



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**Pollyana Leite Primo de Carvalho**

**AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DO  
PROTEOFOSFOGLICANO NUMA POPULAÇÃO NATURAL  
DE *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2016**

Universidade Federal da Bahia  
Sistema de Bibliotecas  
Bibliotheca Gonçalo Moniz – Memória da Saúde Brasileira

C331 Carvalho, Pollyana Leite Primo de.  
Avaliação do polimorfismo gênico do proteofosfoglicano numa população natural de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Pollyana Leite Primo de Carvalho. – 2016.

93 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Nicolaus Albert Borges Schriefer.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui anexo.

1. Leishmaniose. 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*. I. Schriefer, Nicolaus Albert Borges. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina 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 GÊNICO DO  
PROTEOFOSFOGLICANO NUMA POPULAÇÃO NATURAL  
DE *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Pollyana Leite Primo de Carvalho**

**Professor - orientador: Nicolaus Albert Borges Schriefer**

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

**Salvador (Bahia), 2016**

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Membros Titulares:**

- Dr. Adriano Figueiredo Monte Alegre, Professor Adjunto do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.
- Dra. Léa Cristina de Carvalho Castellucci, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

### **Membro Suplente:**

- Dr. Nicolaus Albert B. Shriefer, Professor do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e associado do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Quando abro a porta de uma nova descoberta  
já encontro Deus lá dentro.

*Albert Einstein*

Dedico aos meus filhos João e Flora e ao  
meu marido Florêncio Oliveira, cujos  
amores me propiciam equilíbrio d'alma.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina
- Complexo do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (COM-HUPES)

Serviço de Imunologia (SIM) – Laboratório de Epidemiologia Molecular  
(EPIMOL)

Posto de Saúde de Corte de Pedra – Centro de Referência em Leishmaniose  
Dr.Jackson Mauricio Lopes Costa

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT)



## AGRADECIMENTOS

À Jeová Deus, que me deu a vida, sabedoria e entendimento necessários para a realização deste trabalho, além também, de ter me dado paz mental, nos momentos de aflição.

Ao Dr. Albert Schriefer pela oportunidade proporcionada, pela confiança depositada, pela sua sapiência e disponibilidade em ensinar. Quero registrar também minha admiração pela sua postura ética e dizer que me sinto lisonjeada de ter sido sua orientanda. Muito obrigada professor!

Ao Dr. Edgar Carvalho e Dr. Paulo Machado, meus agradecimentos por terem permitido e viabilizado a realização deste trabalho.

Aos professores e todos colaboradores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), pela oportunidade ímpar de fazer parte deste corpo discente.

A toda equipe da área endêmica de Corte de Pedra, que me deu suporte para realização da pesquisa científica.

As colegas doutorandas da equipe de epidemiologia molecular, Juliana Almeida, Lilian Medina, Silvana Conceição e Viviane Magalhães, por me darem apoio nesses dois anos e meio, pelos conhecimentos compartilhados, pela união e amizade que construímos.

As colegas do laboratório Dra. Ângela Giudice, Tais Dellavechia, e todos os colaboradores do SIM/HUPES, que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Foi muito bom conviver com vocês.

Aos meus pais, José Renato e Jancy Maria, e aos meus irmãos, Renatinho, Emanoela, Priscila e Ciça. Essa conquista é nossa, conseguimos!

Ao meu marido, pela ajuda e apoio, aos meus filhos, me perdoem pelas ausências, amo vocês!

A todos que colaboraram para execução deste trabalho.

# ÍNDICE

Índice de figuras	11
Índice de tabelas	14
Lista de abreviaturas	15
<b>I.Resumo</b>	<b>18</b>
<b>II.Objetivos</b>	<b>19</b>
Geral	19
Específicos	19
<b>III.Introdução</b>	<b>20</b>
<b>IV.Fundamentação teórica</b>	<b>23</b>
IV.1 Epidemiologia da leishmaniose	23
IV.2.Vetor, agente etiológico e ciclo biológico	25
IV.3.Aspectos clínicos da leishmaniose	27
IV.4.Aspectos imunológicos da leishmaniose	28
IV.5. Tratamento e imunoproteção	30
IV.6. A glicoproteína PPG	35
<b>V.Hipótese</b>	<b>40</b>
<b>VI.Justificativa</b>	<b>41</b>
<b>VII.Meterial e métodos</b>	<b>42</b>
VII.1.Desenho do estudo	42
VII.2.Área do estudo	42
VII.3.População e amostra do estudo	43
VII.4.Definição de casos	44
VII.5.Critérios de inclusão e não inclusão	44
VII.6.Aspectos éticos da pesquisa	44
VII.7.Obtenção dos isolados parasitários de <i>L.(V.)braziliensis</i>	45
VII.8.Obtenção do DNA genômico de <i>L.(V.)braziliensis</i>	45

	10
VII.9.Determinação da espécie de <i>Leishmania</i> por PCR em tempo real	46
VII.10.Amplificação por PCR dos alelos do PPG de isolados de <i>L.(V.) braziliensis</i>	46
VII.11.Clonagem dos amplicons do PPG e identificação de plasmídeos recombinantes	48
VII.12.Sequenciamento dos fragmentos do PPG clonados	51
VII.13.Distribuição geográfica dos casos de LTA e alelos do PPG em Corte de Pedra/BA	51
VII.14.Análise estatística	52
<b>VIII.Resultados</b>	<b>53</b>
VIII.1.Avaliação do polimorfismo entre os fragmentos estudados dos genes PPG 3 e PPG 4, e suas sequências de aminoácidos traduzidos em isolados de <i>L. (V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra/BA.	53
VIII.2.Comparação entre as sequências dos genes e peptídeos traduzidos dos fragmentos de PPG 3 e PPG 4 encontrados na <i>L.(V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra/BA e aquelas obtidas de outras espécies de <i>Leishmania</i> depositadas no Genbank.	59
VIII.3. Identificação dos cromossomos em que os <i>loci</i> do PPG 3 e 4 de <i>L.(V.) braziliensis</i> estão localizados.	63
VIII.4. Associação entre alelos do PPG 3 e PPG 4 e forma clínica da LTA causada pela <i>L.(V.) braziliensis</i> em Corte de Pedra/BA.	63
VIII.5. Análise da distribuição geográfica dos alelos do PPG 3 e 4 de <i>L. (V.) braziliensis</i> em Corte de Pedra/BA.	65
<b>XIX.Discussão</b>	<b>69</b>
<b>X.Perspectiva de estudo</b>	<b>74</b>
<b>XI.Conclusões</b>	<b>75</b>
<b>XII.Sumary</b>	<b>76</b>
<b>XIII.Referências bibliográficas</b>	<b>77</b>
<b>XIV.Anexo</b>	<b>90</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura I.** Arquitetura dos domínios da proteína PPG 3 de *L.(V.) braziliensis*. Em cinza domínio APSSS, em amarelo domínio LRR, em verde claro nas extremidades LRR NT e LRR CT, em verde escuro ao centro, região insular.

**Figura II.** Mapa da área endêmica de Corte de Pedra/BA, apresentada em verde.

**Figura 3.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos alelos A e B da PPG3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 1605 há polimorfismo com troca da base adenina por timina em parte dos isolados, configurando alelos distintos. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos nucleotídeos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-22) indica o LTCP seguido da forma clínica (C, (LC); D, (LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 4.** Alinhamento das sequências de aminoácidos dos alelos A e B da PPG3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 535 de ambos os alelos pode ser encontrado uma Isoleucina indicando polimorfismo silencioso. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos aminoácidos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-22) indica o LTCP seguido da forma clínica (C, (LC); D, (LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 5.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos alelos A e B da PPG4/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 286 há polimorfismo com troca da base adenina por guanina em parte dos isolados, configurando alelos distintos. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos nucleotídeos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-14) indica o LTCP seguido da forma clínica (C, (LC); D,(LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 6.** Alinhamento das sequências de aminoácidos dos alelos da A e B da PPG 4/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 96 de ambos os alelos, há polimorfismo com troca do aminoácido treonina por alanina em parte dos isolados, configurando alelos distintos. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos aminoácidos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-14) indica o LTCP

seguido da forma clínica (C, (LC); D,(LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 7.** Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos alelos da PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 178 há um único polimorfismo com troca da base citosina por timina em um único isolado, o que é sugestivo da existência ou predominância de apenas um alelo na região de CP. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos nucleotídeos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-9) indica o LTCP seguido da forma clínica (D,(LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 8.** Alinhamento das sequências de aminoácidos dos alelos da PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA. Na posição 60 há indicação de único polimorfismo com troca de aminoácidos cisteína por arginina. Os asteriscos (\*) indicam a similaridade dos aminoácidos configurando a conservação dos alelos. A primeira coluna (linhas 1-9) indica o LTCP seguido da forma clínica (D,(LD) e M, (LM)) do paciente do qual se obteve o isolado parasitário.

**Figura 9.** Vista satélite da distribuição espacial dos diferentes alelos do PPG 3/LRR de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA em Corte de Pedra/BA. (A) Os pontos em vermelho indicam a distribuição geográfica dos alelos A na área endêmica de CP. (B) Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos B na área endêmica de CP. (C) Os pontos vermelho e preto indicam as distribuições geográficas dos alelos A e B na área endêmica de CP, além de sobreposições entre os alelos em pontos da área endêmica de CP. A Linha vertical divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.

**Figura 10.** Vista satélite da distribuição espacial dos diferentes alelos do PPG 4/LRR de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra/BA. (A) Os pontos em vermelho indicam a distribuição geográfica dos alelos A, na área endêmica de CP.(B) Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos B na área endêmica de CP. (C) Os pontos vermelho e preto indicam as distribuições geográficas dos alelos A e B na área endêmica de CP, além de sobreposições entre os alelos em pontos da área endêmica de CP. A Linha vertical

divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.

**Figura 11.** Vista satélite da distribuição espacial do unico alelo identificado do PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA em Corte de Pedra/BA. Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos na área endêmica de CP. A Linha vertical divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1.** Grau de conservação do PPG 3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania* sp.

**Tabela 2.** Grau de conservação do PPG 4/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania* sp.

**Tabela 3.** Grau de conservação do PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania*.

**Tabela 4.** Associação dos alelos (A e B) do PPG3/LRR entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LC, LD e LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

**Tabela 5.** Associação dos alelos (A e B) do PPG4/LRR entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LC, LD e LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

**Tabela 6.** Associação dos alelos do PPG3/APSSS entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LD x LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIDS:** Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (em inglês “Acquired Immunodeficiency Syndrome”)

**APSSS:** Repetições de Serinas, Prolinas e Alaninas (em inglês “Repeats of serine , proline and alanine”)

**CEP:** Comitê de Ética em Pesquisa

**CHR:** Cromossomo

**CONEP:** Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

**CP:** Corte de Pedra

**DALYs:** Anos de vida ajustados por deficiência ou morte precoce (em inglês “Disability Adjusted Life Years”)

**DCs:** Células dendríticas

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**dNTP:** Dinucleotídeos tri fosfatos

**GPI:** Glicofosfatidilinositol

**GPS:** Sistema de Posicionamento Global (em inglês “Global Positioning System”)

**HIV:** Virus da Imunodeficiência Humana (em inglês “Human immunodeficiency vírus”)

**IFN-  $\gamma$ :** Interferon gama

**IL-12:** Interleucina 12

**IL-10:** Interleucina 10

**IR:** Região insular (em inglês “Island Region”)

**kDNA:** Ácido desoxirribonucléico de cinetoplasto

**KA:** Calazar



**LC:** Leishmaniose cutânea (mesmo que leishmaniose cutânea localizada)

**LCD:** Leishmaniose cutânea difusa

**LD:** Leishmaniose disseminada

**LIT:** Meio de cultura Luria Bertani (em inglês “Liver Infusion Triptose”)

**LM:** Leishmaniose mucosa

**LTA:** Leishmaniose Tegumentar Americana

**LRR:** Repetições Ricas em Leucina (em inglês “Leucine-rich repeats”)

**LV:** Leishmaniose Visceral

**MCO:** Maternidade Climério de Oliveira

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**MS:** Ministério da Saúde

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**ng:** Nanograma

**NNN:** Meio de cultura Mc Neal, Novy e Nicolle

**NO :** Óxido Nítrico (em inglês “nitric oxide”)

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PCR:** Reação em cadeia pela polimerase (em inglês “Polymerase Chain Reaction”)

**PPG:** Proteofosfoglicano (em inglês “Proteophosphoglycan”)

**PSG:** Gel Secretado por Promastigotas (em inglês “Promastigote secreted gel”)

**qPCR:** Reação em cadeia pela polimerase em tempo real, quantitativa

**SC:** Infecção subclínica

**sp. :** Espécies

**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 auxiliar do tipo 1

**Th2:** Linfócito T auxiliar do tipo 2

**TLR2:** Receptor Toll like (em inglês “Toll like receptor”)

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral (em inglês “Tumor necrosis fator”)

**$\mu$ L:** Microlitro

## I. RESUMO

### AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO GÊNICO DO PROTEOFOSFOGLICANO NUMA POPULAÇÃO NATURAL DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*

**Introdução:** A *Leishmania (viannia) braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar americana (LTA). As leishmanioses são causa de doenças com desfechos desfigurantes, muitas vezes fatais. As formas clínicas mais frequentemente causadas pela *L.(V.) braziliensis* são: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD). O Proteophosphoglicano (PPG) é uma glicoproteína de superfície da *Leishmania* spp., que tem sido descrito como um componente importante na transmissão e subsequente invasão da célula hospedeira, os macrófagos. **Objetivo:** Avaliar o polimorfismo do gene codificador da porção protéica do PPG em parasitas de uma população natural de *L.(V.) braziliensis*, causadora de leishmaniose tegumentar americana (LTA). **Métodos:** Foram descritos alelos do PPG detectados na área endêmica para LTA, em Corte de Pedra, Bahia. Vinte e quatro isolados de *L. (V.) braziliensis* provenientes de pacientes com LTA foram obtidos para extração de DNA. Fragmentos de aproximadamente 400 pares de base nos loci das PPG 3 e 4 foram amplificadas por PCR, clonados em plasmídeo (PCR II Invitrogen Inc.) e sequenciados pelo método de Sanger. Os alelos foram alinhados utilizando como referência sequências da PPG depositadas no banco de dados Genbank. Com base em tais sequências, foram determinados os haplótipos de polimorfismos, ou seja, os alelos nos loci do PPG presentes em cada isolado. **Resultados:** Embora tenham sido encontradas posições polimórficas, em geral as sequências avaliadas apresentaram-se altamente conservadas nos genes do PPG comparados, com ampla distribuição geográfica espacial dos alelos na área endêmica em Corte de Pedra. Não encontramos associações significativas entre alelos da PPG e formas clínicas da doença, devido ao papel do PPG mais atuante no início da infecção do que no tropismo dérmico da LTA. **Conclusão:** O gene PPG apresenta-se altamente conservado na *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra, Bahia, e em comparação com outras espécies, o que sugere que ele possa ser empregado de forma ampla como uma subunidade em reagentes que visem bloquear a transmissão do parasito ao hospedeiro.

**Palavras-chave:** 1. *Leishmania* spp.; 2. Leishmaniose Tegumentar Americana; 3. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 4. Proteofosfoglicano; 5. Polimorfismo.

## II. OBJETIVOS

### Geral

Avaliar o polimorfismo e conservação do gene codificador da porção protéica do proteofosfoglicano (PPG) em parasitas de uma população natural de *Leishmania (V.) braziliensis* causadora de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

### Específicos

- 1 Avaliar a conservação dos genes PPG 3 e PPG 4 em Isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA.
- 2 Comparar a conservação entre os alelos do PPG 3 e PPG 4 de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, com as sequências obtidas de outras espécies de *Leishmania* sp.
- 3 Avaliar a associação entre alelos do PPG 3 e PPG 4 e forma clínica da LTA causada pela *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA.
- 4 Analisar a distribuição geográfica dos alelos do PPG 3 e PPG 4 de *L.(V.)braziliensis* em Corte de Pedra /BA.

### III. INTRODUÇÃO

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças infecciosas com amplo espectro de expressão clínica e epidemiológica, de severas manifestações que vão desde lesões cutâneas ulcerativas a inflamações destrutivas das mucosas e infecções viscerais (Desjeux, P. et al, 2001-2004; Herwaldt BL., 1999). São causadas por parasitas protozoários endêmicos em áreas tropicais e subtropicais do globo (WHO, 2000). A *Leishmania* spp. é transmitida pela picada de vetores dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, tanto em animais, quanto em seres humanos (Carvalho EM et al, 1985; Marsden PD et al, 1998). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar americana (LTA). Estimativas indicam que 1,5 a 2 milhões de pessoas desenvolvam a doença a cada ano e que existam 12 milhões de pessoas infectadas no mundo todo (Cox FEG, 1993; Desjeux P. et al, 2004; Gilles HM, 1999). As leishmanioses são doenças com desfechos que podem ser desfigurantes ou fatais (Desjeux, P. et al, 1996).

As distintas formas clínicas dessa doença estão associadas com as diferentes espécies do parasita existentes nas Américas. A *L.(V.) braziliensis* é a principal espécie causadora de LTA no Brasil (Marzochi, 1992). A evolução clínica da leishmaniose causada pela *L.(V.) braziliensis* parece estar relacionada a fatores genéticos dos parasitas e dos hospedeiros (Cabello PH et al, 1995; Ibrahim ME et al, 1999; Zijlstra EE et al, 1994; Peacock C. et al, 2001). As formas clínicas mais frequentemente causadas pela *L.(V.) braziliensis* são leishmaniose cutânea (LC; mesmo que cutânea localizada), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) (Marzochi, 1992). A LC caracteriza-se pela expressão de uma única ou poucas úlceras na pele. A LD apresenta várias lesões, ulceradas ou não, espalhadas por todo o corpo. A LM afeta as mucosas

oral e nasofaríngea (Azulay RD et al, 1995; Bacellar O et al, 2002; Carvalho EM et al, 1994; Costa JM et al, 1986; Turetz ML et al, 2002).

O tratamento que é usual para os pacientes, atualmente, não oferece total segurança em relação à cura. Os medicamentos são de difícil administração, e são usados por longos períodos para se alcançar algum efeito de melhora clínica (Sundar, S. et al, 2002). O medicamento de primeira linha, atualmente recomendado pelo ministério da saúde, é o antimonial pentavalente (Brasil, MS 2007), podendo ser substituído pela pentamidina e anfotericina B (Berman, J.D., 1997; Brasil, MS 2007). Entretanto, essas drogas têm apresentado falhas em relação ao efeito terapêutico desejado (Oliveira-Neto MP et al, 1996-1997; Navin TR et al, 1992; Arana BA et al, 1994; Soto J. et al, 1994-1998). Este quadro reforça a necessidade de imunoprofilaxia contra a leishmaniose.

O Proteofosfoglicano (PPG) é uma importante glicoproteína produzida e secretada por espécies de *Leishmania* sp. (Gopfert, U. et al, 1999; Ilg. T., 2000; Kavooosi. G., et al 2008; Klein, C., et al, 1999; Montgomery, J., et al 2002; Samant, M., 2007). O PPG é expresso tanto em amastigotas quanto em promastigotas, podendo apresentar-se nas formas secretada ou ancorada por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) à superfície do parasita (Montgomery et al, 2002, Ilg T. et al, 1995). A molécula é formada por um esqueleto protéico com estruturas filamentosas (Stierhof. YD., et al, 1999), sendo detectada na superfície das amastigotas e em pequenas vesículas internas dos macrófagos infectados (Alexander J et al, 1975; Antoine J.C., et al, 1987-1990; Prina E et al, 1990; Russell DG et al 1992; Lang T. et al, 1994). O PPG exibe uma variedade de atividades biológicas, que podem ser importantes para sobrevivência do parasita no vetor flebotomíneo e no hospedeiro mamífero (Sacks, DL., 1994).

O PPG possui dois domínios distintos. Um domínio é constituído de repetições ricas em leucina (LRR), que estão envolvidas em interações proteína-proteína e

transdução de sinal (Girardin SE et al, 2002; Kobe B et al, 1995; Kedzierski. L., et al, 2004, Montgomery, J. et al. 2000 - 2002). O outro domínio é formado por uma cadeia de aminoácidos repetitivos, rica em serina, alanina e prolina (APSSS) (Ilg. T., et al., 1999). A maior parte dos resíduos de serina da molécula é glicosilada através de ligações fosfo-diéster. A promastigota da *Leishmania* sp. secreta um gel denominado “gel secretado por promastigotas” (PSG). Isto ocorre no intestino e aparelho bucal do vetor, e durante a hematofagia, ambos, os parasitas e gel são co-transmitidos num ato de regurgitação e a *Leishmania* se adapta ativamente a seus hospedeiros através da eficiência com a qual parasitas interagem com o gel que é rico em açúcares descritos como responsáveis por desempenhar importante papel na ligação aos macrófagos, facilitando a infectividade do parasita (Montgomery, J. et al. 2002; Rogers. M., et al, 2012).

Os PPGs são mediadores de interações e atividades biológicas que inibem a expressão de citocinas imunoregulatórias (Pianini. A., et al, 1999). São expressos com domínios altamente conservados entre algumas espécies (Montgomery, J. et al, 2002; Peacock. C., et al, 2007), e ligam-se aos macrófagos através de receptores específicos (Talamas P. et al, 1989). Estudos com o genoma de algumas espécies da *Leishmania* sp. revelaram um alto grau de conservação dos genes e mostraram que alguns genes que estão diretamente envolvidos com a captação, ligação e internalização de parasitas, promoveram uma atividade inibitória dos peptídeos da superfície celular humana, indicando que os domínios conservados das moléculas contribuem de forma eficaz para busca de alternativas para concepção de vacinas de subunidades contra a leishmaniose (Peacock C. et al, 2007; Puentes et al, 1999).

Estudos que mapeiem porções conservadas das PPGs em *L.(V.) braziliensis*, provenientes de áreas endêmicas são necessários, pois tal conhecimento poderá direcionar o desenvolvimento de reagentes que utilizem imunógenos do parasito na imunoprofilaxia contra LTA, causadora de leishmaniose.

## IV. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### IV.1 Epidemiologia da leishmaniose

As Leishmanioses são doenças de manifestação espectral, causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* sp., membros da família Trypanosomatidae, que são caracterizados por possuírem organismos unicelulares flagelados. São doenças negligenciadas, relacionadas à pobreza, com ocorrências em regiões tropicais e subtropicais do globo (Ashford RW, 1996-1997; BJ Cref et al, 1987; Desjeux P et al, 1996 - 2004; Herwaldt BL, 1999; WHO, 1990). A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) ocorre em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro de 1,6 milhões de casos novos por ano, distribuídos em 88 países (WHO, 2010). A *L.(V.) braziliensis* é o agente etiológico predominante, causador da LTA, na América Latina inclusive no Brasil (P.T.G. Leopoldo et al, 2006; M.C.A. Brelaz et al, 2012). Este parasita é associado a manifestações clínicas que podem variar de lesões cutâneas simples, podendo curar-se espontaneamente, até lesões mais invasivas e desfigurantes das mucosas (Grimaldi Jr. G. et al, 1993; Saraiva N. et al, 1985; Marsden PD. et al, 1986 ).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera a LTA como uma das seis mais importantes doenças infecciosas do mundo pela sua capacidade em causar desfigurações, e constituir grave problema de saúde pública, a carga global de doença devido a leishmaniose tegumentar tem sido estimada em aproximadamente 2,3 milhões de DALYs (anos saudáveis perdidos por incapacidade ou morte precoce) (Colin DM., 2007; Desjeux P., 2004; WHO, 2011).

A leishmaniose é uma doença predominantemente rural (WHO, 2010), as promastigotas, forma infectante, podem produzir ou desencadear a doença numa grande



variedade de mamíferos e hospedeiros silvestres ou domésticos. No homem, as leishmanioses são causadas por 21 espécies de *Leishmania* sp (Antoine JC et al, 1998; Desjeux P et al, 1996; Shaw jj et al 1994; Ashford RW, 1996-1997) e transmitidas por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (Desjeux P., 2001). Geograficamente, os flebotomíneos estão distribuídos em dois gêneros: *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Young; Duncan, 1994). Os países desenvolvidos têm apresentado um crescente aumento no número de casos de leishmaniose, entre viajantes a áreas endêmicas (WHO, 1995), e pessoas co-infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Davidson RN., 1997).

Dos casos anualmente registrados de leishmaniose tegumentar, 90% ocorrem em apenas seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria e Afeganistão no velho mundo, e no Brasil e Peru na América do Sul (Dejeux P., 1999). A LTA tem registro de ocorrências nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (Montenegro J., 1926.). No Brasil, a LTA afeta todas as regiões, sendo mais prevalente no norte e nordeste (Gontijo et al, 2004)

No Velho Mundo as espécies associadas com a doença em seres humanos são as pertencentes ao complexo *Leishmania donovani* (*L.donovani* e *L. infantum*), responsáveis pela leishmaniose visceral, além da *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica*, responsáveis pela leishmaniose tegumentar. No Novo Mundo, as espécies de *Leishmania*, causadoras da doença, estão contidas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* são: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) Venezuelensis* e *L. (L.) major símile* (Silveira et al, 2004; Dantas-Torres F, 2006). As espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis* (Gontijo B. & Carvalho M.L.R , 2003). Dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, as espécies causadoras de LTA no Brasil são: A *L. (V.) braziliensis*, a *L.(V.)*

*guyanensis*, (Lainson. R., et al, 1987) a *L.(V.) naiffi* (Shaw JJ., 1999), a *L.(V.) shawi*, a *L.(V.) lainsoni*, a *L. (L.) amazonenses* (shaw JJ., et al, 1975).

A região de Corte de Pedra (CP), localizada no sudeste da Bahia é uma área endêmica para *L.(V.) braziliensis*, com registro de 1.200 casos novos de LTA por ano (Jirmanus et al 2012). Os pacientes são atendidos no posto de saúde local, onde funciona o Centro de Referência em Leishmaniose Doutor Jackson Maurício Lopes Costa. Nesta região, temos a presença de três formas distintas de LTA: LC, LM, LD. Todas as formas clínicas de LTA em CP são causados pela *L.(V.) braziliensis* (Guimaraes et al, 2009; Jirmanus et al, 2012).

## **IV.2 Vetor, agente etiológico e ciclo biológico**

*Leishmania* sp. é o protozoário, agente etiológico da leishmaniose, pertencente à família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, a *Leishmania* sp. apresenta-se sob duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestório do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Gontijo *et al.*, 2003; Basano *et al.*, 2004).

Os parasitos do gênero *Leishmania*, possuem DNA mitocondrial (kDNA), que pode ser usado para diferenciá-los de quaisquer organismos pertencentes a outras ordens (Simpson, 1987). Estes protozoários possuem suas informações genéticas armazenadas em dois compartimentos distintos; no núcleo, o DNA genômico nuclear que contém as informações básicas do organismo e no Kinetoplasto, o kDNA, que regula parte das informações necessárias para o funcionamento mitocondrial (Nebohacova M. et al, 2009). O cariótipo molecular da *Leishmania* apresenta 36 cromossomos, que variam de tamanho entre 0,35 Mb até 3,0Mb (Wincker P. et al, 1996).

A *L.(V.) braziliensis* foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LTA, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Os vetores da LTA são insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, família Psychodidae, sub-família Phebotominae, gênero *Lutzomyia*. Os flebotomíneos também são conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Brasil, MS 2007; Gontijo et al, 2004).

No Brasil, as principais espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão do agente patogênico causador da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lu. whitmani*, *Lu. umbratilis*, *Lu. intermedia*, *Lu. wellcome* e *Lu. Migonei*. (Brasil, MS 2007). Também no Brasil, foram identificadas seis espécies de *Leishmania* causadoras de LTA, são elas: *L. (L.) amazonenses*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *a L.(V.) braziliensis* (Basano et al, 2004). A *L. (V.) braziliensis*, que é uma espécie prevalente no homem podendo causar lesões cutâneas e mucosas, encontrada em todas as zonas endêmicas do País, é transmitida, entre outras, por espécies de flebotomíneos como *Lu.whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. Intermedia* (Lainson R., et al, 1987). A *L.(V.) guyanensis*, que causa lesões cutâneas e ocorre geralmente na margem norte do Rio Amazonas, é transmitida por *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. Whitmani* (Lainson R., et al, 1987). A *L. (V.) naiffi* ocorre na Amazônia, nos estados do Pará e Amazonas, causa doença com evolução benigna e é transmitida por *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayrozai* (Shaw JJ. 1999). A *L.(V.) shawi*, que é responsável por casos da doença no Amazonas e Pará, tem como vetor a *Lu. Whitmani*. A *L. (V.) lainsoni*, que ocorre apenas na Amazônia, tem como vetor a *Lu. ubiquitous*. A *L. (L.) amazonensis*, que causa leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD), é transmitida principalmente por *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca* (shaw JJ., et al, 1975).

No ciclo biológico e de transmissão da LTA, o flebotomíneo faz a transição dos parasitas entre os reservatórios e os hospedeiros. Ao picar os reservatórios e hospedeiros infectados, as fêmeas dos flebotomíneos adquirem as formas amastigotas do

protozoário, que se desenvolvem nas formas promastigotas e se multiplicam no intestino dos vetores. Durante o novo repasto sanguíneo, os mesmos parasitos são inoculados na pele do hospedeiro (Ministério da saúde, 2007). As formas infectantes são as promastigotas metacíclicas, que adentram as células do sistema fagocítico mononuclear, os macrófagos, perdendo o flagelo, transformando-se em amastigotas, que se multiplicam no interior destas células, disseminando-se para os tecidos (Lainson et al, 1987).

Os hospedeiros reservatórios primários consistem na espécie que representa a fonte de infecção para determinado patógeno e que permite sua manutenção por um longo período e a transmissão para outros hospedeiros, incluindo o homem nos diferentes ciclos de transmissão envolvidos. Os hospedeiros reservatórios secundários não são capazes de manter o ciclo de transmissão natural sustentável por um longo período (Ashford RW, 1996; Lainson R, et al, 2005).

### **IV.3 Aspectos clínicos da leishmaniose**

A *L. (V.) braziliensis* provoca três principais tipos de LTA, a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose disseminada (LD) e a leishmaniose mucosa (LM) (Costa et al, 1986; Carvalho et al, 1994). O grau de metástase das lesões típicas da leishmaniose é a característica principal que diferencia a forma clínica (Amato VS, 2008; Mardsen PD, 1994)

A LC causa lesões restritas ao local de entrada dos parasitos na pele do hospedeiro (Amato VS, 2008; Mardsen PD., 1994). Tais lesões limitam-se a uma ou poucas úlceras de pele (Azulay, RD & DR Azulay Jr., 1995), caracterizam-se por apresentar bordas elevadas e endurecidas e algumas vezes, adenopatia (Silveira et al, 2004).

A LD é caracterizada por ampla disseminação cutânea (Amato VS, 2008; Mardsen PD. 1994), que pode ser precedida por uma única lesão inicial ulcerada em pele. As lesões disseminadas podem ser ulceradas ou não, distribuindo-se em diversas áreas do corpo como a face, o tórax, o abdome e os membros superiores e inferiores. Os pacientes, podem apresentar também febre e astenia transitória (Costa et al, 1986; Carvalho et al, 1994; Turetz et al, 2002).

A LM é caracterizada por apresentar a lesões metastáticas e desfigurantes da face, com a destruição das mucosas podendo atingir boca, laringe e faringe (Kahl et al, 1991; Lessa et al, 2007). A complicação mais comum na LM é a perfuração do septo nasal, podendo ocorrer envolvimento do palato, úvula, faringe, laringe e cordas vocais. A doença pode ser fatal (Choi CM & Lerner EA. 2001).

#### **IV.4 Aspectos imunológicos da leishmaniose**

As respostas imunes inata e adaptativa contra os parasitos de *Leishmania* sp. são iniciadas no momento da picada do *flebótomineo*, quando é feito o repasto sanguíneo e ocorre a entrada de promastigotas na pele do hospedeiro (Murray. HW., et al, 1983). Os macrófagos têm papel importante no combate aos parasitos através do processamento e apresentação de antígenos, expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície celular e liberação de citocinas imunoregulatórias, atuando como células fagocíticas promovendo a eliminação dos parasitos (Carrera L. et al, 1996). A captação e internalização dos parasitos pelos macrófagos envolve tanto a interação direta de ligantes do parasita aos receptores dos macrófagos quanto indireta após a opsonização do parasita por componentes do complemento (Handman E. et al, 1985; Russell DG. et al, 1989; Brittingham A. et al, 1996).

A LTA é uma doença em que a resposta imune do hospedeiro é dependente da resposta da célula T. A produção de IFN- $\gamma$  por células Th1 está relacionada ao controle

da infecção. Esta citocina estimula a produção de óxido nítrico (NO) e superóxido pelos fagócitos. O NO é um importante microbicida contra a *Leishmania* sp. (Proudfoot L. et al, 1996). Os monócitos e macrófagos são ativados a partir de citocinas produzidas pelas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Também, a produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, tem sido associada com o controle da infecção, na resposta imune celular relacionada a leishmaniose, através da ativação dos macrófagos e à destruição do parasita. Contudo, observou-se que o NO tem a sua produção inibida por citocinas como a IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , o que favorece a multiplicação do parasita no hospedeiro. (R. Reithinger et al, 2007; M. Ameen et al, 2010; L.R. Castellano et al, 2009; R.C. Bittar, et al, 2007; A. Gomes-Silva, et al, 2007).

A resposta imunológica dos pacientes com LC é caracterizada por uma resposta exacerbada do tipo Th1, bem regulada frente aos antígenos de *Leishmania*. Observa-se a positividade ao teste cutâneo de resposta de hipersensibilidade celular tardia aos antígenos do parasita, chamado de intradermorreação de Montenegro (Bittencourt A. L. & Barral A., 1991). Esses pacientes produzem níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF, que induzem a ativação de macrófagos quando expostos aos antígenos do parasita. 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 (CHOI et al, 2001; Bacellar et al, 2002; Strazulla et al, 2013).

Os pacientes com LM apresentam uma imunidade celular representada por intensa reação de hipersensibilidade do tipo tardia contra antígenos de *Leishmania*, com a expressão de lesões mucosas. Esta resposta caracteriza-se pela produção exacerbada das citocinas pró-inflamatórias TNF e IFN-  $\gamma$  contra os antígenos parasitários (Carvalho et al, 1995; Bacellar et al, 2002).

Pacientes com LD produzem níveis menores de TNF e IFN-  $\gamma$  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; Machado P. R. & Penna G., 2012).

#### **IV.5 Tratamento e imunoproteção**

O Ministério da saúde (MS) preconiza o uso do antimonial pentavalente (sbv), por via intramuscular ou intravenosa, como o medicamento de primeira escolha no tratamento de todas as formas da LTA, encontrado na forma de antimoniato de metilglucamina (Brasil, MS 2007). Somente algumas drogas alternativas existem e são recomendadas: a pentamidina, a anfotericina B e a miltefosina (Rath *et al* 2003; MS, 2007). A Pentamidina e a anfotericina B são drogas eficazes, porém de caráter tóxico, por isso a OMS recomenda o seu uso apenas na falta do antimonial pentavalente ou falha terapêutica no seu emprego (Amato et al, 2008; David e Carft, 2009; Kappagoda et al, 2011).

A LC em áreas endêmicas, de transmissão por *L.(V.) braziliensis*, tem demonstrado uma taxa de cura após a terapia com sbv que varia em torno de 50% a 90% (Romero et al, 2001; O'Neal et al, 2007; Unger A. et al, 2009). Para o tratamento da LC e LD o MS sugere a dose de 10 a 20mg Sbv/Kg/dia, durante 20 dias. Caso ocorra falha na resposta ao tratamento, o esquema deverá ser prolongado por 30 dias. A refratariedade ao antimonial tem sido relatada nas diversas formas clínicas da doença (Sundar et al, 2000). Na forma LM, o MS sugere 20mg Sbv/Kg/dia durante 30 dias consecutivos. Em caso de falha o tratamento deverá repetido por mais 30 dias (Brasil, MS 2007). A LV tem apresentado índices crescentes de refratariedade e falta de eficácia ao sbv. A sensibilidade das espécies de *Leishmania*, e a resposta imune do hospedeiro, têm sido apontadas como principais causas (Gotto & Lindoso, 2010).

Na área endêmica de CP, o sbv é prescrito amplamente, contudo tem sido relatado crescente diminuição na eficácia do tratamento (Guimaraes et al, 2009; Jirmanus et al, 2012). A falha afeta principalmente a forma LD, na qual menos de 25%

dos casos são curados após o uso da terapia padrão (20mg/Kg/dia durante 30 dias consecutivos), sendo na maioria dos casos necessário mais de um curso de tratamento para cura. Neste cenário, novas drogas têm sido testadas, como por exemplo, a anfotericina B lipossomal (Machado 2015).

A Anfotericina B é uma droga de segunda linha para o tratamento da LTA. É um antibiótico que também possui ação leishmanicida, empregada quando não se obtém resposta ao tratamento com sbv, ou na impossibilidade de seu uso (Grimaldi G, Jr. & Tesh R.B, 1993; Choi CM & Lerner E.A., 2001). Constitui a melhor opção para os pacientes com LM não responsivos à terapia convencional, apresentando uma taxa de cura mais elevada (65%) do que a observada para o Sbv (24%) em pacientes com LD causada por *L. (V.) braziliensis* (Machado, et al, 2011)

A pentamidina é outra droga de uso alternativo. A ação desta droga baseia-se na interferência na síntese do DNA da *Leishmania*, alterando a morfologia do cinetoplasto e causando a morte do parasito. Deve ser administrada em três doses (4mg/kg/dia), por via intramuscular em dias alternados durante a semana (De Paula et al, 2003; Gotto & Lindoso, 2010; Brasil, MS 2007). A pentamidina oferece o benefício do curto período de tratamento, mostrando uma eficácia de 90-94% em relação à *L.(V.) braziliensis* (Amato et al, 2008; De Paula et al 2003). Contudo, este medicamento tem ação no metabolismo da glicose podendo causar diabetes nos pacientes (MS, 2007).

Devido às reportadas falhas terapêuticas com o sbv, estudos recentes com LC em CP e Manaus mostraram que a miltefosina é eficaz tanto para *L.(V.) braziliensis* em CP, quanto para *L.(V.) guyanensis* em Manaus (Talhari et al, 2011). A miltefosina é administrada de forma oral, com doses diárias de 2,5mg/Kg, e tem demonstrado uma taxa de cura da LC em torno de 75%, em comparação com 53% do Sbv (Machado et al, 2007-2010). A mesma tem sido usada com sucesso para o tratamento de LM causada por *L.(V.) braziliensis*, apresentando taxas de cura de cerca de 75% em pacientes bolivianos (Soto et al, 2007, 2009).



Os medicamentos (sbv, anfotericina B, pentamidina e miltefosina) disponíveis para o tratamento de todas as formas de leishmaniose têm inúmeras desvantagens e nenhum se mostra 100% eficaz. A toxicidade, os efeitos colaterais, custos elevados para locais endêmicos, falta de investimento das indústrias para pesquisa em novos medicamentos e resistência aos fármacos têm sido obstáculos no controle da doença. (WHO, 2010). Sendo a leishmaniose uma doença tropical negligenciada associada à pobreza, que afeta a vida de cerca de 12 milhões de pessoas, a elaboração de estratégias de profilaxia e tratamentos mais eficazes, tem sido foco de intensa pesquisa.

A melhor estratégia de controle seria a vacinação, contudo até o momento as vacinas disponíveis são apenas para a leishmaniose visceral em cães, sendo elas a Leishmune<sup>®</sup>, Leishtec e a CaniLeish<sup>®</sup>. Existe ainda uma vacina testada em humanos que é a Leih F1 +MPL-SE (Anteriormente conhecida como Leish-111f) (Keerti J et al, 2015). A Leishmune<sup>®</sup> é licenciada no Brasil, constituída lectina ligante a fucose (Fucose Mannose Ligand; FML) e saponina. Esse antígeno FML purificado de promastigotas de *L.donovani* é associado com o adjuvante saponina. A vacina tem mostrado respostas imunológicas como ativação de neutrófilos e monócitos nos sítios da infecção, estimulação de células T CD8+ com uma resposta pró-inflamatória mediada por interferon gama e óxido nítrico (Araujo et al 2011; Nico et al, 2012).

A Leishtec<sup>®</sup>, também licenciada no Brasil, é constituída pelo antígeno A2 (proteína de 45 a 110 Kda) de *L.donovani* associada com o adjuvante saponina (Keerti, 2015). A A2 é uma proteína caracterizada como o primeiro fator de virulência identificado em amastigotas de *L.donovani* (Charest et al, 1994; Zhang et al, 1997-2001). Cães vacinados apresentaram uma resposta imune Th1, que protege significativamente os cães, retardando o desenvolvimento dos sintomas na Leishmaniose Visceral Canina (Fernandes 2008). Outra vacina recentemente licenciada na Europa para profilaxia canina é a CaniLeish. Ela é composta por proteínas purificadas de *Leishmania infantum* LiESP (*L. infantum* excreted-secreted proteins) associadas com o

adjuvante QA-21 (Quilaja Saponaria Saponina). A CaniLeish tem mostrado capacidade de estimular resposta imunológica Th1 por aproximadamente 1 ano. Sendo assim, as vacinas que tem mostrado proteção significativa contra a doença em condições naturais são Leishmune® no Brasil e CaniLeish na Europa (Gradoni 2015).

Para humanos, a vacina Leish F1 +MPL®-SE (Anteriormente conhecido como Leish-111f) tem sido testada (Casella et al, 2008). O composto da vacina é constituído por três proteínas derivadas de *L.major*, *L.donovani* e *L.braziliensis* (Webb Jr et al, 1996-1998). As Três proteínas são: fator de iniciação de alongamento de *Leishmania* (LelF), antioxidante específico Tiol (TSA), proteína 1, fator de indução ao estresse (LmST11) associadas com um adjuvante monofosforil lipídico derivado do lipopolissacarídeo da *Salmonella minnesota*, formulado em uma emulsão estável (MPL®-SE). Em estudos animais a vacina tem mostrado estimular uma resposta imune Th1, controlando as infecções por leishmaniose (Skeiky et al, 2002; Persing et al, 2002; Reed et al, 2003; Coler RN et al, 2002).

Muitas estratégias de profilaxia vêm sendo estudadas, principalmente na busca de imunógenos (livres e ou associados com adjuvantes) que produzam uma resposta imune protetora mediada por células que possam combater a leishmaniose. Dentre os imunogénos estudados podemos citar alguns como:

- A p36/ LACK (leishmania homolog of receptors for activated C kinase), é uma proteína que possui sequência de aminoácidos conservados na *Leishmania*, tendo sido cogitada como potencial candidato à vacina por demonstrar imunopatogenicidade em modelos murinos e experimentalmente induzir a resposta Th1, porém teve sua eficácia protetora determinada apenas em *L.major* (Mougneau E, et al., 1995; Melby et al, 2001).

- O imunógeno KMP-11 (Kinetoplastid membrane protein 11) mostrou promover aumento na produção de IFN-  $\gamma$ , TNF-  $\alpha$  e nos níveis de IL - 12, juntamente com extrema regulação negativa de IL -10, diminuindo a carga parasitária de *Leishmania* (Santos, DM., et al, 2013).
- A glicoproteína 63 (gp63) ou leishmanolisina, em um estudo realizado com peptídeos sintéticos que apresentavam domínios funcionais altamente conservados desta proteína nas diferentes espécies de *Leishmania*, inibiu a internalização do parasita à célula hospedeira (Puentes et al,1999). Estes resultados indicam que as interações moleculares entre os domínios conservados da GP63 e moléculas na superfície de macrófagos contribuem para a internalização do parasita, e que a neutralização dessa 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).
- O receptor de hemoglobina (HBR) de *Leishmania*, outro imunógeno candidato, é conservado entre várias espécies de *Leishmania*. 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 -  $\gamma$ , interleucina - 12 (IL - 12) e fator de necrose tumoral -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) (Guha et al, 2013).
- Antígenos do gene PPG de *L. donovani* foram avaliados como vacina em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), com eficácia profilática da ordem de aproximadamente 80%. Todos os animais haviam sobrevivido seis meses após o desafio. A eficácia foi suportada por um aumento da

síntese de NO, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, juntamente com extrema regulação negativa de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10. Os resultados sugerem que o domínio N-terminal da PPG de *L. donovani* pode ser explorado como uma vacina de DNA contra LV (Samant M. et al, 2009).

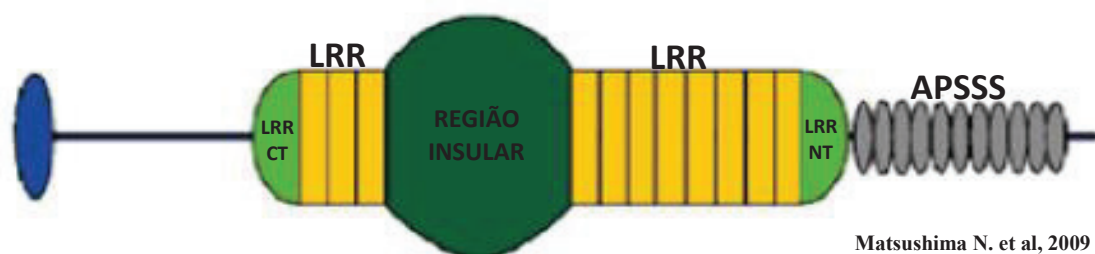
Muitos outros imunógenos como HNP-1 (Human neutrophil peptide-1) e as proteínas CPA e CPB, LmSTII ( Protein Antigen LmSTII), TSA ( Thiol Specific Antioxidant), entre outros, têm sido empregados na tentativa de desenvolver reagentes para a imunoprofilaxia das leishmanioses (Campo-Neto et al, 2001; Duthie et al, 2012). No entanto, os resultados ainda não são conclusivos. Entre os maiores desafios para o desenvolvimento de vacinas está a avaliação de candidatos que propiciem respostas imunes associadas com a proteção a longo prazo e redução da incidência da doença (Duthie et al, 2012). Novas abordagens criativas são necessárias, dada à ineficácia dos atuais tratamentos existentes (Sundar. S., et al, 2002; Peacock. C., et al, 2007).

#### **IV.6 A glicoproteína PPG**

Os PPG,s estão presentes em várias espécies de *Leishmania* (Pianini. A., et, al 1999; Stierhof et al, 1994). Trata-se de uma glicoproteína produzida e secretada que é expressa nas formas amastigotas e promastigotas do parasito, e que apresenta-se em duas formas, uma secretada, solúvel em água e outra ancorada, a superfície do parasita por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Pianini. A., et, al 1999).

A proteína possui um esqueleto protéico com uma forma estrutural filamentosa (Stierhof et al, 1994). É uma molécula grande, complexa, possuindo dois domínios distintos: um domínio constituído de ricas repetições de leucina (LRR), que estão envolvidas em interações proteína-proteína, transdução de sinal, e reconhecimento de patógeno. (Montgomery J. et al, 2000; Girardin S. et al, 2002; Kobe B. et al, 1995); e

outro domínio formado por uma cadeia rica em aminoácidos repetitivos de serina, prolina e alanina (APSSS) (Ilg. T., et al, 1999; Montgomery J. et al, 2000), (Figura I). A maior parte dos resíduos de serina em PPG são glicosiladas através de uma ligação de fosfo-diéster, e os açúcares são um importante ligante celular, favorecendo a infectividade do parasita (Ilg. T., et al, 1992; Kelleher M.,1992). O PPG tem sido assim descrito como componente importante para a interação da *Leishmania* com as células do hospedeiro, os macrófagos, apresentando importante papel na modulação do macrófago infectado, sobretudo, na fase inicial da infecção (Pianini. A., et al, 1999).



**Figura I.** Arquitetura dos domínios da proteína PPG 3 de *L.(V.) braziliensis*. Em cinza domínio APSSS, em amarelo domínio LRR, em verde claro nas extremidades LRR NT e LRR CT, em verde escuro ao centro, região insular.

Estudos experimentais *in vitro* demonstraram por imunofluorescência, a presença do PPG na forma secretada e solúvel em vesículas de macrófagos da medula óssea de camudongo, infectados por *L.major* (Pianini. A., et al, 1999). Uma vez dentro dos macrófagos as promastigotas se albergam em compartimentos delimitados por membranas, conhecidos como fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos, e após 72 horas da infecção, esses vacúolos expressam hidrolases lisossomais (Alexander J., et al, 1975; Antoine J.C, et al, 1987-1990; Prina E. et al, 1990; Russell DG., 1992). Essas hidrolases promovem um ambiente intracelular ácido com o objetivo de degradação desses microorganismos (Russell DG., 1992).

Os PPGs têm sido apontados como importantes mediadores de interações e atividades biológicas, que inibem a expressão de citocinas imunorregulatórias (Pianini.

A., et al, 1999). Os PPGs expressam domínios conservados (Montgomery, J. et al, 2002; Peacock. C., et al, 2007), que ligam-se aos macrófagos através dos receptores CR3 do sistema complemento (Talamas P. et al, 1989). Isso tem sido apontado como facilitador para a internalização e adesão dos parasitas às células hospedeiras (Pianini. A., et al, 1999), bem como para a sobrevivência das amastigotas no interior dessas células (Carrera L. et al, 1996; Hatzigeorgiou D.E., et al, 1996; McConville, MJ. et al, 1992).

A promastigota da *Leishmania* secreta um gel denominado gel secretado por promastigotas (PSG), que é rico em proteofosfoglicanos filamentosos (fPPGs), reconhecidamente importantes na otimização e eficiência do estabelecimento da infecção. O PSG é regurgitado pelos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo, contendo os PPGs. (Rogers. M., et al, 2009). Existem evidências que o PSG aumenta o catabolismo da arginase pelos macrófagos hospedeiros, aumentando a síntese de poliaminas, substâncias glicosiladas, essenciais para o crescimento do parasita (Rogers. M., et al, 2009; 2010). Isso contribui para a potencialização da infecção da *L.(V.) braziliensis* (Gopfert, U., et al, 1999; Ilg. T., 2000; McConville MJ et al, 1990-1991). A quantidade de PSG regurgitado pelos flebotomíneos é proporcional ao grau de sua infecção e ao número de parasitas transmitidos (Rogers. M., et al, 2009).

Os PPGs são diferentes em tamanho e número entre espécies de *Leishmania* (Montgomery J. 2002). Assim, para *L. major*, temos a expressão da PPG 1, PPG 3 e PPG 4 (Montgomery. J. et al, 2001); para *L. mexicana* temos a expressão da PPG 1, PPG 2 e PPG 3 e para *L. donovani*, temos a PPG 1, PPG 2, PPG 3 e PPG 4 (Gopfert. U., et al, 1999; Ilg. T., et al, 2000; Klein. C.,1999); para a *L.(V.)braziliensis*, temos a expressão das PPG 3, PPG 4 e PPG 5 (Matsushima. N. et al, 2009). Estudos realizados indicam que há pelo menos 12 subtipos de genes do PPG, contudo estudos sobre estas moléculas têm sido limitados devido ao tamanho e complexidade desta glicoproteína (Montgomery, J., et al, 2002).

Em ensaios experimentais de sequenciamento do gene PPG 1 da *L. major*, foi observado que os clones consistiam em sequências repetitivas de DNA que codificavam serinas e prolinas. Estes ensaios mostraram que o domínio N-terminal possui uma grande área central com cerca de 1500 aminoácidos, que é codificada por cerca de 4,5 kilobases de DNA repetitivo rico em guaninas e citosinas. Esta área da proteína é constituída em mais de 90% por repetições, sugerindo que o domínio central é constituído por aproximadamente 100 repetições, que codificam para alanina, serina e prolina (Ilg. T., et al, 1999).

Estudos realizados com a sequência dos genes que codificam o PPG demonstraram que o domínio de alanina-prolina-serina (APSSS) repetitivo central é flanqueado por domínios amino e carboxi terminais não repetitivos. Esse domínio é marcante entre todas as espécies de PPG com cerca de 100 repetições da sequência APSASSSSA (P / S) SSSSS ( $\pm$  S), sendo a maioria das serinas fosfoglicosiladas. (Ilg. T. et al, 1999). A serina, por ser altamente glicosilada, tem implicação na melhor eficiência da adesão aos macrófagos (Ilg. T et al, 1992; Montgomery, et al, 2002).

A sequência do PPG apresenta também áreas com ricas repetições de leucina (LRR). Essas são alternadas com regiões insulares não LRR (IR island region), que são regiões ainda, sem função conhecida (Matsushima N. et al, 2009). A reportada ligação com o receptor CR3 dos macrófagos parece está relacionada com a região LRR. (Kedzierski. L. et al, 2004). Estudos realizados com *L.infantum* sugerem que a LRR também esteja relacionada com a resistência ao antimonial pentavalente (Genest et al, 2008).

Os PPGs são mediadores de interações e atividades biológicas, que inibem a expressão de citocinas imunoregulatórias (Pianini. A., et al, 1999); são expressos com domínios altamente conservados entre espécies de *Leishmania* (Montgomery, J. et al, 2002; Peacock. C., et al, 2007) e ligam-se aos macrófagos através de receptores

específicos (Talamas P. et al, 1989) que interagem com domínios conservados destas moléculas e a superfície de macrófagos. Assim os PPGs se mostram bons candidatos a testes como alvos terapêuticos ou subunidades de vacinas. Os resultados do nosso trabalho reforçam que o PPG seja um candidato a ser empregado em reagentes de imunoprofilaxia contra LTA, devido ao elevado grau de conservação encontrado na sua porção proteica num painel de *L.(V.) braziliensis* de uma área de transmissão natural do parasita.



## V.HIPÓTESE

Nossa hipótese é que os principais domínios do PPG de *L.(V.) braziliensis*, envolvidos na interação dos parasitas com as células hospedeiras, isto é LRR e APSSS, podem estar associados a diferentes formas de LTA em Corte de Pedra (BA) e apresentem alta conservação, o que os torna bons candidatos a teste como subunidades em vacinas para a profilaxia da LTA.

## VI. JUSTIFICATIVA

Os PPGs de *L.(V.) braziliensis*, espécie causadora da LTA no Brasil (P.T.G. Leopoldo et al, 2006; M.C.A. Brelaz et al, 2012), expressam domínios conservados e têm sido apontados como facilitadores da infectividade (Montgomery, J. et al, 2002; Pianini. A., et al, 1999). Sendo assim, é de fundamental importância examinar se existe associação entre os alelos do PPG, com as diferentes formas clínicas da doença e o grau de conservação dessa molécula, proveniente de uma área de grande endemicidade para LTA, como aquela explorada neste estudo. Tal conhecimento poderá direcionar o desenvolvimento de reagentes que utilizem imunógenos do parasito na imunoprofilaxia contra leishmaniose, pois estudos tem mostrado que candidatos conservados são mais desejáveis, por seu emprego resultar numa maior cobertura de imunização pelos agentes de saúde pública.

## VII. MATERIAL E MÉTODOS

### VII.1 Desenho do estudo.

É um estudo de corte transversal, no qual foram descritos alelos da glicoproteína PPG de *L.(V.) braziliensis*, isoladas de 24 pacientes de LTA diagnosticados em Corte de Pedra/BA, entre 2008 e 2011.

### VII.2 Área do estudo.

O estudo empregou amostras parasitárias retrospectivas provenientes de pacientes de uma área endêmica para Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) do sudeste do estado da Bahia, denominada Corte de Pedra (CP), (Figura II). CP consiste numa área rural com resquícios de Mata Atlântica, mas parcialmente desmatada. Em CP, nota-se a presença de *Lu. (N.) whitmany* e *Lu. (N.) intermedia*, que são flebotomíneos transmissores da *L.(V.) braziliensis*.

A região está localizada a 280 km ao sul de Salvador, sendo composta por 20 municípios e delimitada pelas coordenadas geográficas (latitude/longitude) 14°/39°, 13°/39°, 14°/40°, e 13°/40°.

Nessa área tivemos acesso a uma população de pessoas afetadas por todo o espectro da doença causada pela *L.(V.) braziliensis*. O posto de saúde de Corte de Pedra, denominado Dr. Jackson M. L. Costa, é um centro de referência para o diagnóstico e tratamento da LTA e tem servido como o sítio de estudo para pesquisas clínicas e epidemiológicas realizadas pela equipe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (SIM/HUPES). No Laboratório de Epidemiologia Molecular do SIM/HUPES, são realizadas as avaliações laboratoriais, o isolamento dos

parasitos a partir dos espécimes clínicos, as genotipagens e análises epidemiológicas e geográficas.



Schriefer et al, 2004

**Figura II.** Mapa da área endêmica de Corte de Pedra/BA, apresentada em verde.

### **VII.3 População e amostra do estudo.**

Os parasitas empregados no estudo foram provenientes da população de pacientes com LTA, residentes da área endêmica de CP, que foram atendidos e tiveram sua avaliação, diagnóstico e acompanhamento clínico e terapêutico realizados pelos médicos e demais profissionais do posto de saúde de Corte de Pedra – BA. A confirmação diagnóstica se deu com base nos seguintes critérios: avaliação clínica; intradermorreação de Montenegro; avaliação histopatológica de fragmento de lesão cutânea ou mucosa; cultivo de parasitos obtidos a partir de material aspirado da borda da lesão; e PCR em tempo real para detecção e determinação da espécie parasitária.

Ao todo, obtivemos isolados de *L.(V.) braziliensis* de 24 pacientes de LTA (08 com LC, 08 com LD, 08 com LM) recrutados entre 2008 e 2011.

#### **VII.4 Definição de Casos.**

A LC foi definida pela presença de uma ou poucas lesões ulcerativas em pele sem evidência de envolvimento de mucosas. A LD foi definida pela presença de mais que 10 lesões ulcerativas, nodulares ou acneiformes sobre a pele, localizadas em duas ou mais regiões corpóreas. A LM foi definida pela presença de lesão mucosa metastática mais freqüentemente localizada no septo nasal, palato, faringe e laringe.

#### **VII.5 Critérios de inclusão e não inclusão.**

Foram incluídos no estudo pacientes que apresentaram definição de caso para LC, LD ou LM, apresentaram cultivo positivo para *L.(V.) braziliensis*, e preencheram e assinaram o TCLE. Não foram incluídos pacientes que apresentaram lesões atípicas, gestantes, menores de 18 anos de idade e aqueles que não quiseram participar do estudo.

#### **VII.6 Aspectos éticos da pesquisa.**

Todos os sujeitos do estudo tiveram explicação detalhada sobre os procedimentos a que seriam submetidos, que não diferem daqueles empregados no diagnóstico complementar de rotina para a LTA, bem como sobre o destino dos seus espécimes clínicos. As amostras parasitárias, e os dados clínicos e geográficos empregados foram obtidos em estudo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Maternidade Climério de Oliveira (MCO) da UFBA, e pela Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP- 128/2008, 17.03.2008).

### **VII.7 Obtenção dos isolados parasitários de *L.(V.) braziliensis*.**

Para as avaliações relativas ao polimorfismo do gene da PPG de *L.(V.) braziliensis*, todos os sujeitos do estudo foram recrutados, as coordenadas geográficas das suas moradias obtidas por GPS, e seus parasitas e amostras de DNA provenientes das culturas parasitárias obtidos a partir de material aspirado das bordas das lesões de pele ou mucosas. Para o isolamento dos parasitas, foi feito o cultivo da amostra clínica em meio LIT/NNN (Liver Infusion Triptose / Mc Neal, Novy e Nicolle) em tubos de polipropileno, 14ml, não pirogênicos (tubos falcon). Cada suspensão foi incubada a 26 °C durante uma a duas semanas. Em seguida, a suspensão foi transferida para meio de cultura Schneider® (Schneider insect extract médium; Sigma-Aldrich /Brasil) complementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor e 2 mM de L-glutamina, em frasco para cultura de tecidos (garrafa de poliestireno, livre de DNase, RNase, pirogênicos e toxinas, estéril, com área de crescimento de 25 cm<sup>2</sup>), e incubada 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.

### **VII.8 Obtenção do DNA genômico de *L. (V.) braziliensis*.**

Para a obtenção do DNA genômico dos isolados de *L. (V.) braziliensis*, foi feito o descongelamento da suspensão parasitária e cultivo em meio Schneider até atingirem a fase promastigota estacionária de crescimento. As promastigotas foram centrifugadas a 200g por 10 minutos e o sedimento 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). As amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, sendo feita então a extração do DNA genômico após a adição

ao lisado celular de 150  $\mu$ L de uma solução de Fenol e Clorofórmio (1:1 v/v). Foi então realizada homogeneização por 5 minutos e centrifugação a 10.000g por 5 minutos. Foi colhido o sobrenadante contendo o DNA genômico, que foi transferido para outro tubo contendo 300  $\mu$ L de etanol absoluto e realizada homogeneização por 5 minutos seguida 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, o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de tampão de TE (TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado a -20°C.

#### **VII.9 Determinação da espécie de *Leishmania* por PCR em tempo real.**

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

#### **VII.10 Amplificação por PCR dos alelos do PPG de isolados de *L. (V.) braziliensis*.**

Para a amplificação dos alelos do PPG foram utilizados 3 pares de primers (oligonucleotídeos iniciadores) previamente desenhados, com as seguintes especificações: (1) para a região APSSS do PPG 3, 5': CGCCACCGCCAACACCT e 5': CGGAGCGGAGCTGCTGC; (2) para a região LRR do PPG 3, 5': GTTCCTGAGGTTTCTCCAGATG e 5': CTCTGGTACTGGCAAGATTGAG; e (3) para a região LRR do PPG 4, 5': GAGCAGCAGCAGCTCCGCGT e 5': GACGACGACGACGCGCTGCT. As reações de PCR convencional empregaram volume final de 50 $\mu$ L como segue: 1  $\mu$ L de DNA alvo em concentração de 4 ng/100  $\mu$ L;

5 $\mu$ L de tampão 10x (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1 $\mu$ L de cada oligonucleotídeo iniciador em concentração de 0,05 mM (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 4 $\mu$ L de dNTP, cada um em concentração de 2,5 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; INVITROGEN Life Technologies, Inc); 1,0 – 2,5 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> em concentração de 50 Mm (INVITROGEN Life Technologies, Inc); 0,2  $\mu$ L/50  $\mu$ L de Taq DNA Polymerase Platinum (INVITROGEN Life Technologies, Inc); e água destilada, completando o conteúdo para o volume final de 50 $\mu$ L.

As reações foram realizadas no Termociclador Veriti® de 96 poços da Applied Biosystems, de acordo com a programação seguinte. Para as reações com o PPG 3 APSSS e o PPG 3 LRR: 94°C na fase de desnaturação da fita por 5 minutos; seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 55°C na fase de anelamento dos primers à 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. Para as reações com o PPG 4 LRR: 94°C na fase de desnaturação da fita por 5 minutos; seguida de 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C na fase de anelamento dos primers à 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  $\mu$ L de cada produto da reação de amplificação do PPG 3 e 4, misturados com 2 $\mu$ L de Azul de Bromofenol- tampão de corrida, foram aplicados e fracionados por eletroforese em gel de agarose por 1 hora a 150 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  $\mu$ g/mL, para confirmação da amplificação dos fragmentos alvo.



### VII.11 Clonagem dos amplicons do PPG e identificação de plasmídeos recombinantes.

Após a amplificação da região contendo os alelos do PPG, foram realizadas as suas clonagens utilizando-se o Topo TA Cloning Kit (INVITROGEN Life Technologies, Inc), tendo os amplicons sido inseridos por ligação no plasmídeo PCR 2.1. Para obtenção de um volume final de 10  $\mu\text{L}$ , para cada reação foram adicionados 2 $\mu\text{L}$  do fragmento amplificado, 1 $\mu\text{L}$  de tampão de ligação 10x, 1 $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligase, 2 $\mu\text{L}$  do vetor PCR<sup>®</sup> 2.1 (25 ng/ $\mu\text{L}$ ) e 4 $\mu\text{L}$  de água destilada. A reação foi homogeneizada gentilmente e incubada durante a noite por um período de 12-16 horas, a 14°C, em termoplacas na geladeira.

Seguida a essa incubação, iniciou-se a etapa da transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5- $\alpha$  competentes com os plasmídeos recombinantes. Aliquotas contendo 100 $\mu\text{L}$  de células competentes foram retiradas do estoque (armazenamento a -70°C) e colocadas em gelo. Adicionou-se a essas alíquotas 2 $\mu\text{L}$  do produto da reação de ligação, sendo então incubadas por 30 minutos em gelo. Após esse tempo, essas células passaram por um choque térmico ao serem incubadas por 3 minutos a 42°C em banho-maria e rapidamente transferidas para o gelo por 2 minutos. Após o choque térmico, foram adicionados 200 $\mu\text{L}$  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 ampicilina a 10mg/mL, tendo sido previamente preparada com a mistura de 40 $\mu\text{L}$  de X-gal a 20 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 4 $\mu\text{L}$  de IPTG a 200 mg/mL (INVITROGEN Life Technologies, Inc). A semeadura foi realizada 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 2 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), o que foi seguido de centrifugação a 12.000 g por 1 minuto. Após a remoção do sobrenadante por aspiração, o sedimento bacteriano foi ressuspense 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 rápida, e incubado 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, por 10 segundos em vórtex em uma posição invertida e incubado em gelo por 5 minutos. Então, 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. Passado 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 no tubo, que foi deixado invertido à temperatura ambiente por 10 minutos até a secagem do mesmo. Finalmente o DNA foi ressuspenso em 50µL de tampão de pH 8,0 TE (Tris-EDTA) com RNase A, previamente preparado com as seguintes concentrações: 0,1 mL de tris-ace 1 M; 0,02 mL de EDTA 0,5 M; 10 mL de H<sub>2</sub>O; 0,02 mL de RNAase A a 20 mg/mL (Gibco BRL, division of invitrogen aithersburg, EUA).

A confirmação das clonagens dos alelos do PPG 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 10U/µL (INVITROGEN Life Technologies, Inc) e 5µL de água destilada. As reações foram incubadas 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, aplicados em gel de agarose e fracionados por 1 hora, a 150 volts, em tampão TBE 0,5X. 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 as seguintes especificações: uma banda com aproximadamente 277pb, para os experimentos realizados com o PPG 3 APSSS; uma banda com 364pb para os experimentos realizados com o PPG 3 LRR; uma banda com 300pb para os experimentos realizados com o PPG 4 LRR. Dados compatíveis com os tamanhos dos fragmentos do PPG da *L.(V.)braziliensis* amplificados por PCR.

### **VII.12 Sequenciamento dos fragmentos do PPG clonados.**

Um clone recombinante de PCR 2.1/PPG por isolado de *L.(V.) braziliensis* foi enviado para ser seqüenciado pela Advancing Through Genomics MACROGEN® (Córea). Para identificação dos sítios de restrição, fragmentos clonados e alinhamentos das seqüências do PPG foi utilizado o programa MEGA 5.05®, usando como base para a avaliação, seqüências do PPG de *L.(V.) braziliensis* depositadas no Centro Nacional de Informação Biotecnológica - NCBI (Genbank). Os diferentes alelos do PPG presentes na amostra do estudo foram identificados com base nos polimorfismos detectados nos alinhamentos dos fragmentos clonados.

### **VII.13 Distribuição geográfica dos casos de LTA e alelos do PPG em Corte de Pedra/BA.**

Para avaliação e análise da distribuição geográfica dos diferentes alelos do PPG em Corte de Pedra/BA, foram coletadas as coordenadas cartesianas dos locais de residência dos sujeitos que tiveram suas amostras parasitárias incluídas neste estudo. Uma vez que a maioria dos residentes dessa área endêmica em LTA mora e trabalha em fazendas, bem como devido ao fato da doença freqüentemente ser transmitida no peridomicílio e plantações próximas às moradias, os locais de moradia foram usados como fontes primárias de coordenadas geográficas a serem analisadas, com fins de padronização. Usando-se o sistema de informação geográfica ARCGIS (ESRI inc.), as distribuições dos diferentes alelos de PPG identificados foram avaliadas visualmente. Então nós comparamos as distribuições dos alelos da PPG, empregando o teste geostatístico de Cusick e Edward. Esse teste compara a distribuição de dois grupos de

eventos geográficos (e.g. pares de alelos de um gene) na área estudada. Quando as distribuições entre os grupos são distintas, o  $p < 0,05$ .

#### **VII.14 Análise estatística.**

A distribuição geográfica dos diferentes alelos do PPG em Corte de Pedra empregou o teste geo-estatístico de Cusick e Edward, como descrito logo acima. Associações entre os alelos do PPG e forma de LTA (i.e. LC, LM e LD) foram avaliadas pelo teste exato de Fisher, comparando-se as frequências de cada alelo entre pares de grupos de pacientes (i.e. LC x LM, LC x LD, LM x LD). Então os odds ratios foram calculados com um intervalo de confiança de 95%.

Todas as comparações foram consideradas significantes ao  $p < 0.05$ . As análises geográficas foram realizadas empregando-se o pacote estatístico Cluster Seer (BioMedware, USA). O teste exato de Fisher foi realizado com o pacote estatístico GraphPad Prism<sup>®</sup>.

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Avaliação do polimorfismo entre os fragmentos estudados dos genes PPG 3 e PPG 4, e suas sequências de aminoácidos traduzidos em isolados de *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA.

Foram amplificados e clonados fragmentos dos genes do PPG de 24 isolados de *L.(V.) braziliensis*, obtidos de casos de LTA diagnosticados no posto de saúde de Corte de Pedra entre 2008 e 2011. Três clones de cada fragmento da PPG estudado foram obtidos de cada isolado parasitário. Para isso, empregamos três pares de primers. Para PPG3/LRR foi amplificado um fragmento com uma extensão total de 363 pares de bases. Para PPG4/LRR, foi amplificado um fragmento com uma extensão total de 402 pares de bases. E para PPG3/APSSS foi amplificado um fragmento com uma extensão total de 277 pares de bases. Os clones dos fragmentos da PPG3/APSSS e LRR foram sequenciados e alinhados utilizando como referência a sequência de nucleotídeos da PPG3 “*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 *proteophosphoglycan ppg3* (LBRM 0520)” retirada do banco de dados Genbank, acessado no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> Reference Sequence: XM\_001568115.1. Já os clones dos fragmentos da PPG4/LRR foram sequenciados e alinhados utilizando como referência a sequência de nucleotídeos da PPG4 “*Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 *proteophosphoglycan ppg4*(LBRM0540)” retirada do banco de dados Genbank, acessado no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/> Reference Sequence: XM\_001568117.2.

Da PPG3/LRR, foram analisadas 22 sequências de DNA provenientes dos fragmentos clonados. Sendo 8 de LC, 6 de LD e 8 de LM. As sequências apresentaram-se altamente conservadas nos segmentos de DNA analisados. Dentre as 22 sequências de nucleotídeos analisadas, foi observada a presença de dois alelos distintos,

predominantes na região de Corte de Pedra. Os alelos foram identificados pela troca da base nucléica adenina por timina, na posição 1605 do alinhamento (Figura 3).

A proteína PPG 3 utilizada como referência apresenta 3041 pares de bases, e traduzida, 1013 aminoácidos. O nosso fragmento amplificado estende-se da posição 438 a 558 da proteína de referência traduzida. Sendo assim, o fragmento PPG3/LRR amplificado dos isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA contém 120 aminoácidos. O peptídeo traduzido a partir de ambos os alelos da PPG 3/LRR apresentou na posição 535, uma isoleucina (Figura 4), indicando que o polimorfismo na posição 1605 dos genes é silencioso.

As análises da PPG4/LRR foram realizadas com 14 sequências de DNA provenientes dos fragmentos clonados. Desta forma, foram 7 de LC, 5 de LD e 2 de LM. As sequências apresentaram-se altamente conservadas nos segmentos de DNA analisados. Dentre as 14 sequências de nucleotídeos analisadas, foi observada a presença de dois alelos distintos, predominantes na região de Corte de Pedra. Os alelos foram identificados pela troca da base nucléica adenina por guanina, na posição 286 do alinhamento (Figura 5).

A proteína traduzida utilizada como referência apresenta 5385 aminoácidos. O nosso fragmento amplificado estende-se da posição 1195 a 1326 da proteína de referência. Sendo assim, o PPG4/LRR amplificado dos isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA contém 131 aminoácidos. Os peptídios traduzidos a partir de ambos os alelos PPG 4/LRR apresentaram na posição 96, dois aminoácidos diferentes; uma treonina e uma alanina (Figura 6).

As análises da PPG3/APSSS foram realizadas com 24 sequências de DNA provenientes dos fragmentos clonados. Desta forma, foram 8 de LC, 8 de LD e 8 de LM. As sequências se mostraram bastante polimórficas quando foram alinhadas. Contudo, 9 sequências (5 de LD e 4 de LM), apresentaram-se altamente conservadas

nos segmentos de DNA analisados, as quais consideramos de fato correspondentes ao segmento PPG3/APSSS estudado, consideramos as demais sequências artefatos da clonagem. Dentre essas 9 sequências de nucleotídeos analisadas, foi observada a presença de um único alelo predominante na região de Corte de Pedra (Figura 7).

A proteína traduzida utilizada como referência apresenta 1013 aminoácidos. O nosso fragmento amplificado estende-se da posição 8 a 122 da proteína de referência. Sendo assim, o PPG3/APSSS amplificado dos isolados de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA contém 114 aminoácidos (Figura 8).









## VIII.2 Comparação entre as sequências dos genes e peptídeos traduzidos dos fragmentos de PPG 3 e PPG 4 encontrados na *L. (V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA e aquelas obtidas de outras espécies de *Leishmania* depositadas no Genbank.

Os alelos referentes às sequências da PPG3 encontrados em Corte de Pedra foram alinhados com as sequências retiradas do banco de dados Genbank, acessado no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Seguem as referências das sequências comparadas: *L. (V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 *proteophosphoglycan ppg3* (LBRM 0520) Reference Sequence: XM\_001568115.1.; *L.(V.) panamensis ppg3* XM\_010704170.1, *L.(L.) mexicana* MHOM/GT/2001/U1103 *ppg3* Reference Sequence: XM\_003879003.1; *L.major ppg3*(LMJF\_35\_0500) Reference Sequence: XM\_003722399.1; *L.infantum* JPCM5 *ppg3* Reference Sequence: XM\_003392744.1; e *L. donovani . ppg3*, (LDBPK\_350500) Reference Sequence: XM\_003864595.1.

A PPG3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA apresentou alto grau de conservação entre os seus alelos A e B, com 98,07% de posições conservadas e 1,93% de posições polimórficas (i.e. 7 polimórficos / 356 conservados). No alinhamento com a sequência padrão para a *L.(V.) brasiliensis*, extraída do genbank, encontrou-se 99,45% de conservação e 0,55% de posições polimórficas para o alelo B (i.e. 2 polimórficos / 361 conservados), e para o alelo A, 99,17% de posições conservadas e 0,83% polimórficas (i.e. 3 polimórficos / 360 conservados).

No alinhamento dos alelos do PPG3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA com aquelas sequências depositadas para outras espécies no Genbank temos um alto grau de conservação, mantido em torno de 97% a 98% em relação à *L.(V.) braziliensis* e à *L.(V.) panamensis*. O grau de polimorfismo encontrado nestas comparações variou entre 0,55% e 2,75%. Para os alelos da *L.(V.) braziliensis* de CP

comparados com a *L.(L.) mexicana*, a *L.major*, e a *L.infantum*, o grau de conservação encontrado variou de 73% a 76% e o grau de polimorfismo encontrado variou de 23% a 26%. Já a *L.donovani*, apresentou 44,36% de conservação em relação ao alelo B e 62,54% em relação ao alelo A da *L.(V.) braziliensis* de CP. Portanto, seu polimorfismo em relação a esses alelos foi de 37% e 55%. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Grau de conservação do PPG3/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania*.

Espécies de <i>Leishmania</i>	Grau de conservação em relação à <i>L.(V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra/BA	
	ALELO A	ALELO B
<i>L.(V.) braziliensis</i> (LBRM (MHOM/BR/M2904)	99,17%	99,45%
<i>L.(V.) panamensis</i>	97,25%	98,08%
<i>L.(L.) mexicana</i>	73,83%	74,94%
<i>L.major</i>	74,40%	74,66%
<i>L.infantum</i>	74,94%	76,04%
<i>L.donovani</i>	62,54%	44,36%

Os alelos referentes às sequências da PPG4/LRR encontrados em Corte de Pedra/BA foram alinhados com as sequências retiradas do banco de dados Genbank, acessado no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Seguem as referências das sequências comparadas: *L.(V.) braziliensis* MHOM/BR/75/M2904, *ppg4* (LBRM 0540) Reference Sequence: XM\_001568117.2, *L.(V.) panamensis* *ppg4*: XM\_010704171.1, *L.major* *ppg4*(LMJF\_35\_0520) Reference Sequence: XM\_003722400.1,; *L.infantum* JPCM5 *ppg4* Reference Sequence: XM\_001468831.2; e *L.donovani* .*ppg4*, (LDBPK\_350490) Reference Sequence: XM\_003864594.1.

A PPG4/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA apresentou um alto grau de conservação entre os seus alelos A e B; 98,25% de posições conservadas e

1,75% de posições polimórficas (i.e. 7 polimórficas / 395 conservadas). Contudo, no alinhamento com a sequência padrão para a *L.(V.) braziliensis*, extraída do genbank, encontrou-se 52% de conservação e 48% de posições polimórficas, tanto para o alelo A, quanto para o alelo B. Para as comparações entre as *L.(V.) braziliensis* e as espécies *L.(V.) panamensis*, *L. major*, *L.infantum* e *L donovani*, foi visto um padrão de conservação variável em torno de 39% a 54% e o grau de polimorfismos variou entre 45% e 60% (Tabela 2).

**Tabela 2.** Grau de conservação do PPG 4/LRR de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania*.

Espécies de <i>Leishmania</i> Genbank	Grau de conservação em relação à <i>L.(V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra/BA	
	ALELO A	ALELO B
<i>L. (V.)braziliensis</i> (LBRM (MHOM/BR.M2904)	51,49%	52,00%
<i>L.(V.) panamensis</i>	47,11%	47,11%
<i>L.major</i>	39,76%	50,48%
<i>L.infantum</i>	52,26%	54,40%
<i>L. donovani</i>	51,53%	51,06%

Os alelos referentes às sequências da PPG 3/APSSS encontrados em Corte de Pedra foram alinhados com as sequências retiradas do banco de dados Genbank, acessado no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>. Seguem as referências das sequências comparadas: *L. (V.)braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 *proteophosphoglycan ppg3* (LBRM 0520) Reference Sequence: XM\_001568115.1.; *L.(V.) panamensis* ppg3 XM\_010704170.1, *L.(L.)mexicana* MHOM/GT/2001/U1103 ppg3 Reference Sequence: XM\_003879003.1; *L.major* ppg3(LMJF\_35\_0500) Reference Sequence: XM\_003722399.1; *L.infantum* JPCM5

ppg3 Reference Sequence: XM\_003392744.1; e *L. donovani* . ppg3, (LDBPK\_350500) Reference Sequence: XM\_003864595.1.

A PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA apresentou um alto grau de conservação entre os seus alelos; 99,70% de posições conservadas e 0,30% de posições polimórficas (i.e. 1 polimórfico / 342 conservados). Contudo, no alinhamento com a sequência padrão para a *L.(V.) braziliensis*, extraída do genbank, encontrou-se 29,45% de conservação e 70,55% de posições polimórficas. Para as comparações entre as *L.(V.) braziliensis* e as espécies *L.(V.) panamensis*, *L. major*, *L.infantum* e *L donovani*, foi visto um padrão de conservação variável em torno de 39% a 45% e o grau de polimorfismos variou entre 54% e 60% (Tabela 3).

**Tabela 3.** Grau de conservação do PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* de Corte de Pedra/BA, em relação a outras espécies de *Leishmania*.

Espécies de <i>Leishmania</i> Genbank	Grau de conservação em relação à <i>L.(V.) braziliensis</i> de Corte de Pedra/BA	
	ÚNICO ALELO	
<i>L. (V.) braziliensis</i> (LBRM (SIROM/BR/M2904)	29,45%	
<i>L.(V.) panamensis</i>	43,77%	
<i>L.(L.) mexicana</i>	45,19%	
<i>L. major</i>	44,03%	
<i>L. infantum</i>	43,55%	
<i>L. donovani</i>	39,36%	

### VIII.3 Identificação dos cromossomos em que os *loci* do PPG 3 e 4 de *L.(V.) braziliensis* estão localizados.

O blast realizado com as sequências dos fragmentos de PPG 3 e PPG 4 naquelas observadas para os cromossomos da *L.(V.)braziliensis* depositadas no site do instituto sanger (<http://www.sanger.ac.uk/>) confirmou que ambos os genes localizam-se no cromossomo 34 do parasito (Montgomery, J. et al. 2000).

### VIII.4 Associação entre alelos do PPG 3 e PPG 4 e forma clínica da LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

Os dados nas tabelas 4, 5 e 6 revelam que não foram detectadas associações entre os alelos de PPG 3/LRR, PPG 4/LRR e PPG 3/APSSS encontrados em Corte de Pedra/BA e risco aumentado para LC, LM ou LD (i.e.  $p > 0,05$  ao teste exato de Fisher). Contudo, o tamanho amostral empregado neste estudo pode ter sido um fator de impedimento para a detecção de possíveis associações.

**Tabela 4.** Associação dos alelos (A e B) do PPG 3/LRR entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LC, LD e LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

Alelos PPG 3 / LRR	OR LC	p LC	OR LD	p LD	OR LM	p LM
<b>A</b>	0,875	0,6111	1,333	0,5555	0,875	0,6111
<b>B</b>	1,143	0,6111	0,75	0,5555	1,143	0,6111



**Tabela 5.** Associação dos alelos (A e B) do PPG 4/LRR entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LC, LD e LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

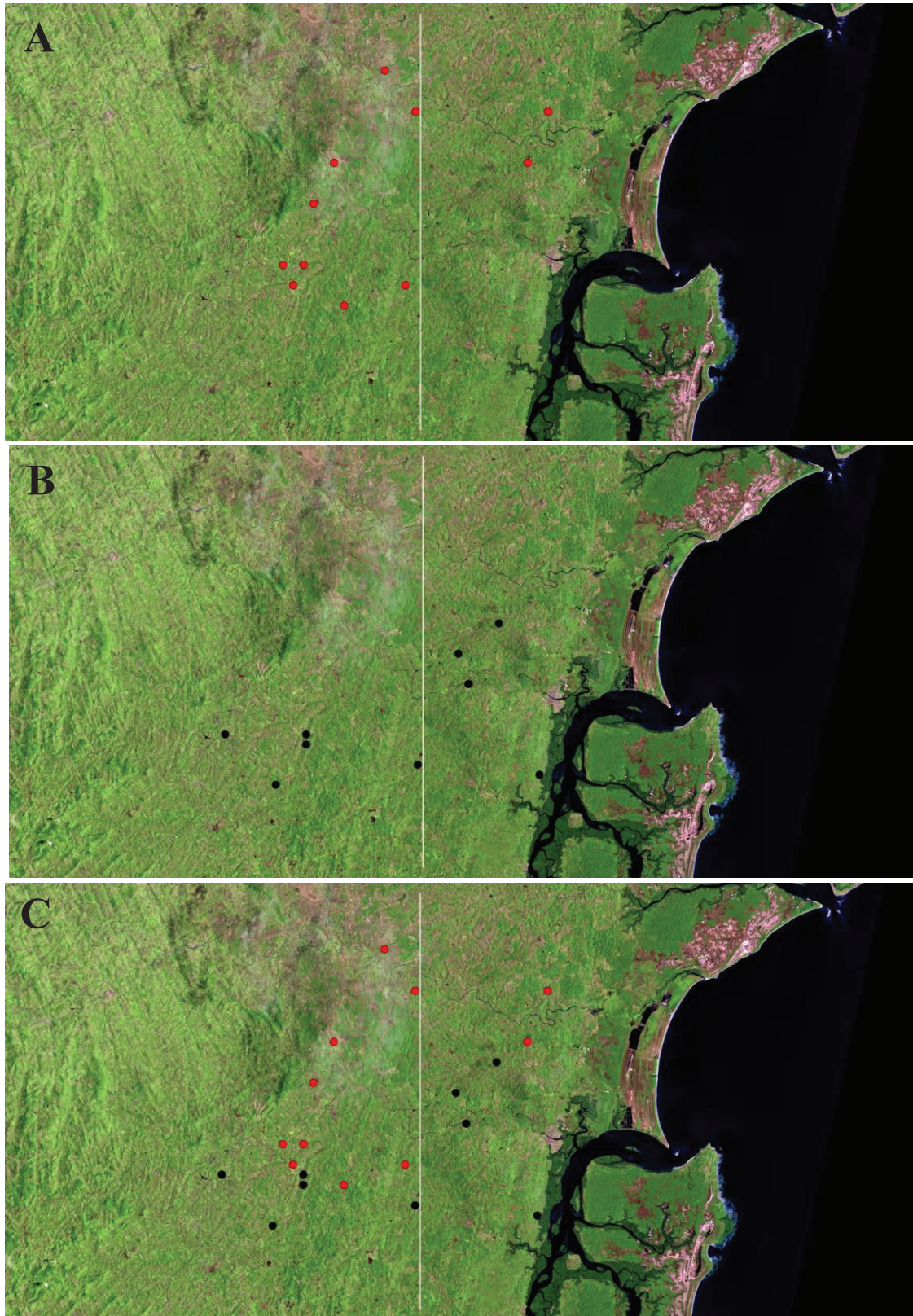
Alelos PPG 4 / LRR	OR LC	p LC	OR LD	p LD	OR LM	p LM
<b>A</b>	0,4	0,3186	1	0,69	4	0,2882
<b>B</b>	7	0,0767	0,3571	0,31	0,25	0,2882

**Tabela 6.** Associação dos alelos do PPG 3/APSSS entre as diferentes formas clínicas de LTA (i.e. LD e LM) causadas pela *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.

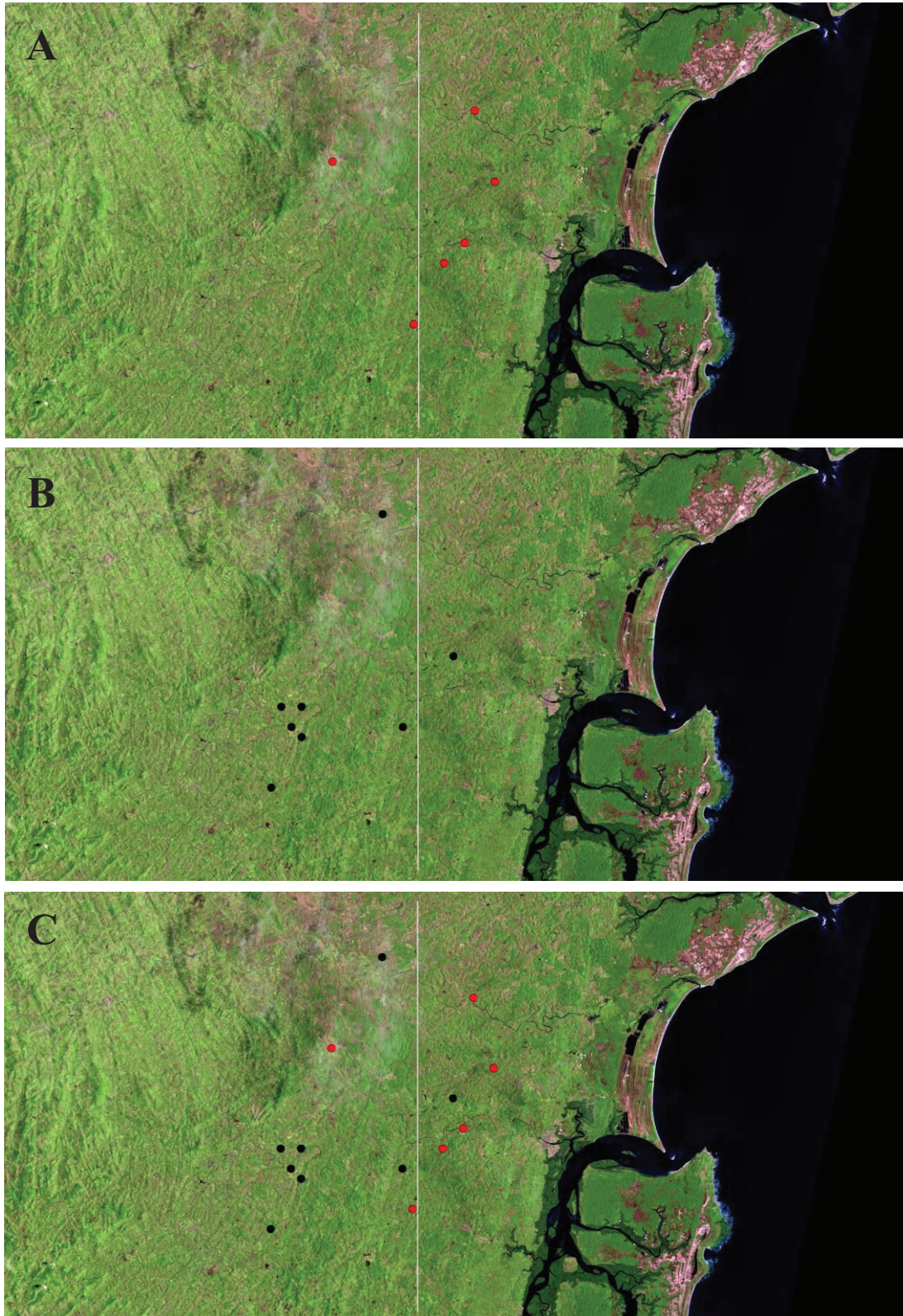
Alelos PPG3 / APSSS	OR LD	p LD	OR LM	p LM
<b>ALELO ÚNICO</b>	1,667	0,5000	0,6000	0,5000

### **VIII.5 Análise da distribuição geográfica dos alelos do PPG 3 e 4 de *L. (V.) braziliensis* em Corte de Pedra/BA.**

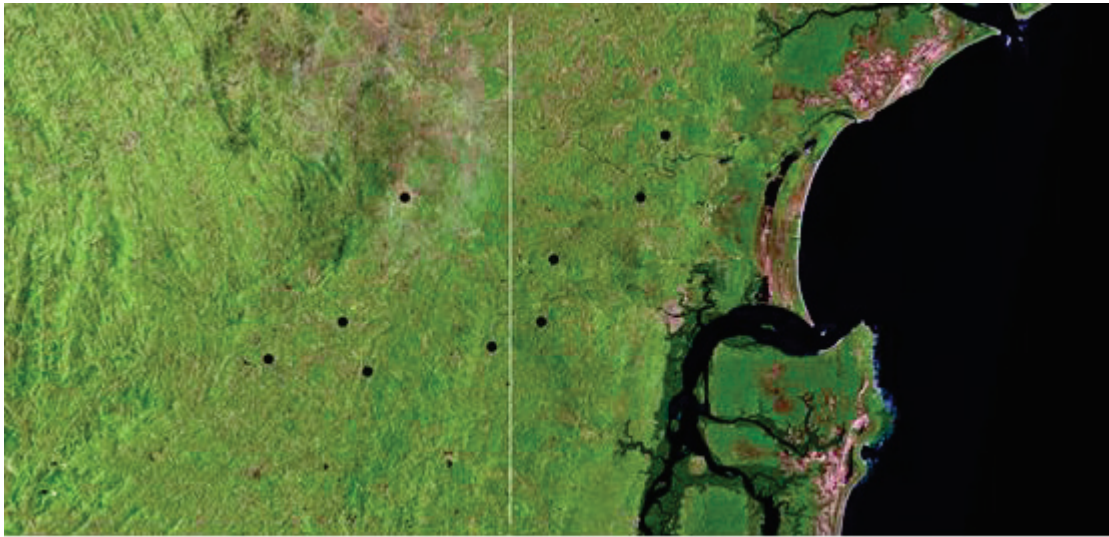
As distribuições geográficas dos diferentes alelos do PPG 3/LRR, PPG 4/LRR e PPG 3/APSSS da *L. (V.) braziliensis*, isolados de casos de LTA entre os anos 2008 e 2011 em Corte de Pedra/BA, estão dispostas nas figuras 9, 10 e 11. O teste de Cusick e Edward, para comparação geo-estatística da distribuição dos pares de grupos de eventos geográficos na área estudada não mostrou diferenças significativas entre os grupos. Podemos observar uma ampla distribuição dos pares de alelos para cada segmento avaliado. Uma grande sobreposição de alelos homólogos pode ser observada a despeito do pequeno tamanho da amostra. Todos os alelos puderam ser detectados tanto na área interna quanto na costeira de CP.



**Figura 9.** Vista satélite da distribuição espacial dos diferentes alelos do PPG 3/LRR de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA em Corte de Pedra/BA. (A) Os pontos em vermelho indicam a distribuição geográfica dos alelos A na área endêmica de CP. (B) Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos B na área endêmica de CP. (C) Os pontos vermelho e preto indicam as distribuições geográficas dos alelos A e B na área endêmica de CP, além de sobreposições entre os alelos em pontos da área endêmica de CP. A Linha vertical divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.



**Figura 10.** Vista satélite da distribuição espacial dos diferentes alelos do PPG 4/LRR de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA de Corte de Pedra/BA. (A) Os pontos em vermelho indicam a distribuição geográfica dos alelos A, na área endêmica de CP.(B) Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos B na área endêmica de CP. (C) Os pontos vermelho e preto indicam as distribuições geográficas dos alelos A e B na área endêmica de CP, além de sobreposições entre os alelos em pontos da área endêmica de CP. A Linha vertical divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.



**Figura 11.** Vista satélite da distribuição espacial do único alelo identificado do PPG 3/APSSS de *L.(V.) braziliensis* entre os anos 2008 e 2011 na área endêmica para LTA em Corte de Pedra/BA. Os pontos em preto indicam a distribuição geográfica dos alelos na área endêmica de CP. A Linha vertical divide a região em interior (à esquerda) e costeira (à direita); áreas de tamanhos semelhantes.

## XIX. DISCUSSÃO

Na Bahia, a região de Corte de Pedra (CP) é reconhecida como área endêmica para *L.(V.) braziliensis* (Jirmanus et al 2012). Este parasita é associado a um amplo espectro de manifestações clínicas que variam de lesões cutâneas simples, que podem curar-se espontaneamente, até lesões mais invasivas e destrutivas das mucosas (Grimaldi Jr G et al, 1993; Saravia N et al, 1985).

As pesquisas desenvolvidas pelo grupo do SIM – HUPES em CP investigam as variações genéticas entre os parasitas da região para tentar estabelecer relação com o espectro da LTA, bem como compreender melhor a biologia do microrganismo. Em parte, esses estudos buscam elaborar métodos eficazes de prevenção e intervenções terapêuticas da LTA.

Chang et al. definiram virulência como a capacidade que um microorganismo tem de causar determinada patogenicidade em um sistema, sob condições normais de imunidade. Eles apontaram produtos de superfície, secretados e de invasão como fatores moleculares determinantes, que estão envolvidos no estabelecimento da infecção, na sobrevivência do parasita, e na patogenicidade em infecções por *Leishmania* sp. (Chang et al, 2003) .

O PPG é uma proteína de superfície da *Leishmania* que tem sido descrita como importante na transmissão, invasão e subsequente sobrevivência intracelular de parasitas. (Samant. M., et al., 2007; Ilg. T., et al., 1998). O presente estudo descreveu alelos do PPG detectados na área endêmica para LTA, em Corte de Pedra, Bahia. Através do alinhamento das sequências de DNA do PPG da *L.(V.) braziliensis* detectamos alguns polimorfismos com troca de bases nucleicas. Contudo, foi marcante a alta similaridade dos alelos da PPG quando eles foram comparados entre si e com as

sequências dos genes e peptídeos traduzidos de outras espécies de *Leishmanias*, depositadas no Genbank. Isso nos revelou um padrão conservado dos alelos da PPG numa área de endemicidade natural dos parasitas da *Leishmania* sp.

Os distintos domínios do PPG, um constituído de repetições ricas em leucina (LRR), o outro formado por uma cadeia de aminoácidos repetitivos, rica em serina, alanina e prolina (APSSS), estão envolvidos em interações proteína-proteína, transdução de sinal, ligação e adesão aos macrófagos e indução a infectividade (Girardin SE et al, 2002; Kobe B et al, 1995; Kedzierski. L., et al, 2004, Montgomery, J. et al. 2000; Ilg. T., et al., 1999; Rogers. M., et al, 2012). Além disso, tem sido mostrado que eles inibem a expressão de citocinas imunoregulatórias (Pianini. A., et al, 1999) e ligam-se aos macrófagos através de receptores específicos (Talamas P. et al, 1989). Os PPGs ricos em leucina formam um grupo de moléculas estruturalmente e funcionalmente relacionados, que participam na organização da matriz extracelular e têm efeitos importantes sobre o comportamento celular (Hocking et al., 1998).

Estudo com mapeamento de domínios conservados mostraram o papel da leishmanolisina na ligação e internalização de parasitas às células hospedeiras. Foi observado que os peptídeos presentes em dois domínios conservados da proteína de diferentes espécies de *Leishmania* são capazes de uma atividade inibitória eficiente a internalização de promastigotas in vitro por modificar a cinética da interação entre as moléculas do parasita e as presentes na linhagem celular humana empregada (Puentes et al, 1999). Esses dados indicam que a inibição dessas interações moleculares pode causar prejuízo à interação parasito-hospedeiro. Isso pode se constituir numa estratégia na busca de imunógenos (Peacock C. et al, 2007; Puentes et al, 1999), que podem ser utilizados como subunidades em reagentes de imunoprofilaxia contra LTA.

Estudos do papel da saliva do vetor no processo de transmissão da *Leishmania* mostraram a capacidade de aumento do potencial de infectividade da saliva dos

flebótomos que contêm PPGs filamentosos (Titus RG., et al, 1988). A otimização provocada pelo gel da secreção salivar que apresenta os proteofosfoglicanos no repasto sanguíneo, também facilita a inoculação e entrada do parasito no hospedeiro (Volf. P., et al, 2004; Rogers M., et al, 2004; Peters. NS., et al, 2008). A quantidade de PSG regurgitada e inoculada pelos flebotomíneos é proporcional ao grau de infecção e ao número de parasitas transmitidos aos hospedeiros. Existem evidências que o PSG module a atividade interna dos macrófagos e a síntese de substratos essenciais para o crescimento intracelular da *Leishmania* (Rogers. M., et al, 2009), contribuindo para a virulência do parasito e potencialização da infecção da *L.(V.)braziliensis* (Ilg. T., et al, 2000; Kavosi. G., et al, 2008; Montgomery. J., et al 2002).

Tem sido proposto que componentes da saliva de flebotomíneos, os proteofosfoglicanos, podem ser candidatos a uma vacina contra leishmaniose (Kamhawi, S., et al, 2000, Elnaien DE., 2005, Valenzuela JG, et al, 2001). Alvos que propiciem a desorganização do inóculo infeccioso seria uma alternativa no rompimento do ciclo de transmissibilidade do parasita. Nesse sentido, o PPG tem sido apontado como bom candidato a emprego como imunoprolático contra a LTA (Peacock et al, 2007). O nosso estudo corrobora esse dado, devido ao elevado grau de conservação encontrado na sua porção protéica numa área de transmissão natural de *Leishmania* sp.

As análises realizadas com o PPG3/LRR revelaram a presença de alelos bem conservados, identificados pela troca da base nucleica adenina por timina, contudo a proteína traduzida nos mostrou ao alinhamento dos aminoácidos, que não houve mudanças no códon, tendo sido visto a formação de um único aminoácido, uma isoleucina, um polimorfismo silencioso. Para estabelecer o grau de conservação da porção proteica, usamos a sequência da *L.(V.)braziliensis* de outra área endêmica com a finalidade de conhecer o espectro de cobertura que um agente imunoprolático pode alcançar. Também encontramos uma alta similaridade destas sequências. Avaliamos



também o PPG4/LRR e observamos a presença de alelos bem conservados na região, porém sem identidade com a sequência padrão disponível no Genbank, o que não nos sugere que possa ser usado para um reagente de imunoprofilaxia de ampla cobertura.

As análises realizadas com o PPG3/APSSS foram feitas com 24 sequências de DNA provenientes dos fragmentos clonados. Desta forma, foram 8 de LC, 8 de LD e 8 de LM. As sequências se mostraram bastante polimórficas, tanto quando foram alinhadas entre si, quanto quando foram alinhadas com a sequência padrão para *L.(V.) braziliensis*, obtida no Genbank. Contudo, 9 sequências; 5 provenientes de LD e 4 de LM, apresentaram um alto grau de conservação nos segmentos de DNA analisados, quando comparadas entre si. Estas 9 sequências apresentam de forma bem definida a formação de um alelo na região de CP, porém, a presença de apenas 1 posição polimórfica com um único nucleotídeo e tradução para um único aminoácido diferentes, parece ser a formação de um outro alelo na região. Entretanto não podemos afirmar, devido às perdas provenientes dos sequenciamentos de DNA. Apesar deste alelo encontrado na região ter apresentado uma marcante similaridade dos alelos, esta homologia não se manteve quando comparamos com a sequência padrão para *L.(V.) braziliensis* proveniente de outra área endêmica. Todos os alelos puderam ser detectados tanto na área interna quanto na costeira de CP.

Apesar do domínio APSSS da proteína PPG, ser bastante glicosilado, tendo os seus açúcares, sido descrito como um importante ligante celular (Ilg T et al, 1992; Kelleher M. et al, 1992), esses componentes podem ser alvos candidatos que propiciem o bloqueio da imunoadesão dos parasitos aos macrófagos.

Foi feito um blast das nossas sequências no genoma da *Leishmania.sp*, disponível no site do instituto Sanger e confirmamos que ambos os genes PPG 3 e PPG 4, estão localizados no cromossomo 34 do parasito, obtivemos então, a confirmação da conservação do gene ao nível do genoma.

Em relação à análise da distribuição geográfica dos alelos do PPG na área endêmica de Corte de Pedra, não avaliamos distâncias, avaliamos apenas a distribuição dos alelos encontrados, estes se mostraram amplamente distribuídos nas áreas internas e costeiras de CP. Em análises futuras, poderemos aumentar o número amostral para então avaliar mais precisamente se há diferença estatística na distribuição geográfica entre esses alelos. Também, observamos que o valor atribuído ao “p” nas nossas análises estatísticas, foi  $p > 0,05$ , não sendo possível detectar associações significativas entre alelos da PPG e forma clínica da doença. Isso não nos surpreendeu, dado o papel do PPG muito mais no estabelecimento da infectividade do parasito durante sua inoculação no hospedeiro, do que ao longo do processo infeccioso estabelecido no indivíduo infectado.

Nosso estudo representa um passo importante na proporção do emprego do PPG como alternativa de subunidade em imunógenos de imunoprofilaxia contra LTA. O elevado grau de conservação encontrado na porção protéica do PPG numa área de endemicidade natural de *L. (V.) braziliensis*, e entre diferentes espécies cujas sequências estão depositadas no genbank, sugere que a imunidade ao PPG seja de ampla cobertura, não sendo necessária modificação desse componente do reagente, quando ele for empregado em diferentes áreas endêmicas. É importante lembrar que além da imunogenicidade, facilidade de administração e eficácia, uma característica que tem sido estimulada pela OMS é a capacidade de ampla cobertura dos imunoprofiláticos em desenvolvimento.

## **X- PERSPECTIVA DE ESTUDO**

Avaliar a capacidade inibitória de anticorpos anti PPG sobre a infecção de macrófagos humanos por *L. (V.) braziliensis* in vitro.

## XI. CONCLUSÕES

1. Os segmentos gênicos PPG 3/LRR apresentam-se altamente conservados na *L.(V.) braziliensis* isolada de pacientes com LTA na área endêmica de Corte de Pedra/BA, e em relação às outras espécies do parasita.
2. O PPG 3/LRR é candidato a emprego como subunidade em um reagente de imunoprofilaxia contra LTA.
3. Os seguimentos gênicos PPG 3/APSSS e PPG 4/LRR apresentaram alta conservação na área de transmissão natural do parasita, Corte de Pedra-BA, contudo provaram ser bastante polimórficos em comparação com outras espécies, o que os torna candidatos menos prováveis para uso em um reagente de imunoprofilaxia a contra LTA.
4. Foram encontradas variações polimórficas, com trocas de nucleotídeos, nos fragmentos da PPG3/LRR, PPG4/LRR e PPG 3/APSSS das três formas clínicas (LC, LD e LM), contudo sem associação com forma clínica da LTA.
5. Os cinco alelos (A / B do PPG3/LRR; A / B do PPG4/LRR e único alelo do PPG3/APSSS), apresentam-se amplamente distribuídos na área endêmica de Corte de Pedra/BA.

## XII. SUMMARY

### EVALUATION OF THE PROTEOPHOSPHOGLYCAN POLYMORPHISM OF GENE IN A NATURAL POPULATION *Leishmania (V.) braziliensis*.

**Background:** The *Leishmania (viannia) braziliensis* is the main causative agent of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL). Leishmaniasis are diseases with cause disfiguring outcomes often fatal. Clinical forms most often caused by *L.(V.) braziliensis* are: cutaneous leishmaniasis (CL) , mucosal leishmaniasis (ML) and disseminated leishmaniasis ( LD) . The Proteophosphoglicano ( PPG) is a surface glycoprotein of *Leishmania spp.*, Which has been described as an important component in transmission and subsequent invasion of the host cell macrophages. **Objective:** To evaluate the polymorphism of the gene encoding the PPG protein in parasites of a natural population of *L. (V.) braziliensis*, which causes american tegumentary leishmaniasis (ATL). **Methods:** We are describing alleles PPG detected in endemic area for LTA in Corte de Pedra, Bahia. Twenty-four isolates of *L.(V.)braziliensis* from patients with ATL were obtained for DNA extraction. Fragments of about 400 base pairs from the loci PPG3 and 4 were amplified by PCR, cloned into plasmid (PCR II Invitrogen Inc.) and sequenced by the Sanger method. Alleles were aligned using as a reference PPG sequences deposited in GenBank database. Based on these sequences, we determined the haplotype polymorphisms, i.e., the alleles in PPG loci present in each isolate. **Results** Although polymorphic positions have been found, the most of the sequences evaluated so far shown to be highly conserved in the genes of PPG compared, with large spatial geographic distribution of alleles in the endemic area of Corte de Pedra. We found no significant associations between alleles of PPG and clinical forms of the disease, due to the role of PPG more active at the beginning of infection than in the dermal tropism of LTA. **Conclusion:** The PPG gene shown to be highly conserved in *L. (V.) braziliensis* of Corte de Pedra, Bahia, suggesting that it can be used broadly as a subunit reagents aimed to block the transmission of the parasite to the host .

**Key words:** 1. *Leishmania spp* .; 2. American Tegumentary Leishmaniasis ; 3. *Leishmania (V.) braziliensis* ; 4. Proteophosphoglycan ; 5. Polymorphism.

### XIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accioly, MC; Amanda Ferreira de Almeida; Andresa Pereira de Oliveira; Marina de Assis-Souza; Lucas Ferreira da Rocha; Valéria Rêgo Alves Pereira; Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology* 279 (2012) 180–186

Aguilar-Be. et al., 2005. Cross-protective efficacy of a prophylactic *Leishmania donovani* DNA vaccine against visceral and cutaneous murine leishmaniasis. *Infect Immun.* 73: 812–9.

Alexander J., Vickerman K., 1975. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *Journal Protozool.* 22: 502–508.

Araújo, M.S., de Andrade, R.A., Sathler-Avelar, R., Magalhães, C.P., Carvalho, A.T., Andrade, M.C., Campolina, S.S., Mello, M.N., Vianna, L.R., Mayrink, W., Reis, A.B., Malaquias, L.C., Rocha, L.M., Martins-Filho, O.A., 2011. Immunological changes in canine peripheral blood leukocytes triggered by immunization with first or second generation vaccines against canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141-164.

Arana BA, Navin TR, Arana FE, Berman JD, Rosenkeimer F, 1994. Efficacy of a short course (10 days) of high-dose meglumine antimoniate with or without interferon- in treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Clin Infect Dis* 18: 381–384.

Antoine J.C., Jouanne C., Ryter A., Zilberfarb V., 1987. *Leishmania mexicana*: a cytochemical and quantitative study of lysosomal enzymes in infected rat bone marrow-derived macrophages. *Exp. Parasitol.* 64: 485–498.

Antoine J.C., Prina E., Jouanne C., Bongrand P., 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* 58: 779–787.

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

Azulay, R. D., R. e D. Azulay Junior. 1995. Imuno-clínico-patológico espectro de leishmaniose. *Int. J. Dermatol.* 34:303-307.

Ashford RW. The leishmaniasis as model zoonoses. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 693–701.

Ashford RW. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 523–32.

BJ Cref, TC Jones, R Badar, D Sampaio, R Teixeira, WDJ Johnson Desnutrição como fator de risco para a leishmaniose visceral grave *J Infect Dis*, 156 (1987), pp. 1030-1033

Bacellar, O., D'Oliveira, A., Jeronimo, S., E.M.Carvalho., 2000. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 8:1228-31.

Basano, S.A.; Camargo L.M.A., 2004. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Leishmaniose tegumentar americana*, Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, N° 3.

Basu R, et al. 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 174(11): 7160–71.

Berman, J.D., 1997. 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): 684-703.

Brittingham A., Mosser D.M., Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes, *Parasitol. Today* 12 (1996) 444–447

Burns JM Jr, et al. 1991. Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. *J Immunol.* 146(2):742–8.

Borja-Cabrera GP, et al. 2010. Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. *Vaccine.* 28(3): 597–603.

Bertholet S, et al. 2009. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. *Vaccine.* 27(50): 7036–45.

Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(20): 3231–40.

Coler RN, et al. 2007. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. *Infect Immun.* 75(9): 4648–54.

Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 56: 315-25.

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.* 1995 Sep;53(3):273-7.

Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, et al, 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol.* 135:4144-8.

Cox FEG, 1993. editor. *Modern parasitology: a textbook of parasitology.* Oxford: Blackwell Science.

Costa, J. M., P. D. Marsden, E. A. Llanos-Cuentas, E. M. Netto, E. M. Carvalho, A. Barral, A. C. Rosa, C. C. Cuba, A. V. Magalhaes, and A. C. Barreto. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* 89: 319-23.

Colin D. Mathers<sup>1</sup>, Majid Ezzati<sup>2</sup>, Alan D. Lopez<sup>3</sup> Measuring the Burden of Neglected Tropical Diseases: 2007. *The Global Burden of Disease Framework*

Coler RN, Skeiky YA, Bernards K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, et al. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-Cell antigens thiol-specific antioxidant, Leishmania major stress-inducible protein 1, and Leishmania elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun* 2002;70(8):4215–25.

Carrera L., Gazzinelli R.T., Badolato R et al., 1996, Leishmania promastigotes selectively inhibit Interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice, *J. Exp. Med.* 183: 515–26.

Cabello PH, Lima AMVMD, Azevedo ES, Krieger H. Familial aggregation of Leishmania chagasi infection in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52:364–365.

Chang KP. 2003. Leishmania modelo de virulência microbiana: a relevância da multiplicação do parasita e pathoantigenicity *Acta Trop.*, 85 (2003), pp 375-390

Charest H, Matlashewski G. Developmental gene expression in *Leishmania donovani*: differential cloning and analysis of an amastigote-stage-specific gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:2975–84.

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

Darrah PA, et al. 2007. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. *Nat Med.* 13(7): 843–50.

Dantas-Torres. 2006. F. Leishmania infantum versus Leishmania chagasi: do not forget the law of priority. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Feb;101(1): 117-8; discussion 8.

Davidson RN. 1997. AIDS and leishmaniasis. *Genitourin Med.* 73: 237–39.

David CV. and Craft N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy.* vol. 22: 491–502.

Depledge, DP et al . 2007. Uma base de dados de repetições de aminoácidos presentes em patógenos eucarióticos inferiores . *BMC Bioinformatics* Vol.8, p.122.

Desjeux P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clin Dermatol* 1996; 14: 417–23.

Desjeux P. et al., 1999. Aspects de Santé Publique et lutte. In: DEDET, J. P. Les Leishmanioses. Paris: AUPELF-UREFF-Ellipses, p.219-238.

Desjeux P The increase in risk factors for the leishmaniasis Worldwide *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 95 (2001), pp. 239–243

Desjeux P. et al., 2004. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*; 27: 305–18.

Duthie, M. S., et al.,2012. The Development and Clinical Evaluation of Second-Generation Leishmaniasis Vaccines. *Vaccine* 5; 30(2): 134–141.

Elnaien DE, Meneses C, Slotman M, Lanzaro GC. 2005. Genetic Variation in the sand fly salivary protein, SP-15, a potential vaccine candidate against Leishmania major, *Insect Mol Biol.* 14: 145-50.



Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, et al., 1997. In vitro e in vivo da resistência de *Leishmania infantum* para antimoniatos de meglumina: um estudo de 37 cepas coletadas de pacientes com leishmaniose visceral. *Agentes Antimicrobiano Chemother.* 41: 827 – 30.

Fernandes AP., Míriam Maria Silva Costa b, Eduardo Antônio Ferraz Coelho, Marilene Suzan Marques Michalickc, Eloísa de Freitas c, Maria Norma Meloc, Wagner Luiz Tafuri d, Daniela de Melo Resendeb, Vinícius Hermonte, Christiane de Freitas Abrantese, Ricardo Tostes Gazzinellib. 2008. Protective immunity against challenge with *Leishmania (Leishmania) chagasi* in beagle dogs vaccinated with recombinant A2 protein. *Vaccine* 26 (2008) 5888–5895

Genest PA., Anass Haimeur , Danielle L'égar'é Denis Sereno, Ga'etan Roy, Nadine Messier, Barbara Papadopoulou, Marc Ouellette, 2008. A protein of the leucine-rich repeats (LRRs) superfamily is implicated in antimony resistance in *Leishmania infantum* amastigotes. *Molecular & Biochemical Parasitology* 158 (2008) 95–99.

Girardin, S. E., P. J. Sansonetti, and D. J. Philpott. 2002. Intracellular vs extracellular recognition of pathogens: common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 10:193.

Gilles HM. 1999. Protozoal diseases. London: Arnold.

Gradoni, L., 2015. Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. *Vet. Parasitol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.003>.

Gopfert, U., Goehring, N., Klein, C. and Ilg, T. 1999. Proteophosphoglycans of *Leishmania Mexicana*. *J. Biochemical Society.* 344

Gontijo B.; Carvalho M.L.R., 2003. Leishmaniose tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36(1): 71-80.

Gontijo; Melo, MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. *Rev. bras. epidemiol.* vol.7 no.3 São Paulo Sept. 2004

Grimaldi Jr. G, Tesh RB., et al., 1993. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol. Rev;* 6:230–50.

Guerra, C.S., Silva, R.M., Carvalho, L.O., Calabrese, K.S., Bozza, P.T., and Corte-Real, S. 2010. Histopathological analysis of initial cellular response in TLR-2 deficient mice experimentally infected by *Leishmania (L.) amazonensis*. *International journal of experimental pathology* 91: 451-459.

Guimaraes, L. H., P. R. Machado, E. L. Lago, D. J. Morgan, A. Schriefer, O. Bacellar, and E. M. Carvalho. 2009. Atypical manifestations of tegumentary leishmaniasis in a transmission area of *Leishmania braziliensis* in the state of Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103:712-5.

Gradoni L, et al., 2005. Failure of a multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine.* 23(45): 5245–51.

Handman E., Goding J.W., The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid containing glycoconjugate, *EMBO J.* 4 (1985) 329–336.

- Handman E, et al. 1995. Protective vaccination with promastigote surface antigen 2 from *Leishmania major* is mediated by a TH1 type of immune response. *Infect Immun.* 63(11): 4261–7.
- Handman E, et al. 2000. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine.* 18(26): 3011–7.
- Hatzigeorgiou D.E., Geng J., Zhu B et al., 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin 1 $\alpha$  gene expression in human monocytes via a unique promoter sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14708–14713.
- Herwaldt BL. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*; 354: 1191–9.
- Hocking et al., , T Shinomura, DJ McQuillan 1998 Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix, *Matrix biology.*
- Ibrahim ME, Lambson B, Yousif AO, et al. Kala-azar in a high transmission foci: an ethnic and geographical dimension. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:941–944.
- Ilg T, Stierhof Y-D, McConville MJ, Overath P. Purification, partial characterization and immunolocalization of a proteophosphoglycan secreted by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Eur J. Cell Biol* 1996; 66:205–215.
- Ilg, T. et al. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *L. major* gene, *ppg1*, that encodes a membrane associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J. Biol. Chem.* 274, 31410–31420
- Ilg, T., et al., 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitology Today.* 16: 489-496.
- Jackson JE, Tally JD, Ellis WY, et al., 1990. Quantitativa in vitro a potência da droga e avaliação de sensibilidade às drogas de *Leishmania* spp. de pacientes que não respondem à terapia pentavalente antimônio. *Am J Trop Med Hyg* 43: 464- 80.
- Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, Carvalho EM., 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg.* 86(3): 426-33.
- Kobe, B., and J. Deisenhofer. 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:409.
- Kamhawi, S., 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly and its role in the establishment of *Leishmania* infections. *Micr. And. Infec.* 2:1765-1773.
- Kavoosi, G., Ardestani, S. K., Kariminia, A., Zeinali, M., Alimohammadian, M. H. 2008. *Leishmania major*: Effects of proteophosphoglycan on reactive oxygen species, IL-12, IFN- $\gamma$  and IL-10 production in healthy individuals. *Experimental Parasitology.* 120: 62–66.
- Keerti Jain, N.K. Jain. 2015. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *Journal of Immunological Methods* 422: 1–12
- Kedzierski, L. et al., 2004. Uma repetição motivo rico em leucina de *Leishmania* antigénio de superfície do parasita 2 liga-se a macrófagos através do receptor para o complemento 3 . *J. Immunol.* 172: 4902-4906.

Klein, C., Gopfert, U., Goehring, N., Stierhof, Y. D. and Thomas Ilg. 1999. Proteophosphoglycans of *Leishmania Mexicana*. *J. Biochemical Society*. 344: 775-786.

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

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

Lang T., Hellio R., Kaye P.M., Antoine J.C., 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation, *J. Cell Sci*. 107: 2137–2150.

L.R. Castellano, D.C. Filho, L. Argiro, H. Dessein, A. Prata, V. Rodrigues, Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production, *Hum. Immunol*. 70 (6) (2009) 383–390.

Leopoldo, P.T.G., Machado, P.R.L. Almeida, R.P., Schriefer,A., Giudice,A., Jesus, A.R., Ho, J.L., Guimarães, L.H., Bacellar,O. and E.M.Carvalho.2006. Differential effects of antigens from *L.braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *Infect. Dis*.6:75.

Young, D. G.; Duncan, M. A. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Memoirs of the American Entomological Institute*. v. 54, p. 1-881, 1994.

Machado, P.R., et al., 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS neglected tropical diseases*. 4(12): p. 912.

Machado PR, Rosa ME, Guimarães LH, Prates FV, Queiroz A, Schriefer A, Carvalho EM. Treatment of Disseminated Leishmaniasis With Liposomal Amphotericin B. *Clin Infect Dis*. 2015 Sep 15;61(6):945-9. doi: 0.1093/cid/civ416. Epub 2015 Jun 5. PubMed PMID: 26048961.

Machado PR, Rosa ME, Costa D, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2011; 105:438–44.

Marzochi, M. C. A. et al., 1989, A leishmaniose tegumentar no Brasil. In: GRANDES Endemias brasileiras. Brasília: Editora Universidade de Brasília.

Marzochi, M. C. A. et al. 1982. Evaluation of diagnostic criteria in human and canine mucocutaneous leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 22, p. 149-155.

Marzochi, M. C. A. et al. 1980. Reação de imunofluorescência indireta e intradermoreação para leishmaniose tegumentar americana em moradores na área de Jacarepagua (Rio de Janeiro). Estudo comparativo dos resultados observados em 1976 e 1987. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 22, p. 149-155.

Marzochi, M. C. A. 1992. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. *J. Bras. Med*. v. 63, p. 82-104.

Marzochi, M. C. A.; Marzochi, K. B. F., 1987. Leishmanioses em áreas urbanas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, [S.l.], v. 30, p. 162-164.

- Matshuhima. N., Tomoko Mikami, Takanori Tanaka, Hiroki Miyashita, Keiko Yamada, Yoshio Kuroki. Analyses of non-leucine-rich repeat (non-LRR) regions intervening between LRRs in proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (2009) 1217–1237
- Marsden PD, Lessa HA, Oliveira MR, et al . Clinical observations of unresponsive mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:543-5.
- Marsden, P. D. 1986. A leishmaniose mucosa ("espundia" Escomel, 1911). *Trans. R. Soe. Trop. Med. Chem. Hyg.* 80:859-876.
- McConville, M.J. and Naderer, T. et al., 2011. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of Leishmania. *Annu.Rev.Microbiol.* 6: 543-61.
- McConville MJ, Thomas-Oates JE, Ferguson MAJ, Homans SW. Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. *J Biol Chem* 1990;265:19611\_23.
- McConville M.J., Blackwell J.M., et al., 1991. Developmental changes in the glycosylated phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the promastigote and amastigote glycolipids, *J. Biol. Chem.* 266: 5170–5179.
- Marsden, P.D., Tada, M.S., Barreto, A.C., and Cuba, C.C. 1984. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 78: 561-562.
- Marsden PD. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:859–76.
- Ministerio da Saude. Manual de Vigilancia da Leishmaniose Tegumentar Americana. Departamento de Vigilancia Epidemiologica. / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica. – 2. ed. – Brasilia : Editora do Ministerio da Saude, 2007. 182 p. – (Serie A. Normas e Manuais Tecnicos)
- Ministerio da Saude. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnosticos clinico e diferencial / Ministerio da Saude, Secretaria de Vigilancia em Saude, Departamento de Vigilancia Epidemiologica – Brasilia: Editora do Ministerio da Saude, 2006. 136 p.: il. color. – (Serie A. Normas e Manuais Tecnicos)
- Murray, H.W., Rubin, B.Y., and Rothermel, C.D. (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *The Journal of clinical investigation* 72, 1506-1510.
- Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., and Saravia N.G. 2005. Advances in Leishmaniasis. *Lancet*; 366:1561–77.
- Montgomery, J., Curtis, J., Handman, E., et al., 2002. Genetic and structural heterogeneity of proteophosphoglycans in *Leishmania*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 121: 75-85
- Montgomery, J., Ilg, T., Thompson, J. K., Kobe, B., Handman, E. 2000. Identification and predicted structure of a leucine-rich repeat motif shared by *Leishmania major* proteophosphoglycan and Parasite Surface Antigen 2. *Molecular and Biochemical Parasitology.* 107: 289-295.
- Montenegro J. 1926. Cutaneous reactions in leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilology* 13:187.

Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimaraes, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna, and E. M. Carvalho. 2010. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: 912.

McMahon-Pratt D, et al. 1992. Loss of the GP46 / M-2 surface membrane glycoprotein gene family in the *Leishmania braziliensis* complex. *Mol Biochem Parasitol*. 50: 151–60.

Mougneau E, et al. 1995. Expression cloning of a protective *Leishmania* antigen. *Science*. 268: 563–6.

Melby PC, et al. 2001. *Leishmania donovani* p36(LACK) DNA vaccine is highly immunogenic but not protective against experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*. 69(8): 4719–25.

M. Ameen, Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics, *Clin. Exp. Dermatol*. 35 (2010) 699–705.

M.C.A. Brelaz, A.P. Oliveira, A.F. Almeida, M.A. Souza, A.C.R. Medeiros, M.E.F. Brito, V.R.A. Pereira, *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease, *Parasite Immunol*. 34 (4) (2012) 236–239.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. 1992. Ensaio clínico de estibogluconato de sódio (Pentostam) versus cetoconazol para o tratamento da leishmaniose cutânea na Guatemala controlado com placebo. *J Infect* 165: 528 - 34.

Nebohacova M, Kim CE, Simpson L, Maslov DA. RNA editing and mitochondrial activity in promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani*. *Int J Parasitol* 2009; 39(6): 635-44

Nico, D., Borges, R.M., Brandão, L.M., Feijó, D.F., Gomes, D.C., Palatnik, M., Rodrigues, M.M., da Silva, A.J., Palatnik-de-Sousa, C.B., 2012. The adjuvanticity of *Chiococca alba* saponins increases with the length and hydrophilicity of their sugar chains. *Vaccine* 30 (21), 3169

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* 2009.

Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C, 1997. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg* 57: 651–655.

Oliveira-Neto MP, Shubach A, Araujo ML, Pirmez C, 1996. High and low doses of antimony (SbV) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91: 207–209.

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 da Saúde. World Health Organization, Library Cataloguing-in-Publication Data First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases .WHO, 2010.

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, 2000

OMS Organização Mundial da Saúde (WHO-World Health Organization) Disponível em: <http://www.who.int/emc/diseases/leish.html>, 1995

OMS Organização Mundial da Saude (WHO-world Health Organization)., et al, 1994. Report on the consultative meeting on Leishmania / HIVco-infection, Rome. 95:3.

O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR, Alcântara L, Morgan DJ, et al. Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195:142–148

Perdomo, Sandra Kalil. Caracterização Funcional da Proteína LRR17 da *Leishmania (Leishmania) major*. Dissertação de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas da universidade de São Paulo. São Paulo. 109: p. 8. (2010).

Peters. NS, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kliling N, Kamhawi S, et al. 2008. In vivo Imaging reveals as essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970-4

P.T.G. Leopoldo, P.R.L. Machado, R.P. Almeida, A. Schriefer, A. Giudice, A.R. Ribeiro de Jesus, J. Ho, L.H. Guimarães, O. Bacellar, E.M. Carvalho, Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production, *BMC Infect. Dis.* 6 (2006) 75.

Persing DH, Coler RN, Lacy MJ, Johnson DA, Baldrige JR, Hershberg RM, et al. Taking toll: lipid A mimetics as adjuvants and immunomodulators. *Trends Microbiol* 2002;10(10 Suppl.):S32–7.

Peacock CS, Collins A, Shaw MA, et al. Genetic epidemiology of visceral leishmaniasis in northeastern Brazil. *Gen Epidemiol* 2001;20:383–396.

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.,. 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 39: 839–847.

Pianini, A., Aline Piania, Thomas Ilgb, Andrew G. Elefantya, Joan Curtisa, Emanuela Handmana *Leishmania major* proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function, *Microbes and Infection*, 1, 1999, 589–599

Proudfoot L., Nikolaev A.V., Feng G.J et al Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicida activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 10984–10989.

Puentes, F., F. Guzman, V. Marin, C. Alonso, M. E. Patarroyo, and A. Moreno. 1999. Leishmania: fine mapping of the Leishmanolysin molecule's conserved core domains involved in binding and internalization. *Exp Parasitol* 93:7-22.

Palacios R, Osorio LE, Grajalew LF, Ochoa MT., 2001. O insucesso do tratamento em crianças em um ensaio clínico randomizado com 10 e 20 dias de antimoniato de meglumina para leishmaniose cutânea devido a *Viannia Leishmania* espécies. *Am J Trop Med Hyg* 64: 187 - 93.

Prina E., Antoine J.C., Wiederanders B., Kirschke H., 1990. Localization and activity of various lysosomal proteases in *Leishmania amazonensis*-infected macrophages, *Infect. Immun.* 58: 1730–1737.

Queiroz, A., Sousa, R., Heine, C., Cardoso, M., Guimarães, L. H., Machado, P. L. R., Carvalho, E. M., Riley, L. W., Wilson, M. E., and Schriefer, A., 2012. Association between an Emerging Disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Strain Polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology* . 50: 4028-4034.

Reed SG, Coler RN, Campos-Neto A. Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. *Expert Rev Vaccines* 2003;2(2):239–52.

Russell D.G., Talamas-Rohana P., *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience, *Immunol. Today* 10 (1989) 328–333.

Russell D.G., Xu S., Chakraborty P., 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana* infected macrophages, *J. Cell Sci.* 103: 1193–1210.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. 2001. Comparação de leishmaniose cutânea devido a *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* no Brasil: resposta terapêutica ao antimoniato de meglumina. *Am J Trop Med Hyg* 65: 456 - 65.

Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG., 1999. Sensibilidade à Glucantime de *Leishmania viannia* isolado a partir de pacientes antes do tratamento. *J. Parasitol* 85: 360 - 6.

Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, et al. 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. *J Infect Dis* 193: 1375–1383.

Rafati S, et al. 2005. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine.* 23(28): 3716–25.

Russo DM, et al. 1991. Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. *J Immunol.* 147(10): 3575–80.

Rogers MB, Downing T, Smith BA, Imamura H, Sanders M, Svobodova M, Volf P, Berriman M, Cotton JA, Smith DF. 2014. Genomic confirmation of hybridisation and recent inbreeding in a vector-isolated *Leishmania* population. *PLoS Genet.* 10(1): 1004092.

Rogers, M., Kropfl, P., Choi, B. S., Dillon, R., Podinovskaia, M., Bates, P., Miller, P. 2009. Proteophosphoglycans Regurgitated by *Leishmania* Infected Sand Flies Target the L-Arginine Metabolism of Host Macrophages to Promote Parasite Survival. *PLoS Pathogens.* 05: 01-14

Raman VS, et al. 2010. Applying TLR synergy in immunotherapy: Implications in Cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol*.

R. Reithinger, J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander, S. Brooker, Cutaneous Leishmaniasis, *Lancet Infect. Dis.* 7 (2007) 581–596.

R.C. Bittar, R.S. Nogueira, R. Vieira-Gonçalves, V. Pinho-Ribeiro, M.S. Mattos, M.P. Oliveira-Neto, S.G. Coutinho, T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* Infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (5) (2007) 625–630.

Routier FH, EX da Silveira, R Wait, C Jones, 1995, Chemical characterisation of glycosylinositol phospholipids of *Herpetomonas* s- *Molecular Elsevier*.

Soong L, et al.1995. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 63(9): 3559–66.

Samant, M.; Reema Gupta, Shraddha Kumari, Pragya Misra, Prashant Khare, Pramod Kumar Kushawaha, Amogh Anant Sahasrabudde, Anuradha Dube, 2006, Immunization with the DNA-encoding N-terminal domain of proteophosphoglycan of *Leishmania donovani* generates Th1-type immunoprotective response against experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 183(1): 470–9.

Samant, M., Sahasrabudde, A. A., Singh, N., Gupta, S. K., Sundar, S. and Dube, A. 2007. Proteophosphoglycan is differentially expressed in sodium stibogluconate-sensitive and resistant Indian clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitology Research.* 134: 1175-1184.

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. 2013. PLGA nanoparticles loaded with KMP-11 stimulate innate immunity and induce the killing of *Leishmania*. *Nanomedicine.* vol. 9(7): 985-95

Sacks, D. L., Saraiva, E. M., Rowton, E., Turco, S. J., and Pimenta, P. F., 1994. *Parasitology* 108: 55–62.

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

Schriefer, A., Guimarães, L. H., Machado, P. R. L., Lessa, M., Lessa, H. A., Lago, E., Ritt, G., Góes-Neto, A., Schriefer, A. L. F., Riley, L. W. and E. M. Carvalho. 2009. Geographic Clustering of Leishmaniasis in Northeastern Brazil. *Infect. Immun.* 15: 871-876.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CE., 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99(3): 239-51.

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

Streit JA, et al. 2000. BCG expressing LCR1 of *Leishmania chagasi* induces protective immunity in susceptible mice. *Exp Parasitol.* 94(1): 33–41.



Stager S, Smith DF, Kaye PM., 2000. Immunization with a recombinant stage-regulated surface protein from *Leishmania donovani* induces protection against visceral leishmaniasis. *J Immunol.* 165(12): 7064–71.

Saravia N, Holguín A, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous Leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:714–20.

Stierhof, YD et al. 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors *European Journal of Cell Biology* Volume 78, Issue 10, Outubro de 1999, Pages 675-689

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 471–78.

Skeiky YA, Coler RN, Brannon M, Stromberg E, Greeson K, Crane RT, et al. Protective efficacy of a tandemly linked, multi-subunit recombinant leishmanial vaccine (Leish-111f) formulated in MPL adjuvant. *Vaccine* 2002;20(27–28):3292–303.

Soto J, Buffet P, Grogl M, Berman J, 1994. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. *Am J Trop Med Hyg* 50: 107–111. 16.

Soto J, Fuya P, Herrera F, Berman J, 1998. Topical paromomycin methylbenzetonium chloride plus parenteral meglumine antimoniate as treatment of American cutaneous leishmaniasis: controlled study. *Clin Infect Dis* 26: 56–58.

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

Sundar, S., Madhukar, R., 2002. Advances in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*,15: 593-598.

Sundar S, Goyal AK, More DK, Singh MK, Murray HW. 1998. Treatment of antimony-responsive Indian visceral leishmaniasis with ultrashort courses of amphotericin-B-lipid complex. *Ann Trop Med Parasitol* 92: 755–64.

Sundar S., More D.K., Singh M.K., Singh V.P., Sharma S., Makharia A., KUMAR P.C., Murray H.W. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: report from the Center of the Indian Epidemic. *Clinical Infectious Diseases*; 31:1104–7. 2000

Sjolander A, et al. 1998. Vaccination with recombinant Parasite Surface Antigen 2 from *Leishmania major* induces a Th1 type of immune response but does not protect against infection. *Vaccine.* 16(20): 2077–84.

Sjolander A, et al. 1998. Induction of a Th1 immune response and simultaneous lack of activation of a Th2 response are required for generation of immunity to leishmaniasis. *J Immunol.* 160(8): 3949–57.

Titus, RG & Ribeiro, JM., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* Infectivity. *Science.* 11:239 (4845): 1306-8

Turetz, M. L., P. R. Machado, A. I. Ko, F. Alves, A. Bittencourt, R. P. Almeida, N. Mobashery, W. D. Johnson, Jr., and E. M. Carvalho. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Inf. Dis* 186:1829-34.

Talamas P., Russell D.G., et al., 1989. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) binds to the CR3, LFA-1, p150, 95 family of adhesion receptors, *J. Cell Biochem. Suppl.* 13: 158.

Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimarães LH, Morgan D, et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2009;80:574–579.[[PMC free article](#)] [[PubMed](#)]

Webb JR, Kaufmann D, Campos-Neto A, Reed SG. Molecular cloning of a novel protein antigen of *Leishmania major* that elicits a potent immune response in experimental murine leishmaniasis. *J Immunol* 1996;157(11):5034–41.

Webb JR, Campos-Neto A, Owendale PJ, Martin TI, Stromberg EJ, Badaro R, et al. Human and murine immune responses to a novel *Leishmania major* recombinant protein encoded by members of a multicopy gene family. *Infect Immun* 1998;66(7):3279–89.

Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet JP, et al. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res* 1996; 24(9): 1688-94

Valenzuela JG, Belkaid Y, Garfield MK, Mendez S, Kamahavi S, Rowton E, Sacks DL, Ribeiro JMC 2001. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: Characterization of a protective salivary protein *J. Exp. Med.* 194(3) 331-342.

Volf P, Benkova I, Myskova J, et al., 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major* / *Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol.* 37(6): 589-93.

Zijlstra EE, El-Hassan AM, Ismael A, Ghalib HW. Endemic kala-azar in eastern Sudan: a longitudinal study on the incidence of clinical and subclinical infection and post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1994;51:826–836.

Zhang WW, Matlashewski G. Characterization of the A2-A2rel gene cluster in *Leishmania donovani*: involvement of A2 in visceralization during infection. *Mol Microbiol* 2001;39:935–48.

Zhang WW, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8807–11.

#### **XIV. ANEXO**

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3º 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<sup>®</sup>).

#### **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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup>) 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