



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



**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA PROTEASE GP63
EM UMA POPULAÇÃO DE *Leishmania Viannia braziliensis*
CAUSADORA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Lilian Silva Medina

Dissertação de Mestrado

Salvador (Bahia), 2014

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

M491 Medina, Lilian Silva

Avaliação do polimorfismo da protease GP63 em uma população de *Leishmania Viannia braziliensis* causadora da Leishmaniose Tegumentar Americana / Lilian Silva Medina. – Salvador, 2014.

109f.

Orientadora: Prof. Dr. Nicolaus Albert B. Schriefer

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina, 2014.

1. Leishmaniose. 2. Parasitologia. 3. GP63. 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 DO POLIMORFISMO DA PROTEASE GP63
EM UMA POPULAÇÃO DE *Leishmania Viannia braziliensis*
CAUSADORA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA**

Lilian Silva Medina

Professor- orientador: Nicolaus Albert B. Schriefer

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

Salvador (Bahia), 2014

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

- Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.
- Dr. Marcelo Távora Mira, Professor Titular do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Escola de Medicina Pontifícia Universidade Católica do Paraná
- Dr. Ricardo Riccio, Pesquisador do Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz, Fundação Oswaldo Cruz.

Membros suplentes:

- Dr. Nicolaus Albert B. Shriefer, Professor Titular do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade federal da Bahia.

Nunca é alto o preço a pagar pelo privilégio de pertencer a si mesmo.

(Friedrich Nietzsche)

Dedico a Deus, aos meus pais, Carlos e Hilda, aos meus irmãos, Leandro, Gabriel, Jorge e Augusto e ao meu noivo Elton Carlos, cujo exemplo, amor e apoio me conduzem.

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

- Faculdade de Medicina da Bahia.
- Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES),
Serviço de Imunologia (SIM).

FONTES DE FINANCIAMENTO

1. NIH - National Institute of Health (Grant P50AI30639-16 e R03AI067663-02).
2. TMRC- Tropical Medicine Research Centers / National Institute of Health.
3. CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Nicolaus Albert B. Schriefer, pela aceitação no seu grupo de pesquisa, por todas as oportunidades proporcionadas, os espaços, a atenção, pela preciosa orientação, sapiência e competência perante este trabalho. A sua confiança em meu trabalho e as oportunidades que me brindou durante estes anos, período rico em experiências e conhecimento. Ao Prof. Albert, minha admiração, respeito, gratidão e a certeza da lembrança por toda vida.

Ao Prof. Edgar Marcelino de Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia (SIM), pela oportunidade oferecida para a realização desse trabalho e pela disponibilidade em atividades desenvolvidas no seu laboratório.

A toda equipe que trabalha na área endêmica de Corte de Pedra, pela geração de materiais para os experimentos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde –PPGCS, pela valiosa contribuição para o crescimento do conhecimento.

Aos colegas do SIM, pelo convívio e trocas de idéias, em especial ao laboratório de Parasitologia Molecular, composta por Kátia Salgado, Angela Giudice, Thaís Delavechia, Anselmo Souza, obrigada pelo apoio, incentivo e ambiente agradável com toda alegria para se conviver no laboratório e fora dele também.

A Adriano Queiroz e Rosana Sousa, a quem sou muito grata, pelos conhecimentos compartilhados, pela valiosa ajuda nos experimentos, paciência, pelas discussões do trabalho e pelo carinho.

A equipe EPIMOL, Juliana Almeida, Viviane Magalhães, Silvana Conceição, Pollyana Primo, Isabele Pinheiro, Bruno Souza, Luiz Henrique Guimarães pela paciência, conhecimentos compartilhados, companhia, carinho, pelo convívio inesquecível que fez o meu dia-a-dia muito feliz. Obrigada por todos os bons momentos alegres que vivemos e que jamais esquecerei.

A Pedro Paulo Carneiro, pela sua dedicação, apoio e carinho durante estes anos, meu carinho será eterno.

Aos amigos e a minha família, em especial aos meus pais e minha avó, pelo sacrifício, amor e apoio por toda a vida. A eles meu amor eterno.

A Elton Matos, pela valiosa companhia, paciência, alegria, carinho, força e dedicação em todos os momentos.

A todos que de uma ou outra forma colaboraram com a execução desta dissertação.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	11
Índice de tabelas	13
Índice de figuras	14
I. Resumo	16
II. Objetivos	17
Geral	17
Específicos	17
III. Introdução	18
IV. Revisão da literatura	21
IV.1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose	21
IV.2 Vetor, agente e ciclo biológico	23
IV.3 Leishmaniose Tegumentar Americana	26
IV.4 Hospedeiro, aspectos clínicos e imunológicos	29
IV.5 Tratamento e prevenção	34
IV.6 Metalloprotease	37
V. Hipótese	43
VI. Justificativa	44
VII. Desenho de estudo e métodos	45
VII.1 Desenho do estudo	45
VII.2 Área de estudo	45
VII.3 População e amostra de estudo	46
VII.4 Definição de casos	47
VII.5 Critérios de inclusão e não-inclusão	47
VII.6 Considerações éticas	48

VII.7 Obtenção dos isolados parasitários de DNA genômico de <i>L.(V.) braziliensis</i> .	48
VII.8 Determinação da espécie de leishmania por PCR em tempo real.	49
VII.9 Amplificação por PCR e clonagem dos alelos de <i>gp63</i> de isolados de <i>L.(V.) braziliensis</i> .	49
VII.10 Sequenciamento dos fragmentos clonados da <i>gp63</i> .	53
VII.11 Distribuição geográfica dos casos de LTA e alelo de <i>gp63</i> em Corte de Pedra – BA.	54
VII.12 Análise estatística	55
VIII. Resultados	56
VIII.1 Identificação dos polimorfismos da <i>gp63</i> em isolados de <i>L.(V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra – BA.	56
VIII.2 Classificação dos alelos da <i>gp63</i> e identificação do cromossomo em que seus loci estão localizados na <i>L.(V.) braziliensis</i> .	58
VIII.3 Distribuição geográfica dos alelos da <i>gp63</i> em Corte de Pedra – BA.	59
VIII.4 Avaliação das sequências traduzidas dos alelos da <i>gp63</i>	61
VIII.5 Associação entre alelos da <i>gp63</i> e a forma clínica de LTA.	66
XIX. Discussão	67
X. Perspectiva de estudo	74
XI. Conclusões	75
XII. Summary	76
XIII. Referências bibliográficas	77
XIV. Anexos	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL: Microlitro

AIDS: Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

AmB: Anfotericina B

CEP : Comitê de Ética em Pesquisa

CONEP: Comissão Nacional de Ética e Pesquisa

DALYs: Disability Adjusted Life Years

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTNs: Doenças Tropicais Negligenciadas

FcγRI, FcγRII: receptores para a porção Fc de imunoglobulinas

GP63: Glicoproteína 63

GPI: glicofosfatidilinositol

HBR: Enzima codificante para receptor de hemoglobina

HNP-1: Peptídeo 1 do neutrófilo humano

IFN- γ: Interferon gama

IL – 12: Interleucina – 12

IL-10: Interleucina 10

kDNA: Ácido desoxirribonucléico de cinetoplasto

KMP-11: Kinetoplastid membrane protein 11

LACK: Leishmania analogue of the receptor kinase C

LC: Leishmaniose cutânea

LD: Leishmaniose disseminada

LIT: Liver Infusion Triptose

LM: Leishmaniose mucosa

LPG: Lipofosfoglicano

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

MA: Antimoniato de meglumina

ml: Mililitro

mM: Milimetro

MS: Ministério da Saúde

MSP: Major Surface Protease

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanograma

NNN: Meio de cultura Neal, Novy e Nicolle

PCR: Polymerase Chain Reaction

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Sbv: Antimonial pentavalente

SFM : Sistema fagocítico mononuclear

SLA: Antígeno solúvel de leishmania

SM: Esfingomielina

sp. : Espécies

SSB : stibogluconato de sódio

TBE : TRIS-Borato_EDTA

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TE : Tris-HCl, EDTA

TELT: Tris-HCL, EDTA , LiCl e Triton .

Th1: Linfócito T auxiliaries do tipo 1

Th2: Linfócitos T auxiliares do tipo 2

TLR2: Receptor Toll like

TNF- α : Fator de necrose tumoral

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Variabilidade dos nucleotídeos do gene *gp63* entre os 4 clados (descritos na figura 3) de *L.(V.) braziliensis*, classificada de acordo com os 31 alelos da glicoproteína, encontrados nos isolados clínicos de Corte de Pedra-BA. 58
- Tabela 2.** Variabilidade dos peptídeos da GP63 nos 4 clados (descritos na figura 6) de *L.(V.) braziliensis*, classificada de acordo com a tradução dos 31 alelos da glicoproteína encontrados nos isolados clínicos de Corte de Pedra-BA. 63

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da área endêmica Corte de Pedra- BA. 46
- Figura 2.** Alinhamento das posições polimórficas dos nucleotídeos do gene *gp63* encontrados nos 31 haplótipos presentes nos 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* em Corte de Pedra – BA, gerado pelo software MEGA 5.0. * Posições polimórficas silenciosas, na sequência-alvo ** Posições polimórficas na sequência-alvo do gene *gp63* que resultaram em troca de aminoácidos e polimorfismos silenciosos (sombreado em cinza). Todas as demais posições ocorreram apenas polimorfismos que resultaram em troca de aminoácidos na proteína traduzida. Leitura das posições em vertical 57
- Figura 3.** Dendograma resultante da classificação por Neighbor-Joining dos 31 alelos do gene *gp63* encontrados em 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra. As extremidades dos ramos mostram os 31 alelos (haplótipos) do gene *gp63* presentes na *L.(V.) braziliensis* isoladas dos casos de LTA. 17 haplótipos estão presentes no grupo 1, clado A e 14 haplótipos estão divididos em 3 cladogramas (B, C e D) no grupo 2. Alelos do clado A em vermelho, do B clado em azul, do clado C em verde e do clado D em cinza. 59
- Figura 4.** Distribuições espaciais dos 4 cladogramas que contém os 31 alelos do gene *gp63* entre 1992 e 2001 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA. (A) 17 haplótipos; (B) 6 haplótipos; (C) 3 haplótipos (D) 5 haplótipos. Pontos vermelhos correspondem aos alelos presentes na clado 1 e os azuis aos alelos presentes no clado 2. Os haplótipos foram mapeados de acordo com as coordenadas geográficas das moradias dos casos de LTA, dos quais foram isoladas as *L. (V.) braziliensis*. 60
- Figura 5.** Alinhamento das posições polimórficas dos peptídeos na sequência- 62

alvo da GP63, encontradas nos 31 haplótipos presentes nos 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* em Corte de Pedra – BA, gerado pelo software MEGA 5.0.

Figura 6. Dendograma resultante da classificação por Neighbor-Joining dos peptídeos da GP63 encontrados em 35 isolados de *L.(V.) braziliensis*, gerado de acordo com as análises com o software MEGA 5.0. As extremidades dos ramos mostram os 31 alelos da GP63 presentes na *L.(V.) braziliensis* isoladas de casos de LTA de Corte de Pedra – BA. Cada alelo recebeu a mesma cor empregada no dendograma da figura 3 para reforçar que as agregações dos peptídeos foram semelhantes às identificadas para os alelos do gene *gp63* correspondentes. 64

Figura 7. Alinhamento das posições conservadas dos peptídeos da GP63 da sequência-alvo, encontradas nos 31 haplótipos presentes nos 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA, gerado pelo software MEGA 5.0. 65

Figura 8. Mapeamento das regiões conservadas SRYD, PAVGNIPA, HEVAH, KAREQYGC (em amarelo) e polimórficas (em lilás) da GP63 na estrutura terciária da proteína gerada pelo software Cn3D 4.3. 66

I. RESUMO

AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DA PROTEASE GP63 NUMA POPULAÇÃO DE *Leishmania Viannia braziliensis* CAUSADORA DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Introdução: A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal causa da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil. Na Bahia a *L. (V.) braziliensis* causa as três formas clínicas de leishmaniose: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). Corte de Pedra (CP) na Bahia é uma área endêmica para a LTA, na qual encontramos as três formas clínicas. A leishmanolisina, ou GP63, é uma importante protease da superfície da leishmania capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos tanto no parasita quanto no hospedeiro. Seus produtos estão envolvidos na adesão e internalização desses parasitas nos macrófagos do hospedeiro e tem sido relacionado com a resistência do parasita à lise pelo sistema complemento e o aumento da virulência da *L. (V.) braziliensis*. **Objetivo.** Avaliar o polimorfismo do gene codificador da glicoproteína GP63 da *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA, e sua associação aos fenótipos de LC, LM e LD da LTA. **Métodos.** É um estudo de corte transversal, onde descrevemos os alelos de GP63 detectáveis na área endêmica para LTA de Corte de Pedra- BA entre 1992 e 2001. Isolados de *L. (V.) braziliensis* de pacientes com LTA, foram obtidos para a extração do DNA. Os *loci* do *gp63* foram amplificados por PCR dessas amostras, os fragmentos de DNA obtidos nestas ampliações foram clonados em plasmídeo com dez clones por isolado de *L.(V.) braziliensis* foram seqüenciados. Baseado nas seqüências obtidas, os alelos dos *loci* presentes em cada isolado foram determinados. **Resultados.** A identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos 35 isolados analisados nos permitiu separar a população de *L. (V.) braziliensis* de acordo com alelos da *gp63*. No total foram encontrados 31 alelos, todos localizados no CHR10. Foram observados polimorfismos com troca de nucleotídeos que resultaram em variações nas regiões da proteína. Sete a cinquenta e uma posições no peptídeo apresentaram trocas de aminoácidos de acordo com o alelo da *gp63*. Quatro regiões altamente conservadas (PAVGNIPA, SRYD, HEMAH e KAREQYGC) também foram encontradas, na proteína traduzida. Estas regiões são consideradas importantes para a adesão e internalização do parasita. **Conclusão.** A GP63 apresentou regiões muito polimórficas, contudo, regiões da proteína envolvidas na sobrevivência do parasita apresentam-se conservadas, sugerindo que possam ser alvos promissores ao emprego em reagentes de imunoprevenção contra a leishmaniose. Todos os alelos encontrados nos isolados estão no CHR10 e não foi encontrada nenhuma associação estatística entre as formas clínicas da LTA e os alelos da *gp63* encontrados nos isolados de Corte de Pedra-BA.

Palavras-chave: 1.Leishmaniose Tegumentar Americana; 2.*Leishmania Viannia braziliensis*; 3.GP63; 4.protease; 5.polimorfismo.

II. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar o polimorfismo do gene codificador da glicoproteína GP63 da *Leishmania (V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA, e sua associação aos fenótipos de leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

ESPECÍFICOS

1. Identificar os polimorfismos no gene *gp63*;
2. Localizar os polimorfismos encontrados na estrutura da proteína;
3. Avaliar as associações entre polimorfismos no gene (i.e alelos) *gp63* e os desfechos da LTA para LC, LM ou LD;
4. Mapear em Corte de Pedra a distribuição dos diferentes alelos de *gp63* encontrados.

III. INTRODUÇÃO

Leishmania spp. compreende um importante grupo de parasitas, transmitido pela picada de vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, causadores de doenças, as leishmanioses, que acometem tanto animais como os seres humanos (WHO, 2013). Estima-se que 1,5 a 2 milhões de pessoas desenvolvam sintomaticamente a doença por ano e que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo (WHO, 2011).

As Leishmanioses são doenças com características clínicas variadas, endêmicas em áreas tropicais e subtropicais do globo (Desjeux et al, 1992). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por espécies dos subgêneros *Leishmania viannia* e *Leishmania leishmania* (Azulay et al, 1995). As distintas manifestações clínicas dessa doença estão associadas às diferentes espécies do parasita existentes nas Américas. A *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie causadora de LTA no Brasil (Ministério da Saúde, 2007). Fatores genéticos dos parasitos e dos hospedeiros parecem contribuir para a evolução clínica da leishmaniose causada pela *L.(V.) braziliensis* (Castellucci et al, 2005; 2006; Schriefer et al, 2008). As formas clínicas frequentemente causadas pela *L.(V.) braziliensis* são: leishmaniose cutânea localizada (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) (Costa et al, 1986; Carvalho et al, 1994; Azulay et al, 1995; Turetz et al, 2002; Machado et al, 2011).

O tratamento da leishmaniose está longe de ser satisfatório. Todas as drogas leishmanicidas são tóxicas e precisam de uso por períodos prolongados (Sundar et al, 2002). Por outro lado, a cura clínica nem sempre coincide com a cura histopatológica (Sundar et al, 2002; Vianna et al, 2013). O tratamento padrão da LTA é feito com o antimonial pentavalente (Sbv) na dose de 15-20mg/Kg por dia, durante 20 a 30 dias, conforme recomendação do Ministério da Saúde (MS) (Ministério da Saúde, 2007). No entanto, a elevada taxa de falha na resposta ao tratamento tem

sido descrita em até 50% dos pacientes (Romero et al, 2001; Santos et al, 2004). Sendo assim, tornam necessário o emprego de outras drogas. Atualmente, as drogas alternativas incluem medicamentos de via parenteral, como a pentamidina e a anfotericina B (Berman et al, 1997; Arana et al, 2001; Berman et al, 2003), cujo uso torna-se limitado pela toxicidade, e assim como ocorre com o Sbv, a via de administração parenteral dificulta a adesão ao tratamento na zona rural. Este quadro é ainda pior em áreas endêmicas como Corte de Pedra/Bahia, onde têm sido documentadas taxas crescentes de falha terapêutica ao Sbv. Atualmente, apenas 60% dos casos de LC são curados com uma série de tratamento (Machado et al, 2010). Além do mais, esta região é dominada pela *L. (V.) braziliensis*, que também apresenta baixa sensibilidade à pentamidina. Assim, novas terapias alternativas e imunoprofilaxia contra leishmaniose são necessárias.

A leishmanolisina, ou GP63, é uma importante protease da superfície da leishmania (Bianchini et al, 2006; Sádlová et al, 2006; Hsiao et al, 2008; Kaur et al, 2011). A GP63 é capaz de hidrolisar uma grande variedade de substratos tanto no parasita quanto no hospedeiro (Bianchini et al, 2006). Genes desta protease são expressos tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas da leishmania, e seus produtos estão envolvidos na adesão e internalização desses parasitas nos macrófagos do hospedeiro (Pandey et al, 2004; Sádlová et al, 2006; Thiakaki et al, 2006; Mauricio et al, 2007; Cuervo et al, 2008). A GP63 tem sido também relacionada com a resistência do parasita à lise pelo sistema complemento (Gomez et al, 2009; Contreras et al, 2010), e o aumento da expressão dessa protease foi correlacionado com o aumento da virulência da *L. (V.) braziliensis* (Yao et al, 2003).

Assim a GP63 se constitui em importante candidata a ser empregada como subunidade numa eventual vacina para a profilaxia das leishmanioses (Lieke et al, 2008;

Kaur et al, 2011). Contudo seu emprego esbarra na grande variabilidade reportada para essas moléculas (Tintaya et al, 2004). Complicando ainda mais este cenário, foi relatado que a *L. (V.) braziliensis* apresenta em torno de 37 genes para GP63, distribuídos em 8 isogênes com elevado grau de polimorfismo entre eles (Victoir et al, 2005). Contudo, domínios funcionais que apresentam regiões altamente conservadas na sequência da GP63 entre diferentes espécies de leishmania apresentam atividade inibidora, quando os peptídeos destas regiões foram correlacionados com a sua capacidade em se ligar às moléculas presentes na superfície celular. Os principais domínios funcionais identificados envolvem as sequências SRYD e HExxH (Puentes et al, 1999).

Assim, são necessários estudos que mapeiem as porções mais frequentemente polimórficas e as mais frequentemente conservadas da GP63 em parasitas isolados de casos naturais de doença, provenientes de áreas endêmicas para a leishmaniose humana. Tal conhecimento poderá nortear o desenvolvimento de reagentes eficazes de imunoprofilaxia baseados na leishmanolisina (Lieke et al, 2008).

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV. 1 Aspectos epidemiológicos da leishmaniose:

As leishmanioses são doenças causadas por vários protozoários (ordem dos Kinetoplastida) do gênero *Leishmania* (Barral et al, 1991) e constituem um espectro de doenças que ocorrem em regiões tropicais e subtropicais do globo (Desjeux et al, 1992). Estima-se que ocorra em todo o mundo 1,5 milhões de novos casos por ano e que 12 milhões de pessoas são afetadas em 98 países em quatro continentes (África, Américas, Ásia e Europa) (WHO, 2011). A estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) é que 350 milhões de pessoas estão sob risco de contrair a leishmaniose, e que 20 a 30 mil mortes ocorram a cada ano (WHO, 2013).

Cerca de 58 mil casos de leishmaniose visceral e 220 mil casos tegumentares são reportados, oficialmente, a cada ano. No entanto, estima-se que apenas cerca de dois terços dos países realmente notificam os dados de incidência, sendo que os dados mais dispersos encontram-se na África, principalmente devido às sub-notificações (Alvar et al, 2012). Depois da malária e tripanossomíase Africana (doença do sono), a leishmaniose é a terceira doença parasitária mais importante e ocupa nono lugar em termos de carga global entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (Hotez P.J, 2004), representando aproximadamente 2,3 milhões de DALYs (anos saudáveis perdidos por incapacidade ou morte precoce) (WHO, 2011)

A maioria dos dados oficiais são obtidos através da detecção passiva de casos, por ser uma doença associada à pobreza, muitos pacientes não têm acesso a cuidados de saúde (Stockdale & Newton, 2013). As infecções assintomáticas (ou indivíduos com infecção sub-clínica que podem atuar como um reservatório) não são relatadas e podem

ser um importante fator de risco para futuras infecções, principalmente em outras áreas geográficas (Stockdale & Newton, 2013).

Classicamente, de acordo com critérios geográficos, a leishmaniose foi dividida em: leishmaniose do velho mundo (Europa, África e Ásia) e leishmaniose do novo mundo (América e Oceania). A Leishmaniose do Velho Mundo inclui a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral (LV), que envolve órgãos internos como as vísceras e corrente sanguínea. No novo mundo predominam as formas clínicas LC, LV e LM (Kobets et al, 2012; Masmudi et al, 2013).

Mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A LC é mais amplamente distribuída, cerca de um terço dos casos ocorrem em três regiões: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental (do Oriente Médio até a Ásia Central). Os dez países com o maior número de casos são: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. Juntos estes países representam 70 a 90% da incidência global estimada da LC (Alvar et al, 2013 e Stockdale et al, 2013).

A leishmaniose visceral (LV) pode resultar em morte se não tratada, e a maioria das mortes por leishmaniose podem passar despercebidas. Mesmo com o acesso ao tratamento, a LV pode resultar em taxas de letalidade de 10-20% (Desjeux P, 1996; Bern et al 2005; Collin et al, 2004; Zijlstra et al, 1994). A taxa de letalidade relatada para LV no Brasil em 2006 foi de 7,2% (Alvar et al, 2013).

A mortalidade associada à leishmaniose tegumentar não é significativa, porém a morbidade com consequentes estigmas sociais, que surgem a partir de lesões cutâneas resultando em cicatrizes, é muito importante (Stockdale et al, 2013). Por outro lado, em áreas endêmicas, muitas pessoas têm a crença que a leishmaniose tegumentar pode ser

transferida através de contato físico (Kassi et al, 2008), resultando em restrição de participação social. Indiscutivelmente, tão importante em termos de carga de doenças como os efeitos econômicos na saúde, são os impactos negativos para a qualidade de vida e saúde mental resultante do estigma social (Hotez PJ, 2008).

Embora responsável pela nona maior carga de doença entre as doenças infecciosas individuais, a leishmaniose é largamente ignorada na discussão das prioridades para as doenças tropicais (Hotez et al, 2004, 2006). Além de apresentar uma epidemiologia e ecologia complexa, à leishmaniose conta com a falta de ferramentas simples e de fácil acesso para diagnósticos de casos, falta de gestão e escassez de dados de incidência. Todos estes fatores negativos são resultantes de falha por parte dos gestores políticos em reconhecer a importância da doença (Alvar et al, 2006; Bern et al, 2008; Alvar et al, 2008).

IV.2 Vetor, agente etiológico e ciclo biológico

Leishmaniose é transmitida pela picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas, dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (Basano et al., 2004; Negrão et al., 2009 ,WHO, 2013). Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos incluídas nos dois gêneros (Kobets et al, 2012) .

Flebotomíneos medem cerca de 2 a 3 mm de comprimento (Aliaga et al, 2003), são encontrados em torno de assentamentos humanos, em matéria orgânica, como serrapilheira (cobertura que se forma na superfície do solo composta por restos de vegetação em diferentes estágios de decomposição, fazem parte dela também restos de animais) e estrume, em matas e em tocas de roedores (Kobets et al, 2012). Eles são frequentemente classificados quanto ao hábito alimentar, ou seja, onde eles preferem sugar o sangue, endofágico (dentro de habitações) ou exofágico (fora de habitações), e

quanto ao local onde se abrigam, endofílico (dentro das habitações) ou exofílico (ao ar livre) (Desjeux P, 2010).

Leishmania é um protozoário intracelular, que pertence à ordem Kinetoplastida, família dos Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Desjeux, 1996; Ashford et al, 1997; WHO, 2013). Existem mais de 20 espécies de leishmania que infectam vertebrados, dentre eles o homem (Desjeux, 1996; WHO, 2013). Cunningham em 1885 observou pela primeira vez este protozoário na Índia. Em 1903, Ross criou o gênero e chamou o parasito de *Leishmania donovani* (Oumeish et al, 1999; Awasthi et al, 2004; Basano et al, 2004). Na América do Sul, os primeiros relatos de doença cutânea foram feitos em 1909 por Lindenberg, que encontrou o parasita em lesões de indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias em São Paulo (Oumeish et al, 1999; Basano et al, 2004). No Brasil, Gaspar Vianna em 1911 considerou o parasita diferente da espécie identificada no Velho Mundo, e a nomeou *Leishmania braziliensis*, de forma que até a década de setenta todos os casos de leishmaniose no país eram atribuídos a esta espécie. Com o desenvolvimento nas técnicas de análise, foram descritas outras espécies e associações com a doença (Oumeish et al, 1999; Basano et al, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania*, assim como todos os protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, possuem um DNA mitocondrial único (kDNA), que pode ser usado para diferenciá-los de quaisquer organismos pertencentes a outras ordens (Simpson, 1987). A taxonomia clássica vem sendo complementada com técnicas bioquímicas, imunológicas e, mais recentemente, com técnicas moleculares que têm revelado a grande complexidade das relações dos parasitas dentro do gênero (Cupolillo et al, 2000). O gênero *Leishmania* se divide em dois subgêneros: *Leishmania* *Viannia*, que compreende o complexo *Leishmania braziliensis*; e o subgênero

Leishmania Leishmania, que compreende os complexos *Leishmania donovani*, *Leishmania trópica e Leishmania mexicana* (WHO, 1990; Rioux et al, 1990; Lainson & Shaw, 1998; Cupolillo et al, 2000). As espécies até então reconhecidas e associadas com doença em humanos no Velho Mundo pertencem aos complexos *L. donovani* (*L. donovani* e *L. infantum*), responsáveis pela Leishmaniose visceral e *L. tropica*, responsáveis pela Leishmaniose tegumentar. Já no Novo Mundo, estas estão contidas em dois subgêneros: *Leishmania Leishmania e Leishmania Viannia*. (Amato et al, 2008; Kobets et al, 2012)

Dentre as espécies do subgênero *Viannia*, a *L. (V) braziliensis* é o maior agente causador da LTA em regiões endêmicas na América Central e Sul (Grimaldi et al, 1989). Esta espécie tem uma grande importância em nosso meio pelo seu alto grau de polimorfismo genético e fenotípico, e pelo espectro de manifestações clínicas observadas na leishmaniose tegumentar (Saravia et al, 1998; Cupolillo et al, 2003; Schriefer et al, 2004).

Como acontece para as demais espécies do parasita, *L. (V.) braziliensis* possui um ciclo vital digenético, alternando entre o estágio promastigota, que é a forma flagelada presente no estômago do inseto transmissor, e a amastigota sem flagelo, encontrada no interior dos macrófagos em hospedeiros vertebrados (Kobets et al, 2012). No intestino dos insetos vetores, as formas promastigotas passam por um processo denominado metaciclogênese, que é o processo pelo qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As formas reprodutivas, não infectantes (procíclicas), prendem-se a parede do tubo digestivo do inseto vetor. Durante a metaciclogênese, as promastigotas sofrem modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo assim sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebótomo. Como resultado, as promastigotas metacíclicas deslocam-

se, migrando para a faringe e cavidade bucal, de onde elas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, durante o próximo repasto sanguíneo (Ministério da Saúde, 2007).

O ciclo recomeça quando nova fêmea de flebotomíneo se infecta durante repasto nesse hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo seus macrófagos cheios de amastigotas do parasito (Lainson et al, 1987). Quando as promastigotas são introduzidas na pele, encontram neste local células do sistema imune (linfócitos T e B, macrófagos residentes, células de Langherans, mastócitos), que formam um compartimento bastante específico denominado sistema imune da pele. Por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido, envolvendo receptores e ligantes em ambas as superfícies, o parasito se adere á superfície dos macrófagos e células de Langherans, passando para o meio intracelular por meio de um processo de fagocitose mediada por receptores, se transforma na forma amastigota, característica do parasitismo nos mamíferos (Ministério da Saúde, 2007).

IV. 3 Leishmaniose Tegumentar Americana

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) distribui-se amplamente nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, abrangendo todos os países exceto o Uruguai e o Chile. No Brasil, a doença é considerada uma das afecções dermatológicas de grande importância, tendo o número de casos crescido progressivamente durante os últimos 20 anos em praticamente todos os estados. Surtos epidêmicos também têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, estando associados ao processo de colonização humana dessas regiões (Ministério da Saúde, 2007). Nos últimos anos, o Ministério da Saúde registrou média anual de 35 mil novos casos de LTA em nosso país (Ministério

da Saúde, 2007). A incidência anual aumentou de 10,45 para 18,63 casos por 100.000 indivíduos entre o período de 1985 e 2000 (Oliveira et al, 2004). Cerca de 39% dos casos de LTA estão na região Nordeste, sendo a maioria deles pertencentes aos estados do Maranhão, Bahia e Ceará. Os dados de mortalidade são escassos e, geralmente, representam apenas as mortes hospitalares (Alvar et al, 2013).

Nas últimas décadas, análises epidemiológicas da LTA têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença, inicialmente considerada zoonoses de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. Observam-se a existência de três perfis epidemiológicos: 1) silvestre – em que ocorre a transmissão em áreas de vegetação primária 2) ocupacional ou lazer – em que a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta e derrubada de matas para a construção de estradas, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias e ecoturismo e 3) rural ou periurbana – em áreas de colonização ou periurbana, em que houve adaptação do vetor ao peridomicílio (Ministério da Saúde, 2007; Aguilar et al, 1987; Barbosa- Santos et al, 1994; Marzochi, 1992; Marzochi & Marzochi, 1994).

As distintas formas clínicas da LTA estão associadas com as diferentes espécies do parasita existentes nas Américas. As formas clínicas frequentemente causadas pela *L.(V.) braziliensis* são: LC, LM e LD (Costa et al, 1986; Carvalho et al, 1994; Azulay et al, 1995; Bacellar et al, 2002; Turetz et al, 2002). Estas formas ocorrem em ambos os sexos e todas as faixas etárias, entretanto na média do país, predominam os maiores de 10 anos, representando 90% dos casos, e o sexo masculino, 74% (Ministério da Saúde, 2007).

No nordeste do Brasil, mais especificamente no estado da Bahia, a LTA é endêmica. Corte de Pedra é reconhecida como uma das mais importantes áreas de transmissão de *L.(V.) braziliensis* no Brasil, com uma alta prevalência de casos de LTA (Jirmanus et al, 2012). A leishmaniose visceral não ocorre nesta área, além da *L. (V.) braziliensis*, a *L. (L.) amazonensis* foi identificada em de Corte de Pedra, mas apenas *L. (V.) braziliensis* tem sido isolada de pacientes nos últimos 15 anos. As formas clínicas encontradas em Corte de Pedra incluem LC, LM e LD (Jirmanus et al, 2012). Mais recentemente, formas atípicas da doença têm sido descritas, apresentando lesões verrugosas e múltiplas lesões nodulares em uma área específica no corpo dos pacientes (Guimarães et al, 2009). Nos últimos 25 anos, os pacientes desta região têm sido atendidos no Centro de Referência em Leishmaniose Doutor Jackson Mauricio Lopes Costa, Posto de Saúde de Corte de Pedra. Ao longo das últimas duas décadas, tem sido notado um aumento no número de casos mais grave da doença (LM e LD) e uma diminuição na eficácia do tratamento à base do antimônio, além de mudanças nos dados demográficos dos pacientes nesta população (Guimarães et al, 2009; Turetz et al, 2002; Jirmanus et al, 2012).

A LTA está em ascensão na Bahia, assim como em todo o Brasil, com mudanças significativas na epidemiologia e manifestações da doença. Residentes em zonas costeiras e as pessoas não envolvidas em trabalho agrícola estão sendo afetadas com mais frequência do que no passado. Acredita-se que os vetores flebotomíneos estejam cada vez mais adaptados ao peridomicílio e áreas periurbanas (Jirmanus et al, 2012).

IV. 4 Hospedeiro, aspectos clínicos e imunológicos

Os principais hospedeiros são animais vertebrados, dentre estes incluem os humanos, (Quinnell RJ & Courtenay O, 2009). Infecções por leishmania que causam a LTA foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e eqüídeos). Com relação a este último, seu papel na manutenção do parasito no meio ambiente ainda não foi definitivamente esclarecido (Ministério da Saúde, 2007). A susceptibilidade ou resistência de um hospedeiro vertebrado à leishmaniose está relacionada com as espécies de leishmania e à resposta imune do hospedeiro. (Bogdan et al, 1996, 2000; Handman et al, 2000) .

Uma ampla variedade de mecanismos imunes pode estar envolvida no controle da resposta imune à infecção por leishmania (Botelho et al, 2009). Ao penetrar no hospedeiro, a leishmania desencadeia uma série de eventos importantes para a ação do sistema imune.

As células que compõem a primeira linha de defesa do hospedeiro incluem os macrófagos, os neutrófilos, os eosinófilos e as células dendríticas. Ao considerar que os macrófagos constituem o principal e o preferencial tipo celular que é infectado por leishmania, a sua função é essencial para o desfecho da infecção no hospedeiro. Tanto no homem como em animais silvestres ou domésticos, e seja qual for à espécie de leishmania envolvida, elas vivem e proliferam em macrófagos e monócitos de vários tecidos, no chamado sistema fagocítico mononuclear (SFM). Esse sistema é composto de uma família de células que compreende os progenitores da medula óssea, os monócitos do sangue circulante e os macrófagos teciduais, que são especializadas e eficientes na fagocitose e têm um importante papel na detecção e eliminação dos microorganismos patogênicos (Mosser et al, 2008).

A imunidade contra a leishmania é mediada através de um conjunto complexo de respostas imunes, incluindo tanto a resposta imune inata (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos) quanto à adaptativa (Células B e células T) (Duthie et al, 2012). Após a inoculação, as promastigotas precisam sobreviver aos mecanismos inatos de defesa do hospedeiro. As mudanças bioquímicas ocorridas durante a metaciclo genese conferem às promastigotas uma resistência aumentada. Substâncias presentes na saliva dos flebotomíneos também favorecem a infecção (Ministério da Saúde 2007). Os flebotomos parecem ter um papel importante no desenvolvimento de leishmaniose, não só como vetores. Num modelo animal de LTA, a inoculação de parasitas (*L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*), com a presença da saliva do vetor exacerbou a infecção, apontando assim que a saliva do vetor contém substâncias com potencial de aumentar o processo infeccioso da leishmaniose (Strazulla et al, 2013).

Em Corte de Pedra- BA, a LTA apresenta-se como uma enfermidade bastante polimórfica, que acomete primariamente a pele e mucosas. O espectro de quadros clínicos pode ser associado a fatores relacionados à resposta imune do hospedeiro, à variabilidade genética dos parasitos envolvidos e também a fatores ambientais. (Carvalho et al, 1994, 1995, Queiroz et al, 2012).

A LC é a mais comum das formas de manifestação da LTA, podendo também ser causada por parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania*, além do *Viannia*. É caracterizada pela presença de uma ou poucas lesões em pele, que se iniciam no sítio de entrada das promastigotas infectantes após a picada do inseto vetor, sendo encontradas principalmente em áreas expostas do corpo como face, braços e pernas. Tais lesões podem ser acompanhadas de intensa adenopatia regional, apresentando-se ulceradas, com bordas elevadas e endurecidas (Silveira et al, 2004). Pacientes com LC apresentam uma imunidade celular preservada, com uma resposta imune do tipo Th1 moderada e

bem regulada frente aos antígenos de *Leishmania*, o que se verifica pela positividade ao teste cutâneo de resposta tardia, a intradermoreação de Montenegro (Bacellar et al, 2002). Esses pacientes apresentam níveis elevados de interferon-gama (IFN- γ), citocina que induz a ativação de macrófagos, e outros fagócitos com elevada atividade antimicrobiana para as formas amastigotas do protozoário (Antonelli et al, 2005).

O estudo histológico das lesões revela riqueza de linfócitos e plasmócitos, e escassez ou mesmo ausência de macrófagos e parasitos. Quando a infecção não é controlada pelos mecanismos adaptativos da resposta imune celular, a doença pode evoluir para uma forma mais grave e em cerca de 4% dos casos ocorre associação com a LM (Carvalho et al, 1995). Na LC, sabe-se que a incapacidade de montar uma resposta imune celular eficaz está associada à evolução clínica e respostas terapêuticas menos favoráveis. Em pacientes imunocomprometidos, como na síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), a LC pode apresentar quadros clínicos atípicos, tendência à disseminação e má resposta aos esquemas medicamentosos usuais (Ministério da Saúde, 2007).

A LM é uma doença caracterizada por envolvimento da mucosa nasal, oral ou faríngea, concomitante à doença cutânea ativa ou iniciada meses a anos após a resolução da lesão primária em pele (WHO, 2010). Lesões mucosas clássicas que ocorrem durante LTA são altamente destrutivas, severamente desfigurantes e potencialmente mortais. As lesões cutâneas podem preceder LM em 5-20 % dos casos (Di Lella et al, 2006). Estas lesões podem ser clinicamente manifestas ou curadas, de dias a décadas antes do acometimento das mucosas (Goto H.& Lindoso, 2010; Herwaldt , 1999). Pacientes que tenham tido LC possuem fatores de risco para desenvolver LM (Camuset et al, 2007).

Os indivíduos acometidos pela LM apresentam uma forte imunidade celular representada por intensa reação de hipersensibilidade do tipo tardia contra antígenos de *Leishmania*, consistindo-se num pólo responsivo caracterizado pela produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN- γ (Carvalho et al, 1995; Bacellar et al, 2002). Este exagero na produção das citocinas do tipo Th1 está associado também a uma produção relativamente baixa de IL-10, citocina capaz de modular a resposta e inibir a ativação de macrófagos. A perfuração do septo nasal é a complicação mais comum na LM, podendo também haver envolvimento do palato, úvula, faringe, laringe e cordas vocais. A doença pode progredir até lesões desfigurantes e destrutivas da cartilagem nasal, lábios e face, algumas vezes chegando a ser fatal (CHOI et al, 2001; Bacellar et al, 2002; Strazulla et al, 2013). A forma mucocutânea ocorre predominantemente na América do Sul, e muitas vezes mostra-se de difícil tratamento (Carvalho et al, 1994). A imunopatogênese da LM é muito complexa e ainda parcialmente desconhecida (de Oliveira & Brodskyn, 2012).

A LD é uma forma clínica da LTA causada por *L. (V) braziliensis* e que vem sendo identificada no estado da Bahia (Carvalho et al, 1994; Turetz et al, 2002). Clinicamente distinta da leishmaniose cutânea difusa, geralmente causada pela *L. amazonensis*, a LD acomete predominantemente homens adultos com atividade rural, caracterizando-se pelo aparecimento de uma única lesão inicial ulcerada em uma extremidade corpórea, seguida, após um período de poucos dias, pelas lesões disseminadas do tipo ulceradas e não ulceradas, distribuídas em diversas áreas do corpo, como a face, tórax, abdome e membros superiores e inferiores dos pacientes, que podem também apresentar febre e astenia. As células da resposta imune dos indivíduos acometidos produzem níveis menores de TNF e IFN- γ , e níveis mais elevados da

citocina IL-10 frente à estimulação com antígenos de *Leishmania* quando comparados aos pacientes com LC (Turetz et al, 2002).

Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate à leishmania, a mesma consegue desenvolver diversos mecanismos de defesa capazes de subverter a capacidade microbicida do macrófago, conseguindo sobreviver no ambiente potencialmente tóxico formado e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando então são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando deste modo a infecção (Olivier et al , 2005; Bhardwaj et al, 2010). Tal característica se deve em parte à contribuição das moléculas de superfície do parasito, que representam um importante papel no direcionamento da infecção, e a interação dessas moléculas com os receptores celulares específicos. Entre as moléculas de superfície presentes no parasito a mais predominante é a LPG seguida pela GP63. Outras moléculas presas à superfície celular são proteofosfoglicanos, fosfatase ácida, nucleotidase e cisteína proteinases que em conjunto conferem virulência a leishmania. Os receptores celulares envolvidos na interação entre a célula hospedeira e o parasita são o CR1, o CR3, o receptor para manose-fucose, os receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (FcγRI, FcγRII), receptor Toll like (TLR2) e o receptor para fibronectina que representam importante papel na ativação da resposta imune inata (Kzhyshkowska et al, 2008).

Embora sejam complexos os mecanismos responsáveis para a imunidade adquirida, uma vacina que induzisse a uma forte e duradoura resposta celular e humoral contra a leishmania poderia prevenir ou combater a infecção em curso (Strazulla et al, 2013).

IV.5 Tratamento e prevenção.

O antimônio pentavalente (Sbv) e suas moléculas derivadas, stibogluconato de sódio (SSB) e antimoniato de meglumina (MA), são recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a terapia de LTA (David & Craft, 2009). A droga de primeira escolha é o Sbv, que é encontrado na forma de antimoniato de Nmetilglucamina (Glucantime), este medicamento está indicado para tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar, embora as formas mucosas exijam maior atenção, já que os pacientes podem apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de resistência. A administração é por via parenteral e a ocorrência de efeitos colaterais pelo seu uso é relatada. A resposta ao esquema terapêutico varia consideravelmente de acordo com a espécie envolvida, a resposta imune do hospedeiro e a forma clínica ou estágio da doença (Grimaldi G, Jr & Tesh R.B, 1993). A resistência ao Sbv é significativa na América do Sul, e é uma causa freqüente de falha terapêutica e recaída. Não está claro se isso depende das características do parasita ou da resposta imune (naturais ou adquiridas) (David & Craft, 2009; Amato V. S., 2008).

A pentamidina é eficaz contra a *Leishmania*, com uma eficácia de 90-94 % em relação a *L. (V.) braziliensis* (Amato et al, 2008). Porém, a OMS recomenda a utilização de pentamidina apenas quando outras opções não estão disponíveis (Kappagoda et al, 2011). A Anfotericina B (AmB) é um medicamento anti-fúngico com eficácia contra *Leishmania sp.* A anfotericina B liga-se com o ergosterol, um componente da membrana celular de fungos e protozoários promovendo a morte celular. Casos de resistência ainda não foram relatados, mas o seu uso crescente no tratamento da leishmaniose em todo o mundo poderia potencialmente aumentar o risco de selecionar cepas resistentes (Amato et al, 2008). As taxas de cura para o tratamento anfotericina B foram semelhantes aos

relatados com antimoniais (88% em um estudo boliviano de cerca de 200 pacientes) (Dedet et al, 1995). No entanto, a toxicidade renal impede a sua utilização como uma droga de primeira linha (David & Craft, 2009).

Dentre outras opções menos frequentemente empregadas para o tratamento da LTA a Miltefosina tem se mostrado eficaz para o tratamento da leishmaniose visceral. É administrada via oral na dose 2.5mg/kg/dia durante 28 dias (David & Craft., 2009). Foi demonstrado que miltefosina produz apoptose em promastigotas de *L. donovani* (Kobets et al, 2012). A mesma tem sido usada com sucesso para o tratamento de LM, nas infecções por *L. (V.) braziliensis*, com taxas de cura de cerca de 75% em pacientes bolivianos (Soto et al, 2007, 2009). Já a paromomicina (ou aminosidina) é uma droga aminoglicosídea que interfere no crescimento de amastigotas. Está disponível em formulações tópicas e intravenosas (Amato et al, 2008). Na Leishmaniose Visceral, a paromomicina é administrada a uma dose de 15mg/kg/dia por 21 dias (Kappagoda et al, 2011), contudo em LTA foi reportado ter somente 60% de eficácia (muito menos eficiente do que o SbV e AmB) (Amato et al, 2008).

Os medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose não são 100% eficazes, possuem efeitos tóxicos e colaterais. A resistência aos medicamentos também é um obstáculo para o controle da doença, sendo assim a vacinação continua a ser uma das melhores esperanças para o controle de todas as formas da doença e tem sido foco de pesquisas em leishmaniose. As tentativas para desenvolver vacinas contra a leishmaniose resultou na identificação de inúmeros antígenos candidatos (Firooz et al, 2006; Sharifi et al, 1998; Momeni et al, 1999; Khalil et al, 2000).

Dentre eles podemos citar a p36/ LACK (leishmania homolog of receptors for activated C kinase) é uma proteína conservada nos protozoários do gênero *Leishmania*

de grande interesse como candidato a vacina por causa do seu papel imunopatogênico em infecção de murinos. A imunização de camundongos com a p36/LACK, entregue na forma de proteína ou de DNA, parece proteger contra a infecção por *L. major* induzindo uma resposta Th1 protetora. A sequência de aminoácidos do antígeno de leishmania p36/LACK é altamente conservada, mas a eficácia desta vacina na prevenção de doenças causadas por outros isolados de leishmania não foi determinada (Melby et al, 2001). Outro imunógeno candidato a vacina é a proteína presente nas membranas dos Kinetoplastida, KMP-11 (Kinetoplastid membrane protein 11), recombinada com nanopartículas parece diminuir a carga parasitaria de leishmania através da indução de resposta imune inata (Santos et al, 2013). O receptor de hemoglobina (HBR) de *Leishmania*, imunógeno candidato, é conservada entre várias espécies de leishmania, e anticorpo anti-HBr pode ser detectado no soro de pacientes com kalazar. Imunização com HBR-DNA induz proteção contra a infecção por *Leishmania donovani* tanto em camundongos BALB / como em hamsters. Além disso, a imunização de HBR - DNA estimulou a produção de citocinas, como IFN - γ , interleucina - 12 (IL - 12), e fator de necrose tumoral - α (TNF - α) (Guha et al, 2013). Muitos outros imunógenos como, HNP-1 e as proteínas cisteínas CPA e CPB, LmSTI1 (Protein Antigen LmSTI1), TSA (Thiol Specific Antioxidant), entre outros, tem sido empregados na tentativa de desenvolver reagentes para a imunoprofilaxia das leishmanioses (Campo-Neto et al, 2001; Duthie et al, 2012), no entanto, os resultados ainda não são conclusivos, em alguns ensaios e em geral, a eficácia é limitada principalmente devido à falta de um sistema de distribuição apropriados ou adjuvantes (Noazin et al, 2009).

Vacinas com proteínas recombinantes com adjuvante ou expressa em vetores microbianos heterólogos, representam uma opção mais viável para as campanhas de vacinação em massa (Dietze, et al, 1997; Ashford et al, 1998). Antígenos definidos,

entregue com DNA plasmídial, DNA em vetor, proteína recombinante em adjuvante, combinados com lipossomas ou recobrando nanoparticulas colóides têm frequentemente provado ser eficaz em modelos animais. Até a data, apenas proteínas recombinantes avançaram para a licenciatura em vacinas humanas. Uma variedade de proteínas recombinantes tem sido investigada como antígenos candidatos para a vacina de *Leishmania* em modelos animais (Souza et al, 2008; Davies et al, 2000; Mayrink et al, 1979; Ritmeijer et al, 2007; Kelly et al, 1997; Alexander & Young, 1992; Ostry et al, 2008).

Até o momento, poucos antígenos avançaram para ensaios clínicos ou veterinários. O desenvolvimento de adjuvantes que podem ser utilizados para conceber vacinas seguras e eficazes, juntamente com o desenvolvimento de candidatos a vacina contra as leishmanioses, poderiam ter um impacto significativo sobre o controle da doença (Asilian et al, 2003). Também é interessante para a doença compreender geneticamente fatores imunológicos que regulam a manifestação clínica os seres humanos (Chappuis et al, 2007).

IV. 6 Metalloprotease GP63

Os protozoários parasitas, kinetoplastidas, do gênero *Leishmania* causam doenças, cujo tratamento é difícil e para as quais não existe uma vacina eficaz (Desjeux P, 1992; WHO, 1990). Um ponto crítico na interação parasito-hospedeiro envolve a fixação e internalização de formas promastigotas por macrófagos (Russell & Talamas-Rohana, 1989; Mukherjee et al, 1988). Numerosos estudos indicam que moléculas da superfície do parasita, tais como a protease glicoproteína-63kda (GP63 ou leishmanolisina) e lipofosfoglicano (LPG), são de extrema importância na fixação, internalização e escape deste parasita às células de defesa da resposta imune inata do

hospedeiro, garantindo assim a sua sobrevivência (Chakrabarty et al, 1996; Garcia et al, 1997). Estudos têm permitido a caracterização de domínios funcionais dentro da GP63 que podem mediar este fenômeno. Entre estes, o SRYD foi recentemente considerado importante para a adesão celular das leishmanias (Soteriadou et al, 1992; Miller et al, 1990). Modificações estruturais da GP63 ou falha na sua expressão podem provocar mudanças na virulência em diferentes espécies do parasita (Chakrabarty et al, 1996; Liu & Chang, 1992; McMaster et al, 1994; McGuire & Chang, 1996).

A GP63 foi descoberta por volta de 1980 e descrita como um dos principais antígenos expresso na superfície das promastigotas em várias espécies de leishmania (Fong & Chang, 1982; Bouvieretal, 1985; Etges et al, 1985; Chang et al, 1986). Devido ao seu estado de glicosilação, e ao fato de ligar a concanavalina A, foi nomeado GP63 (Bouvier et al, 1985; Chang et al, 1986; McGwire & Chang, 1996). Inicialmente, a GP63 foi descrita como tendo atividade de protease, assim chamada de Major Surface Protease (MSP), ou seja, a principal protease de superfície, e mais tarde, especificada como uma zinco-metaloprotease (Bouvier et al, 1989 Chaudhuri & Chang, 1988; Chaudhuri et al, 1989; Etges et al, 1986;). Devido a esta propriedade, a GP63 foi nomeada de leishmanolysin pela IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Esta metaloprotease está presente não só em diferentes espécies de leishmania, mas também em várias espécies de Trypanosoma e na Trichomonas vaginalis (Etges et al, 1985; Ma et al., 2011).

A GP63 é uma molécula compacta, sintetizada no retículo endoplasmático, contendo predominantemente estrutura beta pregueada e foi identificada como uma metaloproteinase neutra com atividade em uma vasta escala de pH (6 a 9), possui uma ampla gama de substratos, incluindo caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio (Etges et al, 1986; Macdonald et al, 1995; Yao C. et al, 2003). Esta

protease pertence à classe do metzincin cujos membros incluem a seqüência de aminoácidos HExxHxxGxxH na região N-terminal, rigorosamente conservados. Este domínio contém um átomo de zinco catalítico e um local ativo contendo duas histidinas de proteinase de zinco, possui ainda um pró-peptídeo que torna a pró-enzima inativa durante a tradução, e é removido durante a maturação e ativação (Etges et al, 1986; Yao C. et al, 2003), está ancorada ao GPI (glicofosfatidilinositol), sendo mais abundante na superfície de promastigotas ($\sim 5 \times 10^5$ moléculas / célula), do que nas amastigotas (Desjeux P, 1996).

Dada a sua presença em ambas as formas evolutivas, a GP63 desempenha diferentes papéis dependendo do estágio do parasita. Em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. major*, a GP63 foi observada clivando C3b em iC3b e, portanto, ajudando a parasita a evitar a lise mediada pelo sistema complemento (Brittingham et al, 1995). Simultaneamente, a geração do iC3b também pode atuar como um opsonina, auxiliando o parasita a interagir com os macrófagos através de receptores do complemento, favorecendo sua internalização (Mosser et al, 1985; Chang et al, 1990). Foi relatado também que a GP63 interage com o receptor de fibronectina e, portanto, poderia ajudar ainda mais a adesão do parasita aos macrófagos (Brittingham et al, 1999). Outro achado importante foi, uma vez que promastigotas de *L. mexicana* estão em contato com a matriz extracelular de tecido subcutâneo, a GP63 pode degradar componentes extracelulares favorecendo sua migração rápida, in vitro (McGwire et al, 2003). A partir dessas várias conclusões, por clivagem e /ou degradação, a GP63 pode afetar profundamente as funções dos macrófagos e favorecer a sobrevivência do parasita (Olivier et al, 2012). Uma vez interiorizados pelos macrófagos, a leishmania vai sobreviver e se multiplicar como amastigotas dentro do fagolisossomo (Yao et al, 2003).

O papel exato da GP63 na sobrevivência intracelular é ainda objeto de discussão. Contudo, resultados relatados nos últimos 20 anos sugerem que em amastigotas a GP63 poderia ter um papel importante nesta sobrevivência (Chaudhuri et al, 1989; Seay et al, 1996; Chen et al, 2000).

Estudos da sequência dos genes que codificam a GP63 no genoma de *Leishmanias sp.* mostraram que os mesmos são organizados em uma matriz em tandem (quatro cópias) no cromossomo 10, um único no cromossomo 28 e outro gene relacionado no cromossomo 31 (Ivens et al, 2005). As sequências de genes derivadas de várias espécies diferem, e as mudanças na expressão também foram relatadas (Streit et al, 1996). Embora análises do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) de isolados naturais indiquem um extenso polimorfismo (Victoir et al, 1995; Espinoza et al, 1995), a variabilidade da sequência de aminoácidos dentro de algumas regiões codificada na proteína expressa (resíduos 100-577 de *L. major*) é limitado (Medina et al, 1993; Webb et al, 1991; Steinkraus et al, 1993). Estudos sugerem que existem diferentes isoformas da metaloprotease e que a mesma pode ser codificada por diferentes genes (Cuervo et al, 2008). Tem sido relatado que espécies do subgênero *Leishmania Viannia* apresentam um maior número de genes que codificam a GP63 quando comparado com espécies do subgênero *Leishmania Leishmania* (Steinkraus et al, 1993; Voth et al, 1998; Victoir et al, 1998, 2005).

As proteínas expressas partilham 18 cisteínas, e o local ativo ligante ao zinco e aos resíduos metionina são menos conservados. O local da âncora GPI em Asn577 não são conservadas em espécies de *Leishmania sp.* Resíduos de superfície são menos conservados do que os resíduos de interiores da proteína, e uma representação da variabilidade da superfície sugere que a variabilidade na sequência é correlacionada com a flexibilidade estrutural da GP63. Estudos mostraram que GP63 possuem

domínios envolvidos na adesão e interiorizações dos parasitas aos macrófagos são altamente conservados (Puentes et al, 1999). Acredita-se que a heterogeneidade encontrada em algumas regiões pode estar relacionada com as funções invasiva e imunomoduladoras atribuída a metaloproteases (Brittingham et al, 1999; McGuire et al, 2003), e isso pode ser refletido no resultado clínico da leishmaniose tegumentar por *L. (V.) braziliensis* (Cuervo et al, 2008). Victor et al, 2005, demonstraram em seus resultados para *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas sequências da GP63, que regiões que codificam o sítio catalítico msp mostrou uma sequência conservada, enquanto que as regiões de codificação de domínios de superfície, possivelmente envolvidos na interação parasito-hospedeiro (epítomos de células B e de células T) eram variáveis. Especulando que esta seria uma estratégia adaptativa do parasita.

Outro estudo observou que regiões funcionais da proteína envolvidas na internalização e ligação do parasita à célula do hospedeiro apresentavam-se altamente conservadas em várias espécies de leishmania (Puentes et al, 1999). Dentre elas, os peptídeos avaliados nesse estudo- PAVGINIPA, HEVAHA e KAREQYGC, SRYD. Posteriormente foi observado que peptídeos sintéticos baseada nessas sequências inibiram a internalização do parasita a célula hospedeira (Puentes et al, 1999). Foi demonstrado também que a GP63 e CR3 interagem através de um domínio específico que contém a sequência SRYD (Soteriadou et al, 1992). Existem domínios estruturais e funcionais em leishmanolisina, que são altamente conservados durante todo o gênero, e são de suma importância para a interação do parasita com células hospedeiras (Puentes et al, 1999).

O polimorfismo relatado em algumas regiões das sequências da GP63 de diferentes cepas, pode dificultar desenvolvimento de peptídeos em futuros estudos de vacinas (Schlagenhauf et al, 1998). Contudo, domínios funcionais que apresentaram

regiões altamente conservadas na sequência da GP63 entre as diferentes espécies de leishmania apresentaram atividade inibidora, quando os peptídeos destas regiões foram correlacionados com a sua capacidade em se ligar as moléculas presentes na superfície da linha celular humana (Puentes et al, 1999). Os principais domínios funcionais identificados envolve as sequências SRYD e HExxH, sendo que a última está ligada ao zinco (Puentes et al, 1999).

Estes resultados indicam que as interações moleculares entre os domínios conservados da GP63 e as moléculas na superfície de macrófagos contribuem de forma eficaz para a internalização do parasita e que a capacidade na indução de neutralizar as respostas imunes, que cause prejuízo a interação parasito-hospedeiro, pode ser uma alternativa importante na concepção de vacinas com subunidades de peptídeos sintéticos contra a leishmaniose humana (Puentes et al, 1999). Desta forma, é necessária uma melhor compreensão de como as regiões conservadas e polimórficas da molécula interagem com a célula do hospedeiro e como este conhecimento também pode ser revertido num reagente de imunoprevenção com maior chance de proteção principalmente em áreas endêmicas para a leishmaniose (Puentes et al, 1999).

A GP63 é um dos candidatos promissores para a vacina de subunidade contra a leishmaniose. Ao considerar o progresso de bioinformática em modelagem molecular, podemos modelar a estrutura GP63 utilizando modelagem por homologia com alta precisão, e, em seguida, analisar a estrutura 3D da GP63, que pode revelar fatos exatos sobre sua estrutura, interação e função (Button et al, 1993).

V. HIPÓTESE

Dadas as observações da relevância da GP63 sobre a virulência da *Leishmania* *sp.* e do reportado polimorfismo, nossa hipótese é que diferentes alelos da GP63 podem estar associados a diferentes formas de LTA em Corte de Pedra (BA).

VI. JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) tem alta incidência no estado da Bahia, sendo distribuída em áreas de atividade agrícola, com desmatamento. A doença afeta indivíduos adultos, jovens e até mesmo crianças. No Brasil tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA tanto em magnitude como em expansão geográfica (Ministério da Saúde, 2007).

Uma vez que a GP63 tem sido avaliada como candidata a vacina contra leishmaniose, e de alguns estudos relatarem que domínios conservados da proteína podem ser importantes no favorecimento na internalização do parasita na célula hospedeira, é de fundamental importância se examinar o grau de variabilidade dessa molécula, principalmente em domínios da proteína que tenham esta participação na interação do parasita com os macrófagos, numa área de grande endemicidade para LTA, como aquela a ser explorada neste estudo.

VII. DESENHO DO ESTUDO E MÉTODOS

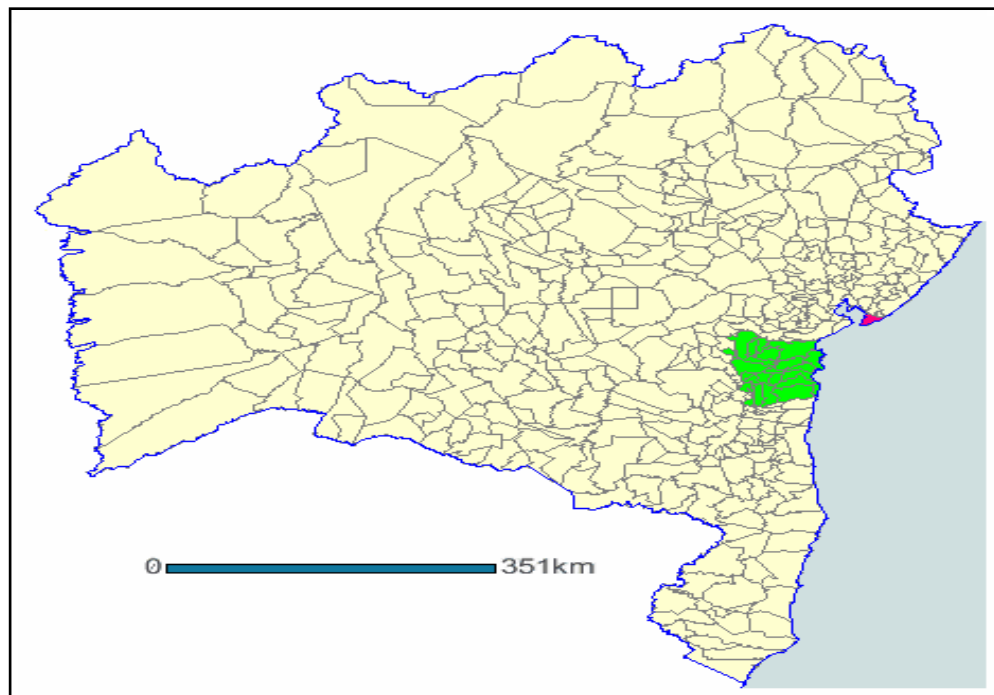
VII. 1 Desenho do Estudo

É um estudo de corte transversal, foi descrito alelos da GP63 detectáveis na área endêmica para LTA de Corte de Pedra- BA entre 1997 e 2001, e suas distribuições espaciais. Foi também avaliada a frequência em que cada genótipo descrito pôde ser observado entre os fenótipos LC, LM e LD, a fim de se avaliar possíveis associações entre cepa parasitária e desfecho de LTA.

VII.2 Área de Estudo

O estudo foi realizado empregando amostras provenientes de uma área endêmica para 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 situada a 280 km de Salvador, sendo delimitada pelas coordenadas geográficas (latitude / longitude) 14 ° / 39 °, 13 ° / 39 °, 14 ° / 40 °, e 13 ° / 40.

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.



Schriefer et al, 2005.

Figura 1. Mapa da área endêmica Corte de Pedra- BA.

VII. 3 População e amostra do estudo

Foi avaliado o polimorfismo do gene da GP63 de 35 amostras de *L. (V.) braziliensis* isoladas de pacientes que foram diagnosticados com diferentes formas de LTA (LC, LM e LD) na população residente na área endêmica de Corte de Pedra - BA.

Os pacientes, dos quais os parasitas foram obtidos, teve sua avaliação, diagnóstico, acompanhamento clínico e terapêutico realizados pelos médicos e demais profissionais de saúde do Posto de Saúde de Corte de Pedra. Os casos suspeitos tiveram sua confirmação diagnóstica com base nos seguintes critérios: avaliação clínica; intradermoreação de Montenegro; avaliação histopatológica de fragmento de lesão cutânea ou mucosa; cultivo de parasitos a partir de material aspirado da borda da lesão e PCR em tempo real para a detecção e determinação da espécie parasitária.

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. Trinta e cinco isolados de *L. (V.) braziliensis* da amostra, provenientes de 18 indivíduos com LC, 9 com LM e 8 com LD, foram utilizados para amplificação do gene *gp63* e avaliação das regiões polimórficas e conservadas da molécula.

VII. 4 Definição de Casos

LC foi definida pela presença de uma ou poucas lesões cutâneas ulcerativas sem evidência de envolvimento da mucosa. LM foi definida como uma doença metastática com lesões da mucosa que afetam o nariz, boca, faringe, laringe, não contíguas com lesões cutâneas primárias. LD foi definida como uma doença com mais de 10 lesões ulcerativas nodulares ou acneiformes sobre a pele, distribuídas em duas ou mais áreas do corpo. Pacientes que apresentaram simultaneamente as definições para LM e LD foram classificados como pacientes com LD.

VII. 5 Critérios de Inclusão e não inclusão

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

VII. 6 Considerações Éticas.

Os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia e Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP-128/2008, 17.03.2008)

VII. 7 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 NNN (Neal, Novy e Nicolle; Agar sangue modificado) e LIT (Liver Infusion Triptose) em tubos de polipropileno, 14ml, não pirogênico (tubos falcon), e incubado a 26 °C durante uma a duas semanas. Em seguida, a suspensão foi transferida para meio Schneider (SCHNEIDER INSECT EXTRACT MEDIUM; SIGMA) complementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 2 mM de L-glutamina, em frasco para cultura de tecido (garrafa de poliestireno, livre de DNase, RNase, pirogênicos e toxinas, estéril, com área de crescimento 25 cm²), e incubado a 26 °C durante um período máximo de duas semanas. Então os parasitas foram congelados em DMSO a 10%, meio de crescimento a 90%, em nitrogênio líquido.

Para a obtenção do DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis*, estes foram descongelados e cultivados em meio de cultura Schneider até os isolados promastigotas atingirem a fase estacionária de crescimento. Aproximadamente, 1,7 mL de isolados promastigotas foram centrifugados a 200g por 10 minutos e o pellet foi

ressuspensão em 150 µL de TELT – tampão de lise (50 mM Tris-HCL pH 8.0; 62,5 mM EDTA pH 9.0; 2,5 M LiCl e 4% v/v Triton 100x). Após esta etapa, as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo extraído o DNA genômico após ser adicionado ao lisado celular 150 µL de uma solução de Fenol e Clorofórmio (1:1 v/v). Em seguida, foi realizada uma homogeneização lentamente por 5 minutos em homogeneizador e centrifugação a 10.000 g por 5 minutos. Foi colhido o sobrenadante contendo o DNA genômico e transferido para outro tubo contendo 300 µL de etanol absoluto e realizado uma homogeneização por 5 minutos seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA genômico precipitado foi lavado mais uma vez com 1 ml de etanol absoluto e centrifugado a 10.000 g por 5 minutos. Após essa etapa, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuspensão em 100 µL de tampão de TE (TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado a -20°C.

VII.8 Determinação da espécie de leishmania por PCR em tempo real

A determinação das espécies da *Leishmanias* isoladas foi realizada por qPCR em tempo real com ensaios SYBER green, utilizando primers baseados nas seqüências de KDNA1, KDNA 3 e MAG1 para análise da curva melt (Weirather et al, 2011).

VII.9 Amplificação por PCR e clonagem dos alelos de *gp63* de isolados de *L. (V.) braziliensis*

Para a amplificação dos alelos da *gp63* foram utilizados primers (oligonucleotídeos iniciadores) previamente selecionados: sense,

ATGTCCCGCGACCGCAGCAG; antisense, TCACACCGCCGCTGTGTCGG. As reações de PCR convencional empregaram volume final de 50 μ L como segue: 1 μ L de DNA alvo em concentração de 16 ng/ μ L; 5 μ L de tampão 10x (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador em concentração de 0,05 mM (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 4 μ L de dNTP em concentração de 2,5 mM - dATP, dCTP, dGTP, dTTP - (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1,0 – 2,5 μ L de MgCl₂ em concentração de 50 Mm (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 0,2 μ L de Taq DNA Polymerase Platinum em concentração de 0,5 U (INVITROGEN Life Technologies, Inc); e água destilada, completando o conteúdo para o volume final de 50 μ L .

As reações foram realizadas no Termociclador Veriti® 96 poços da Applied Biosystems, segundo a seguinte programação: 94°C na fase de desnaturação da fita por 5 minutos; seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 48°C a 56°C na fase de anelamento da fita durante 1 minuto, e 72°C na fase de extensão da fita por 1 minuto; 10 minutos a 72°C na fase de extensão final. 10 μ l de cada produto da reação de amplificação do *gp63* misturados com 2 μ l de Azul de Bromofenol- tampão de corrida, foram aplicados e fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% por 1 hora a 120 volts, em tampão TBE 0,5X (0,04M Tris-HCL-Borato e 1mM EDTA). Os géis foram visualizados através do transluminador de UV conectado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP Labworks Laboratory Imaging and Analysis System Inc., CA, EUA) após serem corados com Brometo de Etídio a 0,5 μ g/mL, para confirmação da amplificação dos fragmentos alvo.

Após a amplificação dos alelos de *gp63*, foram realizadas as clonagens utilizando-se o Topo TA Cloning Kit (INVITROGEN Life Technologies, Inc), tendo os amplicons sido inseridos por ligação no plasmídeo PCR 2.1. Em resumo, num volume

final de 10 µl, para cada reação foram adicionados 2µL do fragmento amplificado, 1µl de tampão de ligação10x, 1µl de T4 DNA ligase, 2µl do vetor PCR[®] 2.1 (25 ng/µl) e 4µl de água destilada. A reação foi homogeneizada gentilmente e incubada durante a noite por um período de 12-16 horas, a 14°C.

Seguida a essa incubação, iniciou-se a etapa da transformação de células *Escherichia coli* DH5- α competentes com os plasmídeos recombinantes. Alíquotas contendo 100µl de células competentes foram retiradas do estoque (armazenamento a -70°C) e colocadas em gelo. Adicionou-se a essas alíquotas 2µl do produto da reação de ligação, gentilmente, sendo incubadas por 30 minutos em gelo. Após esse tempo, essas células passaram por um choque térmico e foram incubadas por 3 minutos a 42°C em banho-maria e rapidamente foram transferidas para o gelo por 2 minutos. Foram adicionados 200µl de meio LB líquido em temperatura ambiente, e a suspensão foi incubada por aproximadamente 2 horas a 37°C, em banho-maria.

Após esse período de incubação, o conteúdo foi semeado cuidadosamente em placas de petri contendo meio LB Agar com 40µl de X-gal a 20 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 4µl de IPTG a 200 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc), com o auxílio de um espalhador de células (alça de Drigalski) e de um disco rotatório. Essas placas foram incubadas durante um período de aproximadamente 24 horas a 37°C em estufa. Posteriormente, foram selecionadas 10 colônias brancas de cada amostra (colônias que provavelmente apresentam o vetor PCR 2.1 contendo o inserto alvo), que foram isoladas e transferidas separadamente para tubos falcon contendo 5 ml de meio LB líquido com ampicilina a 10 mg/ml. Essa suspensão foi incubada sob agitação em incubadora rotatória a 175 rpm por 16 horas a 37°C.

Para a extração do DNA plasmidial dessas suspensões foram colocados 1,5 mL de cada suspensão bacteriana em tubo Eppendorf (1,5mL), seguido de centrifugação a 12.000 g por 1 minuto. Foi feita a remoção do sobrenadante por aspiração e o sedimento bacteriano foi ressuspenso em vórtex com 100µl da solução de minipreparação de DNA I gelada (Glicose a 1mM; EDTA a 0,5M; Tris-Cl a 1M pH 8,0 e água destilada autoclavada). Em seguida, a suspensão foi deixada em temperatura ambiente, incubando por 5 minutos. Logo após, foram adicionados 200µl da solução II (1 mL de SDS 10%, 2 mL de NaOH 1N e 7 mL de água destilada), recém-preparada, e o conteúdo foi homogeneizado 2 a 3 vezes por inversão rapidamente, incubando a mistura em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 150µl da solução III gelada (Acetato de Potássio 5M pH 4,8; Acido Acético e água destilada – solução autoclavada) e o conteúdo foi homogeneizado, gentilmente, por 10 segundos em vortex em uma posição invertida e incubado em gelo por 5 minutos, o tubo contendo a mistura foi centrifugado a 12.000 g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 450µl de fenol: clorofórmio 1:1 (v/v), previamente resfriado, e homogeneizado em vórtex. Em seguida, foi feita uma centrifugação a 12.000g por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1 mL de etanol absoluto, e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente e 20 minutos a – 70°C. Após esse período, foi realizada uma centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1mL de etanol a 70% ao sedimento. Uma nova centrifugação foi realizada nas mesmas condições e logo em seguida o sobrenadante foi descartado, ficando o precipitado de DNA do fragmento no tubo, que foi deixado invertido a temperatura ambiente por 10 minutos até a secagem do mesmo. Finalmente o DNA foi ressuspenso em 50µl de

tampão TE pH 8,0 (Tris-EDTA) com RNase (Gibco BRL, division of INVITROGEN GAITHERSBURG, EUA).

A confirmação das clonagens dos alelos de *gp63* nos plasmídios PCR 2.1 foi feita por análise de restrição. Cada reação foi constituída por 3,5µl do produto da minipreparação de DNA, 1µl de tampão de digestão 10x, 0,5µl da enzima de restrição EcoRI (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 5µl de água destilada, e incubada a 37°C em banho-maria por 1 hora. 10µl do produto da digestão com endonuclease de restrição foram adicionados a 2µl de Azul de Bromofenol em gel de agarose a 1,3%, por 50 minutos, a 120 volts, em tampão TBE 0,5X (0,04M Tris-HCL-Borato e 1 mM EDTA). Após coloração com Brometo de Etídio a 0,5 µg/mL por 10 minutos, e descoloração por 5 minutos, o gel foi visualizado através do transluminador de UV conectado a um sistema de captura eletrônica de imagens (UVP Labworks Laboratory Imaging and Analysis System Inc., CA, EUA). Foram considerados verdadeiros clones aqueles produtos que apresentaram uma banda com aproximadamente 409pb, compatível com o tamanho do fragmento da *gp63* da *L.(V.) braziliensis* amplificado por PCR.

VII.10 Sequenciamento dos fragmentos clonados da *gp63*

Dez clones por isolado de *L.(V.) braziliensis* foram enviados para serem seqüenciados pela Advancing Through Genomics MACROGEN® (Córea). Para identificação dos sítios de restrição, fragmentos clonados e alinhamento das seqüências de *gp63* foi utilizado o programa MEGA 5.05[®], usando como base para a avaliação seqüências da *gp63* de *L.(V.) braziliensis* depositadas no Centro Nacional de Informação Biotecnológica– NCBI (GenBank), os diferentes alelos de *gp63* presentes

na amostra do estudo foram identificados com base nos polimorfismos detectados aos alinhamentos dos fragmentos clonados.

As localizações dos nucleotídeos polimórficos encontrados na *gp63* de diferentes isolados de *L. (V.) braziliensis*, foram mapeadas no modelo publicado para a glicoproteína. Dessa forma foram determinadas as regiões mais estáveis e mais variáveis da molécula encontrada numa população natural do parasita.

VII.11 Distribuição geográfica dos casos de LTA e alelo de *gp63* em Corte de Pedra – BA

A distribuição de casos de LTA, e dos alelos de *gp63* em Corte de Pedra foi determinada pela aquisição das coordenadas geográficas por GPS das residências dos pacientes diagnosticados com LTA. As coordenadas geográficas foram obtidas utilizando um aparelho Brunton Multi-Navigator (Brunton Company, Riverton, WY, EUA). As residências dos pacientes foram utilizadas como pontos de referência para fins de padronização, pois se acredita que a leishmaniose é 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 numa 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 10 (Environmental Systems Research Institute Inc., Redlands, CA, EUA).

VII.12 Análise Estatística

As análises geo-estatísticas de agregações dos alelos de *gp63* foram realizadas com o pacote Cluster-Seer da BioMedware. Resultados com um $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significante.

As associações entre alelos de *gp63* e forma de LTA (i.e. LC, LM e LD) foram avaliadas comparando as frequências dos haplótipos de nucleotídeos polimórficos entre os três grupos de formas clínicas da doença. Essa análise foi feita pelo teste exato de Fisher. Foram consideradas significantes aquelas associações com o valor de $P \leq 0,05$.

As frequências de nucleotídeos polimórficos entre regiões polimórficas e conservadas também foram comparadas pelo teste exato de Fisher.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Identificação dos polimorfismos da *gp63* em Isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra - BA.

Para cada um dos 35 isolados de *L. (V.) braziliensis*, obtidos de casos de LTA diagnosticados no posto de saúde de Corte de Pedra entre 1992 e 2001, 10 clones do fragmento da *gp63* contendo 409pb foram sequenciados. Os 350 clones do fragmento da *gp63* foram alinhados utilizando como consenso a sequência de nucleotídeos da GP63 “*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (LBRM_10_0540)” retirada do banco de dados GenBank, acessado no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/XM_001562773.2.

Nos 350 clones foram encontrados 31 alelos da *gp63* (Figura 2). Consideramos alelo, todo haplótipo de polimorfismos encontrado em mais de um clone do mesmo isolado e necessariamente em mais de um isolado de *L. (V.) braziliensis*. No total foram encontradas 169 posições polimórficas nos fragmentos dos 35 isolados de Corte de Pedra – BA (figura 2). A variação mínima foi de oito posições polimórficas, encontradas no alelo 31, e a máxima de 100, encontradas no alelo nove (figura 2), com uma mediana de 91 polimorfismos por alelo da *gp63* (Tabela1).

Das 169 posições polimórficas, 146, ou seja, 86,4% apresentaram polimorfismos com substituição de uma base nitrogenada por outra. A maioria das variações se concentrou no primeiro e/ou segundo nucleotídeo do códon, o que resultou em substituição de 53,3% posições de aminoácidos na proteína traduzida. Variações silenciosas também foram observadas em 27 posições (15,9%), das 169 posições. As posições 579, 594, 795 e 906 tinham os dois tipos de polimorfismos (Figura 2).

Cada isolado de *L.(V.) braziliensis* avaliado apresentou mais de três alelos distintos. Estes resultados demonstram que a *gp63* é extremamente polimórfica entre *L.(V.) braziliensis*, isolados de pacientes de uma mesma área endêmica.

Tabela 1. Variabilidade dos nucleotídeos do gene *gp63* entre os 4 cladros (descritos na figura 3) de *L.(V.) braziliensis*, classificada de acordo com os 31 alelos da glicoproteína, encontrados nos isolados clínicos de Corte de Pedra-BA.

	TOTAL	CLADO A	CLADO B	CLADO C	CLADO D
Nº de alelos (haplótipos)	31	17	6	3	5
Mínimo de polimorfismos	8	85	86	49	8
Máximo de polimorfismos	100	100	92	53	48
Mediana	91	92	89	53	21

VIII.2 Classificação dos alelos do gene *gp63* e identificação do cromossomo em que seus *loci* estão localizados na *L.(V.) braziliensis*.

A heterogeneidade encontrada nas seqüências da *gp63* foi avaliada classificando-as em um dendograma. Alguns cromossomos são responsáveis pela expressão da GP63 nas leishmanias, contudo esses cromossomos vão variar de acordo com cada espécie. Para a *L.(V.) braziliensis* os genes que codificam a GP63 estão no cromossomo 10 e/ou 31 (Peacock et al, 2007).

Para identificarmos os cromossomos em que os alelos de *gp63* detectados neste estudo estão localizados, fizemos o Blast de cada uma dessas seqüências, ou seja, a busca de cada uma delas, nas seqüências de cada um dos cromossomos da *L.(V.) braziliensis* armazenadas no site do instituto Sanger (Inglaterra),

<http://www.sanger.ac.uk/>. As análises dos clones dos 35 isolados revelaram que todos os alelos puderam ser mapeados no cromossomo 10 do parasito. A classificação dos alelos permitiu identificar dois grandes grupos de alelos, subdivididos em quatro cladogramas menores (Figura 3, cladogramas A-D). O grupo 1 agregou 17 alelos da *gp63*, todos no clado A, ao passo que o grupo 2 agregou 14 alelos distribuídos nos cladogramas B,C,D (Figura 3).

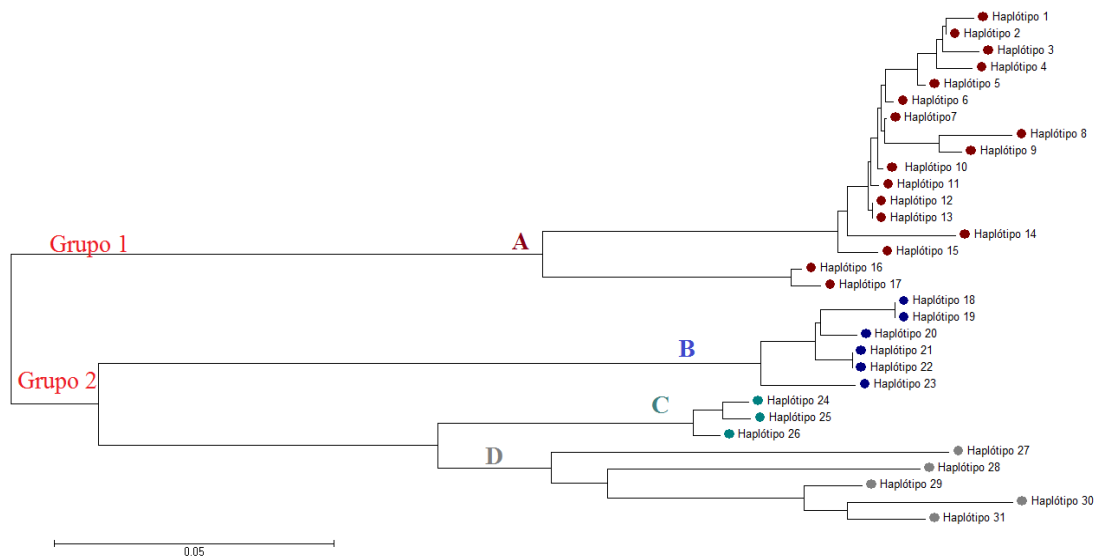
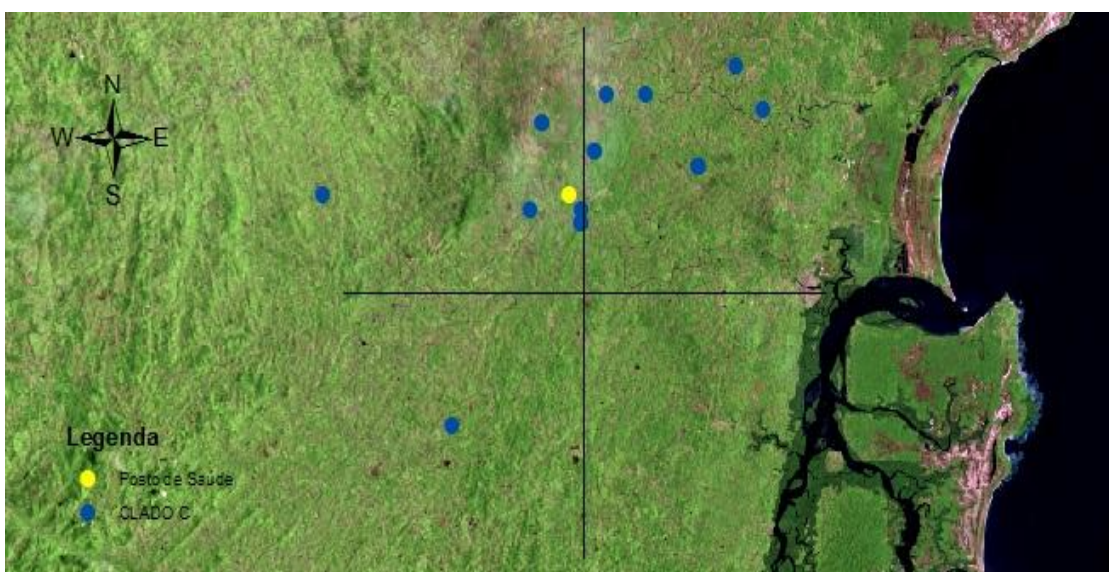
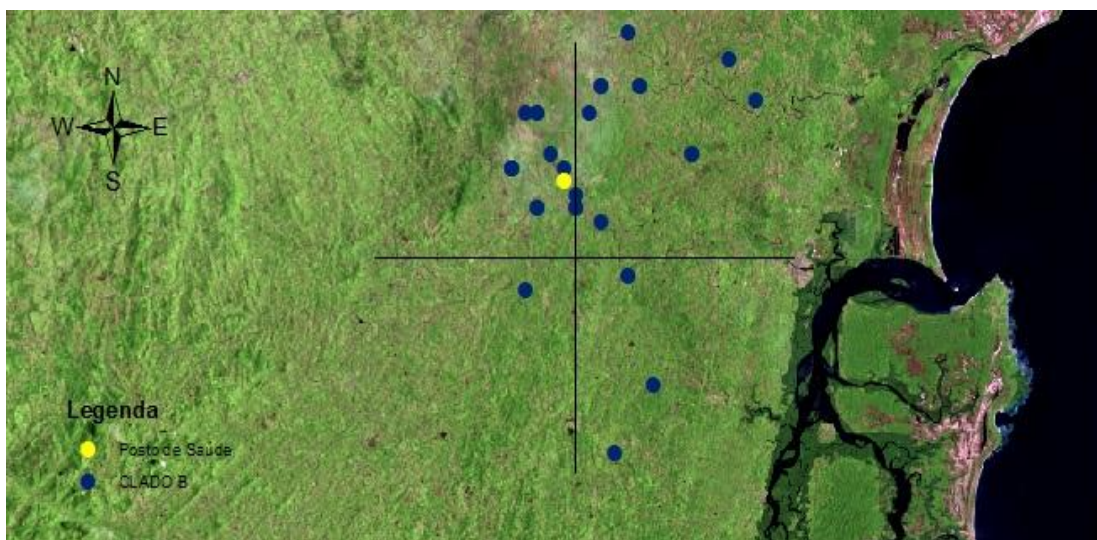
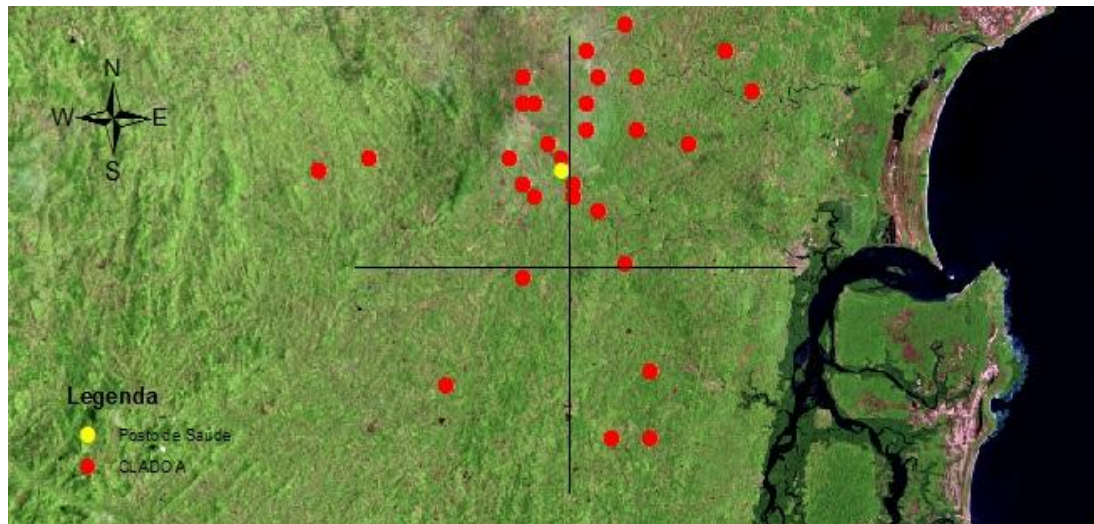


Figura 3. Dendrograma resultante da classificação por Neighbor-Joining dos 31 alelos do gene *gp63* encontrados em 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra. As extremidades dos ramos mostram os 31 alelos (haplótipos) do gene *gp63* presentes na *L.(V.) braziliensis* isoladas dos casos de LTA. 17 haplótipos estão presentes no grupo 1, clado A e 14 haplótipos estão divididos em 3 cladogramas (B,C e D) no grupo 2. Alelos do clado A em vermelho, do B clado em azul, do clado C em verde e do clado D em cinza.

VIII.3 Distribuição geográfica dos alelos do gene *gp63* em Corte de Pedra- Ba.

As distribuições geográficas dos alelos do gene *gp63* identificados nos parasitas isolados dos casos de LTA acompanhados entre 1992 e 2001 no posto de saúde de Corte de Pedra estão dispostas na figura 4. Observa-se que os alelos distribuídos nos quatro cladogramas (A, B, C e D) apresentam sobreposição na área endêmica. Nota-se uma distribuição ampla dos alelos do clado A em Corte de Pedra (Figura 4).



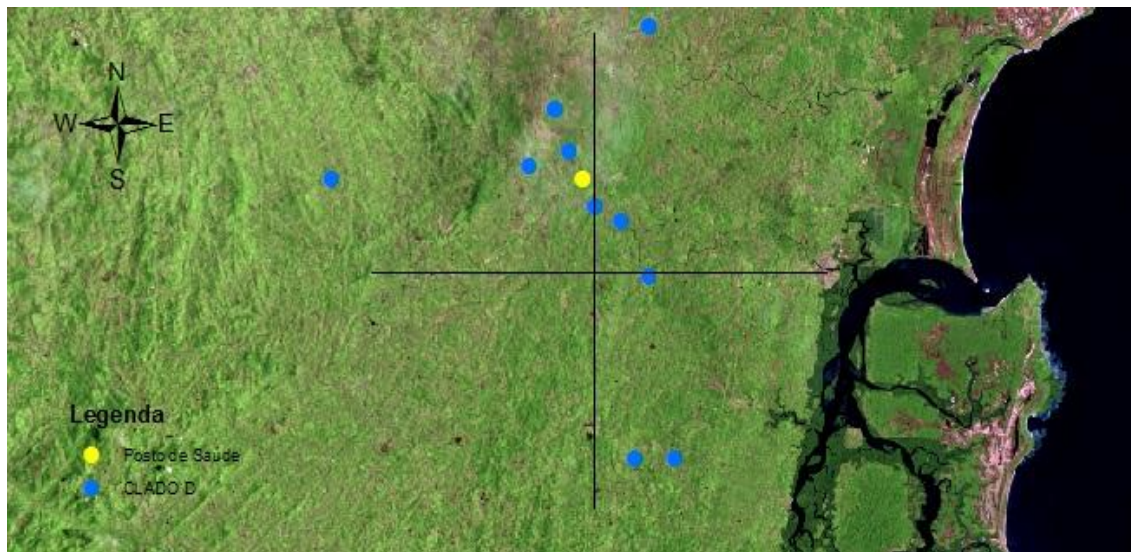


Figura 4. Distribuições espaciais dos 4 clados que contém os 31 alelos do gene *gp63* entre 1992 e 2001 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra – BA. (A) 17 haplótipos; (B) 6 haplótipos; (C) 3 haplótipos (D) 5 haplótipos. Pontos vermelhos correspondem aos alelos presentes na clado 1 e os azuis aos alelos presentes no clado 2. Os haplótipos foram mapeados de acordo com as coordenadas geográficas das moradias dos casos de LTA, dos quais foram isoladas as *L. (V.) braziliensis*.

VIII.4 Avaliação das sequências traduzidas dos alelos da *gp63*

Os alelos foram alinhados utilizando-se como consenso a sequência traduzida da GP63 “*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 GP63 leishmanolysin (LBRM_10_0540)” retirada do banco de dados GenBank, acessado no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/XM_001562773.2.

A proteína utilizada como consenso apresenta 557 aminoácidos. O nosso fragmento amplificado estende-se da posição 180 a 315 da proteína consenso. Sendo assim a GP63 amplificada dos isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra - BA contém 135 aminoácidos. No total foram encontradas 72 posições polimórficas nos peptídeos codificados nos alelos dos 35 isolados de Corte de Pedra – BA (Figura 5). A variação mínima foi de sete trocas de aminoácidos, encontrados no peptídeo traduzido do alelo 31, e a máxima de 51, encontradas nos peptídeos codificados nos alelos 22 e 23, (Figura 5), com uma mediana de 30 trocas de aminoácidos por alelo da GP63 (Tabela 2).

MHONBR75M204GR6D F V L Y V A S V P S E L G V L A W A V M C A F F D R P A Y G V I N I P A A Y I Q S A Y D Q F M L R S V T H E M A H A L G F D L L L F E E L D L D V V S N L R G K D Y E V P L N S P T V V A K A R E Q Y G C A T L T F L E V E D T G D G S T A G S H L K R R N A K D E L
1. P T T V S H M N V R G T T V S S V F N A G I V T N T P F A A S C P E Y Q G S G S G
2. P T T V S H M N V R G T T V S S V F N A G I V T N T P F A A S S P E Y Q G S G S G
3. P T T V S H M N V R G T T V S S V F N A G I V T N T P F A A S S P E Y Q G S G S G
4. P T T M S H M N V R G T T V S S V F N A G I V T N T P F A A S S P E Y Q G S G S G
5. P T T V S H M N V R G T T V S S V F N A G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
6. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
7. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
8. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I V T N T P F A A S S P E Y Q S P G S G
9. P T T V S H L N V R G T T V S S V F G T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
10. P T T V S H M N V R G T T V S S V F S T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
11. P T T V S H M N V R G T T V S S V F S T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
12. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
13. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I V K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
14. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I A K S T P F A A S S P E Y Q G S G S G
15. P T T V S H M N V R G T T V S S V F G T G I A K S T P F A A S S T N Y Q G S G S G
16. P T I M S G Q M N V R D G L T A V S R M F S T G I M M N T R F F S S A T N Y L G C G
17. P T I M S G Q M N V R D G L T A V S R M F S T G I M M N T R F F S S M A T N Y L G C G
18. I G N I S A F V T N G V N R L I T I N R I F D S F G M V T A A I G I Y A T T T L S L G S A S L G
19. I G N I S A F V T N G V N R L I T I N R I F D S F G M V T A A I G I Y A T T T L S L G S A S L G
20. I G N I S A F V T N G V N R P L I T I N R I F D N A G M V T A A I G I Y A T T T L S L K G F A S L G
21. I G N I S A F V T N G V N R P L I T A V N R I F D S F G M V T A A I G I Y A T T T L S L K G F A S L G
22. I G N I S A F V T N G V N R P L I T A V N R I F D S F G M V T A A I G I Y A T T T L S L K G F A S L G
23. I G N I S A F V P G V P I V T A V N R I F D S F G M V T A A I G I Y A T T T L S L G P A S L G
24. D T D M S A F V P G H R P L I T I T I M E I I E N R Y V T K Y L G A G
25. D T D M S A F V P G N R P L I T I T I M E I I E N R Y V D T K Y L G A G
26. P M S A F V P G H R P L I T I T I T I M E I I E N R Y V D T K Y L G A G
27. G A D M E P S M P I V T V T V D R Q I I E N S A S V E L A G
28. P T I T S S G M R I T A V T V D V G I V G D R S A V L G M
29. P M R E R R E R P E L G G
30. K P T N H T V V G V V G R S A L G G
31. K P E R G E R G E R G L G G

Figura 5. Alinhamento das posições polimórficas dos peptídeos da GP63 encontradas nos 31 haplótipos presentes nos 35 isolados de *L.(V.)braziliensis* em Corte de Pedra – BA, gerado pelo software MEGA 5.0.

Dos 135 aminoácidos do peptídeo codificado no fragmento da GP63 empregado neste estudo, 72, ou seja, 53,3% apresentaram trocas de aminoácidos.

Essas substituições de aminoácidos ocorreram devido ao polimorfismo encontrados nos nucleotídeos em 146 posições do gene da *gp63*. 63 aminoácidos, ou seja, 46,7% foram conservados em todos os peptídeos traduzidos dos 31 alelos da GP63 deste estudo (Figura 5).

Tabela 2. Variabilidade dos peptídeos da GP63 nos 4 clados (descritos na figura 6) de *L.(V.) braziliensis*, classificada de acordo com a tradução dos 31 alelos da glicoproteína encontrados nos isolados clínicos de Corte de Pedra-BA.

	TOTAL	GRUPO 1 (Clado A)	GRUPO 2 (Clados B, C e D)
Nº de alelos (haplótipos)	31	17	14
Nº mínimo de polimorfismos	7	38	7
Nº máximo de polimorfismos	51	45	51
Mediana	30	36	19

A heterogeneidade encontrada nas sequências dos aminoácidos da GP63 foi avaliada classificando-as em um dendograma. As 31 variantes do gene que se distribuíram em dois grandes grupos de alelos (Figura 2), foram mantidas nos mesmos clados após sua tradução, apesar dos polimorfismos nos nucleotídeos resultarem em trocas de aminoácidos promovendo um reagrupamento dos clados (Figura 6).

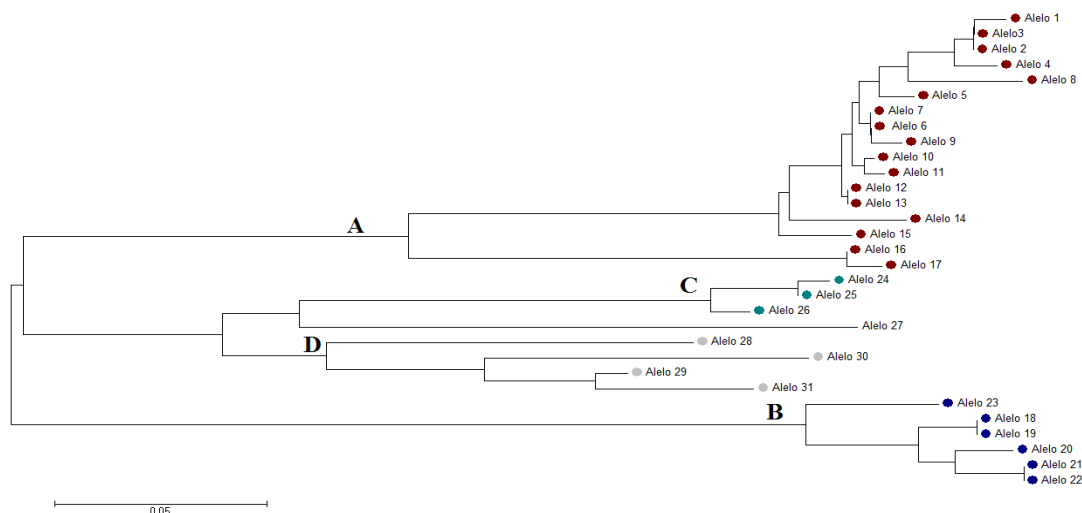


Figura 6. Dendrograma resultante da classificação por Neighbor-Joining dos peptídeos da GP63 encontrados em 35 isolados de *L.(V.) braziliensis*, gerado de acordo com as análises com o software MEGA 5.0. As extremidades dos ramos mostram os 31 alelos da GP63 presentes na *L.(V.) braziliensis* isoladas de casos de LTA de Corte de Pedra – BA. Cada alelo recebeu a mesma cor empregada no dendrograma da figura 3 para reforçar que as agregações dos peptídeos foram semelhantes às identificadas para os alelos do gene *gp63* correspondentes

Embora a análise da estrutura primária da proteína tenha denotado que a maior parte da molécula é bastante polimórfica, quatro segmentos conservados foram detectados: SRYD, PAVGNIPA, HEVAH e KAREQYGC (Figura 7). Todos os quatro segmentos foram localizados na porção da GP63 previamente relatada como sendo importante na interação do parasita com macrófagos (Puentes et al,1999).

Das 135 posições dos peptídeos da GP63, 20% (27) eram as posições contendo os segmentos SRYD, PAVGNIPA, HEVAH e KAREQYGC, destas 27 posições, 22,2% continha trocas de aminoácidos, enquanto que 77,8% são altamente conservadas ($p < 0,0001$). As regiões que não compreendiam os segmentos (108 regiões) apresentaram 60% das suas regiões polimórficas

MHOM/BR/75/M2904	P	A	V	G	V	I	N	I	P	A	S	R	Y	D	H	E	M	A	H	K	A	R	E	Q	Y	G	C	
Alelo 1	M	V	C	.
2	M	V
3	M	V
4	M	V
5	M	V
6	M	V
7	M	V
8	M	V
9	L	V
10	M	V
11	M	V
12	M	V
13	M	V
14	M	V
15	M	V
16	M	D	.	V
17	M	D	.	.	V
18	I
19	I
20	P	.	.	.	I
21	P	.	.	.	V
22	P	.	.	.	V
23	P	.	.	.	V
24	P	.	.	.	I
25	P	.	.	.	I
26	P	.	.	.	I
27	M	P	.	.	.	V	V
28	M	V
29
30
31

Figura 7. Alinhamento das posições conservadas dos peptídeos da GP63 da sequência-alvo, encontradas nos 31 haplótipos presentes nos 35 isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA, gerado pelo software MEGA 5.0.

Os segmentos SRYD e HEVAH encontrados nos isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra – BA têm sido descritos na literatura como importantes para a internalização do parasita pelo macrófago, e são encontrados em outras espécies de leishmania. Os segmentos PAVGNIPA e KAREQYGC estão presentes em uma região maior, sendo descrita como importante para a adesão do parasita aos macrófagos, mas não foram ainda confirmados como participantes deste processo. Esses quatro peptídeos estão mapeados na estrutura terciária da GP63 mostrada na figura 8.

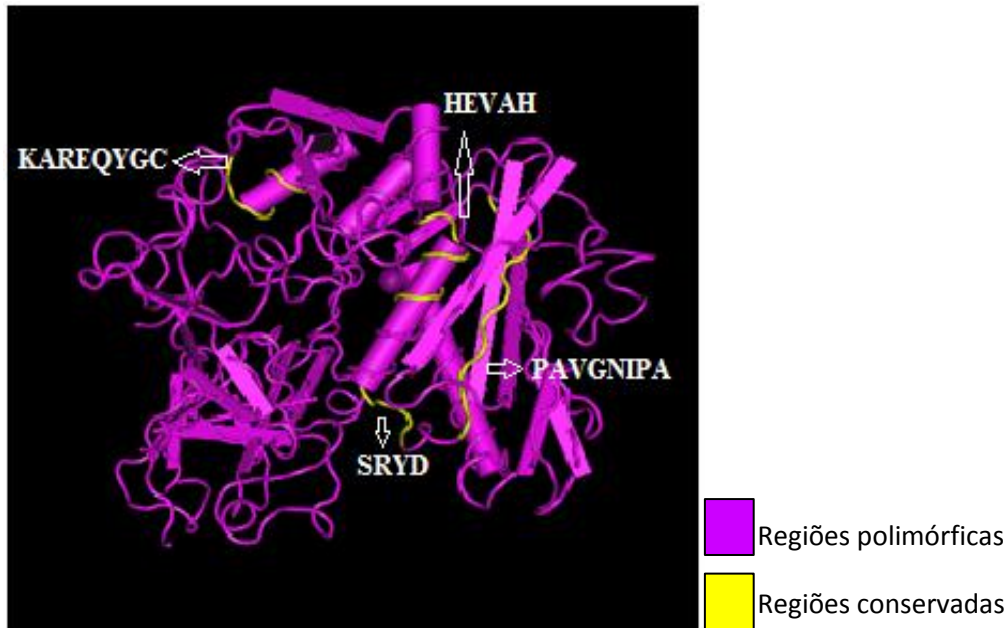


Figura 8. Mapeamento das regiões conservadas SRYD, PAVGNIPA, HEVAH, KAREQYGC (em amarelo) e polimórficas (em lilás) da GP63 na estrutura terciária da proteína gerada pelo software Cn3D 4.3.

VIII.5. Associação entre alelos da *gp63* e forma clínica da LTA.

Devido a GP63 ser a principal metaloprotease expressa por todas as espécies de leishmania (Bouvier et al., 1985; Etges et al., 1986) e ser considerado um importante fator de virulência do parasito, buscamos avaliar possíveis associações entre alelos da *gp63* e forma clínica (LC, LM e LD) de LTA. Contudo nenhum dos 31 alelos encontrados na nossa amostra apresentou associação significativa com LC, LM ou LD. O alto grau de polimorfismo da *gp63* em nossa amostra, certamente resultou em uma perda importante de poder para a detecção de possíveis associações.

XIX DISCUSSÃO

Estudos têm demonstrado que proteases de protozoários parasitos cumprem papéis na infecção, sobrevivência e patogenicidade (Rosenthal, 1999; Sajid & McKerrow, 2002). Estas enzimas têm sido descritas em várias espécies de leishmania (North & Coombs, 1981; Coombs, 1982; Pupkis & Coombs, 1984) e estão envolvidas no estabelecimento do parasitismo intracelular, assim como na inibição da resposta imune do hospedeiro (Chang & Chang, 1986; Russell & Wilhelm, 1986; Liu & Chang, 1992; Mottram et al, 1996; Alexander et al, 1998). As atividades de metaloproteases de espécies de *Leishmania* (*Leishmania*) têm sido amplamente avaliadas na literatura, contudo, a descrição das proteases nas espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) ainda é escassa (Leon et al, 1994).

A principal glicoproteína de superfície da leishmania, GP63, (Bouvier et al, 1985; Etges et al, 1986) é uma metaloprotease dependente de zinco, expressa tanto por promastigotas quanto por amastigotas. A expressão desta enzima acompanha o ciclo de desenvolvimento do parasita, chegando a ser o principal componente da superfície celular de promastigotas metacíclicas (Medina-Acosta et al, 1989, 1993; Bouvier et al, 1995). Já em amastigotas, a GP63 está localizada em grandes vacúolos (Bahr et al, 1993; Ilg et al, 1993). Estudos têm demonstrado que a gp63 está envolvida na evasão do parasita aos fatores da resposta humoral, fazendo com que promastigotas sejam resistentes à citólise mediada por complemento (Brittingham et al, 1995), além de estar envolvida na união das promastigotas aos macrófagos via endocitose mediada por receptor (Chang & Chang, 1986; Russell & Wilhelm, 1986) e promover proteção contra degradação parasitária dentro do fagolisossomo do macrófago (Chaudhuri et al, 1989).

Corte de Pedra – BA é uma área endêmica para a Leishmaniose Tegumentar Americana causada pela *L. (V.) braziliensis*, caracterizada pela presença das três formas clínicas de LTA (cutânea, mucosa e disseminada). A LTA é difícil de tratar e se apresenta com resultados graves, muitas vezes desfigurantes, e casos extremos podem até resultar na morte do paciente. O largo espectro das desordens causadas por estes protozoários sugere uma variabilidade intra-específica que pode afetar manifestações da doença (Schriefer et al, 2004). Neste presente estudo buscamos avaliar a estrutura gênica e protéica da GP63 e determinar se as diferenças encontradas na mesma poderiam estar associadas ou não com as manifestações clínicas encontradas nesta área endêmica, tendo em vista que esta proteína confere virulência a estes parasitas.

Encontramos uma estrutura altamente polimórfica entre os 35 isolados de casos clínicos em Corte de Pedra. O alinhamento das nossas sequências da GP63, oriundas dos isolados de *L. (V.) braziliensis* revelou uma considerável variação tanto na sequência do DNA como na proteína traduzida. A avaliação das 350 sequências dos clones dos 35 isolados revelou 31 haplótipos de nucleotídeos polimórficos e 31 alelos do gene. A avaliação desses haplótipos no dendograma da figura 3 sugere que os alelos detectados nos isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra podem estar codificados em dois *loci* diferentes no mesmo cromossomo 10. Os genes que codificam a GP63 em *L. (V.) braziliensis* parecem estar organizados em tandem (4 cópias) no cromossomo 10 e/ou 31 (Peacock et al, 2007).

A GP63 das espécies do subgênero *Leishmania viannia* apresenta um alto grau de variabilidade em suas sequências e especula-se que existam muitas cópias de genes que possam estar envolvidos na expressão desta proteína na *L. (V.) braziliensis* (Victoir et al, 1995). Dentro do mesmo organismo, estes genes mostram variações de quase 50% nas sequências dos nucleotídeos (Victoir et al, 1995). As nossas análises sugerem que

polimorfismos concentraram nas regiões da proteína GP63 que não participam da interação com a célula hospedeira. Essas variações podem ser induzidas pela pressão do sistema imune do hospedeiro sendo essa proteína de superfície do protozoário. Acreditamos que estes polimorfismos podem conferir às leishmanias a capacidade de driblar as células imunes e sobreviver em um ambiente imune hostil, garantindo assim a sua sobrevivência. Reforçando esta hipótese, estudos sugerem que os polimorfismos da GP63 localizam-se em regiões que serviriam de epítomos para células da resposta imune do hospedeiro (Células T e células B) (Guerbouj et al, 2000, 2001; Victoir et al, 2002).

Ainda analisando os 31 haplótipos encontrados nas sequências dos isolados da área endêmica (Corte de Pedra- BA) buscamos encontrar qual ou quais seriam os haplótipos que pudessem estar associados com as diferentes formas clínicas da LTA, tendo em vista que alguns estudos observaram que características genéticas do parasita sugerem associações com formas mucosa e disseminada da doença em isolados de *L.(V.) braziliensis* (Saravia et al, 1998, 2002; Schriefer et al, 2004; Queiroz et al, 2012). Porém, nenhuma associação estatisticamente significativa pôde ser encontrada. Levantamos duas hipóteses (I) que o tamanho da nossa amostra tenha sido insuficiente, sendo assim, não foi possível encontrar estas associações, (II) que devido a *L.(V.) braziliensis* apresentar inúmeros genes para a *gp63*, talvez com expressões diferenciadas de acordo com o estágio de desenvolvimento do parasita nós não tenhamos avaliado aqueles alelos que são expressos nos seres humanos. Recentemente foi observado que clones de *L.(V.) guyanensis*, com diferentes capacidades metastáticas, expressam diferentes isoformas de EF-1 β e de peroxiredoxina citosólica (Walker et al., 2006).

Assim como os nossos resultados, Victoir et al, 1998 observaram um extenso polimorfismo em moléculas de GP63 em isolados de *L. (V.) braziliensis*, porém nenhuma associação com as formas clínicas cutânea ou mucosa foi encontrada nos

correspondentes isolados. Os autores afirmam ainda que o polimorfismo genético evidenciado no locus *gp63* pode estar associado a dois fenômenos: (I) mudanças na organização genômica dos genes da *gp63*, como por exemplo, devido a sua diferença em número de cópias ao nível do subgênero, espécies e ações individuais de cada espécie (Button et al., 1989; Webb et al 1991; Medina - Acosta et AL, 1993; Roberts et AL, 1993; Steinkraus et AL, 1993; Victoir et al, 1995); e (II) a heterogeneidade genética das regiões dos genes, como por exemplo, a partir de uma família de genes em *L. (L.) major* (Button et al, 1989) para pelo menos quatro, em *L. (V.) guyanensis* (Steinkraus et al, 1993).

Estudo realizado por Cuervo et al, 2007 demonstrou que três isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes das três formas clínicas para LTA (LC, LM e LD) oriundas de Corte de Pedra – BA (mesma região geográfica dos nossos isolados), exibiam heterogeneidade na expressão de moléculas homologas a GP63 na superfície celular, pelo método de citometria de fluxo. Diferenças intraespecíficas puderam ser detectadas, e o isolado oriundo da forma mucosa expressava menor quantidade desta proteína quando comparada aos isolados das formas clínicas cutânea e disseminada. Se tal heterogeneidade está relacionada aos papéis imunomoduladores atribuídos à metaloprotease (Brittingham et al, 1999; McGwire et al, 2003), ou ainda, se está relacionado ao desfecho clínico da *L.(V.) braziliensis*, são questões a serem esclarecidas.

Estudos indicam que moléculas de superfície, como por exemplo a GP63 e a LPG (lipophosphoglycan), são importantes na adesão, internalização e sobrevivência de parasitas em células hospedeiras (Chakrabarty et al, 1996; Garcia et al, 1997; Russell & Wilhelm, 1986; Wilson & Handin, 1988; Brittingham et al, 1995; Seay et al, 1996; Kelleher et al, 1995), e que modificações em componentes estruturais delas ou falha nas

suas expressões induzem a diferentes padrões de virulência dos parasitas, com evidências de redução na adesão e subsequente internalização da leishmania (Chakrabarty et al, 1996; Liu & Chang 1992; McMaster et al, 1994; McGwire & Chang, 1996). Observa-se que domínios funcionais dessa proteína podem mediar estes fenômenos, dentre eles o SRYD (Russell et al, 1989; Soteriadou & Remounds 1992; Soteriadou et al, 1992; Miller et al, 1990).

Nossas análises dos polimorfismos na estrutura primária da proteína revelaram que a maior parte da molécula é bastante polimórfica, contudo quatro segmentos altamente conservados foram detectados: SRYD, PAVGVNIPA, HEVAH E KAREQYGC (Figura 7). Todos os quatro segmentos foram localizados na porção da GP63 previamente relatada como sendo importante na interação do parasita com macrófagos (Puentes et al, 1999). Os segmentos SRYD e HEVAH encontrados nos isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra- BA, têm sido encontrados em outras espécies de *Leishmania* (Brittingham et al, 1999). Alvarez-Valin et al, 2000 verificaram uma heterogeneidade nas sequências de *gp63* e mostraram uma alternância de regiões conservadas e variáveis (aproximadamente nas mesmas posições), em diferentes espécies de leishmania. No estudo de Victoir & Dujardin, (2002), relatam que regiões variáveis estão situadas na superfície da proteína e que esta estrutura pode ser importante na relação do parasita com o hospedeiro, pois a localização de pontos polimórficos nas sequências da *gp63* estão em regiões que apresentam epítomos para as células T e B da resposta imune, estes resultados levaram à hipótese de que os polimorfismos genéticos neste importante antígeno pode trazer vantagens seletivas ao parasita, permitindo a fuga da resposta imune do hospedeiro.

A proteína consiste em três domínios: N-terminal, central e C-terminal. No domínio N-terminal está a estrutura que confere a esta proteína, módulos catalíticos de

zinco proteinase (Stocker & Bode, 1995). Este domínio contém átomos de zinco catalíticos e o sítio ativo contém duas histidinas ligadas a este domínio por uma sequência HExxH conservada em todas as espécies de leishmania. Esta região que contém este sítio ativo está envolvida com atividade proteolítica da proteína e também incluem esta proteína na classe de zinco proteinase, as metzincin. Essas proteases são secretadas por matrizes extracelulares modificando algumas enzimas como as collagenases, o que sugere que esta região possa favorecer a internalização do parasita na célula hospedeira e o estabelecimento da infecção. O desenvolvimento de drogas para inibição da infecção poderia explorar estruturas ou mecanismos que pudessem inibir este sítio ativo da GP63 (Schlagenhauf et al, 1998). Esta região foi encontrada de forma conservada em todos os nossos isolados analisados.

Outra região encontrada nos nossos resultados, altamente conservada em quase todos os isolados, foi aquela contendo o segmento SRYD. Alguns estudos têm permitido a caracterização funcional deste domínio como envolvido principalmente na internalização celular (Russell et al, 1989; Soteriadou & Remounds, 1992; Miller et al, 1990). A interação inicial entre as formas promastigotas da leishmania e macrófagos é mediada por receptores (Chakrabarty et al, 1996; Russell & Wiilhelm, 1986; Soteriadou & Remounds, 1992; Bertho et al, 1992). Moléculas de superfície do parasita (Kelleher et al, 1995; Chang, 1979) e moléculas do sistema complemento (Brittingham et al, 1995; Rosenthal et al, 1996; Van strijp et al, 1993; Da Silva et al, 1989) têm sido postuladas como estando envolvidas neste fenômeno. Inúmeros estudos têm implicado na internalização dos parasitas, os receptores: CR1, CR3 e CR4 do sistema complemento; frutose-manose; por fibronectina; por proteína C-reativa; e porção Fc das imunoglobulinas (Rosenthal et al, 1996; Blackwell et al, 1985; Culley et al, 1996; Mosser et al, 1987; Wyleret et al, 1985; Talamás- Rohana et al, 1990; Wilson &

Pearson, 1986). Interação entre a GP63 com CR3 tem sido descrita, sugerindo uma interação entre a proteína e o sistema complemento (Talámas- Rohana et al, 1990; Wilson & Pearson, 1986). A gp63 e o CR3 parecem interagir em domínios específicos contendo os aminoácidos SRYD (Soteriadou & Remounds, 1992). Puentes et al, 1999, demonstraram que anticorpos monoclonais contra estes peptídeos inibiram a internalização de *L. infantum*.

Os Segmentos PAVGNIPA e KAREQYGC também foram encontrados conservados nos isolados estudados, e o mapeamento na estrutura primária da GP63 demonstrou que estes peptídeos estão presentes em uma região maior, descrita como importante para a adesão do parasita aos macrófagos. Contudo não foram ainda confirmados como participantes deste processo.

Diante dos nossos achados especulamos que os quatro segmentos conservados encontrados nos isolados de *L. (V.) braziliensis*, de uma mesma área endêmica, tenham papel importante no estabelecimento da infecção e que as regiões polimórficas permitam o escape destes parasitas à resposta imune da população humana do foco de transmissão da LTA. Assim, considerando a relevância da GP63 enquanto fator de virulência e de grande relevância à biologia tanto das formas promastigotas quanto amastigotas da leishmania, sugerimos que as porções conservadas SRYD, PAVGVNIPA, HEVAH e KAREQYGC identificadas neste estudo sejam testadas como bons candidatos a subunidades em vacinas e outros reagentes de imunoprofilaxia para o controle da LTA.

X- PERSPECTIVA DE ESTUDO

Avaliar a antigenicidade e a imunidade das regiões da GP63 envolvidas na interação com os macrófagos e seus efeitos sobre esta célula da resposta imune a partir da avaliação da imunogenicidade destes peptídeos.

XI. CONCLUSÕES

1. O gene *gp63* é altamente polimórfico em *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de Leishmaniose Tegumentar Americana.

2. A protease GP63 mostrou-se bastante polimórfica, mas os segmentos PAVGNIPA, SRYD, HEMAH, E KAREQYGC da proteína, que possuem papel importante no estabelecimento da infecção apresentaram grande conservação.

3. Os genes codificantes para a GP63, avaliados neste estudo, encontram-se no cromossomo 10.

4. Os alelos da *gp63* avaliados não apresentam associações com formas clínicas específicas da LTA.

5. Os alelos da *gp63* avaliados distribuem-se principalmente na região norte de corte de Pedra- BA.

XII. SUMMARY

EVALUATION OF THE PROTEASE GP63 POLYMORPHISM IN A POPULATION OF *Leishmania Viannia braziliensis* causing AMERICAN TEGUMENTARY LEISHMANIASIS

Background: *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main cause of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in Brazil. In Bahia, *L. (V.) braziliensis* causes three clinical forms of leishmaniasis: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosal leishmaniasis (ML), and disseminated leishmaniasis (DL). Corte de Pedra (CP) in Bahia is an endemic area for LTA, in which we find these clinical forms. The leishmanolysin or GP63 is an important protease in *Leishmania* surface capable of hydrolyzing a variety of substrates as in the parasite as in the host. Their products are involved in adhesion and internalization of these parasites in host macrophages, and it has been linked to parasite resistance to lysis by the complement system and increase the virulence of *L. (V.) braziliensis*. **Objective:** To evaluate the polymorphism of the gene encoding glycoprotein GP63 from *L. (V.) braziliensis* in Corte de Pedra - BA, and your association to phenotypes of CL, ML, and DL of ATL. **Methods:** It is a cross-sectional study where it was described the GP63 alleles detected in ATL endemic area of Corte de Pedra, Bahia between 1997 and 2001. Isolates of *L. (V.) braziliensis* in patients with ATL were obtained for DNA extraction. The loci were amplified by PCR GP63, these DNA fragments obtained were cloned into plasmid amplification and four to ten clones isolated from *L. (V.) braziliensis* were sequenced. Based on such sequences, alleles of *loci* present in each isolate were determined. **Results:** The identification of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 35 isolates analyzed allowed us to separate the population of *L. (V.) braziliensis* according alleles of *gp63*. In total 31 alleles, all located in CHR10. Mutations were observed on nucleotide exchange resulting in mutations in regions of the protein. Seven to fifty one peptides presented exchanges positions of amino acids according to the *gp63* allele. Four highly conserved regions (PAVGNIPA, SRYD, HEMAH and KAREQYGC) were also found in the translated protein. These areas are considered important for adhesion and internalization parasite. **Conclusion:** Gp63 showed very polymorphic regions, however, the protein regions involved in the survival of the parasite are presented conserved, suggesting they might be promising targets for employment reagents immunoprophylaxis against leishmaniasis. All alleles found are from CHR10 and it was not found statistical association between the clinical forms of LTA and *gp63* alleles found in isolates from Corte de Pedra, Bahia.

Key words: 1.American Tegumentary American; 2. *Leishmania Viannia braziliensis*; 3.GP63; 4.protease; 5. polymorphism.

XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar CM, Rangel EF, Grimaldi Filho G, Momem H. Human. Canine and equine leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area in the State of Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jan-Mar; 82(1):143, 1987.

Alexander B, Young DG. Dispersal of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a Colombian focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Jul-Sep; 87(3):397-403, 1992.

Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania Mexicana* cysteine proteinase – deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol*.161:6794-801.1998.

Aliaga L, Cobo F, Mediavilla JD, Bravo J, Osuna A, Amador JM, Martín-Sánchez J, Cordero E, Navarro JM. Localized mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: clinical and microbiologic findings in 31 patients. *Medicine (Baltimore)*. May;82(3):147-58,2003.

Alvar J, Croft SL, Kaye P, Khamesipour A, Sundar S, Reed SG. Case study for a vaccine against leishmaniasis. *Vaccine*, 2013.

Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev*. Apr;21 (2):334-59, 2008.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, . Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7: e35671, 2012.

Alvarez-Valin, F., Tort, J. F. & Bernardi, G. Nonrandom spatial distribution of synonymous substitutions in the GP63 gene from *Leishmania*. *Genetics* 155, 1683–92, 2000.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*.2006.

Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*. 2008 Jan;105(1):1-9, 2007.

Antonelli, L. R.V., Dutra, W.O., Almeida, R. P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., Gollob, K. J.. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters*: 101, 226-230, 2005.

Arana, B., N. Rizzo, and A. Diaz. Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: a review. *Medical microbiology and immunology*, 190 (1-2): p. 93-5, 2001.

Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, Sampaio DP, Badaro R. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* Jul; 59 (1):53-7, 1998.

Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol.* Oct; 91(7):693-701, 1997

Asilian A, Sadeghinia A, Shariati F, Imam Jome M, Ghoddusi A. Efficacy of permethrin-impregnated uniforms in the prevention of cutaneous leishmaniasis in Iranian soldiers. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics* 28: 175, 2003.

Asthana S, Gupta PK, Chaurasia M, Dube A, Chourasia MK,. Polymeric colloidal particulate systems: intelligent tools for intracellular targeting of antileishmanial cargos, 2013.

Awasthi, A., R. K. Mathur, et al. "Immune response to Leishmania infection." *Indian J Med Res* 119(6): 238-258, 2004.

Azulay RD &Azulay Junior DR. Imune-clinical-pathologic spectrum of leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 34:303-7, 1995.

Bacellar.O, D'Oliveira Jr., A., Jeronimo, S., Carvalho, E. M. Il-10 and Il-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine:* 12, 1228-1231, 2000.

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.

Bahr V, Stierhof YD, Ilg T, DemarM, Quinten M, Overath P. Expression of lipophosphoglycan, high-molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania Mexicana*. *Mol BiochemParasitol.*58:107-21.1993.

Baptista C, Schubach AO, Madeira MF, Leal CA, Pires MQ, Oliveira S, Conceição-Silva F, Rosalino CM, Salgueiro MM, Pacheco RS. *Leishmania (Viannia) braziliensis* genotypes identified in lesions of patients with atypical or typical manifestations of tegumentary leishmaniasis: evaluation by two molecular markers. *Exp Parasitol.* Apr; 121(4):317-22, 2009.

Barbosa-Santos EG, Marzochi MC, Urtado W, Queirós F, Chicarino J, Pacheco RS. Leishmaniasis disseminated by *Leishmania braziliensis* in a mare (*Equus caballus*) immunotherapy and chemotherapy assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Apr-Jun; 89(2):217-20, 1994.

Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi G, Momem H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaró R, Barral-Neto M, Carvalho EM, & Johnson WD. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 44:536-46, 1991.

- Basano, S.A.; Camargo L.M.A. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Leishmaniose tegumentar americana*, Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, N° 3, 2004.
- Berman, J.D., Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24(4): p. 684-703, 1997.
- Berman, J., Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current opinion in infectious diseases*, 16(5): p. 397-401, 2003.
- Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;
- Bern C, Hightower AW, Chowdhury R, Ali M, Amann J, Wagatsuma Y, Haque R, Kurkjian K, Vaz LE, Begum M, Akter T, Cetre-Sossah CB, Ahluwalia IB, Dotson E, Secor WE, Breiman RF, Maguire JH. Risk factors for kala-azar in Bangladesh. *Emerg Infect Dis*. May;11 (5):655-62, 2005.
- Bertho AL, Cysne L, Coutinho SG. Flow cytometry in the study of the interaction between murine macrophages and the protozoan parasite *Leishmania amazonensis*. *J Parasitol*. Aug; 78 (4):666-71, 1992.
- Bhardwaj S, Srivastava N, Sudan R, Saha B. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol*. 2010;
- Bianchini G, Bocedi A, Ascenzi P, Gavuzzo E, Mazza F, Aschi M. Molecular dynamics simulation of *Leishmania major* surface metalloprotease GP63 (leishmanolysin). *Proteins*. Aug 1; 64 (2):385-90, 2006.
- Blackwell, J. M., Ezckowitz, R. A. B., Channon, J. Y., Sim, R. B. & Gorden, S. J. *Exp. Med.* 162, 324-31, 1985.
- Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol*. Jun;10 (6):1221-34, 2008.
- Botelho AC, Mayrink W, Oliveira RC. Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine. *Acta Trop*. 2009.
- Bouvier J, Bordier C, Vogel H, Reichelt R, Etges R. Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. *Mol Biochem Parasitol*. Dec; 37 (2):235-45, 1989.
- Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. *J Biol Chem*. 1985.

Bouvier J, Schneider P, Etges R. Leishmanolysin: surface metalloproteinase of *Leishmania*. *Methods Enzymol.* 248; 614-33, 1995.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* 155:3102-11.1995.

Brittingham, A., Chen, G., Mcgwire, B. S., Chang, K. P.& Mosser, D.M. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infection and Immunity* 67, 4477-4484.1999.

Button LL, Russell DG, Klein HL, Medina-Acosta E, Karess RE, McMaster WR. Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosomal locus and are constitutively transcribed. *Mol Biochem Parasitol.* Jan 15; 32 (2-3):271-83, 1989.

Campos-Neto A, Porrozzini R., Greeson K., Coler R., Webb J., Yasir A. W. Seiky, S. G. Grimaldi Jr. Protection against Cutaneous Leishmaniasis Induced by Recombinant Antigens in Murine and Nonhuman Primate Models of the Human Disease. *Infect. Immun.* 69(6):4103.2001.

Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden.. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta. Trop.* 56: 315-325, 1994.

Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* Sep;53 (3):273-71995.

Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta. Trop.* 56: 315-3251994.

Castellucci L, Menezes E, Oliveira J, Magalhaes A, Guimaraes LH, Lessa M, Ribeiro S, Reale J, Noronha EF, Wilson ME, Duggal P, Beaty TH, Jeronimo S, Jamieson SE, Bales A, Blackwell JM, de Jesus AR, Carvalho EM. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *J Infect Dis.* Aug 15;194(4):519-27, 2006.

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.. Familial aggregation of mucosal leishmaniasis in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 73:69-73, 2005.

Chakrabarty R., Mukherjee S., Lu H.G., Mcgwire B.S., Chang K.P., Basu M.K.: Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into

macrophages: a possible role of virulence molecules (GP63 and LPG). *J. Parasitol.* 84: 632-1996

Chang CS, Chang KP. Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *leishmania*-macrophage binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:100-4, 1986.

Chang KP, Chaudhuri G, Fong D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. *Annu Rev Microbiol*, 1990.

Chaudhuri G., Chang KP. Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 27:43-52, 1988.

Chaudhuri G., Chaudhuri M, Chang KP. Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania Mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. *J Biol Chem* 264: 7483-89. 1989.

Chavoshian O, Biari N, Badiie A, Khamesipour A, Abbasi A, Saberi Z, Jalali SA, Jaafari MR. Sphingomyelin Liposomes Containing Soluble *Leishmania* major antigens Induced Strong Th2 Immune Response in BALB/c Mice. *Iran J Basic Med Sci*; 16 (9):965-72, 2013.

Chen DQ, Kolli BK, Yadava N. Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro. *Infect Immun* 68: 80-86. 2000.

Choi CM, Lerner EA. Leishmaniasis as an emerging infection. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2001.

Collin S, Davidson R, Ritmeijer K, Keus K, Melaku Y, et al. () Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis* 38: 612–619. 2004.

Contreras I, Gómez MA, Nguyen O, Shio MT, McMaster RW, Olivier M. *Leishmania*-induced inactivation of the macrophage transcription factor AP-1 is mediated by the parasite metalloprotease GP63. *PLoS Pathog.* Oct 14; 6 (10):e1001148, 2010.

Coombs GH. Proteinases of *Leishmania Mexicana* and other flagellate protozoa. *Parasitology.* 84: 149-55. 1982.

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.. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J. Trop. Med. Hyg.* 89: 319-323, 1986.

Cuervo P, Santos AL, Alves CR, Menezes GC, Silva BA, Britto C, Fernandes O, Cupolillo E, Batista De Jesus J. Cellular localization and expression of gp63 homologous metalloproteases in *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. *Acta Trop.* Jun;106(3):143-8,2008.

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 ClinMicrobiol*, n7, v. 41, p. 3126-32. 2003.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momem H, Grimaldi G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *ParasitolToday* 16: 142-44.2000.

Da Silva RP, Hall BF, Joiner KA, Sacks DL. CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania* major metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol*;143:617–1989.

Dabirian S, Taslimi Y, Zahedifard F, Gholami E, Doustdari F, et al. () Human Neutrophil Peptide-1 (HNP-1): A New Anti-Leishmanial Drug Candidate. *PLoS Negl Trop Dis* 7(10): e 2491, 2013.

David CV. and Craft N., “Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis,” *Dermatologic Therapy*, vol. 22,no. 6, pp.491–502, 2009.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.*2009.

Davies CR, Llanos-Cuentas EA, Campos P, Monge J, Leon E, Canales J. Spraying houses in the Peruvian Andes with lambda-cyhalothrin protects residents against cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000.

De Oliveira Gomes DC, Schwedersky RP, Barbosa De-Melo LD, Da Silva Costa Souza BL, De Matos Guedes HL, Lopes UG, Rossi-Bergmann B. Peripheral expression of LACK-mRNA induced by intranasal vaccination with PCI-NEO-LACK defines the protection duration against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology.* Oct;139 (12):1562-9,2012.

Dedet JP, Melogno R, Cardenas F, Valda L, David C, Fernandez V, Torrez ME, Dimier-David L, Lyevre P, Villareal ME. Rural campaign to diagnose and treat mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Bull World Health Organ.* 1995.

Desjeux, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World Health Stat. Q.* 45: 267-75, 1992.

Desjeux P. *Leishmaniasis; Public Health Aspects and Control.* Elsevier Science Inc. 1996.

- Desjeux P. Prevention of *Leishmania donovani* infection: Vector control. 2010.
- De Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* Jun 8;3:145. 2012.
- Di Lella F, Vincenti V, Zennaro D, Afeltra A, Baldi A, Giordano D, Pasanisi E, Bacciu A, Bacciu S, Di Lella G. Mucocutaneous leishmaniasis: report of a case with massive involvement of nasal, pharyngeal and laryngeal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Sep;35 (9):870-2, 2006.
- Dietze R, Barros GB, Teixeira L, Harris J, Michelson K, Falqueto A, Corey R. Effect of eliminating seropositive canines on the transmission of visceral leishmaniasis in Brazil. *Clin Infect Dis.* Nov;25 (5):1240-2,1997.
- Duthie MS, Raman VS, Piazza FM, Reed SG. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. *Vaccine.* Jan5;30 (2):134-41,2012.
- Espinoza JR, Skinner AC, Davies CR, Llanos- Cuentas A, Arevalo J, Dye C, McMaster WR, Ajioka JW, Blackwell JM. Extensive polymorphism at the Gp63 locus in Field isolates of *Leishmania peruviana*. *MolBiochemParasitol* 72: 203-13.1995.
- Etges RJ, Bouvier J, Hoffman R, Bordier C. Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. *Mol Biochem Parasitol.* Feb;14(2):141-9. 1985.
- Etges R, BouvierJ,Bordier C. The major surface protein of *Leishmania* promastigotas is a protease. *J Biol Chem.* 261: 9098-9101.1986.
- Firooz A, Khamesipour A, Ghoorchi MH, Nassiri-Kashani M, Eskandari SE, Khatami A, Hooshmand B, Gorouhi F, Rashighi-Firoozabadi M, Dowlati Y. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. *Arch Dermatol.* 2006 Dec;142 (12):1575-9. PubMed
- Fong and Chang, 1982.
- Fong D, Chang KP. Surface antigenic change during differentiation of a parasitic protozoan, *Leishmania mexicana*: Identification by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec;79 (23):7366-70, 1982.
- Garcia MR, Graham S, Harris RA, Beverley SM, Kaye PM. Epitope cleavage by *Leishmania* endopeptidase(s) limits the efficiency of the exogenous pathway of major histocompatibility complex class I-associated antigen presentation. *Eur J Immunol.* Apr;27 (4):1005-13, 1997.

Gomez MA, Contreras I, Hallé M, Tremblay ML, McMaster RW, Olivier M. Leishmania GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. *Sci Signal*. Sep 29;2 (90): 2009.

Grimaldi Junior G., Tesh R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews*, p.230-250.1993

Guerbouj,S., Victoir,K. Guizani,I., Seridi, N., Salti-Nuwayri, Belkaid,M., Ismail,RB. Ray, D.Le & Dujardin, j. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology* 122, 25–35, 2001.

Guha R., Gupta D., Rastogi R., Rajagopal Vikram, Krishnamurthy, G. SanjivaBimal, Roy, S. and Amitabha Mukhopadhyay. Vaccination with *Leishmania* Hemoglobin Receptor–Encoding DNA Protects Against Visceral Leishmaniasis. *Sci Transl Med*, Vol.5, Issue 202, p.202,2013.

Guimarães L.H., Machado P.R.L., Lago E.L., Morgan D.J., Schriefer A., Bacellar O., Carvalho E.M. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103(7): 712–715. 2009

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. Apr;8(4):419-33, 2010.

Handman E, et al. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine*. 18(26):3011–7, 2000.

Hashemi-Fesharki R, Nasser K, Godal T, Smith PG, Modabber F. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*. Feb 5;17(5):466-72,1999.

Herwaldt, B. L., Leishmaniasis. *The Lancet*: 354, 1191-1198, 1999.

Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. *Vaccine* 24:5787-5799, 2006.

Hotez PJ, Remme JHF, Buss P, Alleyne G, Morel C, et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clinical infectious diseases* 38: 871–78, 2004;

Hotez PJ. Stigma: the stealth weapon of the NTD. *PLoS neglected tropical diseases* 2: e230, 2008.

Hsiao CH, Yao C, Storlie P, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol*. Feb;157(2):148-59. 2008

Ilg T, Harbecke D, Overath P. The lysosomal gp63-related protein in *Leishmania Mexicana* amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum. *FEBS Lett.* 327: 103-7, 1993.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, et al. The genome of the Kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-42, 2005;.

Jalouk L, Al Ahmed M, Gradoni L, Maroli M. Insecticide-treated bednets to prevent anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Aleppo Governorate, Syria: results from two trials. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Apr;101(4):360-7, 2007.

Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM. 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.* Mar;86 (3):426-33, 2012.

Junior, A.D'O., Machado, P., Bacellar, O., Cheng, L.H., Almeida, R.P., and E. M. Carvalho. Evaluation of IFN- γ e TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Trop. Med.* 35(1):7-10, 2002.

Kappagoda S, Singh U, Blackburn BG. Antiparasitic therapy. *Mayo Clin Proc.* Jun;86(6):561-83, 2011.

Kassi M, Kassi M, Afghan AK, Rehman R, Kasi PM. Marring leishmaniasis: the stigmatization and the impact of cutaneous leishmaniasis in Pakistan and Afghanistan. *PLoS Negl Trop Dis.*;2(10):e259, 2008.

Kaur T, Sobti RC, Kaur S. Cocktail of gp63 and Hsp70 induces protection against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Parasite Immunol.* Feb;33(2):95-103, 2011.

Kelleher M, Moody SF, Mirabile P, Osborn AH, Bacic A, Handman E. Lipophosphoglycan blocks attachment of *Leishmania major* amastigotes to macrophages. *Infect Immun.* Jan;63(1):43-50, 1995.

Kelly DW, Mustafa Z, Dye C. Differential application of lambda-cyhalothrin to control the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Med Vet Entomol.* Jan;11(1):13-24, 1997.

Khalil EA, El Hassan AM, Zijlstra EE, Mukhtar MM, Ghalib HW, Musa B, et al. Autoclaved *Leishmania major* vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan. *Lancet*, 2000.

Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. *Curr Med Chem.*;19 (10):1443-74, 2012.

Kzhyshkowska J, Gratchev A, Schmuttermayr C, Brundiers H, Krusell L, Mamidi S, Zhang J, Workman G, Sage EH, Anderle C, Sedlmayr P, Goerdts S. Alternatively

activated macrophages regulate extracellular levels of the hormone placental lactogen via receptor-mediated uptake and transcytosis. *J Immunol.* Mar 1;180(5):3028-37,2008.

Lainson R., Killick-Kendrick R., A. Flisser. Interações ecológicas na transmissão das leishmanioses [e Discussão] *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*1988

Lainson R, Ryan L, Shaw JJ. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987

Leon LL, Temporal RM, Soares MJ, Grimaldi Junior G. Proteinase activities during temperature-induced stage differentiation of species complexes of *Leishmania*. *Acta Trop.* 56: 289-98.1994.

Leopoldo PT, Machado PR, Almeida RP, Schriefer A, Giudice A, Jesus AR, Ho JL, Guimarães LH, Bacellar O, Carvalho E. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis in vitro cytokine production. *BMC Infectious Diseases*, 6:75, 2006.

Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Hamesipour A, Berg L, Akuffo H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol.* 2008.

Liu X, Chang KP. Extrachromosomal genetic complementation of surface metalloproteinase (gp63) – deficient *Leishmania* increases their binding to macrophages. *Proc Nat AcadSci USA.* 89: 4991-95.1992.

Macdonald MH, Morrison CJ, McMaster WR. Analysis of the active site and activation mechanism of the *Leishmania* surface metalloproteinase GP63. *BiochimBiophys Acta.* 1253: 199-07.1995.

M.S., Williams, P., 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 73, 385–387.

Ma L, Chen K, Meng Q, Liu Q, Tang P, Hu S, Yu J. An evolutionary analysis of trypanosomatid GP63 proteases. *Parasitol Res.* Oct;109 (4):1075-84, 2011.

Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G, Carvalho EM. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 21;4(12): e 912, 2010.

Machado PR, Rosa ME, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, Teixeira MM, Bacellar O, Carvalho EM. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(8):438-44, 2011.

Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 80: 859-76, 1986.

Martín-Martín I, Molina R, Jiménez M. Molecular and immunogenic properties of apyrase SP01B and D7-related SP04 recombinant salivary proteins of *Phlebotomus perniciosus* from Madrid, Spain. Biomed Res Int. 2013.

Martins VT, Chávez-Fumagalli MA, Costa LE, Canavaci AM, Lage PS, Lage DP, Duarte MC, Valadares DG, Magalhães RD, Ribeiro TG, Nagem RA, Darocha WD, Régis WC, Soto M, Coelho EA, Fernandes AP, Tavares CA. Antigenicity and protective efficacy of a *Leishmania* amastigote-specific protein, member of the superoxygenase family, against visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. 2013.

Marzochi, M.C., Marzochi, K.B.F., Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil—emerging anthrozoosis and possibilities for their control. Cadernos de Saúde Pública 10, 359–375, 1994.

Marzochi, M.C.A. Leishmanioses no Brasil—As leishmanioses tegumentares. J. Bras. Med. 63, 82–104, 1992.

Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. J Dermatol Case Rep. Jun 30;7(2):31-41, 2013.

Mathers CD, Ezzati M, Lopez AD. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. PLoS Negl Trop Dis. Nov 7;1(2):e114, 2007.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. Int J Parasitol. Apr;37 (5):565-76, 2007.

Mayrink W, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Lima AO, Michalick MS, Williams P. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg.;73 (4):385-7, 1979.

McGwire BS, Chang KP. Posttranslational regulation of a *Leishmania* HEXXH metalloprotease (gp63). The effects of site-specific mutagenesis of catalytic zinc binding N-glycosyl phosphatidylinositol addition sites on N-terminal end cleavage intracellular stability and extracellular exit. J Biol Chem. 271: 7903-09. 1996.

McGwire BS, Chang KP, Engman DM. Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surfacemetalloprotease gp63. Infect Immun 71:1008-10. 2003.

McMaster WR, Morrison CJ, MacDonald MH, Joshi PB. Mutational and functional analysis of the Leishmania surface metalloproteinase GP63: similarities to matrix metalloproteinases. *Parasitology*;108 Suppl:S29-36, 1994.

Medina-Acosta E, Beverley SM, Russell DG. Evolution and expression of the Leishmania surface proteinase (gp63) gene locus. *Infect Agents Dis.* Feb;2(1):25-34,1993.

Medina-Acosta E, Karess RE, Schwartz H, Russell DG. The promastigote surface protease (gp63) of Leishmania is expressed but differentially processed and localized in the amastigote stage. *Mol Biochem Parasitol*37 :263-73.1989.

Melby PC, Yang J, Zhao W, Perez LE, Cheng J. Leishmania donovani p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun.* ug;69 (8):4719-25,2001.

Miller RA, Reed SG, Parsons M. Leishmania gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence. *Mol Biochem Parasitol*Mar;39(2):267-74. 1990.

Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de saúde. Manual do Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5^o edição. Brasília, 2007

Momeni AZ, Jalayer T, Emamjomeh M, Khamesipour A, Zicker F, Ghassemi RL, Dowlati Y, Sharifi I, Aminjavaheri M, Shafiei A, Alimohammadian MH, Hashemi-Fesharki R, Nasseri K, Godal T, Smith PG, Modabber F. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed L. major vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine.* Feb 5;17 (5):466-72,1999.

Moreno J, Vouldoukis I, Martin V, McGahie D, Cuisinier AM, Gueguen S. Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* Dec;8 (12):958-69,2008.

Mosser DM, Vlassara H, Edelson PJ, Cerami A. Leishmania promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med.* Jan 1;165 (1):140-5,1987.

Mosser DM, Edelson PJ. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of Leishmania promastigotes. *J Immunol* 135: 2785-89.1985.

Mottram JC, Souza AE, Hutchison JE, Carter R, Frame MJ, Coombs GH. Evidence from disruption of the *Imepb* gene array os *Leishmania Mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Nat AcadSci USA* 93:6008-13.1996.

Mukherjee S, Ghosh C, Basu MK. *Leishmania donovani*: role of microviscosity of macrophage membrane in the process of parasite attachment and internalization. *Exp Parasitol*. Jun;66(1):18-26, 1988.

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.

Nery Costa HC, Nery Costa HC, Tapety CMM, Werneck G. () Controle da leishmaniose visceral em meio urbano: estudo de intervenção randomizado fatorial. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40: 415–419,2007.

Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, Tanner M, Nasser K, Modabber F, et al. Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis. *Vaccine* 27:4747-4753, 2009;.

North MJ, Coombs GH. Proteinases of *Leishmania Mexicana* amastigotes and promastigotas: analysis by gel electrophoresis. *MolBiochemParasitol*. 3: 293-00.1981.

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

Olivier M, Gregory DJ, Forget G. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev*. Apr;18(2):293-305,2005.

Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect*. 2012.

OMS.Organização Mundial de Saúde . Control of leishmaniasis .Report of a WHO Expert Committe.WHO technical report series, nº 793. (WHO) World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland,1990.

OMS.Organização Mundial de Saúde. Leishmaniasis: the vector. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland,2011.

OMS.Organização Mundial de Saúde. Standards for cutaneous leishmaniasis clinical trials published, World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 2013.

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

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

Pandey S, Chakraborti P, Sharma R, Bandyopadhyay S, Sarkar D, Adhya S. Involvement of *Leishmania donovani* major surface glycoprotein gp63 in promastigote multiplication. *J Biosci. Mar*;29(1):15-22,2004.

Palatnik-de-Sousa CB. Vaccines for canine leishmaniasis. *Front Immunol. Apr* 17;3:69. doi: 10.3389/fimmu.2012.

Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrow-smith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 39,839–847 2007.

Picado A, Das ML, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Roy L, Rijal S, Das P, Rowland M, Sundar S, Coosemans M, Boelaert M, Davies CR. Effect of village-wide use of long-lasting insecticidal nets on visceral leishmaniasis vectors in India and Nepal: a cluster randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e587,2010.

Puentes, F., Guzman, F., Marin, V., Alonso, C., Patarroyo, M. E. & Moreno, A. *Leishmania*: fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. *Experimental Parasitology* 93, 7–22.1999.

Pupkis MF, Coombs GH. Purification and characterization of proteolytic enzymes of *Leishmania mexicanamexicana* amastigotes and promastigotes. *J Gen Microbiol.* 130:2375-83.1984.

Queiroz A., Sousa R., Heine C., Cardoso M., Guimarães L.H., Machado P.R.L., 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.*50(12):4028. 2012

Quinnell RJ, Courtenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. *Parasitology.* Dec;136(14):1915-34,2009.

Quispe Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis.* Mar 15;189(6):1035-43. 2004.

Rezvan, H. Immunogenicity of HLA-DR1 Restricted Peptides Derived from *Leishmania major* gp63 Using FVB/N-DR1 Transgenic Mouse Model. *Iranian J Parasitol*: Vol. 8, No.2, pp.273-279, 2013.

Riox J, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 65:111-25. 1990.

Ritmeijer K, Davies C, van Zorge R, Wang SJ, Schorscher J, Dongu'du SI, Davidson RN. Evaluation of a mass distribution programme for fine-mesh impregnated bednets against visceral leishmaniasis in eastern Sudan. *Trop Med Int Health*. Mar;12(3):404-14, 2007.

Roberts SC, Swihart KG, Agey MW. Sequence diversity and organization of the msp gene family encoding gp63 of *Leishmania chagasi*. *Mol Biochem Parasitol* 62:157-71. 1993.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Cupolillo E, Bentin Toaldo C, Macêdo VO, Fernandes O. Sensitivity of the polymerase chain reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) guyanensis*. *Acta Trop*. 2001 Jun 22;79 (3):225-9.

Rosenthal LA, Sutterwala FS, Kehrl ME, Mosser DM. *Leishmania major*-human macrophage interactions: cooperation between Mac-1 (CD11b/CD18) and complement receptor type 1 (CD35) in promastigote adhesion. *Infect Immun*. Jun;64 (6):2206-15, 1996.

Rosenthal PJ. Proteases of protozoan parasites. *Adv Parasitol*, 43:105-59. 1999.

Russell DG, Talamas-Rohana P, Zelechowski J. Antibodies raised against synthetic peptides from the Arg-Gly-Asp-containing region of the *Leishmania* surface protein gp63 cross-react with human C3 and interfere with gp63-mediated binding to macrophages. *Infect Immun*. Feb;57(2):630-2, 1989.

Russell DG, Talamas-Rohana P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. *Immunol Today*. Oct;10(10):328-33, 1989.

Russel DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol* 136: 2613-20. 1986.

Sádlová J, Volf P, Victoir K, Dujardin JC, Votýpka J. Virulent and attenuated lines of *Leishmania major*: DNA karyotypes and differences in metalloproteinase GP63. *Folia Parasitol (Praha)*. Jun;53 (2):81-90, 2006.

Sajid M, McKerrow JH. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*. Mar;120 (1):1-21, 2002.

Saljoughian, N., et al., Development of Novel Prime-Boost Strategies Based on a Tri-Gene Fusion Recombinant *L. tarentolae* Vaccine against Experimental Murine Visceral Leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Vol.3.2013.

Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Fukutani K, Clarencio J, Soto M, Espuelas S, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, de Oliveira CI. Towards development of novel immunization strategies against leishmaniasis using PLGA nanoparticles loaded with kinetoplastid membrane protein-11. *Int J Nanomedicine*.;7:2115-27,2012.

Santos DM, Carneiro MW, de Moura TR, Soto M, Luz NF, Prates DB, Irache JM, Brodskyn C, Barral A, Barral-Netto M, Espuelas S, Borges VM, de Oliveira CI. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine*. Oct;9(7):985-95.2013.

Santos JB, de Jesus AR, Machado PR, Magalhães A, Salgado K, Carvalho EM, Almeida RP. Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Infect Dis*. Nov 15;190(10):1793-6, 2004.

Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia Az, Escorcía B, McMahon-Pratt D. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania Viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 59: 86-94, 2002.

Saravia N.G., Segura I., Holguin A.F., Santrich C., Valderrama L., Ocampo C. Epidemiologic, Genetic, and Clinical Association among Phenotypically Distinct Populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59(1), pp. 86–94. 1998.

Schlagenhauf, E., Eiges, R. & Metcalf, P. The crystal structure of the *Leishmania* major surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure* 6,1035–1046.1998.

Schriefer A, Guimarães LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, Ritt G, Góes-Neto A, Schriefer AL, Riley LW, Carvalho EM. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009.

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

Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. Oct;21,2008.

Sharifi I, FeKri AR, Aflatonian MR, Khamesipour A, Nadim A, Mousavi MR, Momeni AZ, Dowlati Y, Godal T, Zicker F, Smith PG, Modabber F. Randomised vaccine trial of single dose of killed *Leishmania major* plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran. *Lancet*. May 23;351(9115):1540-3,1998.

Silveira F.T, Lainson R., Corbett C.E.P. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *MemInst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 99(3): 239-251, May 2004.

Simpson, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:363-382. 1987.

Soteriadou KP, Remoundos MS, Katsikas MC, Tzinia AK, Tsikaris V, Sakarellos C, Tzartos SJ. The Ser-Arg-Tyr-Asp region of the major surface glycoprotein of *Leishmania* mimics the Arg-Gly-Asp-Ser cell attachment region of fibronectin. *J Biol Chem*. Jul 15;267(20):13980-5,1992.

Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea I, Parra R, Ardiles J, Soto P, Gomez A, Molleda F, Fuentelsaz C, Anders G, Sindermann H, Engel J, Berman J. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis*. 2007 Feb 1;44(3):350-6. Epub Dec 27. PubMed PMID: 17205440,2006.

Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Valda L, Ardiles J, Berman J. Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*. Sep;81(3):387-9, 2009.

Souza V, Juliaõ F, Neves R, Magalhaães P, Bisinotto T, et al. () Community Assay for Assessment of Effectiveness of Strategies for Prevention and Control of Human Visceral Leishmaniasis in The Municipality of Feira de Santana, State of Bahia, Brazil. *Epidemiol Serv Sau´de, Brası´lia* 17: 97–106,2008.

Steinkraus HB, Greer JM, Stephenson DC, Langer PJ. Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the *Leishmania guyanensis* gp63 genes. *Mol Biochem Parasitol*. Dec;62(2):173-85, 1993.

Stockdale L, Newton R. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 20;7(6):e2278.2013

Steinkraus, H. B., Greer, J.M., Stephenson, D. C. & Langer, P. J. Sequence heterogeneity and polymorphic gene arrangements of the *Leishmania guyanensis* gp63 genes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 62, 173–185.1993.

Streit JA, Donelson JE, Agey MW, Wilson ME. Developmental changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock protein in a human macrophage cell line. *Infect Immun*. May;64(5):1810-8,1996.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 28;347(22):1739-46, 2002.

Talamás-Rohana P, Wright SD, Lennartz MR, Russell DG. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol*. Jun 15;144(12):4817-24,1990.

Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, Soteriadou K. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect*. May;8(6):1455-63, 2006.

Turetz M.L., Machado P.R., Ko A.I., Alves F., Bittencourt A., Almeida R.P., Mobashery N., Johnson Junior W.D, Carvalho E. M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, 186:1829–34. 2002.

Van Strijp JA, Russell DG, Tuomanen E, Brown EJ, Wright SD. Ligand specificity of purified complement receptor type three (CD11b/CD18, alpha m beta 2, Mac-1. Indirect effects of an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence. *J Immunol*. Sep 15;151(6):3324-36,1993.

Viana,A.G., Fraga, C. A. C.; Domingos, P. L .B., Paula, A. M. B.; Mayrink, W., Silva, L. M., Bonan, P. R. F., Botelho, A. C. C. Histopathological and immunohistochemical aspects of American Cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *An Bras dermatol*.88:32-40, 2013.

Victoir K, Dujardin JC. How to succeed in parasitic life without sex? Asking *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2002.

Victoir K., Dujardini J. C De Doncker S., Barker D. C., Arevalo J., Hamersaand R Rayi D. Le. Plasticity of gp63 gene organization in *Leishmania* (Viannid) *braziliensis* and *Leishmania* (Viannid) *peruviana*. *InstituutvoorTropische Geneeskunde*. 1995.

Victoir K, Arevalo J, De Doncker S, Barker DC, Laurent T, Godfroid E, Bollen A, Le Ray D, Dujardin JC. Complexity of the major surface protease (msp) gene organization in *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*: evolutionary and functional implications. *Parasitology*. Aug;131 (Pt 2):207-14,2005.

Walker J, Acestor N, Gongora R, Quadroni M, Segura I, Fasel N, Saravia NG. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. *Mol Biochem Parasitol*. Feb;145(2):254-64.2006.

Walton BC, Chinel LV, Eguia y Eguia O. Onset of espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 1973.

Webb JR, Button LL, McMaster WR. Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*;48:173–84.1991.

Weirather JL, Jeronimo SM, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schriefer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial quantitative PCR assay for detection, species discrimination, and quantification of *Leishmania* spp. in human samples. *J Clin Microbiol*. Nov;49(11):3892-904, 2011.

Wilson ME, Pearson RD. Evidence that *Leishmania donovani* utilizes a mannose receptor on human mononuclear phagocytes to establish intracellular parasitism. *J Immunol*. Jun 15;136(12):4681-8,1986.

Wylter DJ, Sypek JP, McDonald JA. In vitro parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: possible role of fibronectin in parasite attachment. *Infect Immun*. 1985.

Yao, C., Donelson, J. & Wilson, M. The major surface protease (MSP or gp63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and Biochemical parasitology* 132, 1–16. 2003.

Zijlstra EE, el-Hassan AM, Ismael A. Endemic kala-azar in eastern Sudan: post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995.

Anexos

XIV. Anexo 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

Nome do paciente:

Investigador Principal: Albert Schriefer, médico, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia.

Nº do Projeto:

Convite e Objetivo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Assinatura ou impressão do participante /Data

Assinatura ou impressão do responsável* / Data Nome do responsável*

Assinatura ou impressão da testemunha / Data Nome da testemunha

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

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

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

Assinatura do investigador

Anexo 2

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