



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA ENDÊMICA DAS
INFECÇÕES PELA *Leishmania (Viannia)*
*braziliensis***

JULIANA ALMEIDA SILVA

Dissertação de Mestrado

Salvador-Bahia
2013

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.**

S586 Silva, Juliana Almeida

Avaliação da estrutura endêmica das infecções pela
Leishmania (Viannia) braziliensis / Juliana Almeida Silva.-
Salvador, 2013.

98 f.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da
Bahia. Faculdade de Medicina da Bahia, 2013.

1. *Leishmania*. 2. Endemia. 3. Leishmaniose. I.
Schriefer, Nicolaus Albert Borges. II. Universidade Federal
da Bahia. III. Título.

CDU 616.993.161



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA ENDÊMICA DAS
INFECÇÕES PELA *Leishmania (Viannia)*
*braziliensis***

JULIANA ALMEIDA SILVA



Professor-orientador: Nicolaus Albert B. Schriefer

Dissertação apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde, da área de concentração em Epidemiologia Molecular.

Salvador-Bahia
2013

COMISSÃO EXAMINADORA

1

 VIRTUTE SPIRITUS 1808	UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA Fundada em 18 de Fevereiro de 1808 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde Largo do Terreiro de Jesus, s/n – Pelourinho 40026-010 Salvador, Bahia, Brasil Telfax: (55) (71) 3283-5582 – 3283-5567 www.fameb.ufba.br pos.saude@ufba.br	 1808 SAN REATQUE SERVARE
---	---	--

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

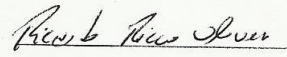
1 Aos 22 dias do mês de fevereiro de 2013, no horário das 09:00 horas, nas dependências do
2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da
3 Universidade Federal da Bahia, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da
4 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO DA ESTRUTURA ENDÊMICA DAS INFECÇÕES
5 PELA *Leishmania (Viannia) braziliensis*" apresentada pela pós-graduanda **Juliana Almeida**
6 **Silva**. A Comissão Examinadora aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em
7 Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-
8 Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em
9 Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por: Prof. Dr. Ricardo
10 Riccio Oliveira, Doutor em Imunologia - UFBA (Presidente); Profa. Dra. Luciana Santos
11 Cardoso, Doutora em Imunologia – UNEB; Prof. Dr. Marcelo Távora Mira, Doutor em
12 Bioquímica – PUCPR e Prof. Dr. Nicolaus Albert Schriefer, Doutor em Imunologia – UFBA
13 (suplente). Após a apresentação da dissertação, a Comissão Examinadora realizou a arguição
14 que foi respondida SATISFAZORIAMENTE (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pela
15 mestranda. A dissertação apresentada foi considerada APROVADA (aprovada ou
16 reprovada). E, para constar do processo de conclusão de curso e de colação de grau¹, a
17 Comissão Examinadora lavrou a presente Ata que é assinada por todos os seus membros. A
18 Comissão Examinadora aprova a dissertação:

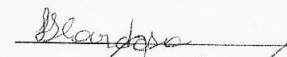
19 Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.

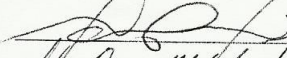
20 Sem recomendações de modificações da versão final.

21 **Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser**
22 **concluído o processo de outorga do título de mestre.**

23 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

24  Ricardo Riccio Oliveira (Presidente)

25  Luciana Santos Cardoso

26  Marcelo Távora Mira

27  Nicolaus Albert Schriefer (Suplente)

32 Ata Aprovada na Sessão do dia 22/02/2013

33
34 ¹ A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do
35 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da dissertação,
36 acompanhados de 4 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no **prazo máximo de 60 dias**.

FONTES FINANCIADORAS

NIH - National Institute of Health (Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02)

TMRC – Tropical Medicine Research Centers

INCT – DT – Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia de Doenças Tropicais

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

A lei da mente é implacável.
O que você pensa, você cria.
O que você sente, você atrai.
O que você acredita, torna-se realidade.

Buda

A Deus pelo discernimento e à minha Mãe, exemplo de vida, pela dedicação e incentivo, onde a amizade, carinho e a união estão sempre presentes. Obrigada pelo seu infinito amor.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, **Dr. Albert. Schriefer**, pela aceitação na sua equipe de pesquisa, dedicação, paciência, compreensão e confiança, sempre orientando e compartilhando seus conhecimentos de forma ímpar durante todo o projeto. Serei eternamente grata;

À Dr. Edgar Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia (SIM), por ter me acolhido no grupo e permitido o desenvolvimento do trabalho, e de outras atividades perante o grupo;

A Adriano Queiroz por todo apoio, valiosos ensinamentos e discussões durante a construção do trabalho;

À Rosana Sousa pelos ensinamentos e ideias compartilhadas, além dos bons momentos convívio durante o desenvolvimento do trabalho;

À Silvana Silva e Viviane Andrade pela excelente amizade e compartilhamento de conhecimentos e de momentos agradáveis não só durante a realização desse trabalho, como em outras ocasiões;

À Izabella Moura, aluna de Iniciação Científica, pela força, auxílio nas análises e discussões científicas;

Aos colegas e amigos do SIM pelo convívio harmônico no laboratório, em especial Angela Giudice, Anselmo Souza, Kátia Salgado, Lilian Medina e Thaís Delavechia pela força, incentivo e alegria compartilhada por todos;

À Ednaldo Lago pelo trabalho realizado no posto de saúde de Corte de Pedra e pela coleta dos dados de GPS dos pacientes que fizeram parte do nosso estudo;

Aos pacientes e a toda equipe de Corte de Pedra, pessoas que trabalham muito para que os nossos estudos sejam realizados;

A todos os professores e funcionários do PPgCS pelo comprometimento, proporcionando a formação de grandes profissionais;

Aos meus familiares e amigos pelas palavras de alento, companheirismo e pela força, especialmente minha mãe Tereza, meu irmão Rodrigo, minha tia Juvelita e minha amiga-irmã Hitomi;

A Deus e a Nsr^a Aparecida por iluminarem minha mente e pela sustentação diante dos obstáculos;

Enfim, agradeço a todos que contribuíram com o meu trabalho.

Lista de Abreviaturas

ATL: *American tegumentary leishmaniasis*

CL: *Cutaneous leishmaniasis*

DL: *Disseminated leishmaniasis*

DNA: Ácido desoxirribonucléico

IFN- γ : Interferon gamma

INDEL: Inserção ou deleção de nucleotídeo

LIT: Meio de cultura Luria Bertani

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Leishmaniose disseminada

LM: Leishmaniose mucosa

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

MgCl₂: Cloreto de magnésio

μ g: Micrograma

μ l: Microlitro

mM: Milimolar

ML: *Mucosal leishmaniasis*

NNN: Meio de cultura Nicolle, Novy e McNeal

pb: Pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

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

RAPD: *Random amplification of polymorphic DNA*

SNP: *Single nucleotide polymorphisms*

TH1: Linfócitos T auxiliares tipo1

TNF: Fator de necrose tumoral

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Posição cromossômica dos seis *loci* polimórficos identificados na *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de pedra. O genoma completo da *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOHM/BR/75/M2904 foi utilizado, acessado no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> 50
- Tabela 2.** Lista de SNPs / Indels encontrados por *locus* estudado da *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de Pedra e frequências de seus alelos na amostra. 52
- Tabela 3.** Lista dos haplótipos encontrados em pelo menos 10% dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de Pedra para cada *locus* estudado. 53
- Tabela 4.** Frequência de haplótipos em seis *loci* polimórficos de 35 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra – BA entre 1992 - 2001. 56
- Tabela 5.** Frequência de haplótipos no *locus* CHR 24/3074 de 94 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra – BA entre 2008 e 2011. 57
- Tabela 6.** Distribuição setorial das frequências do haplótipo ACAT do *locus* CHR 24/3074 nos quadrantes de Corte de Pedra – BA entre 2008 e 2011. 69

Tabela 7. Frequência anual dos quatro haplótipos mais comuns do *locus* CHR 24/3074 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA, entre 2008 e 2011.

70

Lista de Figuras

- Figura 1.** Padrões eletroforéticos de amplicons gerados a partir do DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, gerados por protocolos de RAPD previamente publicados (separadamente representados nos painéis A, B e C) ⁽³⁰⁾. 45
- Figura 2.** Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém-diagnosticado em Corte de Pedra. 58
- Figura 3.** Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 59
- Figura 4.** Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 59
- Figura 5.** Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 60

Figura 6. Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 61

Figura 7. Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 61

Figura 8. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 62

Figura 9. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 63

Figura 10. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 63

Figura 11. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 64

Figura 12. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 65

Figura 13. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. 65

Figura 14. Distribuição espacial dos 4 haplótipos mais comuns no *locus* CHR 24/3074 entre 2008 e 2011 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA. 67

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

I. Resumo	19
II. Objetivos	21
II.1. Geral	21
II.2. Específicos	21
III. Introdução	23
IV. Fundamentação Teórica	25
IV.1. Histórico e Sumário do Gênero <i>Leishmania</i> e seus vetores	25
IV.2. Leishmaniose Tegumentar Americana	27
IV.3. Ciclo Biológico e Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana	31
IV.4. Aspectos Clínicos e Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana causados pela <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	34
IV.5. Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra-BA	36
IV.6. Endemicidade da Leishmaniose Tegumentar Americana	38
IV.7. Clonalidade das infecções na Leishmaniose Tegumentar Americana	39
V. Hipótese	42
VI. Justificativa	43

VII. Desenho do Estudo e Métodos	44
VII.1. Área de Estudo	44
VII.2. Desenho do Estudo	44
VII.3. População de Estudo	44
VII.3.1. Definição de Casos	45
VII.3.2. Critérios de Inclusão e Exclusão	46
VII.3.3. Amostra	46
VII.3.4. Obtenção dos isolados parasitários e estoque de DNA genômico de <i>L. (V) braziliensis</i>	47
VII.3.5. Clonagem de fragmentos de DNA Genômico de <i>L. (V) braziliensis</i> amplificados por PCR	47
VII.3.6. Identificação e caracterização de <i>loci</i> polimórficos na <i>L. (Viannia) braziliensis</i> causadora de Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra	50
VII.3.7. Distribuição Geográfica dos Casos de LTA em Corte de Pedra – BA	51
VII.3.8. Análise Estatística	52
VIII. Resultados	55
VIII.1. Avaliação da clonalidade nos isolados de <i>L. (Viannia) braziliensis</i> obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra	55
VIII.2. Avaliação da agregação têmporo-espacial de casos de LC, LM e LD em Corte de Pedra – BA	57
VIII.3. Avaliação da agregação têmporo-espacial da LTA em	

Corte de Pedra - BA	64
VIII.5 Distribuição têmporo-espacial dos haplótipos mais comuns do <i>locus</i> CHR 24/3074 em Corte de Pedra, entre 2008 e 2011	66
IX. Discussão	71
X. Conclusões	80
XI. Referências	82
XII. Anexos	89

I. RESUMO

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) pode resultar de infecções humanas com *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o qual é responsável por três formas de doença: leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM) e disseminada (LD). As LC, LM e LD podem ser encontradas em Corte de Pedra (CP), Bahia / Brasil. O objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos de manutenção da endemicidade da LTA em CP. Foi verificado se os casos humanos de LTA nesta região ocorrem por meio de surtos ou de casos esporádicos. No período de 2008 a 2011, 47 casos de LC, 35 de LM e 47 de LD (129 LTA) foram incluídos no estudo. As coordenadas geográficas dos locais de moradia desses pacientes foram coletadas por GPS e plotadas numa foto de satélite de alta definição da região e geo-referenciada, usando o sistema de informação geográfica (SIG). Cada forma de LTA foi analisada separadamente. Para cada caso novo de uma forma de LTA diagnosticado (ex. LC, LM e LD), a distância dos casos anteriores e que ocorreram nos 3, 6 e 12 meses anteriores, foram calculados usando a ferramenta SIG. Em seguida, foi avaliada a correlação entre a frequência de casos recentes próximos aos casos novos diagnosticados e as distâncias destes novos casos diagnosticados. De forma geral e na maioria dos estratos considerados, os casos de LC e LD mostraram uma correlação inversa significativa entre as frequências de casos recentes e a distâncias dos casos novos diagnosticados, sugerindo que, para estas formas de doença e em CP, os surtos são mais frequentes do que os casos esporádicos. Os casos de LM não apresentaram correlações sugestivas de agrupamento da doença. Isto sugere que a LM possivelmente ocorre como forma de doença esporádica, embora uma amostragem maior seria necessária para reforçar esta conclusão. Procurou-se também trazer a luz do conhecimento a clonalidade destas infecções de dentro do hospedeiro. Na avaliação preliminar, foram cultivados e genotipados 94 parasitos obtidos de pacientes com LTA incluídos no estudo. Na caracterização genotípica, foi realizado o sequenciamento de um *locus* polimórfico, localizado a partir da posição 3074 do cromossomo 24. Em 87% dos isolados testados, apenas 1 ou 2 haplótipos de SNP e indels foram detectados no locus CHR24/3074, sugerindo que estas infecções apresentaram um ou dois clones predominantes de *L. (V.) braziliensis*. Entretanto, estas análises precisam ser expandidas para os materiais biopsiados, os quais refletem melhor o que ocorre no tecido do hospedeiro, particularmente devido à tendência de alguns clones parasitários se adaptarem melhor ao cultivo *in vitro* do que outros. Finalmente, avaliou-se a distribuição dos 4 haplótipos mais frequentes na população de *L. (V.) braziliensis* previamente genotipada. A análise visual dos mapas plotados com os haplótipos indicou uma ampla dispersão dos 4 haplótipos na área endêmica. A falta de agregação dos haplótipos na área de estudo sugere que esses haplótipos iniciaram a sua dispersão alguns anos atrás e isso permitiu a eles ocuparem toda a região de CP. A outra possibilidade é que talvez o *locus* CHR24/3074 seja conservado demais para distinguir a população *L. (V.) braziliensis* estudada. De forma geral, o cenário que foi descrito aqui é de infecções humanas oligoclonais, os quais ocorreram a partir de surtos de LC e LD, e de casos esporádicos de LM.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Distribuição Geográfica, Endemia.

ABSTRACT

American tegumentary *Leishmaniasis* (ATL) may result from human infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which causes three forms of disease: cutaneous (CL), mucosal (ML) and disseminated *Leishmaniasis* (DL). CL, ML and DL can be found in Corte de Pedra (CP), Bahia / Brazil. In the present study we aim to progressively clarify the mechanism of maintenance of the ATL endemics in CP. We assessed whether the human cases of ATL in that region occur in clusters indicative of outbreaks or isolated like sporadic cases. Forty-seven CL, 35 ML and 47 DL cases (129 ATL) were enrolled in CP between 2008 and 2011. Geographic coordinates of their living sites were collected by GPS and plotted onto a high definition, geo-referenced, satellite photograph of the region, using a geographic information system (GIS). Each form of ATL was analyzed separately. For each new diagnosed case of that particular form of ATL (i.e. CL, DL or ML), the distances for the preceding cases that occurred in the 3, 6 and 12 preceding months were calculated using the GIS tool. Then the correlation between the frequencies of recent cases closest to newly diagnosed cases and incremental distances to these newly diagnosed cases were evaluated. Overall, CL and DL showed significant inverse correlations between frequencies of recent cases and distances to newly diagnosed cases in most time strata taken into account, suggesting that outbreaks are more frequent than sporadic cases of these diseases in CP. ML did not display correlations suggestive of clusters of disease. This suggests that ML may occur as sporadic cases, although a larger sample is necessary for reinforcing this conclusion. We also sought to shed some light on the clonality of these infections within the host. In a preliminary evaluation, parasites of 94 of the ATL patients enrolled in this study were cultured and genotyped by sequencing of a polymorphic locus starting at position 3074 in chromosome 24 of the parasites of CP. Eighty seven percent of these isolates showed only 1 or 2 haplotypes of SNPs and indels detectable for the CHR24/3074 locus, suggesting that these infections presented one or two predominant clones of *L. (V.) braziliensis*. However this analysis needs to be expanded to biopsy specimens, which better reflect what occurs in the host tissues, particularly given the tendency of some clones of the parasite to adapt better to in vitro culturing than others. Finally, we evaluated the distribution of the four most frequent haplotypes found among the previously genotyped isolates. Visual analysis of the haplotypes plotted maps indicates a broad dispersion of 4 haplotypes on endemic area. The lack of aggregation of the haplotypes on the study area suggests that these haplotypes begun their dispersion on CP many years ago, and this abled to them to currently occupy all region of the study area or the CHR24/3074 locus is too conserved and unable to distinguish the studied *L. (V.) brasiliensis* sample. All in all, the picture that is emerging is of oligoclonal human infections, which occur in clusters for CL and DL, and as sporadic cases of ML.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, geographic distribution, endemic.

II. OBJETIVOS

II.1 GERAL

Avaliar a estrutura da endemia (se mantida por casos esporádicos ou por surtos) e a clonalidade das infecções humanas pela *L. (V) braziliensis*.

II.2 ESPECÍFICOS

- Genotipar os parasitas isolados de casos de LTA ocorridos em Corte de Pedra-Ba entre 1992 e 2001, e entre 2008 e 2011, através do sequenciamento de seis *loci* polimórficos (CHR 24/3074, CHR 26/765, CHR 28/ 195696, CHR 28/425451, CHR 32/1356278, CHR 35/335652) identificados na *L. (V) braziliensis* da região (Queiroz *et al.*, 2012);
- Identificar a frequência alélica para esses *loci* em cada isolado parasitário avaliado;
- Avaliar a distribuição dos casos de LTA recrutados e georeferenciados através do mapeamento em foto de satélite da região entre 2008-2011;
- Avaliar se a endemia é mantida por casos esporádicos dos clones de *L. (V) braziliensis* ou surtos, empregando-se os dados das genotipagens dos isolados da *L. (V) braziliensis* e do mapeamento dos casos acima;

- Avaliar a clonalidade das infecções humanas com base nas frequências de alelos encontradas nas genotipagens dos isolados parasitários.

III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um espectro de doenças que acometem, sobretudo, as regiões tropicais e subtropicais da Terra. Elas são causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas de animais para o homem por fêmeas de flebotomíneos infectadas (Gontijo *et al.*, 2003; Queiroz *et al.*, 2012; Schriefer *et al.*, 2004-2009). Constituem um problema de saúde pública global sendo considerado, pela OMS, e estão entre as seis infecções parasitárias mais frequentes no mundo. Estima-se que a incidência anual da doença está em 2.000.000 indivíduos e a prevalência em 12 milhões de casos (WHO, 2009).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada pelos parasitas dos complexos *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* no Novo Mundo (Marsden *et al.*, 1985). A LTA ocorre nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países do continente, com exceção do Uruguai e do Chile (Montenegro, 1926; Desjeux, 1999).

A incidência de LTA no Brasil tem aumentado nos últimos 20 anos, em praticamente todos os estados (Gontijo *et al.*, 2003; Jirmanus *et al.*, 2012). Eventualmente, em regiões já colonizadas, permaneceram áreas de matas nativas, onde animais silvestres são reservatórios de *Leishmanias* (Dourado *et al.*, 1989; Gontijo *et al.*, 2003; Negrão *et al.*, 2009).

Duas formas clássicas de LTA podem resultar da infecção humana por *Leishmania (Viannia) braziliensis*: leishmaniose cutânea localizada (LC) e mucosa (LM) (Murray *et al.*, 2005). A leishmaniose disseminada (LD) é uma

terceira forma, emergente, de LTA causada pela *L. (V.) brazilienses*, a qual ocorre, sobretudo, no nordeste do Brasil (Costa *et al.*, 1986; Turetz *et al.*, 2002). Essa variedade de desfechos de leishmaniose pode ser simultaneamente encontrada em Corte de Pedra, uma área endêmica para LTA situada no sudeste do estado da Bahia (Schriefer *et al.*, 2004).

LC, LM e LD são entidades distintas, apresentando diferentes características clínicas. LC é comumente limitada a uma ou poucas úlceras de pele frequentemente encontradas em membros (Murray *et al.*, 2005). Na LD, múltiplas lesões de pele (i. e. dez ou mais), ulceradas ou não, são simultaneamente encontradas em mais de uma área do corpo do paciente, as quais podem ser precedidas por período febril transitório (Carvalho *et al.*, 1994; Costa *et al.*, 1986; Turetz *et al.*, 2002). LM afeta, sobretudo, boca, nariz e mucosa faríngea. LM pode levar a lesões desfigurantes da face, além de destruição grave em boca, laringe e faringe (Marsden *et al.*, 1986; Murray *et al.*, 2005).

Os estudos que abordam a epidemiologia da LTA têm focado, sobretudo, distribuições de formas clínicas, bem como de espécies e cepas parasitárias em diferentes regiões do globo (Costa *et al.*, 2005; Schriefer *et al.*, 2004-2009). Apesar do conhecimento gerado por esses trabalhos, a literatura não aborda como é mantida a endemia em áreas afetadas, se por casos esporádicos ou por surtos, tão pouco se a infecção humana é monoclonal (uma cepa) ou policlonal (mais de uma cepa). Esses são conhecimentos muito importantes, para o controle das endemias para o melhor planejamento e logística de insumos e profissionais da saúde nas áreas afetadas, e para o manejo clínico dos casos de LTA.

IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

IV.1 Histórico e sumário do Gênero *Leishmania* e seus vetores

O primeiro parasita do gênero *Leishmania* foi identificado em 1885, na Índia, por Cunningham em casos de leishmaniose visceral (Cunningham, 1885 *apud*: Medeiros *et al.*, 1999). Em 1903, Leishman e Donovan descreveram o parasita como pertencente à família Trypanosomatidae, responsável por uma manifestação clínica do tipo visceral, ainda na Índia (Oumeish, 1999) e Ross criou o gênero nomeado de *Leishmania donovani* (Oumeish, 1999; Awasthi *et al.*, 2004). O primeiro cultivo do parasito foi realizado em 1908 por Nicolle que o cultivou num meio de cultura chamado NNN (Nicolle, Novy e McNeal) (Nicolle, 1908, *apud*: Oumeish, 1999). Em 1855, na América do Sul, Cerqueira denominou clinicamente como “Botão de Biskra” a enfermidade observada na pele (Basano *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 1999). Entretanto, a doença foi confirmada pela primeira vez em 1909 após Lindenberg encontrar formas de *Leishmania*, idênticas à *Leishmania tropica* (Wright, 1903) da leishmaniose do Velho Mundo, observar e comparar as lesões cutâneas e nasofaríngeas de indivíduos que trabalhavam em matas do interior de São Paulo, após ser observado à presença da doença na Itália em indivíduos provenientes de São Paulo (Medeiros *et al.*, 1999; Oumeish, 1999; Basano *et al.*, 2004). Em 1911, Gaspar Vianna denominou o parasito que causava a doença no Brasil de *Leishmania braziliensis*, diferenciando-o da *Leishmania tropica* ao atribuir a doença a uma nova espécie (Vianna, 1911 *apud*: Oumeish, 1999).

A *Leishmania* é um protozoário parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, que pertence à família *Trypanosomatidae* e apresenta duas formas evolutivas principais:

promastigota (flagelada), encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; e amastigota (aflagelada), presente nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Gontijo *et al.*, 2003; Basano *et al.*, 2004). Na família *Trypanosomatidae* existem outros gêneros importantes relacionados à ocorrência de doenças, como o *Trypanosoma*. A *Leishmania* possui o ciclo de vida heteroxênico, sobrevivendo em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, responsáveis pela transmissão dos parasitas entre os vertebrados (Gontijo *et al.*, 2003; Basano *et al.*, 2004).

A variedade de espécies é uma característica do gênero *Leishmania*. Cerca de 14 espécies distintas são responsáveis por leishmanioses no Novo Mundo, entre elas a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) peruniana*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) shawi*, *L.(V.) naiffi*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L.(L.) amazonensis*, *L. (L.) pífanói*, *L.(L.) venezuelensis* causadoras de lesões cutâneas e mucosas, e *L. (L.) infantum / L. (L.) chagasi* causadora de infecções viscerais (Thomaz Soccol *et al.*, 1993).

As fêmeas dos insetos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, coletivamente chamados de flebotomíneos, são os vetores responsáveis pela transmissão das leishmanioses. Nas Américas, a transmissão é realizada pelo gênero *Lutzomyia*, tendo sido descritas cerca de 350 espécies distribuídas desde o sul do Estados Unidos até o norte da Argentina (Basano *et al.*, 2004; Negrão *et al.*, 2009).

Esses insetos pertencem à Classe Insecta, Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae*, Gênero *Lutzomyia* – no Novo Mundo, e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (Ross 1903), recebendo denominações populares diferentes de acordo com a região geográfica, como

mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. As principais espécies transmissoras da LTA no Brasil são: *Lu. flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e, *Lu. migonei* (Medeiros *et al.*, 1999; Gontijo *et al.*, 2003).

IV.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças que acometem o homem, causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas entre animais e seres humanos por fêmeas de flebotomíneos infectadas, estabelecendo um espectro de doenças que ocorrem na África, Europa, Ásia e América (Desjeux, 1992).

As leishmanioses constituem um problema de saúde pública global e, de acordo Organização Mundial da saúde (OMS), são consideradas como uma das seis doenças infecciosas parasitárias mais frequentes e importantes no mundo.

A doença pode ser classificada de acordo com os seus aspectos clínicos em Leishmaniose Tegumentar e Leishmaniose Visceral (Gontijo *et al.*, 2003; Medeiros *et al.*, 1999). No Brasil, ocorrem a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e a Leishmaniose Visceral Neotropical ou Americana. A LTA é um importante problema de saúde pública e sua incidência no Brasil é de aproximadamente 35.000 casos por ano (Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

A LTA é uma doença causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, não contagiosa, de evolução crônica e provoca lesão

localizada ou difusa, na pele e/ou na região nasofaríngea dos indivíduos infectados (Basano *et al.*, 2004).

No Brasil, a LTA pode ser causada por diversas espécies do gênero *Leishmania*. A *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais importante envolvida na LTA e está distribuída amplamente pelo Brasil, abrangendo outros países da América Latina. Há indícios de que um complexo de subespécies está envolvido nessas infecções (Medeiros *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2004). Foram encontrados parasitas semelhantes em roedores, como *Akodon* sp., *Proechimys* sp., *Rattus* sp., *Oryzomys* sp. e *Rhipidomys* sp. e no marsupial *Didelphis* sp (Medeiros *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2004; Brasil, 2007).

Apresenta vetores antropofílicos, com picadas diurnas e de maior atividade nas estações de chuva, além de outras espécies adaptadas em áreas peridomésticas, e ainda as de florestas primárias, como a *Lu. whitmani*, *Lu. migonei*, *Lu. pessoai*, *Lu. intermedia*, *Lu. carrerai*. Cavalos, cães, jumentos e até gatos apresentam-se também como hospedeiros na transmissão peridoméstica. No homem *L. (V.) braziliensis* causa a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutâneo-mucosa (Medeiros *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2004), que é caracterizada por úlcera cutânea, única ou múltipla, cuja principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, podendo causar destruição desses tecidos (Silveira *et al.*, 2004). Além disso, a *L. (V.) braziliensis* é responsável pela forma disseminada da doença, forma cutânea disseminada caracterizada por lesões múltiplas, geralmente ulceradas, distribuídas por diversas áreas do corpo, distantes do sítio de inoculação primária. A leishmaniose disseminada é uma terceira forma, emergente, de LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, com ocorrência,

principalmente, no Nordeste do Brasil (Carvalho *et al.*, 1994; Azulay e Azulay Jr., 1995; Turetz *et al.*, 2002; Basano *et al.*, 2004).

A *L. (L.) amazonensis* também responsável pela leishmaniose cutânea, leishmaniose cutâneo-mucosa, e pela leishmaniose cutânea difusa. É distribuída, principalmente, em áreas de florestas primárias e secundárias do tipo várzea e igapó, na Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão). Além disso, é também encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Goiás, tendo como principal vetor o *Lu. flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno e pouco antropofílico, e *Lu. olmeca nociva*, que apresenta-se como vetor secundário no Amazonas e em Rondônia (Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007). O principal hospedeiro silvestre é o roedor *Proechimys* sp., mas ainda não existem evidências bem definidas que indiquem que esses roedores são realmente os reservatórios dessa espécie de *Leishmania* (Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

A *L. (V.) guyanensis* encontra-se, no Brasil, distribuída no Amazonas, Pará, Amapá e Roraima, ao norte do rio Amazonas, tendo como hospedeiros a preguiça (*Choloepus didactylus*), o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*), o marsupial *Didelphis* sp. e o roedor *Proechimys* sp. É transmitida pelos vetores *Lu. Umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. Whitmani* (Follador *et al.*, 1999; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007). No homem, a *L. (V.) guyanensis* causa a leishmaniose cutânea, com múltiplas lesões, sendo muito rara a presença de lesões mucosas provocadas por esta espécie. As lesões são predominantemente ulceradas, cutâneas, únicas ou múltiplas, sendo que as lesões múltiplas são consequências de diversas picadas simultâneas de vários

flebótomos infectados e/ou pela disseminação linfática (Follador *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

A *L. (V.) lainsoni* foi identificada nos ciclos de transmissão da LTA nos estados do Pará, Rondônia e Acre. Tem como hospedeiro a paca (*Agouti paca*), e seu único vetor conhecido e de baixa antropofilia, fator que pode explicar o número reduzido de indivíduos infectados, que é o *Lu. ubiquitalis*, que causa com baixa frequência a leishmaniose cutânea (Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

A *L. (V.) naiffi* está distribuída nos estados do Amazonas e Pará e tem como hospedeiro o tatu (*Dasypus novemcinctus*). A transmissão é causada por flebotomíneo que apresenta alta antropofilia, mas com hábitos zoofílicos pouco conhecidos. Causa, principalmente, a leishmaniose cutânea no homem (Follador *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007). A *L. (V.) shawi* pode ser encontrada no estado do Pará e no oeste do Maranhão. O parasito foi isolado de amostras de vísceras e pele de alguns mamíferos silvestres como: macacos (*Chiropotes satanas* e *Cebus apella*), quati (*Nasua nasua*) e preguica (*Choloepus didactylus*). *Lu. whitmani* é a única espécie de vetor transmissor dessa *Leishmania*, que habita troncos em florestas primárias, estando associado aos hábitos dos animais silvestres usados como reservatórios (Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

O gênero *Leishmania* apresenta também uma diversidade de espécies considerável distribuída distintamente no Velho Mundo, sendo reconhecida como parasita de relevância médica (Silveira *et al.*, 2004). O número de espécies descritas atualmente é muito amplo e novas propostas de

classificação taxonômica para o gênero são importantes (Cupolillo *et al.*, 1998), principalmente, que levam em consideração possíveis associações com os desfechos clínicos da leishmaniose.

IV.3 Ciclo Biológico e Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) apresenta um ciclo de transmissão complexo, heteroxênico, alternado entre hospedeiros vertebrados e os insetos vetores (Dourado *et al.*, 1989; Gontijo *et al.*, 2003). As fêmeas dos insetos vetores são as responsáveis pela transmissão dos parasitas de um vertebrado para outro, através da picada (Gontijo *et al.*, 2003).

O ciclo biológico de *Leishmania sp.* tem início quando fêmeas dos flebotomíneos inoculam no hospedeiro vertebrado os parasitas sob a forma promastigota. Esta forma passa por um processo denominado metaciclogênese no intestino do vetor (Awasthi *et al.*, 2004). Durante esse período, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, que permitem sua proteção diante da ativação da via clássica do complemento (Bogdan *et al.*, 1998). Essa ativação do complemento recobre o parasita por fatores da cascata que são reconhecidas pelas células hospedeiras, facilitando a entrada nos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Bogdan *et al.*, 1998; DE Almeida *et al.*, 2003). O parasita inicialmente presente no intestino do inseto, migra para a faringe e cavidade bucal, de onde ele é transmitido ao hospedeiro vertebrado, durante o repasto sanguíneo (Awasthi *et al.*, 2004).

Nos vertebrados, os parasitas assumem a forma amastigota, que se reproduz por fissão binária, obrigatoriamente dentro de células do sistema monocítico fagocitário (Awasthi *et al.*, 2004). Os macrófagos se rompem à

medida que as amastigotas vão se multiplicando, ocasionando a liberação dos parasitas. Os parasitas são então fagocitados por outros macrófagos, permitindo a persistência da infecção no organismo do hospedeiro (Awasthi *et al.*, 2004).

Finalmente, as formas amastigotas são ingeridas pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo, e diferenciam-se em promastigotas procíclicas no aparelho digestivo do inseto, e em metacíclicas, forma infectante, na faringe. Ao serem posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada reiniciam este ciclo biológico (Awasthi *et al.*, 2004).

A LTA é causada pelos parasitos dos complexos *Leishmania mexicana* e *Leishmania braziliensis* no Novo Mundo (Marsden *et al.*, 1985). A doença tem ocorrência nas Américas desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (Montenegro, 1926; Desjeux, 1999). Nos últimos 20 anos, a incidência de LTA no Brasil tem aumentado em praticamente todos os estados (Jirmanus *et al.*, 2012). Eventualmente, em regiões já colonizadas, permaneceram áreas de matas nativas, onde animais silvestres são reservatórios de leishmanias. Além disso, a leishmaniose também é observada em torno de habitações e, neste caso, animais domésticos e roedores podem ser reservatórios dos parasitos (Dourado *et al.*, 1989).

A *L. (V) braziliensis* é a espécie causadora de LTA de maior importância no Brasil (Oliveira *et al.*, 2004). Essa espécie é frequentemente encontrada em áreas do país onde ocorrem intensas modificações ambientais e que apresentem resquícios de Mata Atlântica. A *L. (V.) braziliensis* possui uma

distribuição geográfica ampla, abrangendo desde o sul do Pará, a região Nordeste e o centro-sul do país, além de acometer algumas áreas da Amazônia Oriental (Oliveira *et al.*, 2004).

Outras espécies de *Leishmania* também são encontradas no país acometendo quase todas as regiões. A *L. (L) amazonensis* é encontrada em estados da região Norte, restrita a regiões de mata fechada. Além disso, essa espécie é também encontrada em estados da região Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste (Basano *et al.*, 2004, Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007). Na região Norte pode ser observado a presença da *L. (V) guyanensis*, distribuída no Norte da Bacia Amazônica, estendendo para outros países, como Guianas, Equador, Peru e Venezuela (Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007). Outras espécies foram descritas, recentemente, que são causadoras da LTA no Brasil, sendo elas a *L. (V) lainsoni*, *L. (V) naiffi* e a *L. (V) shawi*, encontradas em casos humanos no Pará e Maranhão (Basano *et al.*, 2004; Secretaria de Vigilância de Saúde, Brasil, 2007).

Estima-se que a incidência mundial anual da doença esteja em 2.000.000 indivíduos e a prevalência em 12 milhões de casos (Desjeux *et al.*, 2004). A incidência da LTA vem aumentando na América Latina, principalmente no Brasil (Murray *et al.*, 2005). Entre 1980 e 2003 ocorreram 523.975 casos autóctones no país, em sua maior parte nas regiões Nordeste e Norte (Basano *et al.*, 2004). Esse aumento pode está associado ao processo de colonização, ou seja, mudanças de hábitos do homem, já que doenças que eram típicas da zona rural vêm aumentando as ocorrências na zona urbana e periurbanas,

podendo estar atribuída a uma possível adaptação do vetor em outros ambientes (Oliveira *et al.*, 2004).

No Brasil, os casos de LTA vêm aumentando progressivamente, distribuídos em quase todos os estados do país nos últimos 20 anos. A incidência anual da doença no Brasil aumentou de 10,45 casos por 100.000 indivíduos em 1985 para 18,63 casos por 100.000 indivíduos em 2000 (Oliveira *et al.*, 2004), com média anual de 35 mil novos casos, segundo a Organização mundial da Saúde. A região Nordeste apresenta 39% dos casos de LTA no país, acometendo principalmente os estados do Maranhão, Ceará e Bahia (Oliveira *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas a LTA vem apresentando modificações em sua distribuição geográfica, deixando de ser uma doença circunscrita à zona rural. O número de casos nas áreas urbanas e periurbanas têm aumentado, estando associado a uma possível adaptação do inseto vetor a novos ambientes (Cupolillo *et al.*, 1998; Basano *et al.*, 2004). A capacidade de adaptação dos parasitos e vetores à mudanças ambientais, como desmatamento e urbanização, podem estar contribuindo para o aumento da incidência da LTA no Brasil (Cupolillo *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2004).

IV.4 Aspectos Clínicos e Imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana causados pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A patogênese da LTA depende de diversos fatores, como parasito, estado imunológico genético do hospedeiro, co-morbidades que este passa apresentar, e também de substâncias inoculadas pelos vetores durante a

transmissão dos parasitas (Carvalho *et al.*, 1994; Schriefer *et al.*, 2004; Castellucci *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2012). Na maioria das formas clínicas, a patologia da LTA está associada à resposta Th1 exagerada nem sempre modulada. Células como macrófagos, neutrófilos e dendríticas, além de moléculas produzidas por essas células tem mostrado ter participação no controle e patogênese da LTA (Carvalho *et al.*, 1994; Bacellar *et al.*, 2002).

As lesões típicas da LC são caracterizadas por úlceras com bordas elevadas, infiltradas, de cor eritematoviolácea, recoberta por secreção serosa ou sero-purulenta; a úlcera típica recebe a denominação de “*úlcera em moldura*” (Silveira *et al.*, 2004). A LC é comumente limitada, apresentando uma ou poucas úlceras de pele, frequentemente, encontradas em membros e outras áreas expostas, como a face (Barretto *et al.*, 1981; Silveira *et al.*, 2004). Os pacientes com LC apresentam a resposta imune do tipo Th1 moderada e bem regulada contra os antígenos de *Leishmania*, caracterizada por um elevado nível de Interferon-gama (IFN- γ), que é uma citocina de ativação dos macrófagos (Carvalho *et al.*, 1994; Bacellar *et al.*, 2002).

Na LM, o acometimento mucoso tem início com eritema e uma discreta infiltração do septo nasal seguida de ulceração e perfuração do septo cartilaginoso. As asas nasais e o lábio superior podem também ser acometidos. Essas lesões podem levar à desfiguração da face, além de destruir gravemente a boca, laringe e faringe (Marsden *et al.*, 1986; Bacellar *et al.*, 2002). A LM é acompanhada de uma exagerada imunidade celular, com produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF contra antígenos de *Leishmania* (Costa *et al.*, 1986; Bacellar *et al.*, 2002).

Na LD, múltiplas lesões de pele, ulceradas ou não, são simultaneamente encontradas em mais de uma área do corpo do indivíduo, as quais podem ser precedidas por período febril transitório (Costa *et al.*, 1986; Carvalho *et al.*, 1994; Turetz *et al.*, 2002). A resposta imunológica dessa forma da doença está caracterizada pela produção de níveis elevados de IFN- γ e TNF contra antígenos parasitários, porém mais baixos que os observados na LC e LM (Turetz *et al.*, 2002).

IV.5 Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra-BA

Na Bahia, a LTA é endêmica em praticamente toda sua extensão (Brito *et al.*, 2009). As espécies de *Leishmania* causadoras de LTA na Bahia são a *L. (L.) amazonensis* e a *L. (V.) braziliensis*, sendo esta última a espécie mais prevalente, podendo causar lesões cutâneas e mucosas (Gontijo *et al.*, 2003).

Uma variedade de formas clínicas de LTA (LC, LM e LD) pode ser simultaneamente encontrada em Corte de pedra, área endêmica que fica situada em uma região rural no sudeste da Bahia a 280 km do município de Salvador-BA (Schriefer *et al.*, 2004). Corte de Pedra possui cerca de 20 municípios, uma extensão de aproximadamente 10.000 km² e apresenta resquícios de Mata Atlântica. *Lu. (N.) whitmani* e *Lu. (N.) intermedia* são flebotomos transmissores de *L. (V.) braziliensis* nessa área endêmica (Schriefer *et al.*, 2009). Os residentes dessa área sobrevivem, principalmente, da agricultura que muitas vezes foram florestas primárias e secundárias (Schriefer *et al.*, 2004). O posto de saúde de Corte de Pedra, situado no município de Tancredo Neves, é um centro de referência para o atendimento

de pessoas com LTA e recebe cerca de 500 a 1.300 pacientes com essa doença anualmente (Jirmanus *et al.*, 2012).

A LTA em Corte de Pedra é causada pela *L. (V.) braziliensis* (Costa *et al.*, 1986). Cerca de 5% ou menos de LTA em Corte de Pedra apresenta LM (Marsden, 1986). Esse número vem diminuindo progressivamente (Jirmanus *et al.*, 2012). A LD é a forma emergente da doença na região, sendo que no início da década de 70, apenas 0,2% do total dos pacientes com leishmaniose tinham essa forma da doença, mas esse número sofreu um aumento para 1,9% na década de 90 (Turetz *et al.*, 2002) e, atualmente, 2,3% dos pacientes com LTA, em Corte de Pedra, desenvolvem a forma disseminada da doença (Jirmanus *et al.*, 2012).

Schriefer *et al* (2009) demonstrou que os casos de LD sofreram um aumento significativo em Corte de Pedra e que ocorreram por surtos, entre os anos de 1993 e 2003. Eles realizaram uma inspeção visual (mapeamento) por geoprocessamento que mostrou a dispersão e conseqüentemente o aumento dos casos de LD na área endêmica, e realizaram uma análise de correlação entre as distâncias dos casos recentes e os casos novos diagnosticados, e constataram que a maioria dos casos ocorreu em até 7.500 metros, sugerindo que ocorriam por surtos da doença. Esse estudo mostrou que existe um forte indicativo que a doença na região ocorra por surtos, induzindo a um aprofundamento nas análises, expandindo o número de casos, tempo e para as demais formas clínicas de LTA.

IV.6 Endemicidade da Leishmaniose Tegumentar Americana

Segundo a Organização Mundial da saúde, a leishmaniose está presente em 88 países e é uma importante causa de endemias no continente americano e no Brasil. No Brasil, assim como em outros países da América do Sul, a doença pode se manifestar por meio de surtos epidêmicos, em regiões que sofreram desmatamentos e onde pessoas acometidas pela doença, normalmente vivem de atividades do campo e moram próximas a regiões de mata nativa (Medeiros *et al.*, 1999; Negrão *et al.*, 2009).

A distribuição da LTA Brasil tem sofrido mudanças nos últimos anos, e com isso, o número de casos observados em áreas urbanas e periurbanas têm aumentado, possivelmente devido a uma adaptação do inseto vetor a esses novos ambientes (Oliveira *et al.*, 2004). Há indícios que, nesses locais, animais domésticos como cães e equinos servem de reservatórios, como observado em áreas da cidade do Rio de Janeiro (Medeiros *et al.*, 1999; Basano *et al.*, 2007).

A LTA, assim como as leishmanioses em geral, é dependente do fator de virulência da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune estabelecida pelo hospedeiro humano (Medeiros *et al.*, 1999). Além disso, a variedade de parasitas que acometem diferentes populações e a relação dos mesmos com os vetores e reservatórios pode ser um fator relevante para a ocorrência de endemias em áreas afetadas (Medeiros *et al.*, 1999). Espécies de *Leishmania* de importância médica apresentam características relevantes para a manutenção da doença em áreas afetadas: são restritas a regiões tropicais e subtropicais do planeta, seus ciclos zoonóticos envolvem animais selvagens e domésticos e a maioria das vezes infectam indivíduos que residem

em áreas rurais ou que mantêm contato em áreas silvestres (Cupolillo *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2004).

Modificação nos padrões ambientais devido a mudanças de hábitos humanos associados a alterações no meio ambiente tem contribuído para as mudanças na forma de transmissão e prevalência dos casos de LTA, já que dados sugerem a possibilidade de adaptação dos parasitos e vetores em ambientes modificados ecologicamente (Cupolillo *et al.*, 1998).

IV.7 Clonalidade das infecções na Leishmaniose Tegumentar Americana

A diversidade genética das espécies de *Leishmania* está relacionada com a interação dos parasitas com seus vetores e reservatórios, além de ter um papel determinante na manifestação clínica da doença (Queiroz *et al.*, 2012). Esse fato pode ser reforçado pela observação de que as cepas da região amazônica tem uma maior heterogeneidade genética se comparado com os isolados de outras regiões. A presença de uma população de parasitos mais homogênea indica uma introdução mais recente de uma nova cepa na região, seguida de sua expansão clonal (Negrão *et al.*, 2009).

Cepas epidemiologicamente relacionadas podem compartilhar características, já que são derivadas da expansão clonal de uma única cepa. A estabilidade molecular das cepas e a sua diversidade dentro da espécie podem estar relacionadas à divergências genéticas evolutivas provenientes de mutações aleatórias que se acumularam ao longo do tempo (Maslow *et al.*, 1993).

A avaliação da variabilidade genética intra-específica de *L. infatum*, provenientes de diferentes hospedeiros, e regiões geográficas e formas clínicas distintas, demonstrou a existência de heterogeneidade entre as cepas (Toledo *et al*, 2002). A comparação entre cepas de *L. (V.) braziliensis* provenientes das regiões Sudeste e Norte do Brasil demonstrou que os parasitos eram geneticamente diferentes (Gomes *et al.*, 1995). Esses estudos mostram a importância de compreender a estrutura clonal das espécies de *Leishmania*, já que este é um fator determinante para manutenção a endemia em regiões afetadas.

Na região endêmica de Corte de Pedra, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie dominante e é responsável por causar de três formas distintas da LTA. Um estudo recente demonstrou que a população da *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra é multiclonal e que é formada por distintas subpopulações ou clados parasitários, que estão associados a fenótipos complexos como forma de doença e distribuição geográfica das formas de LTA (Schriefer *t al.*, 2004; Murray *et al*, 2005).

No mais recente estudo realizado por Queiroz e colaboradores (2012), as sequências de seis *loci* polimórficos dos genomas dos parasitos de Corte de Pedra mostraram que certos genótipos de *L. (V.) braziliensis* causam elevado risco de desenvolvimento de LD nos indivíduos portadores de infecções com aquelas cepas.

A identificação do comportamento clonal das cepas é de grande relevância, pois permite a detecção de polimorfismos genéticos específicos para a espécie de *Leishmania* estudada e o seu uso como marcadores

genéticos, possibilitando, um melhor controle da doença em áreas endêmicas. Além disso, a investigação da genética desse parasito, associados a outros dados, como ambientais e aprofundamento no conhecimento comportamental dos vetores e reservatórios, são informações muito relevantes para uma melhor compreensão da dinâmica da doença em áreas afetadas.

V. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a LTA é mantida por surtos de infecções humanas nos focos de endemicidade e que a maioria das infecções seja causada por uma única ou poucas cepas parasitárias. Esta hipótese é parcialmente fundamentada por um trabalho recente do nosso grupo, o qual evidenciou que a emergência da LD em Corte de Pedra - BA se deu por meio de surtos (Schriefer *et al.*, 2009).

VI. JUSTIFICATIVA

Estudos epidemiológicos sobre a LTA têm focado, sobretudo, distribuições de formas clínicas ou espécies parasitárias e fatores de risco para a infecção humana e animal (Schriefer *et al.*, 2009). Esses estudos esclarecem pontos importantes, mas não explicam como a endemia é mantida nos focos de transmissão ativa da LTA. A compreensão acerca de como é mantida a endemia em áreas afetadas pela doença, se por surtos ou casos esporádicos, bem como se a infecção humana é causada mais frequentemente por uma cepa (monoclonal) ou por mais de uma cepa (oligoclonal ou policlonal) é muito importante, tanto para o controle das endemias quanto para o melhor planejamento da logística de insumos e profissionais da saúde nesses locais, e para o manejo clínico dos casos. Sobre este último aspecto, a demonstração de monoclonalidade das infecções reforçaria a factibilidade de se identificar biomarcadores parasitários com valores prognósticos sobre os desfechos clínicos e terapêuticos das infecções humanas pela *L. (V.) braziliensis*. No presente estudo, empregamos a área endêmica de Corte de Pedra-BA para responder em parte essas questões.

VII. DESENHO DO ESTUDO E MÉTODOS

VII.1 Área de Estudo

O estudo foi realizado empregando amostras provenientes de uma área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), situada no sudeste do estado da Bahia, denominada Corte de Pedra. Corte de Pedra é uma região composta por 20 municípios, em uma área rural anteriormente dominada pela Mata Atlântica. *Lu. (N.) whitmany* e *Lu. (N.) intermédia* são flebotomíneos que transmitem *L.(V.) braziliensis* em Corte de Pedra. Residentes nesta área trabalham principalmente na agricultura, muitas vezes, na proximidade de florestas primárias ou secundárias. Entre a população, há pouca migração dentro ou para fora da região. A média de tempo de permanência dos participantes do estudo em seus endereços no momento do diagnóstico e amostragem do parasita foi de 17 anos, mais de 90% dos participantes do estudo viviam em fazendas.

VII.2 Desenho do Estudo

Este é um estudo de corte transversal, onde avaliamos a agregação temporal de casos de LTA e genótipos de *L. (V) braziliensis* em pontos da área endêmica de Corte de Pedra – Ba, no período de 2008-2011, bem como a clonalidade de isolados parasitários obtidos de pacientes da área em dois períodos distintos: (1) 1992 – 2001; e (2) 2008 – 2011.

VII.3 População de Estudo

Os participantes do estudo consistiram em pacientes com LTA recrutados no posto de saúde de Corte de Pedra. Esses pacientes foram

classificados de acordo com as definições da doença em três grupos: pacientes com LM, com LD e com LC, no qual para cada caso novo de LM e/ou LD dois casos de LC foram incluídos no estudo devido o número de casos de LC ser maior do que as demais formas de LTA. Os diagnósticos foram realizados e os sujeitos do estudo foram recrutados entre 1992 e 2001, e entre 2008 e 2011. Todos os casos de LTA no presente estudo foram auto-referidos e diagnosticados no posto de saúde que trata aproximadamente 70% dos pacientes com leishmaniose na região.

VII.3.1 Definição de Casos

Leishmaniose cutânea (LC) foi definida pela presença de uma ou poucas lesões cutâneas ulcerativas sem evidência de envolvimento da mucosa. Leishmaniose mucosa (LM) foi definida como uma doença metastática com lesões da mucosa que afetam o nariz, boca, faringe, laringe e ou não contígua com lesões cutâneas primárias. Leishmaniose disseminada (LD) foi definida como uma doença com mais de 10 lesões ulcerativas nodulares, acneiformes ou espalhados sobre a pele em mais de duas áreas do corpo. Pacientes que apresentaram simultaneamente as definições para LM e LD foram classificados como pacientes com LD. Todos os pacientes tiveram o diagnóstico confirmado por: (1) isolamento de parasitas a partir da secreção da lesão cultivados em meio, (2) a detecção de DNA do parasita por PCR em amostras de biópsia da lesão, (3) teste de hipersensibilidade tipo tardia (Montenegro teste).

VII.3.2 Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com definição de caso para LC, LM ou LD, confirmação laboratorial de LTA e que preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e excluídos aqueles pacientes que apresentaram lesões atípicas, gestantes ou menor de 18 anos de idade e aqueles que não quiseram participar do estudo ou completar o TCLE.

Os procedimentos adotados nesse estudo foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia, e da Universidade de Iowa. O projeto e seus protocolos clínicos foram também aprovados pelo NIH, nos EUA, e pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP- 128/2008, 17.03.2008) no Brasil. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos que participaram do estudo.

VII.3.3 Amostra

Os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram obtidos através do aspirado da lesão dos pacientes diagnosticados com LTA no posto de saúde em Corte de Pedra, Bahia, Brasil. Trinta e cinco isolados de *L. (V.) braziliensis* da amostra retrospectiva (1992 e 2001) utilizados para amplificação de seis *loci* polimórficos e usados na análise da clonalidade foram provenientes de 17 indivíduos com LC, 9 com LM e 9 com LD, e 129 isolados da amostra prospectiva foram utilizados para análise de agregação temporal e amplificação de um locus polimórfico usado na avaliação da clonalidade obtidos de 35 pacientes com LM, 47 com LD e 47 com LC entre 2008 e 2011.

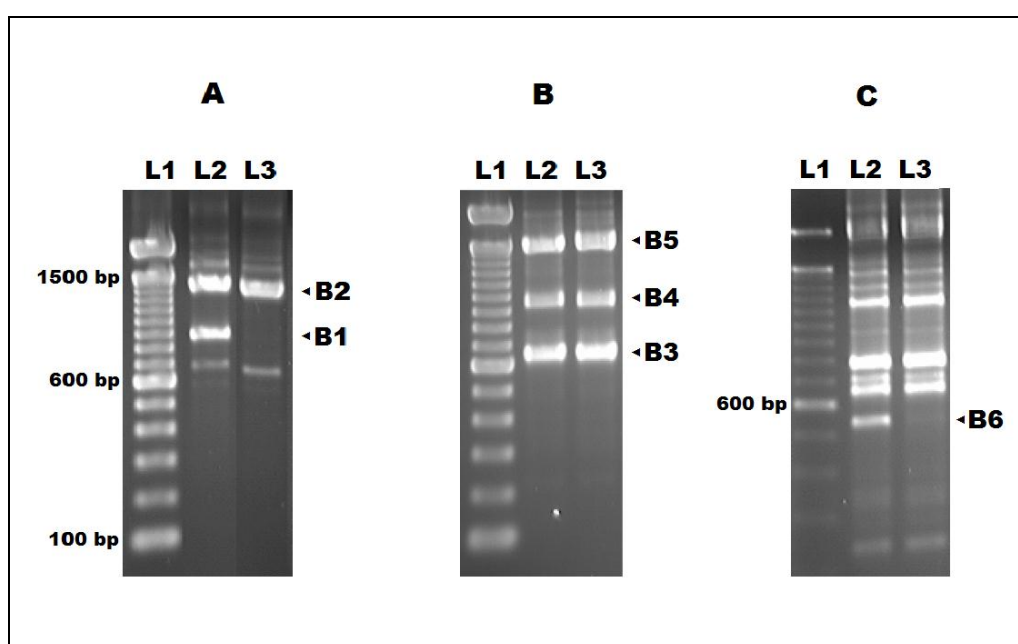
VII.3.4 Obtenção dos isolados parasitários e estoque de DNA genômico de *L. (V) braziliensis*

Os isolados de *L. (V) braziliensis* utilizados no presente estudo foram cultivados a partir de material aspirado das bordas das lesões de pele ou mucosas. O material aspirado foi imediatamente suspenso em meio bifásico LIT / NNN e incubado a 26 ° C durante uma a duas semanas. Em seguida, a suspensão foi transferida para meio de Schneider (SCHNEIDER INSECT EXTRACT MEDIUM< SIGMA), complementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 2 mM de L-glutamina e incubado a 26 ° C durante um período máximo de duas semanas. A determinação das espécies de *Leishmania* isoladas foi baseada no PCR-RFLP do *locus* HSP70 e, mais tarde confirmada por qPCR em tempo real. Os parasitas foram congelados em DMSO a 10%, meio de crescimento a 90%, em nitrogênio líquido e descongelados antes dos ensaios de genotipagem.

VII.3.5 Clonagem de fragmentos de DNA Genômico de *L. (V) braziliensis* amplificados por PCR

A seleção dos alvos genômicos de *L. (V) braziliensis* a serem usados nas genotipagens foi baseada em várias bandas geradas por RAPD, que tinham sido úteis para subtipagem isolados de *L. (V) braziliensis* de Corte de Pedra em estudo anterior (figura1) (Schriefer *et al.*, 2004). Esses *loci* foram novamente amplificados por RAPD de cada um de nove isolados de *L. (V) braziliensis*, utilizando os iniciadores e protocolos anteriormente descritos. As bandas de DNA resultantes foram clonadas no vetor pCR 2.1-TOPO

(Invitrogen, Inc.) de acordo com as instruções do fabricante. Plasmídeos foram preparados a partir de seis clones de bactérias representativos de cada reação de transformação. Em seguida, os insertos desses plasmídeos foram sequenciados. Após o alinhamento das sequências homólogas, seis *loci* polimórficos (CHR 24/3074, CHR 26/765, CHR 28/ 195696, CHR 28/425451, CHR 32/1356278, CHR 35/335652) foram identificados, os quais foram utilizados durante todo estudo.



Schriefer *et al*, 2004

Figura 1. Padrões eletroforéticos de amplicons gerados a partir do DNA genômico de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, gerados por protocolos de RAPD previamente publicados (separadamente representados nos painéis A, B e C) (30). As bandas marcadas foram excisadas, clonadas e sequenciadas, e depois alinhadas, entre nove isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra, para a detecção de polimorfismos. Os *loci* polimórficos seguintes foram detectados entre os parasitas de Corte de Pedra: (B1) CHR 24/3074 (cromossomo 24, com início na posição 3074), (B2) CHR 26/765, (B3) CHR 28/195696, (B4) CHR 28/425451, (B5) CHR 32/1356278 e (B6) CHR 35/335652. O *locus* CHR 26/765 foi também encontrado no cromossomo 33, a partir de posição 1476284. (L1) marcador de peso molecular. (L2, L3) Exemplos de isolados de *L. (V.) braziliensis*. (pb) de comprimento dos ácidos nucleicos estimados em pares de bases.

Com base nas sequências geradas com os ensaios preliminares acima, seis pares de iniciadores foram concebidos recentemente (tabela 1), e foram utilizados para amplificar os *loci* selecionados de 35 isolados *L. (V.) braziliensis* (Queiroz *et al.*, 2012). Nessas reações, 3 ng de DNA genômico foram incubadas com 1 pmol de cada primer direto e reverso. As concentrações de MgCl₂ e temperaturas de anelamento empregadas nas reações de PCR estão listadas na tabela 1. As seguintes condições de amplificação foram empregadas: 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de 30 seg a 95°C, 1 min a uma temperatura de anelamento indicados na tabela 1 (55° - 58°C), e 2 min a 72°C, seguido por uma extensão final a 72°C durante 10 min.

Os amplicons foram submetidos à eletroforese e as bandas correspondentes foram extraídas a partir de géis de agarose e clonadas em vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Inc.). Os plasmídeos contendo cada um dos seis fragmentos amplificados, a partir de cada um dos 35 isolados de *L. (V.) braziliensis*, foram transformados em *Escherichia coli* DH5α competente. Mini-preparações de plasmídeo foram obtidos a partir de seis clones bacterianos por *locus* representativos avaliado.

Para a análise das sequências de ácidos nucleicos dos *loci* polimórficos, os insertos nos plasmídeos foram sequenciados, empregando-se um iniciador complementar para a sequência do bacteriófago M13 presente no vetor. Os sequenciamentos foram realizados na Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul). As sequências foram comparadas empregando-se o pacote de software mega 4,0. Primeiro determinou-se a sequência consenso em todos os *loci*, comparando-se os *loci* homólogos nos diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*. Então, as sequências de cada um dos seis *loci* foram analisadas para a identificação da

ocorrência de SNPs e / ou indels entre os vários segmentos homólogos de DNA genômico parasitário comparados.

A fim de localizar fisicamente nos cromossomos homólogos da *L. (V.) braziliensis* os *loci* polimórficos detectados no genoma do parasita, a sequência de consenso de cada *locus*, obtido como descrito acima, foi baseada em cada um dos cromossomas do genoma completo da *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75 / M2904, acessado no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Isto permitiu, por um lado, a identificação dos cromossomas contendo os *loci* e, então a determinação do ponto de partida para cada *locus* dentro destes cromossomas.

VII.3.6 Identificação e caracterização de *loci* polimórficos na *L. (Viannia) braziliensis* causadora de Leishmaniose Tegumentar Americana em Corte de Pedra

A estrutura populacional da *L. (V.) braziliensis* obtida de pacientes com LTA que vivem em Corte de Pedra - BA foi descrita por Schriefer *et al*, 2004. Subpopulações ou clados de parasitas foram identificados com base em genótipos definidos por perfis eletroforéticos de alvos genômicos amplificados por RAPD. No presente estudo, foram utilizadas bandas dos perfis eletroforéticos, gerados por RAPD de nove isolados foram clonadas e sequenciadas para se definir sequências moleculares polimórficas nos genomas desses parasitos, capazes de melhor discriminar cepas de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA (Schriefer *et al.*, 2004). Foram encontrados e caracterizados polimorfismos em seis sequências genômicas amplificadas por três protocolos de RAPD nessas *L. (V.) braziliensis*. As bandas em que

esses seis *loci* polimórficos foram identificados são mostradas na figura 1 (Schriefer *et al.*, 2004). A tabela 1 lista as distribuições desses seis *loci* polimórficos nos cromossomos do parasita, bem como alguns amplicons (Queiroz *et al.*, 2012).

A análise de 35 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes com LTA de Corte de pedra, com diferentes formas da doença, revelou um total de 27 SNPs e indels nos seis *loci* polimórficos. Com base no número de isolados em que os alelos de cada polimorfismo (SNP ou Indel) pôdem ser encontrados, foi possível se determinar alelos mais ou menos frequentes para cada posição polimórfica nos cromossomos (tabela 2). Geralmente, um nucleótido predominante pôde ser encontrado na amostra, com substituições ou inserções-deleções sendo observadas em um subconjunto menor dos isolados. O sequenciamento de amplicons clonados nos permitiu a identificação de haplótipos contendo diversos SNPs e indels em cada *locus*. A tabela 3 mostra as frequências dos haplótipos encontrados. Dezesete haplótipos diferentes, distribuídos nos seis *loci*, puderam ser identificados em pelo menos 10% dos isolados de *L. (V.) braziliensis* avaliados (Queiroz *et al.*, 2012).

VII.3.7 Distribuição Geográfica dos Casos de LTA em Corte de Pedra – BA

A distribuição de casos de LTA em Corte de Pedra foi determinada pela aquisição das coordenadas geográficas por GPS das residências dos pacientes diagnosticados com LTA, prováveis locais de transmissão da doença. As coordenadas geográficas foram obtidas utilizando um aparelho Brunton Multi-Navigator (Brunton Company, Riverton, WY, EUA), que tem uma precisão de

15 m. As residências dos pacientes foram utilizadas como pontos de referência para fins de padronização. Acredita-se que a leishmaniose para ser transmitida, principalmente, dentro de plantações, onde os moradores da região vivem e trabalham. Os dados coletados foram comparados estatisticamente, conforme descrito abaixo, e plotados, para a inspeção visual em medições das distâncias entre casos de LTA e genótipos de *L. (V.) braziliensis*, uma fotografia de satélite de alta definição da região de Corte de Pedra (ENGESAT, Curitiba, Brasil), utilizando-se o sistema de informação geográfica (SIG) ArcGis versão 9 (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, CA, EUA).

VII.3.8 Análise Estatística

O mapeamento dos casos LTA em Corte de Pedra foi realizado com a utilização do sistema de informação geográfica (SIG) ArcGis versão 9 (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, CA, EUA) para obtenção das medidas das distâncias entre os casos recentes e os casos novos. Cada caso recente foi medido a cada caso novo surgido em estratos temporais de 3, 6 e 12 meses precedidos e estratificados por forma de doença: LC, LD e LM. Essas distâncias foram estratificadas pelos intervalos de distância de 0 – 2.500; 2.501 – 5.000; 5.001 – 7.500; 7.501 – 10.000; 10.001 – 12.500 e 12.501 - 15.000 metros. Então foi realizado o teste de regressão linear (Correlação de Spearman) para comparar a distância dos casos recentes em relação aos casos novos. Um valor $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Tabela 1. Posição cromossômica dos seis *loci* polimórficos identificados na *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de pedra. O genoma completo da *Leishmania (Viannia) braziliensis* MHOHM/BR/75/M2904 foi utilizado, acessado no site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Locus (band)*	Primers por locus para amplificação por PCR	Cromossomo	Localização no Cromossomo	Temperatura de anelamento	[MgCl ₂] (mM)	Tamanho do amplicon	Genes sobrepostos
CHR 24/3074	5':GGACTGGAGTGATCGAA	24	3074 -	55°C	1.0	779	Piruvato desidrogenase
(B1)	5':TGGCTCAAAGTGTGCGA		3848				quinase
CHR 26/765**	5':GAAATAAGAGACGAAAAGGC	26	765 - 1425	58°C	1.0	660	
(B2)	5':TGACGTAGGGGTAGAGAAAC						
CHR 28/195696	5':GGACTGGAGTCTGCTTTATTG	28	195696 -	55°C	1.5	618	Nucleobase/nucleosídeo
(B3)	5':ACCAGGGTCGTGAACATGCT		196300				transportador
CHR 28/425451	5':TAAGGTGAACAAGAAGAATC	28	425451 -	48°C	1.0	622	Cadeia longa de Ácidos
(B4)	5':CTGCTCGCTTGCTTTC		426067				graxos – CoA-ligase proteína

CHR	5':GTACGCACATGAGCCCGGAT	32	1356278 -	55°C	2.5	498
32/1356278	5':GCGGCGTATCAGCACACTTTT		1356777			
(B5)						
CHR 35/335652	5':TTATAGACGTGACACAGCG	35	335652 -	56°C	1.0	497
(B6)	5':AGCAGTCCGGAGTTGT		336148			

Queiroz et al, 2012.

* Banda correspondente na Figura 1.

** Este locus é duplicado no cromossomo 33 na posição 1476284.

Tabela 2. Lista de SNPs / Indels encontrados por *locus* estudado da *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de Pedra e frequências de seus alelos na amostra.

Locus (banda) *	Polimorfismo	Posição Cromossomal	Alelos (proporção de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> com cada alelo) **
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)
	SNP26/1050ac	1050	A/C (0.77/0.81)
CHR 28/195696 (B3)	SNP28/195926gc	195926	G/C (0.77/0.83)
	SNP28/196016cg	196016	C/G (0.77/0.83)
	SNP28/196100ga	196100	G/A (0.77/0.86)
CHR 28/425451 (B4)	SNP28/425481tc	425481	T/C (0.8/0.74)
	SNP28/425737ct	425737	C/T (0.83/0.71)
	Indel28/425996t-	425996	T/indel (0.69/0.83)
CHR 32/1356278 (B5)	SNP32/1356321gt	1356321	G/T (0.97/0.31)
	SNP32/1356500ca	1356500	C/A (0.94/0.61)
	Indel32/1356597c-	1356597	C/indel (1/0.12)

	SNP32/1356598ca	1356598	C/A (0.94/0.53)
	SNP32/1356599ca	1356599	C/A (1/0.12)
CHR 35/335652 (B6)	SNP35/335735ca	335735	C/A (1/0.23)
	SNP35/336018tc	336018	T/C (1/0.08)
	SNP35/336094ca	336094	C/A (1/0.06)

Queiroz et al, 2012.

* Banda correspondente na Figura 1.

** Porcentagem de isolados que apresentaram o alelo particular no *locus* especificado.

*** Este *locus* é duplicado no cromossomo 33, na posição 1476284.

Tabela 3. Lista dos haplótipos encontrados em pelo menos 10% dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* de Corte de Pedra para cada *locus* estudado.

Locus	Haplótipos				
	(Proporção de isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> com os haplótipos)				
	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)			

Queiroz et al, 2012.

* Este *locus* é duplicado no cromossomo 33, na posição 1476284.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Avaliação da clonalidade nos isolados de *L. (Viannia)*

braziliensis obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra

Empregando-se o conhecimento acerca dos haplótipos identificados para a *L. (V.) braziliensis*, 35 isolados obtidos de casos de LTA diagnosticados no posto de saúde de Corte de pedra entre 1992 e 2001 foram genotipados. A frequência de haplótipos distintos para cada *locus* parasitário em cada isolado foi determinado e usado como indicador da clonalidade da amostra e possível clonalidade de infecção humana correspondente.

Praticamente todos os isolados estudados apresentaram um máximo de dois haplótipos para os *loci* avaliados, com exceção do *locus* CHR 28/425451, para o qual 4 isolados apresentaram mais de dois haplótipos (tabela 4). Levando-se em consideração que em geral os genomas das *Leishmania* sp. são diploides, embora aneuploidias venham sendo descritas, os dados sugerem que as amostras, e possivelmente as infecções das quais se originaram, são clonais ou oligoclonais.

Para validar esse achado, uma amostra recente formada por isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de 94 pacientes de LTA, diagnosticadas em Corte de pedra entre 2008 e 2011, foi genotipada de acordo com as sequências obtidas para o *locus* CHR 24/3074 (tabela 5). Tal como observado para o mesmo *locus* na amostra de 35 isolados retrospectivos (1992 – 2001), a maior parte dos isolados apresentou apenas um haplótipo detectável ao sequenciamento de seis clones do *locus*, seguido de uma frequência menor de isolados apresentando dois haplótipos distintos. Apenas 13% dos isolados de

L. (V.) braziliensis estudados apresentaram três ou mais haplótipos para o locus CHR 24/3074, reforçando a hipótese de que essas amostras clínicas e suas infecções de origem sejam predominantemente oligoclonais ou clonais.

Tabela 4. Frequência de haplótipos em seis loci polimórficos de 35 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra – BA entre 1992 - 2001.

LOCUS	NÚMERO DE HAPLÓTIPOS			
	1	2	3	4
CHR 24/3074	28 (80%)	7 (20%)	0	0
CHR 26/765	12 (34%)	19 (54%)	1 (2%)	0
CHR 28/195696	14 (40%)	20 (57%)	0	0
CHR 28/425451	17 (48%)	14 (40%)	4 (12%)	0
CHR 32/1356278	16 (45%)	13 (37%)	2 (5%)	1 (2%)
CHR 35/335652	24 (68%)	11 (32%)	0	0

Tabela 5. Frequência de haplótipos no *locus* CHR 24/3074 de 94 isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra – BA entre 2008 e 2011.

NÚMERO DE HAPLÓTIPO	Frequência (%)	
1	57	(60%)
2	25	(27%)
3	10	(11%)
4	2	(2%)

VIII.2 Avaliação da agregação têmporo-espacial de casos de LC, LM e LD em Corte de Pedra – BA

Com o intuito de se avaliar se os casos de LTA ocorrem em agregados sugestivos de surtos na área endêmica, 47 pacientes com LC, 47 com LD e 35 com LM tiveram as coordenadas geográficas de seus locais de moradia mapeados por GPS e dispostos numa foto satélite de Corte de Pedra, empregando-se um sistema de informação geográfica. Usando-se a ferramenta do SIG mensurações das distâncias entre casos novos e recentes, ocorridos a intervalos de tempos de 3, 6 e 12 meses em relação aos casos novos. Essa avaliação foi feita para cada forma de LTA separadamente (LC, LM e LD) e para a LTA total (figuras 2 - 13). Para cada forma de doença e para a LTA total foi avaliada a correlação entre frequência de casos diagnosticados nos últimos

3, 6 e 12 meses de uma dada forma da doença e a distância para um caso novo da mesma forma de LTA. Nessas avaliações, os casos de LC mostraram uma significativa correlação inversa, ou seja, quanto menor à distância para um novo caso maior foi o número de casos recentes diagnosticados. Os coeficientes de correlação (r^2) e níveis de significância (p) das correlações foram calculados nos três estratos temporais analisados e estão dispostos nas figuras 2 a 4. A maioria dos casos recentes de LC (85%) ocorreu a até 7.500 m de distância de um caso novo, sugerindo que a LC acontece em agregados têmporo-espacial de pacientes, indicando que surtos da doença são mais frequentes que casos esporádicos em Corte de Pedra - BA.

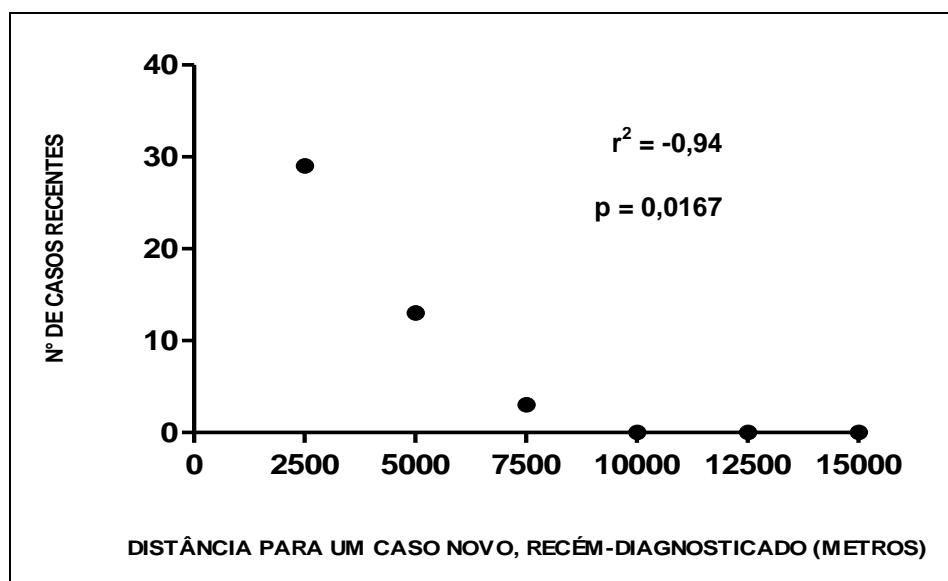


Figura 2. Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém-diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0167$ e $r^2 = -0,94$.

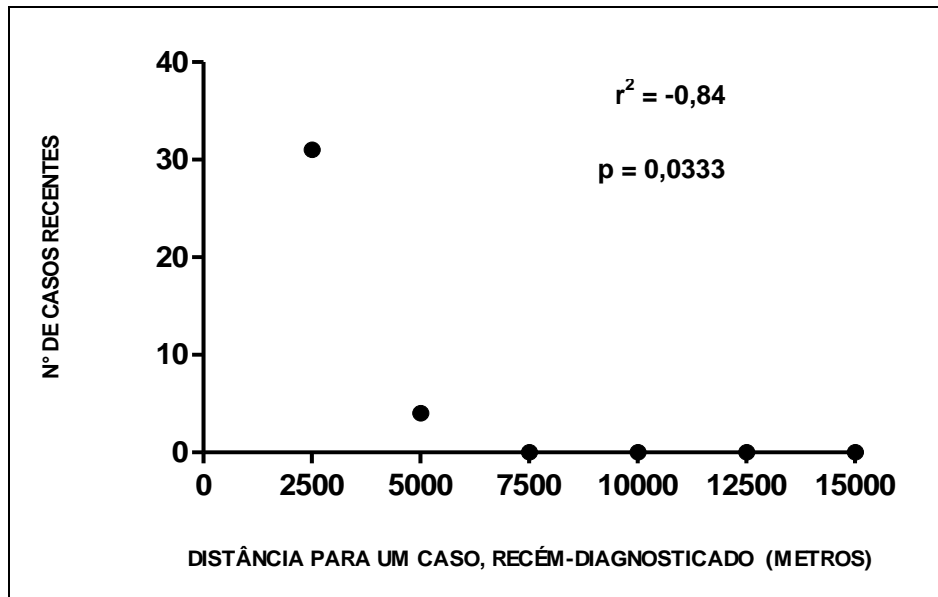


Figura 3. Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0333$ e $r^2 = - 0,84$.

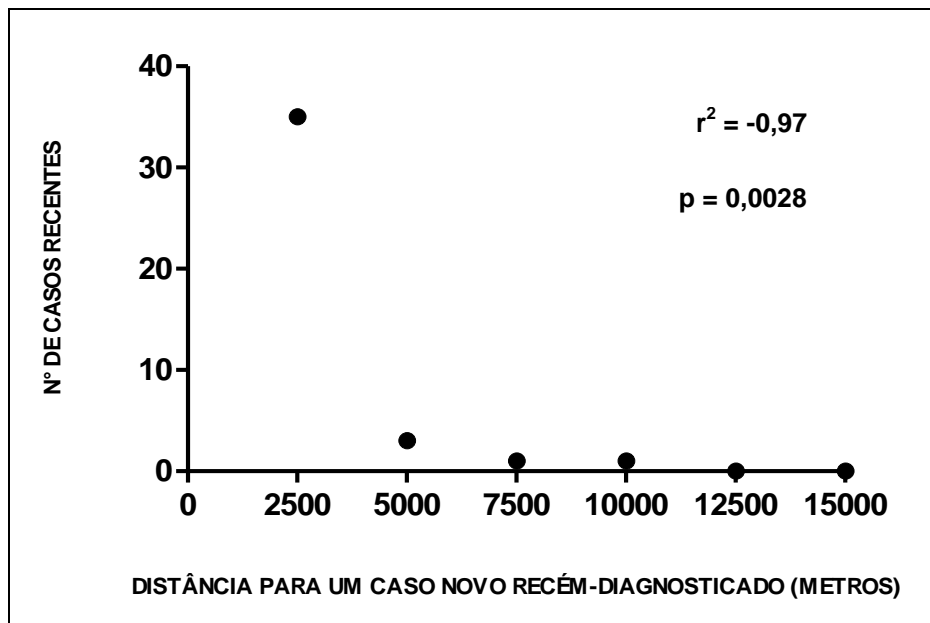


Figura 4. Regressão linear entre o número de casos LC ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0028$ e $r^2 = - 0,97$.

Como observado para LC, os casos de LD mostraram uma correlação inversa significativa entre a frequência de casos diagnosticados nos últimos 3, 6 e 12 meses precedentes a um caso novo de LD e a distância para estes casos recém-diagnosticados (figuras 5 - 7). A maioria dos casos recentes (97%) ocorreu a até 7.500 m de distância do caso novo, sugerindo que a LD ocorre em agregados tempo-espacial e que surtos da doença são mais frequentes que casos esporádicos em Corte de Pedra-BA.

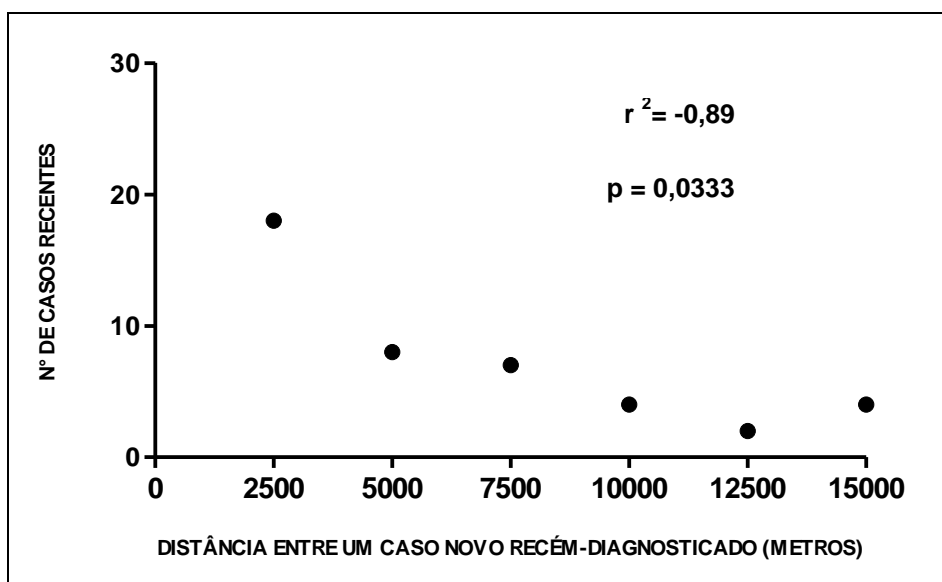


Figura 5. Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0333$ e $r^2 = -0,89$.

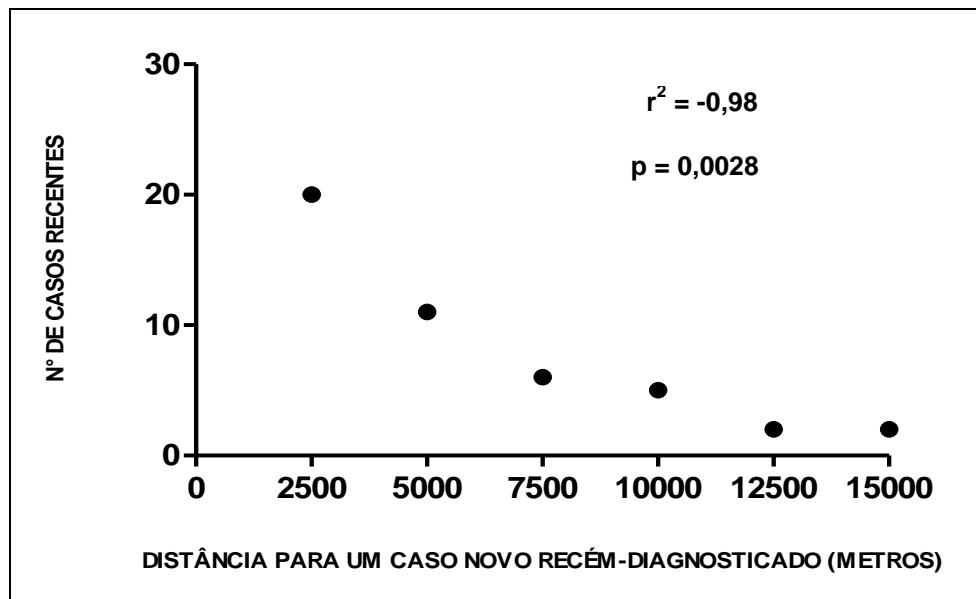


Figura 6. Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0028$ e $r^2 = -0,98$.

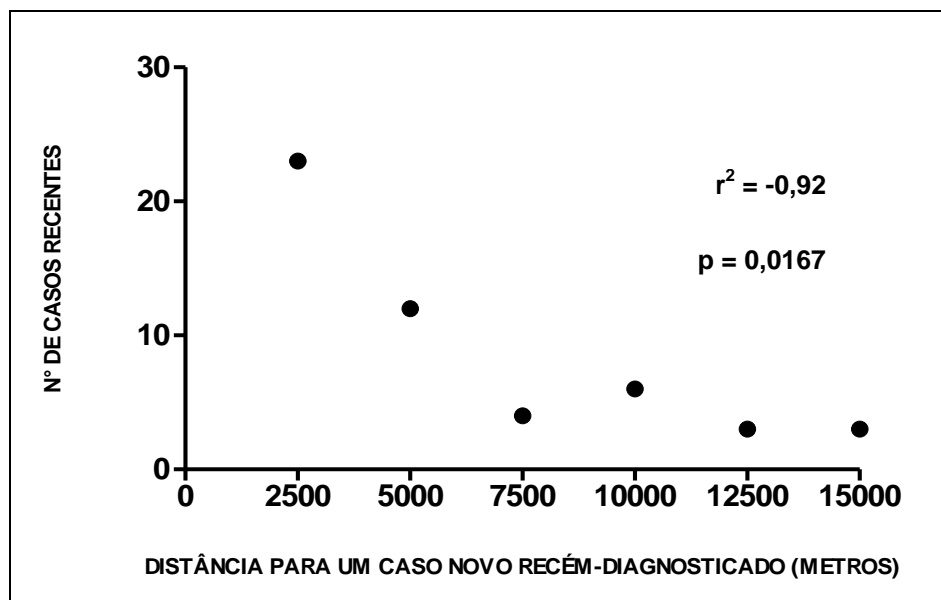


Figura 7. Regressão linear entre o número de casos LD ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0167$ e $r^2 = -0,92$.

Em contraste ao observado para LC e LD, os casos de LM não mostraram uma correlação significativa entre a frequência de casos recentes e a distância para casos novos recém-diagnosticados, em qualquer dos estratos temporais avaliados (ie. 3, 6 ou 12 meses) (figuras 8 - 10). Esse achado indica que a LM não forma agregados têmpero-espaciais, devendo ocorrer, sobretudo, como casos esporádicos.

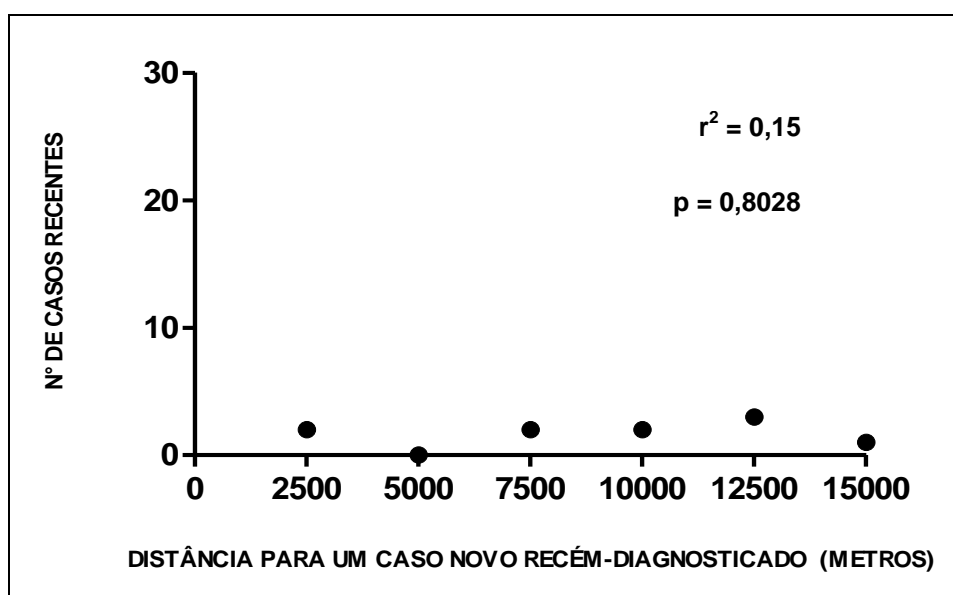


Figura 8. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,8028$ e $r^2 = - 0,15$.

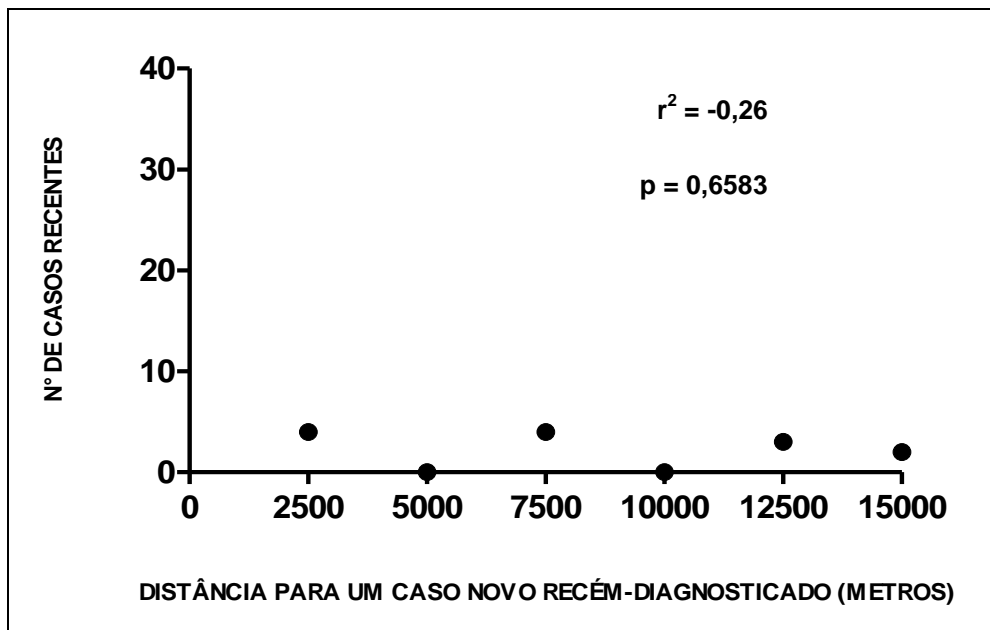


Figura 9. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $r^2 = - 0,26$ e $p = 0,6583$.

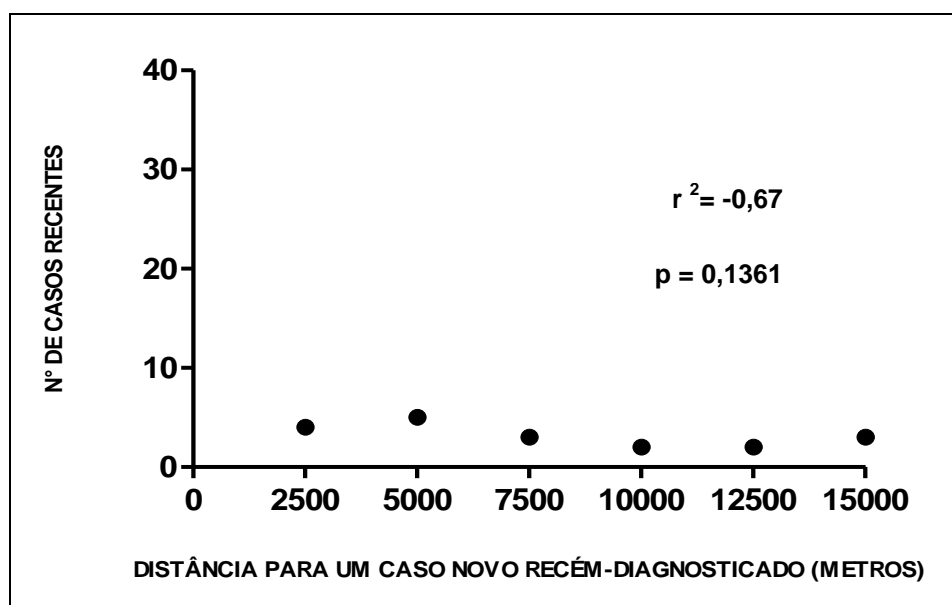


Figura 10. Regressão linear entre o número de casos LM ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $r^2 = - 0,67$ e $p = 0,1361$.

VIII.3 Avaliação da agregação têmporo-espacial da LTA em Corte de Pedra- BA

A fim de se avaliar como a endemia, considerando-se todas as três formas de doença, se mantém em Corte de Pedra, a mesma amostra acima foi realizada sem estratificação por forma de doença. Os dados mostram uma correlação inversa significativa, como observado para LC e LD, independente do estrato temporal avaliado (3, 6 ou 12 meses) (figuras 11 a 13). A maioria dos casos recentes de LTA ($\approx 97\%$) ocorreu a até 7.500 m de distância do caso novo, sugerindo que a endemia seja mantida por surtos de LTA em Corte de Pedra - BA, e corroborando com os achados para LC e LD.

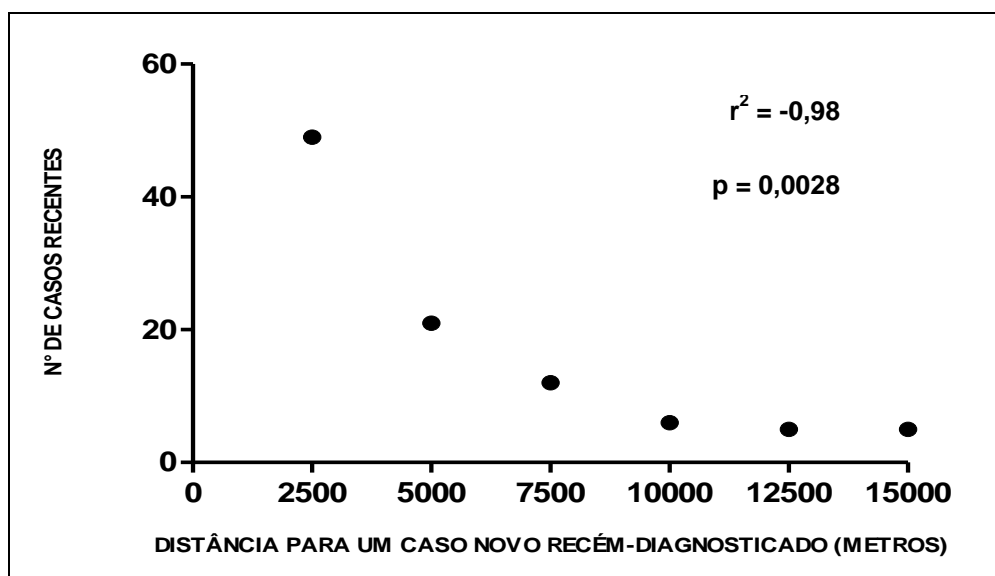


Figura 11. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos três meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0028$ e $r^2 = - 0,98$.

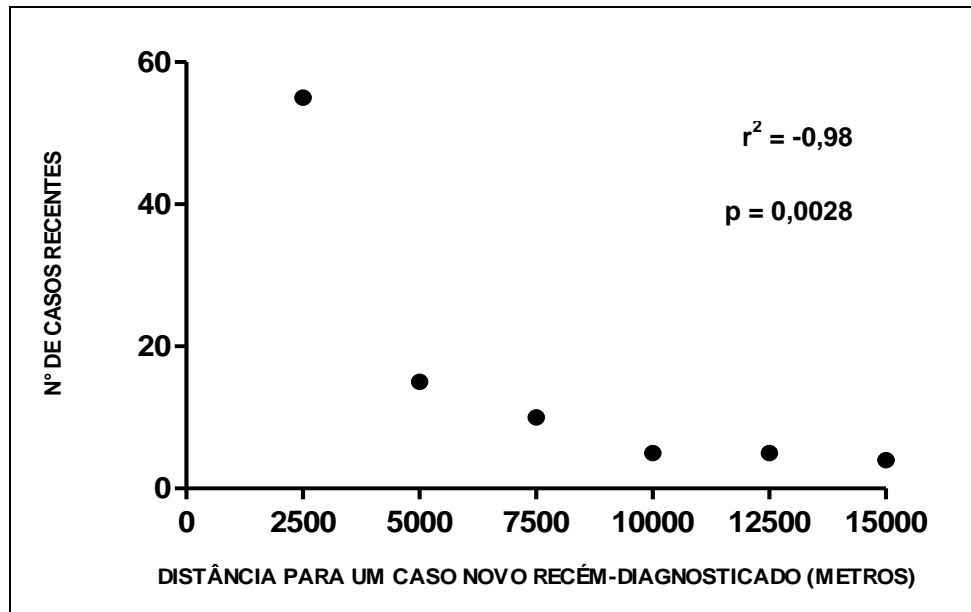


Figura 12. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos seis meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0028$ e $r^2 = - 0,98$.

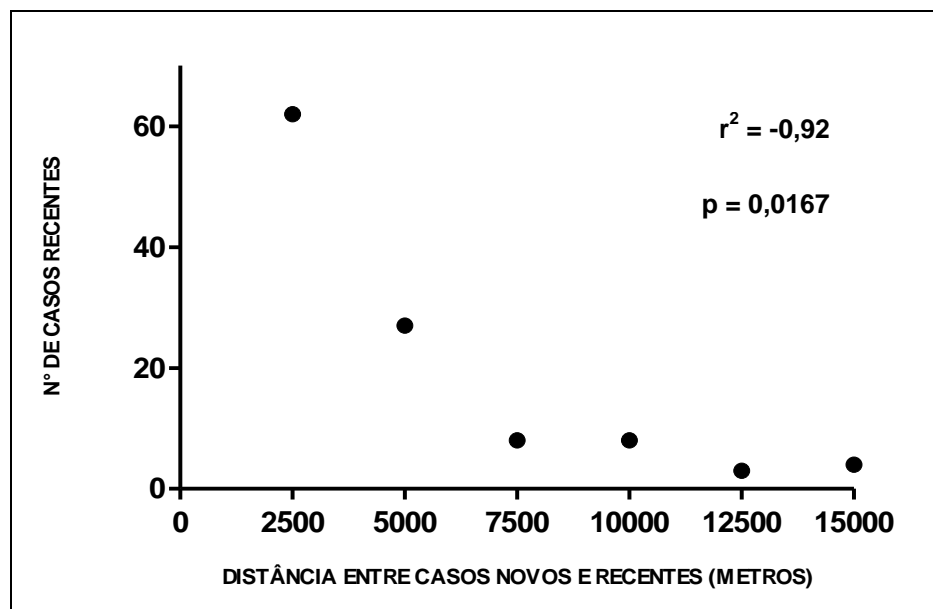


Figura 13. Regressão linear entre o número de casos LTA ocorridos nos doze meses precedentes a um novo diagnóstico da doença e a distância em estratos de 2.500 metros para o caso novo recém- diagnosticado em Corte de Pedra. $p = 0,0167$ e $r^2 = - 0,92$.

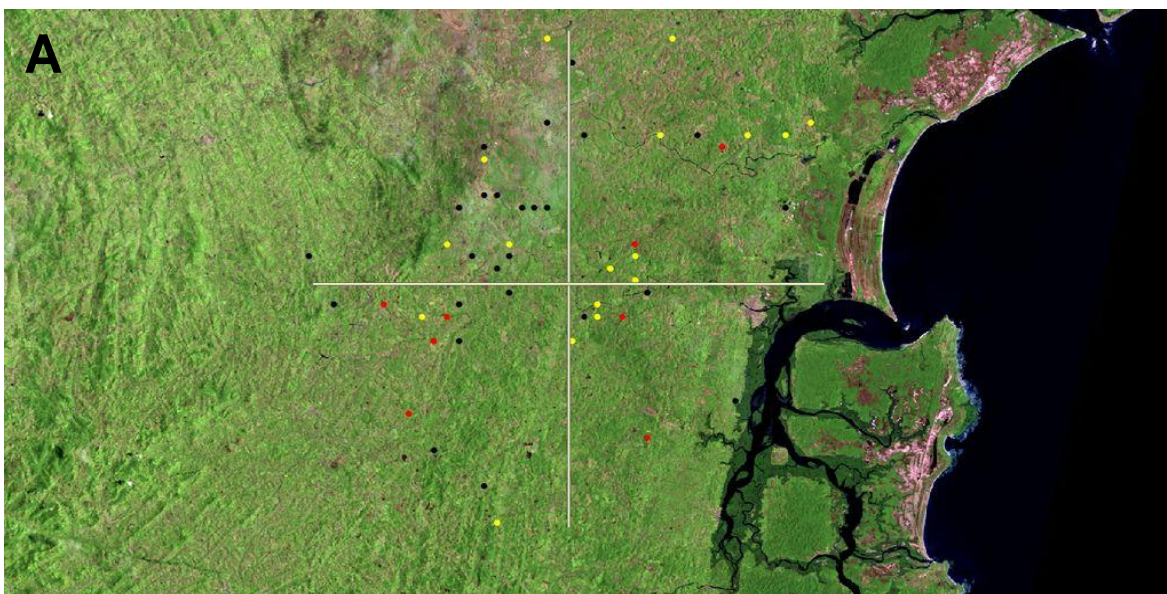
VIII.4 Distribuição têmporo-espaical dos haplótipos mais comuns do locus CHR 24/3074 em Corte de Pedra, entre 2008 e 2011

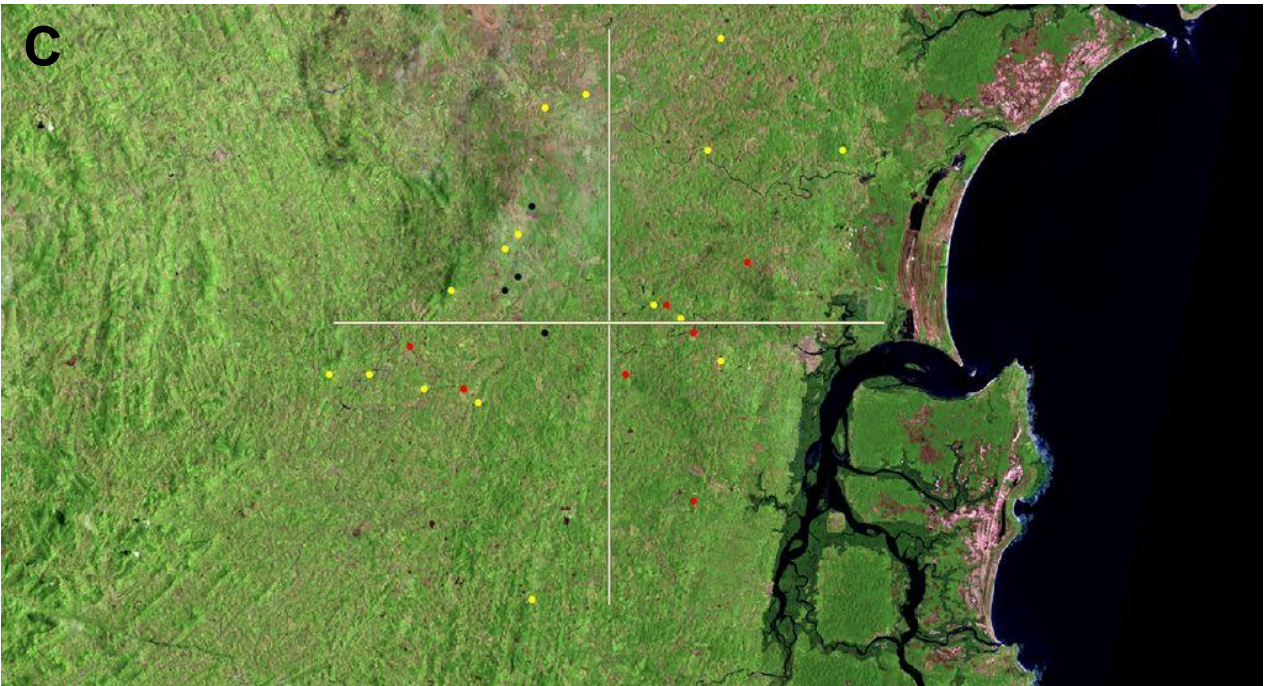
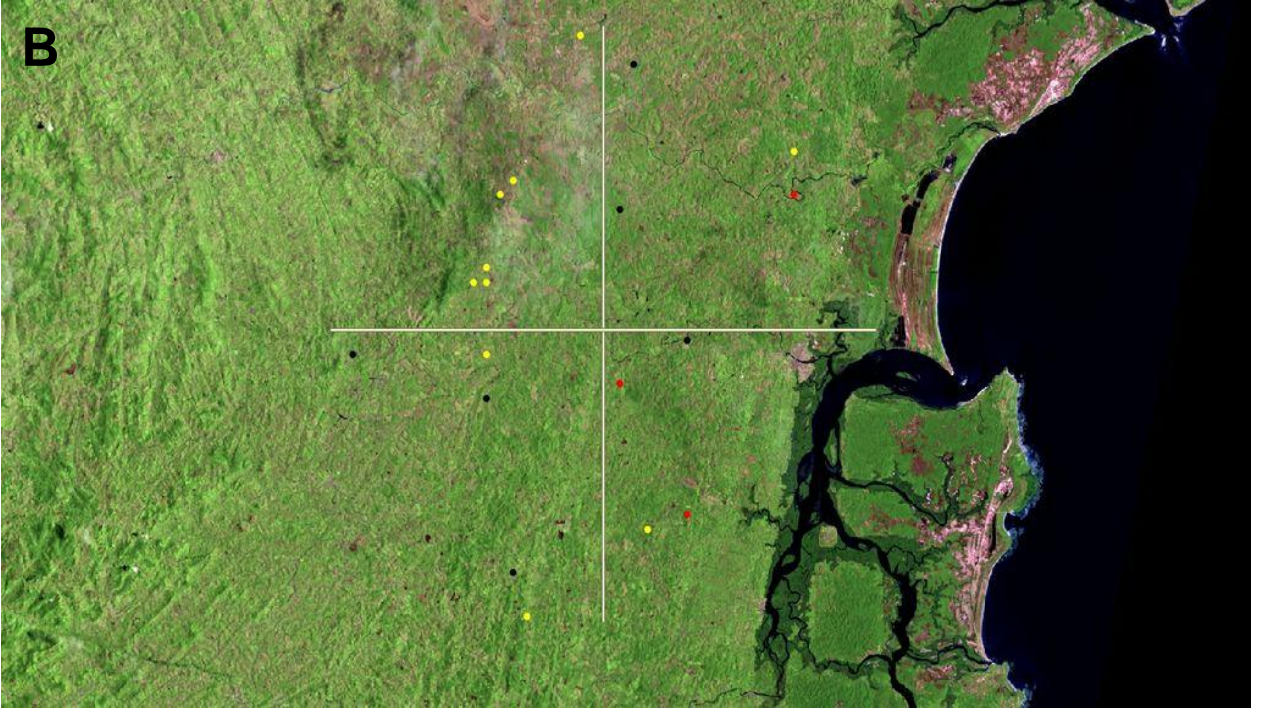
Com a finalidade de compreender melhor o comportamento da população da *L. (V.) braziliensis* na endemia de LTA em Corte de Pedra, os quatro haplótipos mais frequentes no locus CHR 24/3074 desses parasitos no período do estudo foram mapeados em foto satélite da área usando-se o SIG. As coordenadas geográficas dos locais de moradia dos pacientes fontes dos isolados parasitários foram usadas como aproximações das distribuições das diferentes cepas em Corte de Pedra. Embora os haplótipos avaliados tenham apresentado frequências bem distintas na amostra parasitária. Todos se mostraram amplamente distribuídos em Corte de Pedra, sem uma distinção aparente em suas segregações na região (figura 14). Uma análise pormenorizada da distribuição do haplótipo ACAT, mais comum no período, evidencia uma ampla distribuição das cepas parasitárias mais prevalentes no período de estudo, envolvendo os quatro quadrantes de Corte de pedra, embora a metade interior, isto é, oeste, tenha sido a mais acometida, concentrando uma proporção um pouco maior dos isolados de *L. (V.) braziliensis* possíveis para o haplótipo ACAT (57%) (tabela 6 e figura 14).

A avaliação das frequências relativas anuais de cada um dos quatro haplótipos em Corte de Pedra revelou comportamentos distintos entre eles (tabela 7). Entretanto, o haplótipo CCCT apresentou um padrão estável ao longo do tempo e os haplótipos ACAT, ATAC, e CCAT apresentaram diferenças em suas frequências relativas entre os três anos de estudo. Nesse particular, o haplótipo ACAT apresentou um aumento marcante em sua incidência no ano, ao passo que os haplótipos ATAC e CCAT experimentaram

um marcado aumento em suas incidências no ano 2, em relação ao resto do período do estudo. Essas observações sugerem que apesar dos diferentes genótipos parasitários apresentarem uma ampla distribuição na área, variações nas condições ambientais, populações de vetores ou reservatórios, ou flutuações da imunidade de rebanho da população humana de Corte de Pedra às diversas cepas de *L. (V.) braziliensis* circulantes na região, possam ser acompanhadas de surtos por cepas específicas desses parasitas, que trariam o quadro anteriormente delineado de uma endemia mantida por surtos de doença humana ainda mais complexa.

Figura 14. Distribuição espacial dos 4 haplótipos mais comuns no *locus* CHR 24/3074 entre 2008 e 2011 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA. (A) haplótipo ACAT; (B) haplótipo ATAC; (C) haplótipo CCAT e (D) haplótipo CCCT. Pontos vermelhos correspondem aos casos de LTA ocorridos no ano 1 do estudo, amarelos no ano 2 e pretos no ano 3. Os haplótipos foram mapeados de acordo com as coordenadas geográficas das moradias dos casos de LTA dos quais foram isolados as *L. (V.) braziliensis* com os genótipos em questão.





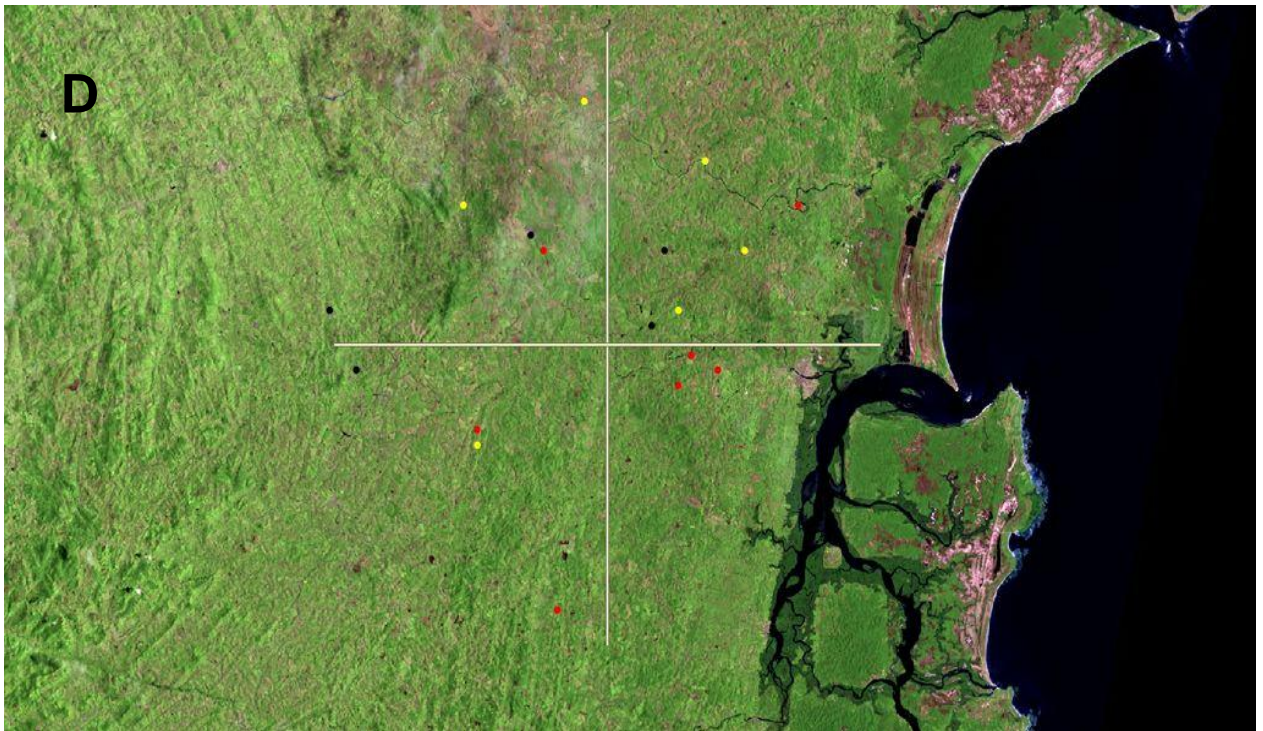


Tabela 6. Distribuição setorial das frequências do haplótipo ACAT do locus CHR 24/3074 nos quadrantes de Corte de Pedra – BA entre 2008 e 2011.

ANO	QUADRANTE				TOTAL
	NE	SE	SO	NO	
1	2	2	4	0	8
2	8	3	2	4	17
3	4	2	6	12	24
TOTAL	14	7	12	16	49

Tabela 7. Frequência anual dos quatro haplótipos mais comuns do *locus* CHR 24/3074 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA, entre 2008 e 2011.

HAPLÓTIPOS				
ANO	ACAT	ATAC	CCAT	CCCT
1	8 (16%)	3 (15%)	7 (26%)	7 (39%)
2	17 (35%)	10 (53%)	16 (59%)	6 (33%)
3	24 (49%)	6 (32%)	4 (15%)	5 (28%)
TOTAL	49 (100%)	19 (100%)	27 (100%)	18 (100%)

IX. DISCUSSÃO

A variabilidade genética entre as diferentes espécies de *Leishmania* é amplamente reconhecida e as diferentes formas clínicas atribuídas a essas espécies, sugerem uma influência da genética do parasita no desfecho da doença (Thomaz et al., 1993). A *L. (V.) braziliensis* é uma das principais espécies responsáveis pela LTA na América do Sul estando envolvida em formas distintas de desfecho da doença, sugerindo a interferência nessas diferentes manifestações pela contribuição de sua variabilidade genética intraespecífica (Schriefer et al., 2004).

Em um estudo desenvolvido por Schriefer et al.(2004) demonstrou-se que a população de *L. (V.) braziliensis* na área de Corte de Pedra é composta por cepas multiclonais, formadas por distintas subpopulações ou clados parasitários e que as mesmas estariam associadas à diferentes formas de LTA na região. Corte de Pedra é uma área endêmica de LTA, situada no sudeste da Bahia, a 280 km de Salvador, onde desde a década de 1980 estudos epidemiológicos e clínicos têm sido realizados nessa região. A avaliação da endemicidade nessa área surgiu, portanto, como consequência das observações prévias de que: (1) a população de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra é multiclonal; (2) a forma disseminada (LD) era localizada na parte mais continental de Corte de Pedra, e posteriormente, se dispersou, ocupando toda área endêmica; (3) a doença ocorre através de surtos na área endêmica (Schriefer et al., 2004 - 2009). A população de *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra tem um papel importante nos desfechos da LTA na região e é, provavelmente, um fator determinante da distribuição das formas de doença

(Schriefer et al., 2004; Queiroz et al., 2012). Dessa forma, acredita-se que a LTA em Corte de Pedra é mantida por surtos clonais de infecções humanas nos focos.

Inicialmente, foi verificado se a leishmaniose em Corte de Pedra é devida a infecções monoclonais ou policlonais. 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. Um total de 17 haplótipos diferentes foi identificado no estudo de Queiroz et al. (2012), possibilitando o reconhecimento de pelo menos 10% dos isolados de *L. (V.) braziliensis*. A partir desses dados, o presente estudo avaliou a frequência de alelos presentes nesses haplótipos numa população de 35 isolados de *L. (V.) braziliensis* de uma amostragem retrospectiva (obtidos de pacientes diagnosticados entre 1992 e 2001), encontrando em 96% dos isolados a presença de até dois haplótipos. Esses achados sugerem que a infecção por esses parasitas é oligoclonal, e que as infecções ocorridas nessa região estudada podem se dar por meio de agregados, reforçando que cepas antigas podem ser responsáveis pela manutenção da doença na área. Uma mesma avaliação foi realizada com o intuito de validar os resultados já obtidos, utilizando um número maior de isolados de *L. (V.) braziliensis* em uma amostragem prospectiva (94 isolados obtidos de pacientes diagnosticados entre 2008 e 2011) na qual observamos que a maioria dos isolados (87%) apresentou até dois haplótipos apenas, concordando com os achados obtidos com a amostra retrospectiva, ou seja, que as infecções em Corte de Pedra são

oligoclonais. Sabe-se que a estrutura genética da *L. (V.) braziliensis* é bastante polimórfica e deve ser estudada com minuciosidade, mas esses achados associados a uma abordagem futura mais complexa podem dar suporte ao entendimento de como ocorre à manutenção da doença na região e com esses dados ter subsídio para o manejo da LTA em Corte de Pedra - BA.

Normalmente, os pacientes com LC desenvolvem uma única lesão ulcerada no local da picada do flebotomíneo. Nesse caso, imagina-se que a oportunidade de inoculação do parasita é feita uma única vez ou por um único vetor, sugerindo que alguns deles poderiam ter transmitido mais de uma cepa de *L. (V.) braziliensis* em pacientes com LC que apresentaram infecção aparentemente policlonal. Possivelmente, o vetor deve ter adquirido essas duas ou mais cepas ao picar diferentes reservatórios e/ou hospedeiros humanos. O flebotomíneo pode sobreviver por várias semanas, e durante esse período, ele pode acumular cepas diferentes em seu tubo digestivo (Cupolillo et al., 2003). Talvez isso explique a inoculação de mais de uma cepa no hospedeiro humano e a presença das mesmas em um único hospedeiro.

Boité et al. (2012), mostraram que haplótipos podem ser compartilhados entre diferentes espécies de *Leishmania*. Todavia, um grande número de haplótipos específicos para *L. (V.) braziliensis* foi encontrado no seu estudo, podendo ser raros ou recentes nesta população. A análise dos haplótipos é relevante, pois gera resultados mais robustos, já que esses se referem a todos os SNPs que foram observados em conjunto em cada um dos alelos dos isolados, e possibilita a visualização da quantidade de alelos presente em cada

isolado, permitindo a avaliação do número de cepas envolvidas na infecção e utilizando-os como possíveis biomarcadores.

Os SNPs espécie-específicos não foram detectados em *L. (V.) braziliensis* no estudo Boité et al. (2012), porém SNPs espécie-específicos para as espécies estudadas foram demonstrados posteriormente, inclusive para *L. (V.) braziliensis*. Esta inconsistência entre os dois estudos pode ser uma consequência de diferentes genes analisados, bem como nas estirpes estudadas, ou mesmo mudanças na estrutura genética das espécies (Boité et al., 2012). Por conseguinte, os SNPs devem ser utilizados com cautela para a identificação de espécies, mesmo quando as estirpes serão mais detalhadas em estudos posteriores. As sequências devem ser obtidas integralmente para que os SNPs utilizados como marcadores sejam usados para uma identificação e caracterização precisa (Boité et al., 2012).

Para a compreensão da dinâmica das infecções ocorridas em Corte de Pedra e o comportamento dessas cepas, Schriefer *et al.* (2009), avaliaram a distribuição dos casos de LD e LM na região e demonstraram que a maioria dos pacientes com LM residiam numa região específica da área e que os pacientes com LD estavam distribuídos por toda a área endêmica. Além disso, mostraram que há uma sobreposição entre a distribuição e o agrupamento dos casos, onde as cepas agrupadas no clado A foram associadas à LD e no clado C foram associadas à LM (Schriefer et al., 2004).

Diante desses achados e do surgimento de novos casos da doença próximos às regiões onde já havia sido observada a ocorrência de outros casos de LTA, o presente estudo analisou a distância e a frequência entre os casos

recentes e os casos novos ocorridos em Corte de Pedra-BA. A avaliação da regressão linear, usada no cálculo da distância e da frequência entre os casos recentes e os casos recém-diagnosticados ocorridos, mostrou que a maioria (91%) dos casos recentes ocorre a uma distância de 0 à 7.500 metros dos casos novos. A estratificação desses casos por forma clínica mostrou que, das três formas de doença encontradas em Corte de Pedra (LC, LD e LM), apenas a LM não mostrou indícios de que a transmissão ocorra através de surtos. É provável que o número reduzido de casos com LM incluídos no estudo tenha influenciado a avaliação para essa forma de doença, ou a avaliação foi comprometida pelo retardo em que a LM se manifesta no paciente, após a inoculação do parasito. Em LC, houve uma significância relevante, no qual os três estratos temporais demonstram essa proximidade dos casos. Esse fato pode estar relacionado à frequência e a densidade de flebotomíneos próximos a domicílios e peridomicílios, já que a presença de resquícios da mata original e a distância desta em relação às residências são fatores que parecem ser relevantes à base da persistência da LTA na sua forma zoonótica em regiões afetadas pela doença (Monteiro et al., 2008). Além disso, a modificação da vegetação nativa circundados pelo ambiente degradado por causa do processo agrícola, possivelmente, podem funcionar como refúgios ecológicos para vetores e reservatórios de *L. (V.) braziliensis*.

Em LD ocorreu o mesmo que em LC, ou seja, uma significância entre as correlações mostrando que a maioria dos casos recentes de LD (97%) ocorreu a até 7.500 m de distância dos casos novos. Esses dados sugerem que as infecções humanas pela *L. (V.) braziliensis* acontecem em agregados, corroborando com os achados de LC de que surtos da doença são mais

frequentes que casos esporádicos em Corte de Pedra-BA. A LD ao longo dos anos vem sofrendo uma expansão na região de Corte de Pedra. Schriefer *et al.* (2009) mostraram claramente a disseminação dessa forma de LTA em Corte de Pedra, onde até 1996, os casos de LD se restringiam a região central área e nos anos seguintes, se expandiam por toda a região. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que em 2003 os casos de LM ficavam mais concentrados na região central de Corte de Pedra, enquanto que os casos de LD eram bem distribuídos por toda a área endêmica, mostrando que a distribuição dos casos de LTA em Corte de Pedra vem sofrendo mudanças ao longo do tempo.

As mudanças ambientais que se seguem, o homem vivendo em regiões próximas à mata nativa e a presença de cães, equinos e outros reservatórios peridomésticos, provavelmente, criaram um ambiente propício para que as cepas de *L. (V.) braziliensis* se propagassem na região. Provavelmente, os surtos de leishmaniose em Corte de Pedra são mantidos pelos vetores *Lu. Whitmani* e *Lu. Intermedia*, que são endêmicos em Corte de pedra (Schriefer *et al.*, 2009) e tem hábitos peridomiciliares (Lainson *et al.*, 1988). *Lutzomyia ssp* são os vetores, fatores importantes na transmissão de *L. (V.) braziliensis* no Novo Mundo e, portanto, são susceptíveis à participação no ciclo de transmissão (Brito *et al.*, 2009). Esta espécie é mais abundante em peridomicílios (em galpões onde há presença de animais próximos as casas), mas houve achados da espécie no principal remanescente de Mata Atlântica (Brito *et al.*, 2009). Esses fatores podem estar exercendo uma grande influência na região de Corte de Pedra, já que foi mostrado que a população de *L. (V.) braziliensis* desta área endêmica é formada por subpopulações ou clados parasitários e que estão associados a fenótipos da forma de LTA

(Schriefer et al., 2004). Sabe-se que a maioria da população de Corte de Pedra sobrevive da agricultura em áreas desmatadas que no passado foi Mata Atlântica ou que ainda há resquícios de mata, podendo esses fatores ser agravantes para a ocorrência de surtos da doença na região. Castellucci et al. (2005), mostraram que nessa região, predominantemente rural, os indivíduos da mesma família podem compartilhar além de fatores genéticos, fatores ambientais, podendo ambos interferir no desfecho da doença. Além disso, demonstrou-se que indivíduos que apresentam o risco aumentado de desenvolver LM ou LC já tiveram casos de membros da família que têm histórico de LM, quando comparados às pessoas que não tiveram familiares afetados pela doença (Castellucci et al., 2005).

O risco de adquirir a infecção é determinado pelo comportamento do vetor e pela presença de um animal reservatório ou pelo hospedeiro humano infectado, ou seja, ambiente propício para a infecção (Murray et al., 2005). O hábito de vida da população também exerce um grande papel na transmissão da doença. A exposição do indivíduo a fatores de risco que estão associados ao aumento da LTA podem ser relevantes para a aquisição da doença. Yadon et al (2003), realizaram um estudo na Argentina e evidenciaram que a transmissão interna pode vir do aumento do risco para as pessoas que habitam casas que tem uma menor quantidade de dormitórios, possuem pisos de terra, ou aberturas permanentes para janelas, ou seja, um ambiente aberto propício a entrada de flebotomíneos. Além disso, mostraram que a evidência mais direta para transmissão peridomiciliar vem da constatação de que o risco de LTA foi maior para aqueles que mais frequentemente dormiam ao ar livre (Yadon et al., 2003) e possivelmente mais expostos aos vetores. Estas características foram

também encontradas para aumentar o risco de LTA em outras áreas endêmicas, onde a transmissão doméstica era suspeita (Yadon et al., 2003). A ocorrência de surtos em áreas afetadas pode está associada a todos esses fatores. A identificação de pontos na área onde essas infecções estão ocorrendo e como se dá essa transmissão podem auxiliar no controle e manutenção da doença na região. A existência de transmissão contínua em áreas urbanizadas já foi vista em outras regiões e formas da doença, assim como em outras espécies, como na leishmaniose visceral ocasionada pela *L. (L.) chagasi* e pela *L. (L.) infantum* e transmissão interna de leishmaniose cutânea pela *L. (Vianna) braziliensis*, *L. (L.) mexicana* na América Latina (Murray et al., 2005).

A identificação de focos de doenças em áreas afetadas é de grande relevância, pois medidas prognósticas podem ser estabelecidas nessas regiões. Além disso, a associação com agrupamentos de genótipos em relação ao tempo / espaço e a forma clínica da doença podem mostrar com maior clareza a ocorrência de surtos em áreas endêmicas.

Todos os casos de LTA diagnosticados entre 2008 e 2011 foram genotipados e mapeados. O objetivo dessa avaliação foi verificar se os diferentes genótipos formavam agregados em Corte de Pedra. Os resultados mostraram que os genótipos analisados tinham ampla distribuição e não formaram aglomerados de casos em pontos específicos da região, como era esperado. É possível que cada uma das cepas ocupasse a região a tempo suficiente para que tenha ocorrido uma ampla dispersão das mesmas, ou a

ferramenta utilizada não teve o poder discriminatório suficiente para distinguir os isolados que de fato são genotipicamente diferentes.

A abordagem empregada nesse estudo foi a mesma que Queiroz et al., 2012 utilizou em suas análises, nos quais foram utilizados seis *loci* para distinguir os isolados de *L. (V.) braziliensis*. No atual estudo, a genotipagem foi realizada com apenas um *locus*, o que talvez justifique a baixa capacidade de discriminar os isolados. A genotipagem desses mesmos isolados utilizando os outros cinco *loci* poderá aumentar o poder discriminatório da análise e, conseqüentemente, ser capaz de revelar os agrupamentos ocasionados pelos surtos.

Interessantemente, quando a distribuição dos genótipos foi estratificada por ano, observou-se que houve um aumento na incidência dos casos após o primeiro ano do estudo, notando-se uma dispersão dos casos por toda extensão da área endêmica de Corte de Pedra. Esse fenômeno pôde ser observado para os quatro haplótipos avaliados. É possível que os isolados tenham surgido na parte sul da área endêmica, onde foram observados os casos do primeiro ano do estudo e se expandiu em direção a região norte.

A manutenção da vigilância na área endêmica pode nos dar a chance de encontrar um genótipo que ainda não se expandiu. Isso permitiria, se for o caso a observação de como o surto ocorre na área endêmica e como este se dissemina na região. A abordagem sobre a relação entre endemia e clonalidade das infecções humanas por *L. (V.) braziliensis* ressalta a importância da observação de como é mantida a endemia na região afetada e como as cepas se comportam para manter os casos da doença.

X. CONCLUSÕES

1- As formas LC e LD provavelmente ocorrem em surtos de casos em Corte de Pedra-BA.

2- A LM ocorre como casos esporádicos em Corte de Pedra na amostra avaliada.

3- As infecções humanas pela *L. (V.) braziliensis* são oligiclonais, contudo as avaliações precisam ser estendidas para as amostras de DNA provenientes de biópsias, para que os achados baseados nas genotipagens de parasitas cultivados possam ser confirmados.

4- A ampla distribuição dos quatro haplótipos do locus CHR24/3074 observada na área endêmica de Corte de Pedra sugere que as cepas que os apresentam não são recentes, o que resultou na dispersão desses genótipos na área endêmica.

5- Os comportamentos das frequências dos haplótipos do locus CHR24/3074 ao longo dos três anos de estudo em Corte de Pedra sugerem que surtos de cepas de *L. (V.) braziliensis* mantêm a endemia de LTA na região. Contudo as avaliações precisam ser estendidas para haplótipos menos frequentes desse locus e para os demais loci polimórficos identificados nos

parasitas dessa área, a fim de se realizar uma avaliação mais detalhada dos comportamentos das cepas do parasita na região e se confirmar essa impressão.

XI. REFERÊNCIAS

- Awasthi, A., R. K. Mathur, et al. 2004. "Immune response to *Leishmania infection*." Indian J Med Res 119(6): 238-258.
- Azulay, R. D., and D. R. Azulay Junior. 1995. *Immune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis*. Int. J. Dermatol. 34: 303-307.
- 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.
- Basano, S.A.; Camargo L.M.A. *American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control*. Leishmaniose tegumentar americana, Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, Nº 3, 2004.
- Barral A, Barral-Netto M, Almeida R, Jesus AR, Grimaldi Jr GJ, Netto EM, Santos I, Bacellar O, Carvalho EM. *Lymphadenopathy associated with Leishmania braziliensis cutaneous infection*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 47:587-592, 1992.
- Barral A, Guerreiro J, Bonfim G, Correia D, Barral-Netto M, Carvalho EM. *Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by Leishmania braziliensis*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 53:256-259, 1995.
- Barretto A. C., Cesar A. C. Cuba," Philip D. Marsden, Julio A. Vexanat e Mark De Belder *Características Epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana em uma Região Endêmica do Estado da Bahia, Brasil*. Leishmaniose Humana. Bol Of Sand Panam 90(5), 1981.

Boité MC, Mauricio IL, Miles MA, Cupolillo E (2012) *New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of Leishmania (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis*. PLoS Negl Trop Dis 6(11): e1888. doi:10.1371/journal.pntd.0001888

Bogdan, C.; Rollinghoff, M. *The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion*. Int J Parasitol, n1, v. 28, p. 121-34. 1998.

Brito m. E. F., Andrade m. S., Mendonça m. G., Silva c. J., Almeida e. L., Lima b. S., Félix s. M., Abath f. G. C., Graça g. C. Da, Porrozzi r., Shaw e. A. I. J., Cupolillo e. And s. P. Brandão-filho. *Species diversity of Leishmania (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil*. Tropical Medicine and International Health volume 14 no 10 pp 1278–1286 october 2009.

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.

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.

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. Magalhães, 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.

Costa j.m.l. *Epidemiology of the Leishmaniasis in Brazil*.Gaz. méd. Bahia (Jan-Jun):3-17 (2005) ;75:1.

Cupolillo, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI JR,G. *Genetic diversity in natural populations of new world leishmania*. Mem inst Oswaldo Cruz, n.5, v.93, p.663-8. 1998.

Cupolillo, E.; Brahim L. R.; Toaldo, C. B.; De Oliveira-Neto, M. P.; de Brito, M. E.; Falqueto, A.; et al. *Genetic polymorphism and molecular epidemiology of leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil*. J Clin Microbiol, n7, v. 41, p. 3126-32. 2003.

De Almeida, M. C.; Vilhena, V.; Barral, A.; Barral-Neto, M. *Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, n.7, v.98, p.861-70. 2003

Desjeux, P. 1992. *Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects*. World Health Stat. Q. 45: 267-275.

Desjeux, P. *Leishmaniasis: current situation and new perspectives*. Comp. Immunol Microbiol Infect dis, n. 5, v. 27, p. 305-18. 2004.

Dourado, M.I.C., Noronha C. V., Alcantara N., Ichihara M. Y. T., Loureiro S. *Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana e suas relações com a lavoura e o garimpo, em localidade do Estado da Bahia (Brasil)*. Rev. Saúde públ., S.Paulo, 23:2-8, 1989.

Follador I., Araujo C., Cardoso, M. A. Tavares-Neto J., Barral A., José Miranda C, Bittencourt A. e Carvalho E. M.. *An outbreak of American cutaneous leishmaniasis in Canoa, Santo Amaro, Bahia, Brazil*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 32(5):497-503, set-out, 1999.

Gontijo, B., Carvalho, M. L. R. 2003. *American cutaneous leishmaniasis*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36(1):71-80, jan-fev. Artigo de Atualização.

Jones TC, Johnson WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Martins Netto E, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golightly L, Frikrig E, Costa JML, Cuba CAC, Marsden PD. *Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis*. The Journal of Infectious Diseases 156:73-83, 1987.

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.

Kaye, P., P. Scott . 2011. "*Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface*." Nat Rev Microbiol 9(8): 604-615.

Lainson R., Killick-Kendrick R., A. Flisser. 1988. *Interações ecológicas na transmissão das leishmanioses [e Discussão]* Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 1988 321, doi: 10.1098/rstb.1988.0099, published online 31 October 1988.

Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de saúde. *Manual do Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 5º edição. Brasília, 2007
Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana* 2.ª edição atualizada Série A. Normas e Manuais Técnicos Brasília – DF 2007.

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.

Marsden, P. D. 1986. *Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911)*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80: 859-876.

Medeiros, A. C. R.; Roselino, A. M. F. *Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje*. Educação Médica Continuada. Na Brás dermatol. Rio de Janeiro, 74 (4), 329-36. 1999.

Monteiro w. M., neitzke h. C., Ionardon, m. V. C. Silveira, t. G. V. M., ferreira, e. M., teodoro. C. U. *Geographic distribution and epidemiological features of American tegumentary leishmaniasis in old rural settlements in Paraná State, Southern Brazil*. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 24(6):1291-1303, jun, 2008.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) *Advances in leishmaniasis*. Lancet 366:1561-1577.

Negrão, G. N; Ferreira, M.E.. M. *Considerações sobre a Dispersão da Leishmaniose Tegumentar Americana nas Américas*. Revista Percurso - NEMO Maringá, v. 1, n. 1 , p. 85-103, 2009.

Oliveira, C. C.; Lacerda, H. G.; Martins, D. R.; Barbosa, G. D.; Monteiro, G. R.; Queiroz, J. W. *Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban-rural interface*. Acta Trop, n.2, v. 90, p. 155-62. 2004.

Organização Mundial da Saúde (WHO-World Health Organization) Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish.html>, Acesso em 2012.

Oumeish, O. Y. (1999). "*Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective*." Clin Dermatol 17(3): 249-254.

Queiroz, A. S., Sousa, R. S., Heine, C., Cardoso, M., Guimarães, L.H., Machado, P. L. R., Carvalho, E. M., Riley, L.W., Wilson, M. E., Schriefer, A. *Association Between an Emerging Disseminated form of leishmaniasis and Leishmania (Viannia) braziliensis Strain Polymorphisms*. J. Clin. Microbiol. December 2012 50:124028-4034; published ahead of print 3 October 2012.

Schriefer, A., Schriefer, A. L. F., Góes-Neto, A., Guimarães, L. H., Carvalho, L. P., Almeida, R. P., Machado, P. R., Lessa, H. A., Ribeiro de Jesus, A., Riley, L.W. and E. M. Carvalho. 2004. *Multiclonal Leishmania (Viannia) braziliensis Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemic American Tegumentary Leishmaniasis (ATL)*. Infect. Immun. 72: 508-514.

Schriefer, A, ALF Schriefer, A Góes-Neto, LH Guimarães, PRL Machado, HA Lessa, M Lessa, G Ritt, LW Riley, E Lago, EM Carvalho. 2009. *Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. Emerging Infectious Diseases*. 6: 871-876. DOI: 10.3201/eid1506.080406.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E. *Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, n.3, v.99, p.239-51. 2004.

Silveira, F. T.; Lainson, R.; Corbett, C. E. *Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review*. Mem Inst Oswaldo Cruz, n.3, v.99, p.239-51.2004

Toledo, A.; Martin-Sanchez, J. Pesson, B.; Sanchiz-Marin, C.; Morillas-Marquez, F. *Genetic variability within the species Leishmania infantum by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure.* Mol Biochem Parasitol, n.2, v.119, p.257-64.2002.

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.

Thomaz Soccol-V, Lanotte G , Rioux JA , Pralong F , Martini-Dumas A , E Serres. *Monophyletic origin of the genus Leishmania Ross, 1903.* Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Brasil. 1993.

Thomaz-Soccol, V., G. Lanotte, et al. (1993). "*Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania.*" *Ann Parasitol Hum Comp* 68(2): 104-106.

Yadon Z. E., Rodrigues L. C., Davies C. R., Quigley M. A. *Indoor And Peridomestic Transmission Of American Cutaneous Leishmaniasis In Northwestern Argentina: A Retrospective Case-Control Study.* *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 68(5), 2003, pp. 519–526 Copyright © 2003 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

XII. ANEXO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: O PAPEL DO POLIMORFISMO DA *Leishmania (Viannia) 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 (Viannia) 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. Foram-me 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. Foram-me 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