.
25. **Saravia, N. G., K. Weigle, C. Navas, I. Segura, L. Valderrama, A. Z. Valencia, B. Escorcía, and D. McMahon-Pratt.** 2002. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* **66**:738-744.
26. **Schriefer, A., L. H. Guimaraes, P. R. Machado, M. Lessa, H. A. Lessa, E. Lago, G. Ritt, A. Goes-Neto, A. L. Schriefer, L. W. Riley, and E. M. Carvalho.** 2009.

- Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* **15**:871-876.
27. **Schriefer, A., A. L. Schriefer, A. Goes-Neto, L. H. Guimaraes, L. P. Carvalho, R. P. Almeida, P. R. Machado, H. A. Lessa, A. R. de Jesus, L. W. Riley, and E. M. Carvalho.** 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun* **72**:508-514.
 28. **Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar.** 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**:1596-1599.
 29. **Turetz, M. L., P. R. Machado, A. I. Ko, F. Alves, A. Bittencourt, R. P. Almeida, N. Mobashery, W. D. Johnson, Jr., and E. M. Carvalho.** 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis* **186**:1829-1834.
 30. **Ubeda, J. M., D. Legare, F. Raymond, A. A. Ouameur, S. Boisvert, P. Rigault, J. Corbeil, M. J. Tremblay, M. Olivier, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2008. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* **9**:R115.
 31. **Weirather, J. L., S. M. Jeronimo, S. Gautam, S. Sundar, M. Kang, M. A. Kurtz, R. Haque, A. Schriefer, S. Talhari, E. M. Carvalho, J. E. Donelson, and M. E. Wilson.** 2011. Serial quantitative PCR assay for detection, species-discrimination and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol*.

Table 1. Chromosomal position of the six polymorphic loci identified in *Leishmania (Viannia) braziliensis* of Corte de Pedra. The *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 complete genome, accessed on the web site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, was used.

Locus (band)*	Primers for locus amplification by PCR	Chromosome	Location in chromosome	Melting (annealing) temperature	[MgCl ₂] (mM)	Amplicon size	Genes overlapped
CHR 24/3074 (B1)	5':GGACTGGAGTGATCGAA 5':TGGCTCAAGTGTCGCA	24	3074 - 3848	55°C	1.0	779	Pyruvate dehydrogenase kinase
CHR 26/765** (B2)	5':GAAATAAGAGACGAAAAGGC 5':TGACGTAGGGGTAGAGAAAC	26	765 - 1425	58°C	1.0	660	
CHR 28/195696 (B3)	5':GGACTGGAGTCTGCTTTATTTG 5':ACCAGGGTCGTGAACATGCT	28	195696 - 196300	55°C	1.5	618	Nucleobase/ nucleoside transporter
CHR	5':TAAGGTGAACAAGAAGAATC	28	425451 -	48°C	1.0	622	Long-chain-fatty-acid-

28/425451	5':CTGCTCGCTTGCTTTC		426067				CoA ligase protein
(B4)							
CHR	5':GTACGCACATGAGCCCGGAT	32	1356278 -	55 ⁰ C	2.5	498	
32/1356278	5':GCGGCGTATCACGCACTTTT		1356777				
(B5)							
CHR	5':TTATAGACGTGACACAGCG	35	335652 -	56 ⁰ C	1.0	497	
35/335652	5':AGCAGTCCGGAGTTGT		336148				
(B6)							

* Corresponding band on Figure 1.

**This locus is duplicated in chromosome 33 at position 1476284.

Table 2. List of SNPs / Indels found per *Leishmania (Viannia) braziliensis* locus studied and frequencies of their alleles in the sample.

Locus (band)*	Polymorphism	Chromosomal position	Alleles (proportion of <i>L. (V.) braziliensis</i> isolates with each allele)**
CHR 24/3074 (B1)	SNP24/3099ag	3099	A/G (0.23/1)
	SNP24/3120ga	3120	G/A (0.23/1)
	SNP24/3136ta	3136	T/A (0.23/1)
	SNP24/3197ag	3197	A/G (0.23/1)
	Indel24/3207a-	3207	A/indel (0.23/1)
	SNP24/3537ct	3537	C/T (0.23/1)
	SNP24/3672tc	3672	T/C (0.23/1)
CHR 26/765*** (B2)	SNP26/808ca	808	C/A (0.90/0.42)
	Indel26/815-c	815	indel/C (1/0.17)
	SNP26/909ga	909	G/A (0.77/0.77)
	SNP26/953tg	953	T/G (0.77/0.81)
	SNP26/1007ga	1007	G/A (0.77/0.81)
CHR 28/195696	SNP26/1050ac	1050	A/C (0.77/0.81)
	SNP28/195926gc	195926	G/C (0.77/0.83)

(B3)	SNP28/196016cg	196016	C/G (0.77/0.83)
	SNP28/196100ga	196100	G/A (0.77/0.86)
	SNP28/425481tc	425481	T/C (0.8/0.74)
CHR 28/425451	SNP28/425737ct	425737	C/T (0.83/0.71)
(B4)	Indel28/425996t-	425996	T/indel (0.69/0.83)
	SNP32/1356321gt	1356321	G/T (0.97/0.31)
	SNP32/1356500ca	1356500	C/A (0.94/0.61)
CHR 32/1356278	Indel32/1356597c-	1356597	C/indel (1/0.12)
(B5)	SNP32/1356598ca	1356598	C/A (0.94/0.53)
	SNP32/1356599ca	1356599	C/A (1/0.12)
	SNP35/335735ca	335735	C/A (1/0.23)
CHR 35/335652	SNP35/336018tc	336018	T/C (1/0.08)
(B6)	SNP35/336094ca	336094	C/A (1/0.06)

* Corresponding band in Figure 1.

** Proportion of isolates presenting the particular allele at the specified locus.

*** This locus is duplicated in chromosome 33 at position 1476284.

Table 3. List of haplotypes found in at least ten percent of the parasite isolates for each *Leishmania (Viannia) braziliensis* locus studied.

Locus	Haplotypes				
	(proportion of <i>L. (V.) braziliensis</i> isolates with haplotype)				
	gaag-tc	agtaact			
CHR 24/3074	(0.97)	(0.23)			
	c-agac	c-gtga	a-gtga		
CHR 26/765*	(0.75)	(0.44)	(0.37)		
	cga	gcg			
CHR 28/195696	(0.83)	(0.66)			
	cct	cc-	tt-		
CHR 28/425451	(0.71)	(0.11)	(0.8)		
	gcccc	tcccc	gacac	gaccc	tacac
CHR 32/1356278	(0.82)	(0.12)	(0.37)	(0.21)	(0.19)
	ctc	cta			
CHR 35/335652	(1.0)	(0.23)			

* This locus is duplicated in chromosome 33 at position 1476284.

Table 4. Association between SNP / indel haplotypes in *Leishmania (Viannia) braziliensis* investigated loci and disseminated leishmaniasis phenotype.

Locus	Haplotype	<i>f</i> (Counts)*	<i>f'</i> (Counts)**	RR***	<i>P</i>****	95% CI	AF*****
CHR 28/425451	cc- (+)	0.44 (4/9)	0 (0/26)	6.2	0.002	2.8 - 13.8	0.8
CHR 28/425451	cct (+)	1 (9/9)	0.62 (16/26)	1.6	0.03	1.2 – 2.2	0.8
CHR 28/425451	cct (+) and cc- (+)	0.44 (4/9)	0 (0/26)	6.2	0.002	2.8 - 13.8	0.8
CHR 28/425451	cct (+) and tt- (+)	0.89 (8/9)	0.38 (10/26)	7.5	0.01	1.0 – 54.2	0.9
CHR 24/3074	agtaact (-)						
CHR 28/425451	cct (+)	1 (9/9)	0.38 (10/26)	8.6	0.004	1.2 – 60.7	0.9
CHR 24/3074	agtaact (-)						
CHR 32/1356278	gacac (+)						

CHR 28/425451	cct (+)	0.50 (4/8)	0.17 (4/24)	3.0	0.08	1.0 – 9.3	0.7
CHR 24/3074	agtaact (-)						
CHR 28/195696	cga (+)						
CHR 28/425451	cct (+)	1 (9/9)	0.35 (9/26)	9.5	0.002	1.3 – 67.3	0.9

* f - Frequencies of DL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of DL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of DL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

** f' - Frequencies of ML and CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of CL and ML cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of CL and ML cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

*** RR - Risk ratio.

**** Fisher`s exact test.

***** AF - Fraction of DL Attributable to the polymorphism.

(+) The presence of the haplotype in *L. (V.) braziliensis* isolates was evaluated for association with DL.

(-) The absence of the haplotype in *L. (V.) braziliensis* isolates was evaluated for association with DL.

CHR 32/1356278	gacac (+)											
CHR 28/425451	cct (+)	0.11 (1/9)	0.30 (7/23)	0.4	0.26	0.05 – 2.5	0.2 (3/15)	0.29 (5/17)	0.7	0.42	0.3 – 2	
CHR 24/3074	agtaact (-)											
CHR 28/195696	cga (+)											
CHR 28/425451	cct (+)	0.22 (2/9)	0.61 (16/26)	0.3	0.049	0.06 – 1.1	0.41 (7/17)	0.61 (11/18)	0.7	0.20	0.3 – 1.3	

[#] *f* - Frequencies of ML isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of ML cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of ML cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

^{##} *f* - Frequencies of DL and CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of DL and CL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of DL and CL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

^{###} *f* - Frequencies of CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of CL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of CL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

f' - Frequencies of DL and ML isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of DL and ML cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of DL and ML cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

* RR - Risk ratio.

** Fisher`s exact test.

(+) The presence of the haplotype in *L. (V.) braziliensis* isolates was evaluated for associations.

(-) The absence of the haplotype in *L. (V.) braziliensis* isolates was evaluated for associations.

Table 6. Association between SNPs and combinations of SNPs in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and risk for localized cutaneous or mucosal leishmaniasis phenotypes.

Combined SNP polymorphisms	ATL form	f (Counts)*	f' (Counts)**	RR***	P ****	95% CI	AF*****
SNP24/3672tc	ML	0.44 (4/9)	0.15 (4/26)	2.7	0.09	0.9 – 7.7	0.6
SNP32/1356500c only	ML	0.67 (6/9)	0.29 (7/24)	3.1	0.06	0.9 – 10.2	0.7
SNP32/1356598c only	ML	0.67 (6/9)	0.39 (9/23)	2.3	0.1	0.7 – 7.5	0.5
SNP32/1356598c only SNP24/3672tc	ML	0.33 (3/9)	0.08 (2/26)	3.0	0.09	1.1 – 8.2	0.7
SNP26/953g only	CL	0.93 (13/14)	0.70 (12/17)	3.1	0.1	0.5 – 19.4	0.7

* f - Frequencies of either ML or CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of ML or CL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of ML or CL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

** f' - Frequencies of either non-ML or non-CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of either non-ML or non-CL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* haplotype(s) divided by the total number of either non-ML or non-CL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

*** RR - Risk ratio.

**** Fisher`s exact test.

***** AF - Fraction of ML or CL attributable to that combination of polymorphisms.

Table 7. Association between combined SNPs in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and risk for disseminated leishmaniasis phenotype.

Combined SNP polymorphisms				<i>f</i> (Counts)*	<i>f'</i> (Counts)**	RR***	<i>P</i> ****	95% CI	AF*****
SNP24/3672c only	SNP28/196100ga	SNP28/425737tc	SNP32/1356598ca	0.50 (4/8)	0 (0/24)	7	0.002	2.8 – 17.3	0.9
SNP24/3672c only	SNP28/425737tc	SNP32/1356598ca		0.75 (6/8)	0.08 (2/24)	9	0.0008	2.2 – 36.0	0.9
SNP24/3672c only	SNP28/196100ga	SNP28/425737tc		0.67 (6/9)	0.19 (5/26)	4.4	0.01	1.3 – 14.3	0.8
SNP24/3672c only	SNP28/425737tc			0.89 (8/9)	0.27 (7/26)	10.7	0.002	1.5 – 76.3	0.9
SNP24/3672c only	SNP32/1356598ca			0.75 (6/8)	0.29 (7/24)	4.4	0.03	1.0 – 18.4	0.8
SNP28/196100ga	SNP28/425737tc			0.67 (6/9)	0.19 (5/26)	4.4	0.01	1.3 – 14.3	0.8
SNP28/425737tc	SNP32/1356598ca			0.75 (6/8)	0.12 (3/24)	7.7	0.002	1.9 – 31.2	0.9
SNP32/1356598ca	SNP26/909g only			0.37 (3/8)	0 (0/22)	5.4	0.01	2.4 – 11.9	0.8

* *f* - Frequencies of DL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of DL cases presenting the *L. (V.) braziliensis* SNPs divided by the total number of DL cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

** f' - Frequencies of ML and CL isolates with the polymorphism. In parentheses is the number of CL and ML cases presenting the *L. (V.) braziliensis* SNPs divided by the total number of CL and ML cases that had isolates evaluated in that particular analysis.

*** Risk ratio.

**** Fisher's exact test.

***** Fraction of ML or CL attributable to that combination of polymorphisms.

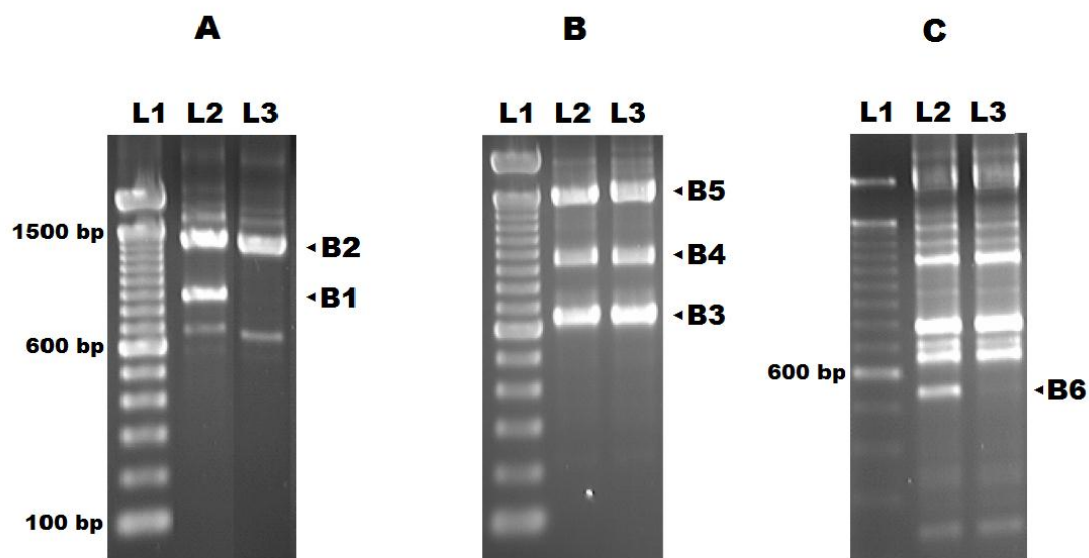


Figure 1. Electrophoretic patterns of *Leishmania (Viannia) braziliensis* genomic DNA amplicons generated using three random amplified polymorphic DNA (RAPD) protocols (separately depicted in panels A, B and C) previously described (27). Marked bands were excised, cloned and sequenced, then aligned among nine *L. (V.) braziliensis* isolates from Corte de Pedra to detect polymorphisms. The following polymorphic loci were detected among parasites of Corte de Pedra: (B1) CHR 24/3074 (chromosome 24, starting at position 3074), (B2) CHR 26/765, (B3) CHR 28/195696, (B4) CHR 28/425451, (B5) CHR 32/1356278 and (B6) CHR 35/335652. The locus CHR 26/765 was found duplicated on chromosome 33 starting at position 1476284. (L1) Molecular weight marker. (L2, L3) Examples of *L. (V.) braziliensis* isolates. (bp) estimated nucleic acid length in base pairs.

5. MANUSCRITO 2

TITLE: The spatial and temporal distribution of American Tegumentary Leishmaniasis cases in northeastern Brazil

AUTHORS: Adriano Queiroz¹, Luiz Henrique Guimarães^{1,2}, Paulo Roberto Lima Machado^{1,2}, Ednaldo Lago¹, Mary E. Wilson³, Edgar Carvalho^{1,2}, Albert Schriefer^{1,2,4*}

AUTHORS AFFILIATIONS: ¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Brazil; ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Doenças Tropicais (INCT-DT), Brazil; ³Departments of Internal Medicine and Microbiology, University of Iowa and the VA Medical Center, USA; ⁴Departamento de Biointeração, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brazil.

***Corresponding Author.** Mailing address: Albert Schriefer, M.D., Ph.D., Universidade Federal da Bahia, Rua João das Botas, s/n, Hosp. Univ. Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, Salvador, Bahia, Brazil, 40.110-160; Phone 55-71-3237-7353; Fax 55-71-3245-7110; aschriefer@globo.com.

Running title: Distribution of leishmaniasis cases in northeast of Brazil.

Key Words: *Leishmania braziliensis*, leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis, disseminated leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis.

ABSTRACT: Human-dependent changes in forest cover have affected the behavior of the phlebotomine vector and acted as a driving force in the spread of different forms of leishmaniasis in endemic areas. In addition, the genetic diversity of *Leishmania spp.* directly affects disease outcome and is involved in the parasite and vector-reservoir relationship. Thus, monitoring the distribution of leishmaniasis in endemic areas is a necessary first step in gaining an understanding of the disease dynamics in these regions. In this study and over a three year period, we obtained geographic coordinates from the residences of cutaneous, mucosal and disseminated leishmaniasis (CL, ML and DL) patients living in an endemic area in northeastern Brazil. In the first year, no difference was observed in the distribution of the three disease types. However, between the second and third years, the distribution pattern of CL cases changed, mainly due to an increase of CL cases in the northwest region of the endemic area. Differences in the distribution patterns among the disseminated forms in this area was also observed between 1996 and 2003. In the context of these findings, the present results suggest that these epidemiological changes are part of a continuous process. The environmental and genetic factors involved in the spread of leishmaniasis in this endemic area should be further evaluated in order to elucidate the dynamics of this disease.

INTRODUCTION

Leishmaniasis results in several possible clinical manifestations, varying from skin ulcer to metastatic disease, and includes mucosal inflammation, dissemination throughout the body and visceral infection[1]. All of these clinical disease forms are caused by approximately 20 different species of the *Leishmania*, which have been found in more than 88 countries in the world. In the New World, the parasites complexes *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* are the common etiologic agents of american tegumentary leishmaniasis[2].

The southeast of Bahia, Brazil, contains a focus highly endemic for American tegumentary leishmaniasis (ATL), with area of 10,000 km² in a region previously covered by the Atlantic rain forest (known as Corte de Pedra [CP]). Currently, this area is dominated by farmers who have removed the native vegetation and used the land for rural activities such as agriculture. The population affected by ATL in CP, normally lives on the farms where they work, in close proximity to the native forest[3]. The only species causing ATL in this area is *L. braziliensis*, which is responsible for cutaneous leishmaniasis (CL), mucocutaneous leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis (DL).

Factors related to leishmaniasis outcomes in Corte de Pedra are not totally understood. Castellucci (2005)[4] documented a familial aggregation of CL and ML in the Corte de Pedra region, and proposed that the genetic background of the patient population may be influencing the immunological response and consequently, the disease outcome. In a previous study conducted by our group, it was demonstrated that *L. braziliensis* in Corte de Pedra is multiclonal and statistically related with disease forms[5]. Furthermore,

DL has been emerging throughout the last decades, suggesting the spread of a new strains of the parasites and reinforcing the complexity of leishmaniasis determinants[3, 6, 7].

Despite ongoing efforts attempting to determine the roles of human hosts and *L. braziliensis* strain polymorphisms on ATL outcomes, a paucity of information remains regarding the distribution of leishmaniasis forms in time and space over affected areas. Regarding the distribution of the leishmaniasis in the Corte de Pedra region, our group has shown: (i) a different distribution between DL and ML cases; (ii) continuous changes in DL distribution; (iii) and overlap between specific *L. braziliensis* subpopulations and patients with ML or DL [3].

Obtaining detailed data of the geographical distribution of leishmaniasis cases in Corte de Pedra will enable us to fine map and assess for ATL forms spatial patterns. This information will allow us to eventually addresses the aggregation of disease with respective environmental characteristics, such as species of vectors[8] and reservoirs, proximity with native forest[9] and altitude[10]. In the future, these data can also be used in conjunction with the genotype data of the related *L. braziliensis* strains, to revisit our hypothesis that parasite genotype influences distribution of different ATL forms over an affected area[9].

Thus, in order to better understand the dynamic distribution of ATL over an affected area, a prospective evaluation of the distributions of CL, DL and ML cases in space and time was carried out during a three consecutive years period in CP.

METHODS

Study area. The Corte de Pedra region is composed of 20 municipalities in a rural area previously dominated by the Atlantic rain forest. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* and *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* sandflies, which transmit *L. braziliensis*, are part of the local fauna. Residents in this area work mostly in agriculture, often in proximity to primary or secondary forests. Among the population, there is little migration in or out of the region. Study participants' mean time of residence at their addresses at the time of diagnosis and parasite sampling was 17 years; >90% of the study participants lived in farms.

Disease Definitions. CL was defined as a disease with <10 ulcerative skin lesions without evidence of mucosal involvement. DL was defined as a disease with >10 nodular, acneiform, or ulcerative lesions spread over the skin of >2 body areas. ML was defined as a disease with metastatic mucosal lesions affecting the nose, palate, pharynx, or larynx and not contiguous with primary cutaneous lesions. Patients who simultaneously satisfied the definitions for ML and DL were classified as patients with DL. All patients had their diagnosis confirmed by: (1) culturing parasites from lesion aspirates; (2) detecting parasite DNA by PCR[11] in lesion biopsy specimens; (3) delayed type skin test (Montenegro test).

Patients with ATL. Participants with ATL were classified according to disease definitions into three groups: 35 patients with ML, 76 with DL, and 225 with CL. Diagnoses were made and study subjects were enrolled between 2008 and 2011 in Corte de Pedra. All ATL cases in this study were self-referred and diagnosed in a health post that treats ≈70% of patients with leishmaniasis in the region.

Geographic Distribution of Patients with ATL. High-resolution distribution of ATL cases was determined by acquisition of geographic coordinates of likely places of disease transmission by a global positioning system. Geographic coordinates were obtained using a Brunton Multi-Navigator global positioning system apparatus (Brunton Company, Riverton, WY, USA), which has a precision range of 15 m. Because leishmaniasis is believed to be transmitted mostly within plantations, where residents of the region live and work, patient residences were used as reference points for standardization purposes. Collected data were statistically compared as described below and plotted for visual inspection onto a high-definition satellite photograph of the Corte de Pedra region (ENGESAT, Curitiba, Brazil) using ArcGis version 9 software (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, CA, USA).

Statistical Analyses. The distributions of CL, ML and DL in Corte de Pedra were compared in two manners. First, the area was sectorized into inland and coastal, and southern and northern regions, and the frequencies of each of these forms of ATL were compared among these 4 sectors, using the χ^2 test and Fisher's exact test. Then, the Cuzick and Edwards test (Clusterseer version 2.3, Terraseer Inc., Ann Arbor, MI, USA), was used to evaluate whether geographic patterns of the distinct ATL forms were different on CP. The comparisons above were made in the entire three years period, as well as for yearly stratifications of the data set.

RESULTS

Spatial distribution of CL, DL and ML cases in Corte de Pedra, Brazil

The distribution of cases of American tegumentary leishmaniasis from 2008 to 2011 was plotted on a satellite map of the Corte de Pedra region (Figure 1). These maps were arbitrarily divided into inland and coastal regions, and into northern and southern regions of approximately equal areas. The analysis of the global distributions using the Cuzick and Edwards test showed that the cases of CL had a distribution that was significantly different from those of the DL ($p = 0.01$) and ML cases ($p = 0,01$). However, DL and ML cases distributed similarly over Corte de Pedra ($p > 0.05$).

To further confirm the differential distribution of CL versus ML and DL in Corte de Pedra, and to identify where these differences occur, we compared the distribution of CL, DL and ML across the north, south, east and west sectors of the region (Table 1). No difference was found between ML and DL cases in each of the evaluated quadrants. However, CL distribution was significantly distinct from DL in the South of Corte de Pedra (Cuzick and Edwards test, $p = 0.008$), and from ML in the North, South and West of the region (Cuzick and Edwards test, $p < 0.05$).

The frequency of each ATL forms was evaluated across different sectors of Corte de Pedra (Figure 2). CL, DL and ML cases presented different frequencies in each one of four quadrants of the region. The significance of this sectored analysis showed in Table 2 confirms the finding of the global analyses with the Cuzick and Edwards test. DL and ML were not significantly different regarding their frequencies in different regions of Corte de Pedra ($p > 0.05$, by Fisher's exact tests), while CL and DL cases had different frequencies in the south and east of the Corte de Pedra region ($p = 0.023$ and $p = 0.036$

respectively, by chi-square test). Comparing CL with ML cases, the frequencies were different only on northern region ($p = 0.016$).

Temporal distribution of CL, DL and ML cases in Corte de Pedra, Brazil

CL, DL and ML cases were stratified according to the year of study they were enrolled, then their geographic coordinates were plotted on satellite views of Corte de Pedra (Figure 3). In the first and second years of the study, no difference in the distribution of CL, DL and ML cases could be observed (Cuzick and Edwards test $p > 0.05$). However, in the third year, the CL cases presented distributions that were distinct from those of DL ($p = 0.002$) and ML cases ($p = 0.002$), suggesting a dynamic rather than stagnant spread of ATL over the focus of transmission. The distributions of each disease form was analyzed separately, comparing year one with year two, year one with year three and year two with year three (Table 3). DL and ML had no significant difference in their distributions throughout the three compared years ($p > 0.05$, by Cuzick and Edwards test). However, CL was significantly different in its distribution upon comparison of years one and three ($p = 0.013$) and years two and three ($p = 0.019$). At the third year, cases of CL almost disappeared from the northeast region, while DL cases began to increase in number of cases in the same sector.

DISCUSSION

This work stems from our previous observations that the population of *L. braziliensis* in the Corte de Pedra region is complex and that different ATL forms present distinct distribution within the area[3, 5]. We compared the distributions of CL, ML and DL in the Corte de Pedra region to test our hypothesis that different diseases forms have different distributions in this

endemic area. As mentioned before, there was no significant difference in the distribution of ML from DL. However, CL cases had an overall distribution differing from both ML and DL. Differences in geographic distribution of distinct clinical forms of ATL also have long been recognized in Andean countries in South America[12, 13]. A better understanding of the changing distribution of the disease in Corte de Pedra may help us design more effective and cost-efficient strategies for the control of these diseases.

Although DL cases showed a homogenous distribution within the Corte de Pedra region, with approximately the same number of cases in the four designated quadrants in the present study, the proportion of disseminated cases and how they spread in the endemic Corte de Pedra region appear to have undergone dynamic changes over the last 20 years[3, 6, 14]. Until 1996, most of the disseminated cases were concentrated in the inland area[3], after which they began to spread to the entire endemic area and appear to have maintained this distribution up to the point of this study.

Like DL, ML cases were firstly concentrated in the inland region of the endemic area until at least 2003[3]. However, in the present study, we observed an important reduction in cases in the northwest – only 19% of ML cases – with a corresponding increase in their frequency in the northern coastal region, totaling 21% of all ML cases. It seems plausible that the ML cases are following the same pattern of dissemination over CP that was displayed by DL cases more than 10 years before it. Shimabukuro (2010)[8] compared the distribution of six sand fly species with incidence of the American cutaneous leishmaniasis in São Paulo state, Brazil, and suggested a cause-effect relationship between them. Likewise, future entomological analyses may prove helpful in explaining

the migration of ML and DL cases from the inland to coastal areas of the Corte de Pedra region. Furthermore, it was suggested that the dispersion of *Leishmania* clones was associated with both vector and reservoir movements[15]. Factors that predispose pathogens to infect multiple hosts include high levels of genetic diversity and opportunities for cross-species transmission[16]. Coupling these analyses with those on the movements of *L. braziliensis* genotypes associated with ML and DL may help refine our understanding of phenomenon herein represented. Interpretation of these results regarding CL is more complicated, as all cases of leishmaniasis began as a cutaneous form of disease, and may or may not progress to ML or DL.

Cutaneous leishmaniasis has a different distribution from ML and DL. Our group found different distributions of disease forms in Corte de Pedra[3] and we attribute this phenomenon to the presence of some subpopulations of parasites which are associated with factors affecting the transmission dynamics of *L. braziliensis* strains, such as various sand fly vectors present in the study area. The presence or absence of specific species (or population) of flies in different regions could explain why – at the same period of time – changes in the pattern of distribution were observed for one form of disease and not for another[9]. However, Pratlong (2009)[17] found a wide distribution of a genetically homogenous zymodeme and, rather than to distribution of fly species, attributed the *Leishmania* dissemination to human migration and/or to historical climates changes.

CL, DL and ML case distributions remained similar from 2008 to 2009. After this time, CL cases changed your distribution and became different from DL and ML cases. The movement of ATL cases was observed for DL in

1996[3], apparently for ML from 2003[3] to 2011, and now for CL cases. These data suggest continuous changes in the distribution of ATL cases occurring on Corte de Pedra, since we began to monitor the distribution of leishmaniasis cases. As the median time of residency among locals living in the Corte de Pedra region is 17 years, other factors may explain this dynamic. Schriefer (2004), suggests that the *Leishmania braziliensis* in Corte de Pedra is complex and formed by subpopulations of strains which are related to the disease forms they cause. Indeed, Schriefer (2009) demonstrated an overlap between the clusters of parasites and disease forms, suggesting a probable cause-effect relationship between strains and disease forms. Our concern is that strain distributions are reflected in disease distribution, which justifies the difference between CL, ML and DL cases distributions in the present study. How the parasite strains migrate from one place to another can be explained by ecological and/or entomological approaches. As suggested by Lainson (2002) [15], reservoirs or vectors can be a source of spread of the *L. braziliensis* strains.

In the Americas, more than 40 species of mammals can be carriers of *Leishmania* spp. parasites[18]. However, the natural reservoirs of *L. braziliensis* are not well known[19]. On the other hand, since the transmission cycle of *L. braziliensis* is frequently associated with human penetration into forest or highly vegetated regions, it is likely that wild mammals are the natural reservoirs for this species[20]. Patients with leishmaniasis in Corte de Pedra are usually farmers who live on the farms where they work, and are in close proximity to native forest. The increased number of CL and DL cases in the northwest of Corte de Pedra may also be explained by the large concentration of domestic

animal hosts in this area. This part of the Corte de Pedra region is distinguished by the presence of cities and villas bordering an economically important highway. The high population density in this region is usually followed by a high domestic canine population, which may be contributing to the spread of the disease. Domestic canine hosts and *L. braziliensis* parasite have been associated with cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais state, Brazil[19] and with an epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia[21].

In the Corte de Pedra region, *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmany* and *Lutzomyia (Nyssomyia) intermedia* sandflies which transmit *L. braziliensis* are endemic in the local fauna. It is known that the vector populations are affected by humidity, temperature, vegetation, availability of sunlight and altitude[22]. Corte de Pedra is a rural region previously dominated by the Atlantic rain forest, with a tropical climate and where people usually live and work on farms which are bordered by remnants of the Atlantic forest. Since the affected people probably live in similar environments, we evaluated for notable differences in altitude. Highlands have been a refuge from the Old World leishmaniasis vector and human infection is uncommon or absent[23-25]. It is thought this is because higher altitudes generally have lower temperatures and lower relative humidity, which affect the distribution of the vector. However, in the lowlands the vectors find a suitable environment for spread and propagation. A high correlation between leishmaniasis and the prevailing topographic conditions were found in India. There, the influence of topography (altitude) is of particular importance in predicting disease risk[10]. In our study, of the 326 ATL cases, 277 (almost 85%) live in localities between 100 and 300 meters of altitude, and only 12 live above 400m. It is plausible that below roughly 300 m of altitude, there exist

suitable factors for proliferation of the vectors and, therefore, more disease. Spatial locations, such as riverbanks, alluvial soil, and dark, damp places (such as deep cracks in the soil or rock) are the breeding sites of the vector[26, 27]. Further ecological studies, including the evaluation of local humidity, temperature, altitude and vegetation density, are warranted to clarify the role of vectors and the environment on dissemination of leishmaniasis.

In conclusion, different outcomes of leishmaniasis have different distributions in the Corte de Pedra region. Differences between disseminated and mucosal leishmaniasis were observed about twenty years ago, and in that time mucosal leishmaniasis was concentrated in the inland region of Corte de Pedra while DL occupied the inland and the coastal areas. At around this time, DL began to spread to all of the Corte de Pedra region. In the present work we demonstrated that ML followed the same pattern of distribution observed by DL cases. Now, DL and ML cases has no differences in their distribution. On the other hand, cutaneous leishmaniasis has a statistically different distribution from DL and ML in specific areas of the Corte de Pedra region since 2009, when CL distribution began to change in the endemic region. We demonstrate that ATL in the Corte de Pedra region is continuously changing its patterns of distribution over the years. The genotyping of the *L. braziliensis* parasites would help us to understand to whom the diseases are spreading in the endemic region. The evaluation of vectors and reservoirs and their relationship with changes in Corte de Pedra environments can also improve our capacity to understand the factors behind the distribution and spread of leishmaniasis in Bahia.

REFERENCES

1. Azulay, R.D. and D.R. Azulay Junior, *Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis*. Int J Dermatol, 1995. **34**(5): p. 303-7.
2. Ashford, R.W., *The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses*. Int J Parasitol, 2000. **30**(12-13): p. 1269-81.
3. Schriefer, A., et al., *Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil*. Emerg Infect Dis, 2009. **15**(6): p. 871-6.
4. Castellucci, L., et al., *Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil*. Am J Trop Med Hyg, 2005. **73**(1): p. 69-73.
5. Schriefer, A., et al., *Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 508-14.
6. Turetz, M.L., et al., *Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil*. J Infect Dis, 2002. **186**(12): p. 1829-34.
7. Jirmanus, L., et al., *Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of Leishmania (Viannia) braziliensis transmission over a 20-year period*. Am J Trop Med Hyg, 2012. **86**(3): p. 426-33.
8. Shimabukuro, P.H., et al., *Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of Sao Paulo, Brazil*. Parasit Vectors, 2010. **3**: p. 121.
9. Cupolillo, E., et al., *Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3126-32.
10. Bhunia, G.S., et al., *Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: a study based on remote sensing and geographical information system*. Geospat Health, 2010. **4**(2): p. 155-65.
11. Weirather, J.L., et al., *Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of Leishmania spp. in human samples*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3892-904.
12. Calvopina, M., R.X. Armijos, and Y. Hashiguchi, *Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: current status of knowledge -- a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(7): p. 663-72.
13. Lucas, C.M., et al., *Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru*. Am J Trop Med Hyg, 1998. **59**(2): p. 312-7.
14. Jones, T.C., et al., *Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis*. J Infect Dis, 1987. **156**(1): p. 73-83.
15. Lainson, R., E.A. Ishikawa, and F.T. Silveira, *American visceral leishmaniasis: wild animal hosts*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2002. **96**(6): p. 630-1.
16. Woolhouse, M.E., L.H. Taylor, and D.T. Haydon, *Population biology of multihost pathogens*. Science, 2001. **292**(5519): p. 1109-12.
17. Pratlong, F., et al., *Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains*. Trop Med Int Health, 2009. **14**(9): p. 1071-85.

18. Oliveira, F.S., et al., *PCR-based diagnosis for detection of Leishmania in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil*. Vet Parasitol, 2005. **129**(3-4): p. 219-27.
19. Quaresma, P.F., et al., *Wild, synanthropic and domestic hosts of Leishmania in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2011. **105**(10): p. 579-85.
20. Grimaldi, G., Jr. and R.B. Tesh, *Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(3): p. 230-50.
21. Velez, I.D., et al., *An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by Leishmania braziliensis and Leishmania panamensis*. Am J Trop Med Hyg, 2012. **86**(5): p. 807-11.
22. Gomes, A.C., *Sand fly vectorial ecology in the State of Sao Paulo*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1994. **89**(3): p. 457-60.
23. Ponirovskii, E.N. and B. Charyev, *[The characteristics of the topographical distribution of leishmaniasis in Turkmenistan]*. Med Parazitol (Mosk), 1996(1): p. 13-7.
24. Sharma, R.C., et al., *A new focus of cutaneous leishmaniasis in Himachal Pradesh (India)*. Indian J Dermatol Venereol Leprol, 2003. **69**(2): p. 170-2.
25. Joshi, D.D., M. Sharma, and S. Bhandari, *Visceral leishmaniasis in Nepal during 1980-2006*. J Commun Dis, 2006. **38**(2): p. 139-48.
26. Lysenko, A.J., *Distribution of leishmaniasis in the Old World*. Bull World Health Organ, 1971. **44**(4): p. 515-20.
27. Sharma, U. and S. Singh, *Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control*. J Vector Borne Dis, 2008. **45**(4): p. 255-72.

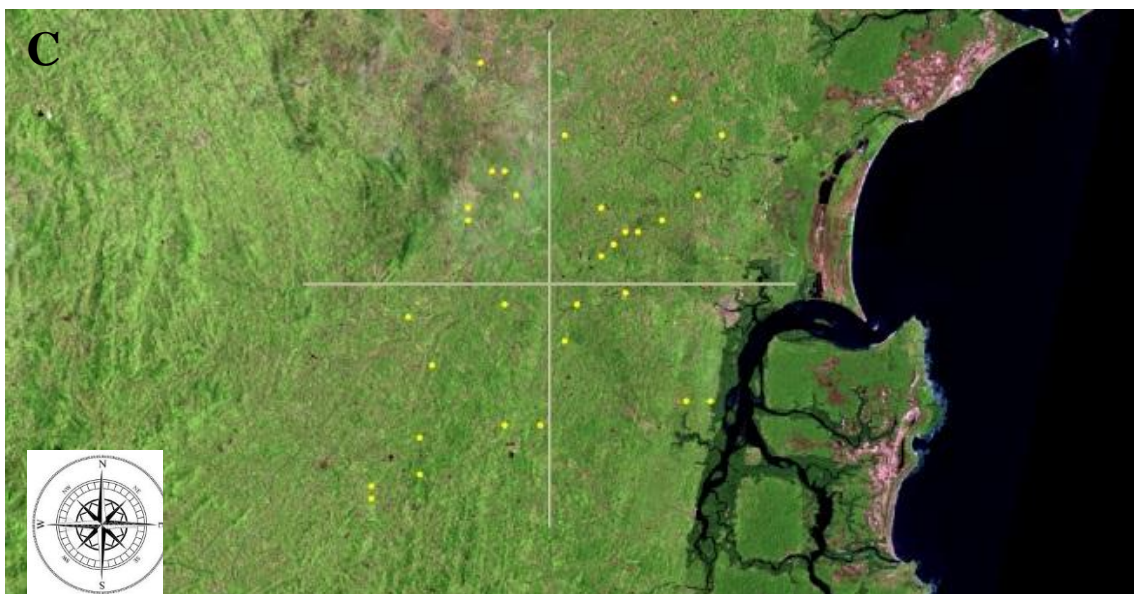
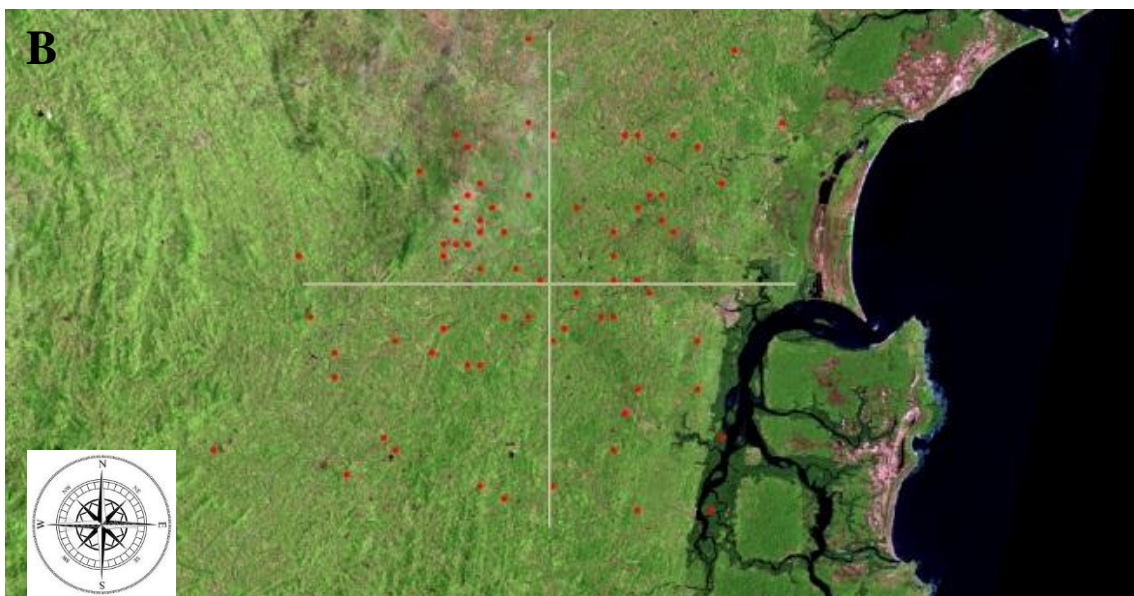
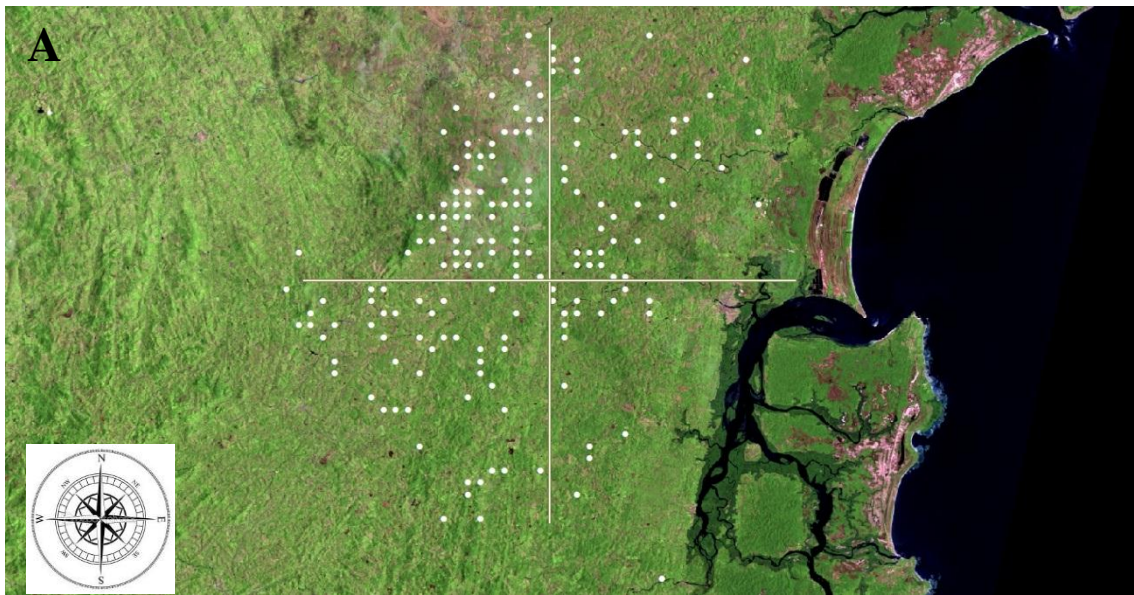


Figure 1. Satellite view of the distribution of patients with cutaneous leishmaniasis (CL), patients with disseminated leishmaniasis (DL) and patients with mucosal leishmaniasis (ML) in Corte de Pedra, Brazil, 2008-2011. A) White circles indicate patients with CL. B) Red circles indicate patients with DL. C) Yellow circles indicate patients with ML. Vertical line divides the region into inland (left) and coastal (right) areas of similar size. Horizontal line divides the region into north (up) and south (down) areas of similar size.

Table 1. Comparison between disease forms on North, South, East and West of Corte de Pedra, Brazil.

	North	South	East	West
Diseases forms	Simes <i>P-value</i> *			
CL and DL	0.344006	0.008215	0.113002	0.092780
CL and ML	0.037919	0.009716	0.753647	0.002997
DL and ML	0.328402	0.585002	0.626123	0.258962

* Simes P-Value were calculated using the Cuzick and Edwards test.

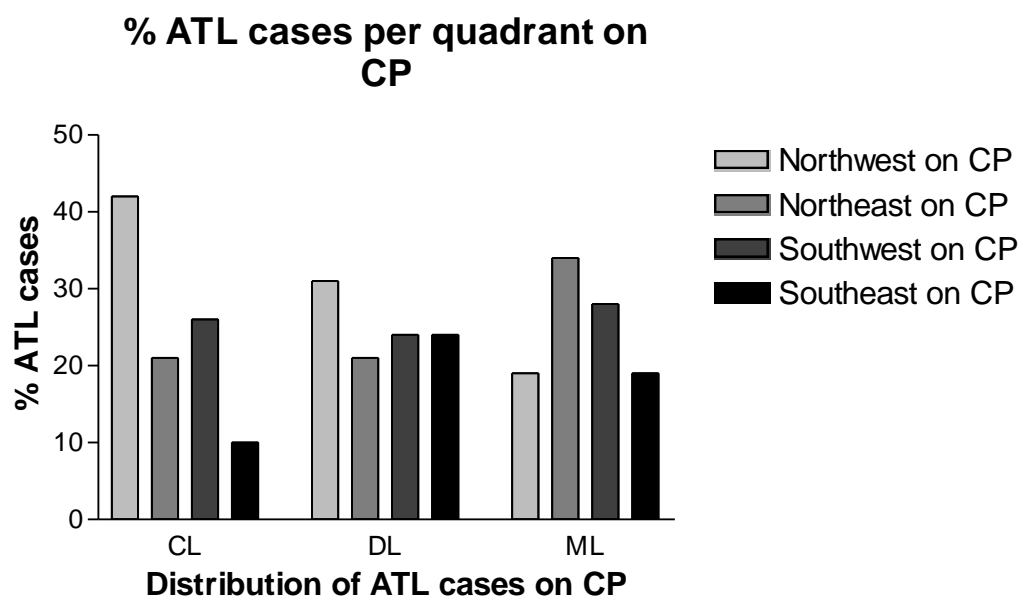


Figure 2. Frequency of CL, DL and ML cases across Northwest, Northeast, Southwest and Southeast sectors of Corte de Pedra during the period of 2008-2011.

Table 2. Association between different forms of American tegumentary leishmaniasis on different regions of Corte de Pedra, Brazil.

	All regions	NW and NE	SW and SE	NE and SE	NW and SW
Forms of disease	<i>P-value</i>				
CL, DL, ML	0.012*	0.04*	0.054*	0.09*	0.25*
CL, DL	0.015*	0.46**	0.023**	0.036**	0.6**
CL, ML	0.049*	0.016**	0.36**	1.0**	0.17**
DL, ML	0.331*	0.15**	0.56**	0.24**	0.37**

* P value were calculated using the chi-square test.

** P value were calculated using the Fisher's exact test.

CL = Cutaneous leishmaniasis

DL = Disseminated leishmaniasis

ML = Mucosal leishmaniasis

NW = Northwest quadrant of Corte de Pedra

NE = Northeast quadrant of Corte de Pedra

SW = Southwest quadrant of Corte de Pedra

SE = Southeast quadrant of Corte de Pedra

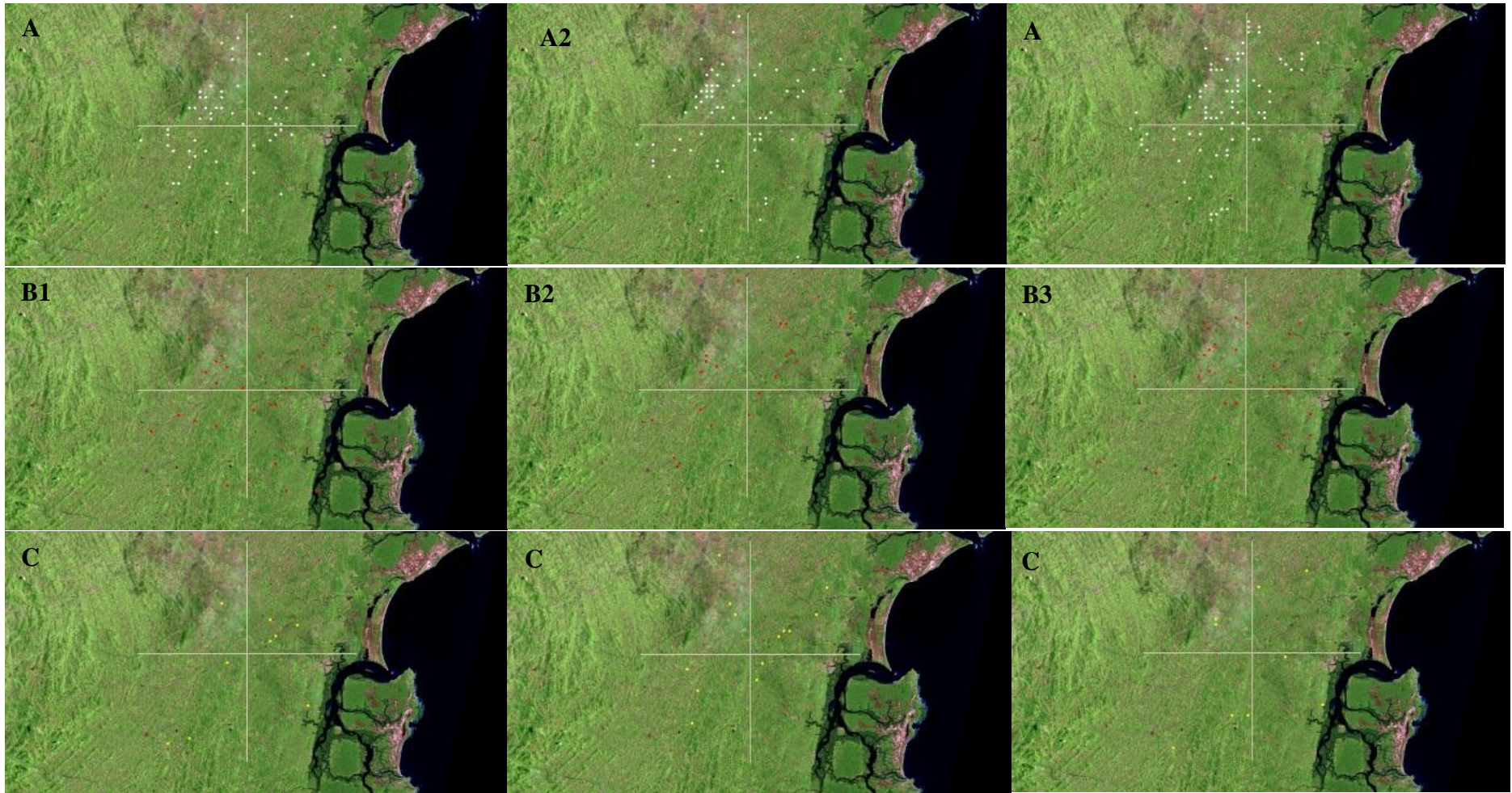


Figure 3. Satellite view of progressive distributions of patients with cutaneous leishmaniasis (CL), patients with disseminated leishmaniasis (DL) and patients with mucosal leishmaniasis (ML) in Corte de Pedra, Brazil, 2008-2011. Blue circles indicate cases of CL. Red circles indicate cases of DL. Yellow circles indicate cases of ML. A1, B1, C1) Year 1. A2, B2, C2) Year 2. A3, B3, C3) Year 3. Vertical lines divides the region into inland (left) and coastal (right) areas of similar size. Horizontal lines divides the region into north (up) and south (down) areas of similar size.

Table 3. Comparisons between temporal distributions of cutaneous leishmaniasis, disseminated leishmaniasis and mucosal leishmaniasis.

Diseases forms	Simes <i>P-value</i> *		
	Years1 & 2	Years 1 & 3	Years 2 & 3
Cutaneous leishmaniasis	0.156455	0.013573	0.019238
Disseminated leishmaniasis	0.728638	0.456949	0.754524
Mucosal leishmaniasis	0.828050	0.684061	0.920808

* Simes P-Value was calculated using the Cuzick and Edwards test.

6. DISCUSSÃO

Corte de Pedra é uma região endêmica de leishmaniose tegumentar, localizada no sudeste da Bahia, a 280 km de Salvador. Estudos epidemiológicos e clínicos têm sido realizados nessa área desde 1980. A região tem uma área com mais de 8.000 km², a sua altitude varia de 15 a 500 m acima do nível do mar, com uma população estimada em 240.000 habitantes. A área que era, predominantemente, coberta pela Mata Atlântica, ao longo dos anos, a vegetação nativa tem sido destruída para dar espaço ao cultivo de cacau, banana e mandioca. A região tem uma pluviosidade anual que varia de 1.100 a 2.100 e a temperatura local oscila entre 18 e 30°C. O posto de saúde de Corte de Pedra é o centro de referência para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose e atende a 14 municípios espalhados em um raio de 38 km do posto. No posto de saúde, apenas a *L. braziliensis* e a *L. amazonensis* foram identificadas, mas apenas a *L. braziliensis* tem sido isolada nos últimos 15 anos. Essa espécie é responsável por cerca de 1.200 casos de leishmaniose anualmente. Esses casos distribuem-se entre as três formas de doença diagnosticadas na região: a cutânea, mucosa e disseminada. A população afetada é, na sua maioria, de homens que exercem atividades no campo (Jirmanus *et al.*, 2012).

Diante deste cenário, inicialmente, investigou-se o papel da cepa parasitária no desfecho da doença, que foi, em parte, respondida por Schriefer *et al.*, (2004). Nesse trabalho, foi demonstrado que a população de *L. braziliensis*, em Corte de Pedra, é complexa, composta por cepas multiclonais e que diferentes cepas estariam associadas às diferentes formas da doença. Se as cepas identificadas eram responsáveis pelas formas de doença, então,

elas deveriam estar determinando a distribuição das formas de doença na região. Para confirmar essa hipótese, Schriefer *et al.*, (2009), avaliaram a distribuição dos casos de LD e LM na região de Corte de Pedra. Nesse trabalho, foi demonstrado que os pacientes com leishmaniose mucosa residiam, na grande maioria, na região mais a oeste da área endêmica e que os pacientes com leishmaniose disseminada estavam distribuídos por toda a área endêmica (Schriefer *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado a sobreposição entre a distribuição dos casos cujas cepas foram agrupados nos clados A e C (respectivamente associados às formas disseminada e mucosa de leishmaniose [Schriefer *et al.*, 2004]) com a distribuição dos casos de LD e LM. Por fim, ficou evidenciado que o surgimento de novos casos da doença acontecia próximo às regiões onde já havia sido observada a ocorrência de outros casos de leishmaniose. Nesse contexto, as justificativas consideradas plausíveis para explicar a dinâmica da leishmaniose em Corte de Pedra foram: 1) diferentes cepas de *L. braziliensis* são responsáveis por diferentes formas de doença; 2) existem, em Corte de Pedra, sub-populações de *L. braziliensis* com diferentes capacidades de disseminação na região; 3) a doença ocorre através de pequenos surtos que surgem em vários pontos distintos da região de Corte de Pedra. Dessa forma, o presente trabalho surgiu da necessidade de expandir o entendimento acerca do papel da cepa parasitária no desfecho da doença, bem como avaliar, em um estudo prospectivo, a dinâmica da leishmaniose na região.

O primeiro trabalho, intitulado “*Association Between an Emerging Disseminated form of Leishmaniasis and Leishmania Viannia braziliensis Strain Polymorphisms*”, foi idealizado com o propósito de detectar marcadores

moleculares mais específicos para as sub-populações de *L. braziliensis* de Corte de Pedra. Durante a execução do trabalho foram identificados, clonados e sequenciados 6 amplicons gerados por RAPD, previamente utilizados na genotipagem dos isolados de *L. braziliensis* (Schriefer *et al.*, 2004), e que se mostraram polimórficos. A partir da análise dessas sequências, oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos loci foi desenhados e aplicados na amplificação, por PCR, de 35 isolados de *L. braziliensis*, recuperados de pacientes diagnosticados com LC, LM e LD na região de Corte de Pedra entre os anos de 1994 e 2001.

Inicialmente, foram sequenciados os amplicons gerados a partir de DNA de *L. braziliensis* e oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada um dos loci testados. Entretanto, ao longo das sequências, foram encontrados várias posições nos quais a base não pôde ser definida por causa da heterozigidade desses sítios, muito comum em organismos diplóides. Bases ambíguas em uma mesma posição também podem ser encontradas quando as sequências analisadas pertencem a cepas isoladas de uma infecção policlonal. Maurício *et al.*, (2006), encontrou o mesmo problema durante a padronização do protocolo de MLST usado na tipagem de isolados do complexo *L. donovani*. O uso de primers alelo-específico permitiu o sequenciamento de apenas um dos alelos em seu trabalho. Essa abordagem não pôde ser aplicada no presente estudo por falta de um conhecimento mais detalhado dos polimorfismos presentes nas sequências de interesse. Por isso, a solução encontrada foi a clonagem dos produtos de PCR, que, além de possibilitar a análise da sequência do inserto, permitiu que todos os alelos possíveis pudessem ser representados nas análises.

Um total de 27 polimorfismos com 3 a 7 variações alélicas foram detectadas por locus na população de *L. braziliensis* estudada. Foi avaliada a associação de cada um dos 27 polimorfismos com às três formas de doença. Como demonstrado no manuscrito 1, várias associações estatisticamente significantes entre a presença de combinações de SNPs com casos de LD foram encontradas. Usamos o cálculo da razão de risco para avaliar as associações e, dessa forma, sermos capazes de mensurar a tendência que um paciente tem de desenvolver a forma disseminada da doença, caso ele seja infectado por uma cepa que apresente aquele polimorfismo específico. Uma abordagem semelhante foi usada por Castellucci *et al.*, (2011), que determinaram a existência de uma associação entre o polimorfismo no gene *FLI1* nos pacientes avaliados e o desenvolvimento da forma cutânea de leishmaniose. No presente trabalho, 90% dos isolados que haviam sido recuperados de pacientes com LD apresentaram ambos os SNPs, SNP24/3672cc e SNP28/425737tc, os quais, juntos, estavam associados a um risco de 10,7 vezes de o paciente desenvolver a forma disseminada da doença. A significância desse risco foi de 0,002. O SNP SNP28/425737tc sozinho, representado em 90% das cepas isoladas de pacientes com LD, representa uma razão de risco de 6,7 para o desenvolvimento desse desfecho (dados não apresentados no manuscrito). Esses dados são de alta relevância tanto do ponto de vista do estudo da leishmaniose, quanto do ponto de vista do paciente. Do ponto de vista do estudo da leishmaniose, eles deixam claro que as cepas estão contribuindo, de forma relevante, no desfecho da doença, pelo menos para o desenvolvimento da LD. Do ponto de vista do paciente, esse marcador poderá ser usado como ferramenta prognóstica, ajudando o paciente,

por exemplo, a buscar alternativas terapêuticas mais eficazes contra essa forma da doença. Além disso, cerca de 28,6% dos pacientes com LD desenvolvem lesão mucosa (Turetz *et al.*, 2002) que é a forma mais agressiva entre as leishmanioses tegumentar (Lessa *et al.*, 2007) e que tem importante associação com a refratariedade ao antimonial (Lessa *et al.*, 2001). Esses dados, reforçam a necessidade de que seja desenvolvida uma ferramenta prognóstica que antecipe a informação sobre possíveis desfechos clínicos ou terapêuticos durante a leishmaniose.

A análise dos haplótipos é importante, pois, geram resultados mais robustos, já que esses se referem a todos os SNPs juntos que foram observados em cada um dos alelos dos isolados, e possibilita a mensuração da quantidade de alelos que cada isolado apresentou, permitindo que o número de cepas envolvidas na infecção seja inferido (infecção mono ou policlonal). Em teoria, um único alelo seria um indicativo de infecção monoclonal por cepas homozigotas para o locus em questão, a presença de dois alelos representaria uma infecção monoclonal por uma cepa heterozigota ou policlonal e, por fim, a presença de mais de dois alelos para um único locus seria um indício de infecção policlonal ou de aneuploidia.

Foram avaliados o número de isolados, recuperados de pacientes com LC, LM e LD, que tinham indícios de infecção policlonal em, pelo menos, um dos seis loci testados. Isolados de dois pacientes com LC tinham 3 alelos, apenas isolado de um paciente de LM tinha 3 alelos e isolados de cinco pacientes com LD apresentaram mais de 2 alelos, sendo que um dos isolados apresentou 4 alelos em um dos loci. A razão de risco para que um paciente com infecção supostamente policlonal desenvolva a forma disseminada da

doença é 4,2, com intervalo de confiança variando de 1,5 até 12,1 e valor P (*Fisher's exact test*) igual a 0,01.

Talvez, a leishmaniose disseminada seja causada por uma infecção policlonal. Camundongos previamente infectados com um pequeno número de amastigotas de *L. major* e posteriormente inoculados com *L. infantum* apresentaram uma manifestação clínica mais exacerbada. Durante a primeira infecção, se houver uma resposta do tipo TH2, o camundongo estará mais propício a uma disseminação da doença na infecção posterior (Nation *et al.*, 2012). Entre os pacientes descritos nesse trabalho, mais de 50% dos casos de leishmaniose disseminada apresentam indícios de infecção policlonal. É necessário, no entanto, que novas avaliações sejam feitas para confirmar esses achados e para tentar entender, se isso for confirmado, qual a relação entre a infecção policlonal e a leishmaniose disseminada. Os dados de Nation *et al.*, 2012, dão uma pista, mas não explicam totalmente o fenômeno descrito nesse trabalho, pois, no caso de uma infecção policlonal, ambas as cepas teriam sido aspiradas, simultaneamente, da lesão dos pacientes de Corte de Pedra. Interações competitivas entre diferentes cepas presentes durante uma co-infecção, entretanto, podem afetar a resposta imune do hospedeiro e ter um papel importante, determinando a imunopatologia das formas progressivas e destrutivas de LM (Cupolillo *et al.* 2003). Algumas causas subjacentes dessa resposta hiperérgica incluem os seguintes fatores: 1 - a resistência de alguns clones parasitários à eliminação e à persistência de antígenos "alérgicos" que causam uma resposta inflamatória de hipersensibilidade hiperérgica e; 2 - Fenômeno autoimune relacionado à reação cruzada entre antígenos de *Leishmania* e o tecido do hospedeiro (Cupolillo *et al.* 2003).

O segundo trabalho, intitulado “*The spatial and temporal distribution of American Tegumentary Leishmaniasis cases in northeastern Brazil*”, teve como objetivo maior mostrar como os casos de leishmaniose têm se distribuído na região de Corte de Pedra, em relação aos dados observados há quase 10 anos (Schriefer *et al.*, 2009). Até 2003, os casos de LM estavam concentrados na parte mais interna da região, enquanto que os casos de LD estavam espalhados por toda a área endêmica. Além disso, os casos de LD que também estavam concentrados na área mais continental da região foram, posteriormente, espalhando-se em direção à região costeira (Schriefer *et al.*, 2009; Jirmanus *et al.*, 2012).

Diferenças na distribuição geográfica de formas clínicas distintas de LTA têm sido reconhecidas nos países andinos da América do Sul. Esse fenômeno parece ser determinado pela prevalência de várias espécies de *Leishmania* em ambientes diversos. Por exemplo, no Equador e no Peru, as terras altas abrigam quase que exclusivamente casos de LC, causados por diversas espécies de *Leishmania*, enquanto que a LM é, principalmente, limitada à Floresta Amazônica e é causada pela *L. braziliensis* (Lucas *et al.*, 1998). No presente trabalho, os principais achados foram: 1 – os casos de LC se distribuem de forma diferente dos casos de LM e de LD em Corte de Pedra; 2 – Os casos de LD e LM apresentam, nesse momento, a mesma distribuição na área endêmica; 3 – A região noroeste da área endêmica é onde está concentrado o maior número de casos de LC e LD e menor número de casos de LM; 4 – Os casos de LM e LD mantiveram sua distribuição estável durante os três anos de avaliação, enquanto que os casos de LC mudaram seu perfil de distribuição na área endêmica entre o segundo e o terceiro anos do estudo; 5 –

Essa mudança na ocorrência dos casos de LC fez com que as distribuições entre os casos de LC e LM, e LC e LD se tornassem diferentes, a partir do terceiro ano do estudo.

A realização desse trabalho foi motivada pela necessidade de entendermos a dinâmica da distribuição dos casos de LTA em Corte de Pedra nos últimos dez anos, em relação ao que foi previamente descrito (Schriefer *et al.*, 2009). No presente trabalho, foi a distribuição dos casos de LC que mais chamou a atenção. Esses casos mudaram sua distribuição nos últimos três anos, tornando-se diferentes dos casos de LM e LD. Essa mudança pode ser reflexo da introdução de uma nova cepa na região ou uma mutação importante em cepas pre-existentes na área geográfica estudada, que pode ter interferido na relação entre cepas, vetores e reservatórios, promovendo, assim, um impacto na distribuição dos casos de LC. Cupolillo *et al.*, (2003), mostraram que a distribuição geográfica da *L. braziliensis* reflete a plasticidade desses parasitas no que se refere a adaptação em diferentes espécies de vetores (ou populações de vetores) envolvidos no ciclo de transmissão. É importante que seja dada uma atenção especial aos novos casos de LC localizados no noroeste da área endêmica, região onde houve um expressivo aumento do número de casos de LC nos últimos 3 anos, para determinar se a mudança na distribuição, causada, provavelmente, pela presença de uma nova cepa, também não será acompanhada pela mudança na imunopatogênese da doença ou na resposta terapêutica dos pacientes.

Os casos de LM distribuem-se, hoje, toda a extensão da área endêmica, apresentando, portanto, uma distribuição semelhante à dos casos de LD, e divergindo da distribuição dos casos de LM ocorridos à dez anos, que,

praticamente, só ocupavam a parte ocidental da região endêmica (Schriefer *et al.*, 2009). Em 1996, os casos LD também eram concentrados na porção mais a oeste da região endêmica, e, entre esse período e o ano de 2003, disseminou-se por toda a área. Parece claro para nós que os casos de LM seguiram o mesmo padrão de distribuição apresentado pelos casos de LD há dez anos, e que, provavelmente, os casos de LM foram motivados pelos mesmos fatores que promoveram a migração dos casos de LD (Schriefer *et al.*, 2009).

A avaliação da distribuição dos novos casos de ATL deve ser continuada, a fim de monitorar as constantes mudanças que ocorrem em Corte de Pedra. Essa avaliação deve ser simultânea à genotipagem dos isolados para que possamos entender, numa abordagem mais filogenética, qual o impacto das diferentes sub-populações de *L. braziliensis* na dinâmica da leishmaniose na região. Essa vigilância deve, no entanto, ser acompanhada por um estudo ecológico na região, para que sejam avaliadas as possíveis mudanças no perfil dos vetores e reservatórios. Por fim, é importante que seja dada uma atenção especial às mudanças na imunopatogênese e respostas terapêuticas no hospedeiro humano, como consequências de possíveis mudanças na carga genética da cepa parasitária.

Como perspectivas futuras, estamos analisando os resultados da genotipagem de 126 isolados, obtidos entre 2008 e 2011, usando os mesmos loci avaliados no presente trabalho. Alguns legados imediatos dessas análises incluem: 1 – a confirmação dos achados de genotipagem apresentados no trabalho anterior, usando um painel maior de isolados; 2 – estabelecimento da ligação dos genótipos desses 126 isolados com a posição no tempo e no

espaço bem como com a forma clínica da doença; 3 – o uso dos genótipos, junto com as informações da distribuição dos casos, para confirmar a hipótese de que a doença ocorre através de pequenos surtos em toda a área endêmica; 4 - avaliação do papel dos genótipos na refratariedade dos parasitos ao antimonial.

Trabalhos futuros podem utilizar as informações dos genótipos parasitários para esclarecer alguns fenômenos que têm sido observados em Corte de Pedra nos últimos anos. Uma pergunta que é consequência direta desse trabalho refere-se à infecção policlonal associada aos casos de LD. Na região Noroeste de Corte de Pedra, foi encontrado uma alta densidade de LC e LD e sem diferença estatística (Cuzick and Edwards) na sua distribuição. Seria importante avaliar se as pessoas com LD não estão, também, sendo co-infectadas com cepas teoricamente menos virulentas e que estariam associadas à forma cutânea de leishmaniose. Essa abordagem também explicaria o fato de algumas pessoas que procuram o posto com lesão clássica da LC desenvolverem a forma disseminada da doença, depois que o tratamento se inicia. A hipótese é que estaria havendo uma co-infecção de cepas associadas à LC com cepas resistentes ao antimonial associadas à LD. A morte das cepas susceptíveis favoreceria a disseminação das cepas resistentes no corpo do paciente, talvez, por diminuir o número de cepas que estariam competindo pelas células hospedeiras. A genotipagem dos isolados também pode ser útil para que se possa compreender por que alguns pacientes desenvolvem a forma de LD clássica, apresentando uma lesão ulcerada que inicia a doença, seguido do surgimento de várias pápulas

espalhadas pelo corpo, enquanto que outros pacientes procuram o posto com a LD, mas, ao invés de pápulas, apresentam várias lesões ulceradas.

7. CONCLUSÃO

1 - Os dados apresentados nesse trabalho, mostraram que a LD em Corte de Pedra é fortemente associada à cepa de *L. braziliensis* infectante. É provável que, usando-se um número de isolados maior, e obtidos durante um intervalo de tempo menor, será encontrada associação entre cepas parasitárias e as outras duas formas de leishmaniose, a cutânea e a mucosa.

2 - Em relação a distribuição dos casos em Corte de Pedra, foi observado que, embora os casos de LC, LM e LD pareçam ser bem distribuídos por toda a área endêmica, a avaliação da distribuição desses casos, respaldadas por análises estatísticas, mostrou que os casos de LC se distribuem de forma distinta, tanto dos casos de LD quanto dos casos de LM.

3 – A distribuição de LC distinguiu-se das distribuições de LM e LD a partir do terceiro ano do estudo.

4 - Por fim, o padrão de distribuição dos casos de LTA observados até 2003 difere do padrão atual, mostrando que a LTA em Corte de Pedra está constantemente mudando o seu perfil de distribuição.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A. K. (2008). *Imunologia celular e molecular*. Elsevier. Rio de Janeiro. **1**: 564.
2. Adai, V., I. Maes, et al. (2011). "Multilocus genotyping reveals a polyphyletic pattern among naturally antimony-resistant *Leishmania braziliensis* isolates from Peru." *Infect Genet Evol* **11**(8): 1873-1880.
3. Alcais, A., L. Abel, et al. (1997). "Evidence for a major gene controlling susceptibility to tegumentary leishmaniasis in a recently exposed Bolivian population." *Am J Hum Genet* **61**(4): 968-979.
4. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2005). "Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis." *Immunol Lett* **101**(2): 226-230.
5. Ashford, R. W. (2000). "The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses." *Int J Parasitol* **30**(12-13): 1269-1281.
6. Awasthi, A., R. K. Mathur, et al. (2004). "Immune response to *Leishmania* infection." *Indian J Med Res* **119**(6): 238-258.
7. Azulay, R. D. and D. R. Azulay Junior (1995). "Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis." *Int J Dermatol* **34**(5): 303-307.
8. Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." *Infect Immun* **70**(12): 6734-6740.
9. Bafica, A., F. Oliveira, et al. (2003). "American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline." *Int J Dermatol* **42**(3): 203-207.
10. Bailey, H. and W.J. Bishop, *Leishman-Donovan bodies and donovianiasis; Sir William Boog Leishman, 1865-1926; Charles Donovan, 1863-1951*. *Br J Vener Dis*, 1959. **35**(1): p. 8-9.
11. Barral, A. and J. Costa (2011). "Leishmanias e a Leishmaniose tegumentar nas américas". Ed. A. Barral and J. Costa. CYTED, CNPq. Salvador. **1**: 248.
12. Bhunia, G. S., S. Kesari, et al. (2010). "Influence of topography on the endemicity of Kala-azar: a study based on remote sensing and geographical information system." *Geospat Health* **4**(2): 155-165.

13. Bittencourt, A. L. and A. Barral (1991). "Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(1): 51-56.
14. Bomfim, G., C. Nascimento, et al. (1996). "Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis." Exp Parasitol **84**(2): 188-194.
15. Bradley, D. J., B. A. Taylor, et al. (1979). "Regulation of Leishmania populations within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse." Clin Exp Immunol **37**(1): 7-14.
16. Cabrera, M., M. A. Shaw, et al. (1995). "Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis." J Exp Med **182**(5): 1259-1264.
17. Carvalho, E. M., O. A. Bacellar, et al. (1988). "Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania." Braz J Med Biol Res **21**(1): 85-92.
18. Carvalho, E. M., A. Barral, et al. (1994). "Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis." Acta Trop **56**(4): 315-325.
19. Castellucci, L., L. H. Cheng, et al. (2005). "Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil." Am J Trop Med Hyg **73**(1): 69-73.
20. Castellucci, L., S. E. Jamieson, et al. (2011). "FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil." Genes Immun **12**(7): 589-594.
21. Cortes, S., Y. Vaz, et al. (2012). "Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region." Vet Parasitol.
22. Costa, J. M., P. D. Marsden, et al. (1986). "Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases." J Trop Med Hyg **89**(6): 319-323.
23. Cupolillo, E., L. R. Brahim, et al. (2003). "Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil." J Clin Microbiol **41**(7): 3126-3132.

24. Da-Cruz, A. M., M. P. de Oliveira, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **91**(2): 225-229.
25. Dantas-Torres, F. (2007). "The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis." Vet Parasitol **149**(3-4): 139-146.
26. de Almeida, M. C., V. Vilhena, et al. (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review." Mem Inst Oswaldo Cruz **98**(7): 861-870.
27. Desjeux, P. (1992). "Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects." World Health Stat Q **45**(2-3): 267-275.
28. Faria, D. R., K. J. Gollob, et al. (2005). "Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis." Infect Immun **73**(12): 7853-7859.
29. Gangneux, J. P., J. Menotti, et al. (2003). "Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections in an area of nonendemicity." J Clin Microbiol **41**(4): 1419-1422.
30. Gelanew, T., I. Cruz, et al. (2011). "Multilocus microsatellite typing revealed high genetic variability of Leishmania donovani strains isolated during and after a Kala-azar epidemic in Libo Kemkem district, northwest Ethiopia." Microbes Infect **13**(6): 595-601.
31. Hamarsheh, O. (2011). "Distribution of Leishmania major zymodemes in relation to populations of Phlebotomus papatasi sand flies." Parasit Vectors **4**: 9.
32. Herwaldt, B. L. (1999). "Leishmaniasis." Lancet **354**(9185): 1191-1199.
33. Jirmanus, L., M. J. Glesby, et al. (2012). "Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of Leishmania (Viannia) braziliensis transmission over a 20-year period." Am J Trop Med Hyg **86**(3): 426-433.
34. Kassem, H. A., J. Siri, et al. (2012). "Environmental factors underlying spatial patterns of sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with leishmaniasis in southern Sinai, Egypt." Acta Trop **123**(1): 8-15.

35. Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-615.
36. Kuhls, K., L. Keilonat, et al. (2007). "Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis." Microbes Infect **9**(3): 334-343.
37. Laskay, T., G. van Zandbergen, et al. (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?" Trends Microbiol **11**(5): 210-214.
38. Laurent, T., S. Rijal, et al. (2007). "Epidemiological dynamics of antimonial resistance in Leishmania donovani: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal." Infect Genet Evol **7**(2): 206-212.
39. Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony." Am J Trop Med Hyg **65**(2): 87-89.
40. Lessa, M. M., H. A. Lessa, et al. (2007). "Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects." Braz J Otorhinolaryngol **73**(6): 843-847.
41. Lucas, C. M., E. D. Franke, et al. (1998). "Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru." Am J Trop Med Hyg **59**(2): 312-317.
42. Machado, P., J. Kanitakis, et al. (2002). "Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis." Eur J Dermatol **12**(5): 449-451.
43. Machado, P. R., H. Lessa, et al. (2007). "Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis." Clin Infect Dis **44**(6): 788-793.
44. Marsden, P. D. (1986). "Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911)." Trans R Soc Trop Med Hyg **80**(6): 859-876.
45. Marsden, P. D., and T. C. Jones. (1985). "Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis". Coordinating ed., E. Chang and R.S. Bary. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

46. Maslow, J. N., M. E. Mulligan, et al. (1993). "Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms." Clin Infect Dis **17**(2): 153-162; quiz 163-154.
47. Mauricio, I. L., M. Yeo, et al. (2006). "Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD)." Int J Parasitol **36**(7): 757-769.
48. Murray, H. W., J. D. Berman, et al. (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-1577.
49. Nation, C. S., B. Dondji, et al. (2012). "Previous exposure to a low infectious dose of *Leishmania major* exacerbates infection with *Leishmania infantum* in the susceptible BALB/c mouse." Parasitol Res.
50. Ng, L. G., A. Hsu, et al. (2008). "Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites." PLoS Pathog **4**(11): e1000222.
51. Noyes, H. A., H. Reyburn, et al. (1998). "A nested-PCR-based schizodeme method for identifying *Leishmania* kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples and its application to the study of the epidemiology of *Leishmania tropica* in Pakistan." J Clin Microbiol **36**(10): 2877-2881.
52. Oumeish, O. Y. (1999). "Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective." Clin Dermatol **17**(3): 249-254.
53. Peters, N. C., J. G. Egen, et al. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-974.
54. Quaresma, P. F., G. M. Carvalho, et al. (2012). "Natural *Leishmania* sp. reservoirs and phlebotomine sandfly food source identification in Ibitipoca State Park, Minas Gerais, Brazil." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(4): 480-485.
55. Reiner, N. E., R. Lo, A. Llanos-Cuentas, H. Guerra, L. L. Button, and W. R. McMaster. 1989. "Genetic heterogeneity in Peruvian *Leishmania* isolates". Am. J. Trop. Med. Hyg. **41**: 416-421.
56. Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **31**(1): 143-148.

57. Rioux, J. A., G. Lanotte, et al. (1990). "Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification." Ann Parasitol Hum Comp **65**(3): 111-125.
58. Rotureau, B., C. Ravel, et al. (2006). "Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples." J Clin Microbiol **44**(2): 459-467.
59. Saravia, N. G., I. Segura, et al. (1998). "Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of Leishmania (Viannia) in Colombia." Am J Trop Med Hyg **59**(1): 86-94.
60. Schonian, G., L. Schnur, M. el Fari, L. Oskam, A. A. Kolesnikov, W. Sokolowska-Kohler, and W. Presber. 2001. "Genetic heterogeneity in the species *Leishmania tropica* revealed by different PCR-based methods". Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. **95**: 217-224.
61. Schriefer, A., L. H. Guimaraes, et al. (2009). "Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil." Emerg Infect Dis **15**(6): 871-876.
62. Schriefer, A., A. L. Schriefer, et al. (2004). "Multiclonal Leishmania braziliensis population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis." Infect Immun **72**(1): 508-514.
63. Schwenkenbecher, J. M., T. Wirth, et al. (2006). "Microsatellite analysis reveals genetic structure of Leishmania tropica." Int J Parasitol **36**(2): 237-246.
64. Shimabukuro, P. H., T. R. da Silva, et al. (2010). "Geographical distribution of American cutaneous leishmaniasis and its phlebotomine vectors (Diptera: Psychodidae) in the state of Sao Paulo, Brazil." Parasit Vectors **3**: 121.
65. Struelens, M. J. (1996). "Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems." Clin Microbiol Infect **2**(1): 2-11.
66. Tanczos, B., N. Balogh, et al. (2012). "First record of autochthonous canine leishmaniasis in Hungary." Vector Borne Zoonotic Dis **12**(7): 588-594.

67. Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, et al. (1993). "Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania." Ann Parasitol Hum Comp **68**(2): 104-106.
68. Toledo, A., J. Martin-Sanchez, et al. (2002). "Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure." Mol Biochem Parasitol **119**(2): 257-264.
69. Turetz, M. L., P. R. Machado, et al. (2002). "Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil." J Infect Dis **186**(12): 1829-1834.
70. Velez, I. D., L. M. Carrillo, et al. (2012). "An epidemic outbreak of canine cutaneous leishmaniasis in Colombia caused by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*." Am J Trop Med Hyg **86**(5): 807-811.
71. Ze manova, E., M. Jirku, et al. (2007). "The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing." Int J Parasitol **37**(2): 149-160.

9. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS.

Objetivo do Projeto: Uso de marcadores polimórficos de DNA randomicamente amplificados (“Randomly amplified polymorphic DNA”, RAPD) e tipagem de *loci* baseada em sequenciamento (“Multilocus sequence typing”, MLST) para distinguir cepas de *Leishmania braziliensis* envolvidas com doença humana em Corte de Pedra.

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.
Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

Convite e Objetivo:

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm diferentes formas de leishmaniose. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®).

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar se as leishmanias causadoras das diferentes formas de leishmaniose são iguais ou diferentes. Para isto obteremos as leishmanias responsáveis por sua doença em material da ferida, pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele e por aspiração da borda da ferida.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, os procedimentos para obtenção das leishmanias serão os mesmos realizados para o diagnóstico normal em doentes não participantes do estudo. Ou seja, além de ser examinado por um médico clínico, será realizada biópsia e aspirado da lesão, bem como teste intradérmico, e tirados 5 ml de sangue para sorologia, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para diagnóstico da sua doença será feita com anestesia para você não sentir dor. Uma parte deste material de biópsia e do material de aspirado será usada para o diagnóstico e a outra para os estudos sobre a leishmania. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para a pesquisa será destruído.

Análise do material biológico. Uma parte do material coletado durante a biópsia e a aspiração feitas em sua ferida servirá para o estudo da leishmania. Serão empregados

dois testes com o objetivo de caracterizar geneticamente a leishmania que está causando a sua doença e depois compará-la com as leishmanias que estão causando doença nas outras pessoas desta região. Para um dos testes, o RAPD (DNA polimórfico randomicamente amplificado) o aspirado e a biópsia triturada serão colocados num líquido especial que permite o crescimento da leishmania. Depois da leishmania crescida, ou seja, multiplicada, será extraído o DNA dela. É este DNA que será caracterizado pelo RAPD. O resultado desta caracterização se chama genótipo. Finalmente, os genótipos das leishmanias de outros pacientes desta região serão comparados com o genótipo da que está causando a sua doença. O outro teste se chama MLST (Tipagem de loci baseada em sequenciamento). Ele também tem como objetivo identificar os genótipos das leishmanias. No MLST não é necessário crescer a leishmania antes de se fazer o teste, ele pode ser realizado diretamente na biópsia e no aspirado. O RAPD e o MLST serão realizados em conjunto com o objetivo de confirmar os resultados e também de torná-los mais precisos.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e confirmação do diagnóstico sua participação no estudo acabará em 2 ou 3 dias. Todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecida gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: O tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão, participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você. De qualquer forma o risco de hemorragia ou infecção durante as biópsias e aspirados de lesão serão minimizados pela limpeza extensa da superfície mucosa ou cutânea das lesões com anti-sépticos antes dos procedimentos, pelo uso de instrumentos e materiais estéreis, e aplicando-se pressão com gaze nos locais onde foram realizados os procedimentos para estancar o sangramento. Materiais descartáveis serão usados em todos os procedimentos. O risco de reflexo vago-vagal será minimizado realizando-se os procedimentos com você deitado. Você também deverá se alimentar antes do procedimento para evitar tonturas ou perda transitória da consciência por causa do reflexo vago-vagal. Também será reservado um leito que você poderá usar para repousar e se recuperar caso sinta tonturas durante os procedimentos. Quaisquer reações adversas que você apresente devido ao teste cutâneo de Montenegro serão tratadas com pomadas anti-inflamatórias de corticosteróides (hidrocortisona 1%) no momento da leitura do exame (48 a 72 horas após a aplicação). Em caso de reação adversa ao teste de Montenegro você também receberá pomada adicional para que em casa você possa passá-la na pele, no local do teste três vezes ao dia por 3 a 5 dias, conforme necessário.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: Pode não haver qualquer benefício pessoal para você, como consequência de sua participação neste estudo. Contudo, nós esperamos que, no futuro, a sociedade possa se beneficiar deste estudo por ele resultar numa melhor compreensão desta doença parasitária freqüente, que poderá, inclusive, ajudar no desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone (71) 3237-7353: Dr. Albert Schriefer, Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, através do endereço que encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone (71) 3247-4634.

Consentimento: Eu li ou leram para mim as informações deste termo de consentimento livre e esclarecido acima. O Dr. Schriefer ou um representante dele explicou o estudo para mim e respondeu a todas as minhas dúvidas. Me foram listados também os riscos e incômodos a que serei submetido, bem como os possíveis benefícios gerados por este estudo.

Também me foi dito que eu não tenho que tomar parte deste estudo e que eu posso me recusar a participar a qualquer momento.

A equipe médica do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos estará disponível para quaisquer cuidados médicos que se mostrem necessários devido a injúrias resultantes da minha participação neste estudo. Além do mais, o Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos, ou o patrocinador do estudo, cobrirá quaisquer despesas resultantes de cuidados médicos relativos à minha participação neste estudo.

Os meus direitos como participante da pesquisa me foram esclarecidos e eu, voluntariamente, consinto na minha participação no estudo. Me foram esclarecidos o estudo e as razões de sua realização. Eu receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido para arquivar, como documentação da minha participação como voluntário neste estudo.

Assinatura ou impressão do participante

Data

Assinatura ou impressão do responsável* / Data

Nome do responsável*

Assinatura ou impressão da testemunha / Data

Nome da testemunha

*Requerido apenas se o participante não for competente para tomar decisões

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu discuti os pontos acima com o participante do estudo ou seu representante legal. É da minha opinião que o participante entende os riscos, benefícios e obrigações envolvidos em sua participação neste projeto de pesquisa.

Assinatura do investigador

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE
IDADE
(MENORES DE 18)**

Nome do Projeto: O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania braziliensis* NO DESFECHO CLÍNICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS LEISHMANIOSES TEGUMENTARES POR ESTES PARASITOS.

Objetivo do Projeto: Uso de marcadores polimórficos de DNA randomicamente amplificados (“Randomly amplified polymorphic DNA”, RAPD) e tipagem de *loci* baseada em sequenciamento (“Multilocus sequence typing”, MLST) para distinguir cepas de *Leishmania braziliensis* envolvidas com doença humana em Corte de Pedra.

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.
Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

Convite e objetivo: Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm diferentes formas de leishmaniose. A principal doença que nós estudaremos é chamada leishmaniose, mas nós daremos atenção a outras infecções.

Nós perguntaremos a você sobre a sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de duas colheres de sopa ou uma xícara de café pequena) de seu braço usando uma seringa e agulhas descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós também iremos fazer um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Se você tiver a ferida nós também vamos precisar fazer uma pequena aspiração e remover um pequeno pedaço da pele ou do nariz para confirmar se você tem a doença. Isso será feito por um médico no posto de saúde, com anestesia local para evitar dor. Para fazer o estudo nós iremos usar o mesmo material que você doou para o diagnóstico de sua doença acima. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre a doença, entendê-la e assim poderemos preveni-la no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Assinatura ou impressão do participante

Data

Assinatura ou impressão do responsável* / Data

Nome do responsável*

Assinatura ou impressão da testemunha / Data

Nome da testemunha

*Requerido apenas se o participante não for competente para tomar decisões

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Eu discuti os pontos acima com o participante do estudo ou seu representante legal. É da minha opinião que o participante entende os riscos, benefícios e obrigações envolvidos em sua participação neste projeto de pesquisa.

Assinatura do investigador