

## RESUMO

**Introdução** A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) pode resultar de infecções humanas com *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a qual é responsável por três formas de doença: leishmaniose cutânea (LC), mucosa (LM) e disseminada (LD). Essas três formas da doença podem ser encontradas em Corte de Pedra (CP), Bahia/Brasil. A ocorrência desses diferentes desfechos da doença nesta área endêmica, sugere que a cepa parasitária exerça um importante papel sobre a determinação do prognóstico da infecção. **Objetivos** Buscamos avaliar a dinâmica na constituição genotípica da população parasitária de *L. (V.) braziliensis* ao longo do tempo, sua associação com os desfechos clínicos de LTA em Corte de Pedra-BA, e se a carga parasitária está relacionada com a gravidade da doença. **Métodos** DNA total foi obtido a partir da suspensão de *L. (V.) braziliensis* isoladas de sujeitos com LC, LM ou LD pertencentes a duas amostras temporalmente distintas: Amostra A, 35 sujeitos recrutados entre 1992 e 2001; Amostra B, 126 sujeitos recrutados entre 2008 e 2011. Dois loci polimórficos (CHR24/3074 e CHR28/425451) dessas *L. (V.) braziliensis* foram amplificados por PCR, clonados, sequenciados e seus genes comparados entre os parasitas das duas amostras, para a caracterização de seus alelos. Esses loci foram explorados para avaliar a associação entre genótipos do parasita e as formas clínicas da doença. Um total de 194 amostras de DNA do parasita obtidos a partir de biópsias de lesões dos pacientes com LTA foram quantificadas por qPCR e utilizadas para avaliar a associação entre a carga parasitária e as manifestações clínicas da LTA. **Resultados** Identificamos no CHR24/3074 11 eventos de polimorfismos (SNP's e Indel's) e um total de 15 haplótipos de acordo com as nossas definições, sendo que 4 apresentaram-se mais frequentes. Já o locus CHR28/425451 apresentou 3 eventos polimórficos com um total de 7 haplótipos, dos quais 3 mantiveram-se consistentes entre as amostras A e B. Quatro haplótipos foram detectados exclusivamente na amostra mais recente, B. A avaliação da carga parasitária revelou que a alta carga pode estar associada à resposta terapêutica dos pacientes. **Conclusão** As avaliações entre genótipos parasitários e os fenótipos da LTA confirmaram estudos anteriores, mostrando associação entre os genótipos e desfechos clínicos da doença. Além disso, pudemos constatar como a qPCR pode ser eficaz para quantificação da carga parasitária, e esta pode exercer um papel importante na resposta terapêutica desses pacientes.

**Palavras-chave:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Polimorfismo Parasitário, Leishmanioses, Carga Parasitária.

## ABSTRACT

**Introduction** American tegumentary leishmaniasis (ATL) can result from human infections with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which is responsible for three forms of disease: cutaneous leishmaniasis (CL), mucosa (ML) and disseminated (DL). These three forms of the disease can be found in Corte de Pedra (CP), Bahia /Brazil. The occurrence of these different disease outcomes in this endemic area suggests that the parasitic strain plays an important role in determining the prognosis of the infection.

**Objectives** We sought to evaluate the dynamics in the genotypic constitution of the parasitic population of *L. (V.) braziliensis* over time, its association with the clinical outcomes of ATL in the of Corte de Pedra-BA, and whether the parasitic load is related to the severity of the disease.

**Methods** Total DNA was obtained from the suspension of *L. (V.) braziliensis* isolated from subjects with LC, LM or LD belonging to two temporally distinct samples: Sample A, 35 subjects recruited between 1992 and 2001; Sample B, 126 subjects recruited between 2008 and 2011. Two polymorphic loci (CHR24/3074 and CHR28/425451) of these *L. (V.) braziliensis* were amplified by PCR, cloned, sequenced and their genes compared between the parasites of the two samples, to the characterization of their alleles. These loci were explored to evaluate the association between genotypes of the parasite and the clinical forms of the disease. A total of 194 parasite DNA samples obtained from lesions biopsies of patients with ATL were quantified by qPCR and used to evaluate the association between parasite load and clinical manifestations of ATL.

**Results** We identified in the CHR24/3074 11 polymorphism events (SNP's and Indel's) and a total of 15 haplotypes according to our definitions, 4 of which were more frequent. The CHR28/425451 locus presented 3 polymorphic events with a total of 7 haplotypes, of which 3 remained consistent between samples A and B. Four haplotypes were detected exclusively in the most recent sample, B. The parasite load evaluation revealed that the high load may be associated with the therapeutic response of the patients.

**Conclusion** Evaluations between parasite genotypes and ATL phenotypes have confirmed earlier studies showing association between genotypes and clinical outcomes of the disease. In addition, we have verified how qPCR can be effective for the quantification of the parasite load, and this can play an important role in the therapeutic response of these patients.

**Keywords:** *Leishmania (Viannia) braziliensis*, Polimorfic Parasite, Leishmaniasis, Parasitic load.

## VIII. RESULTADOS

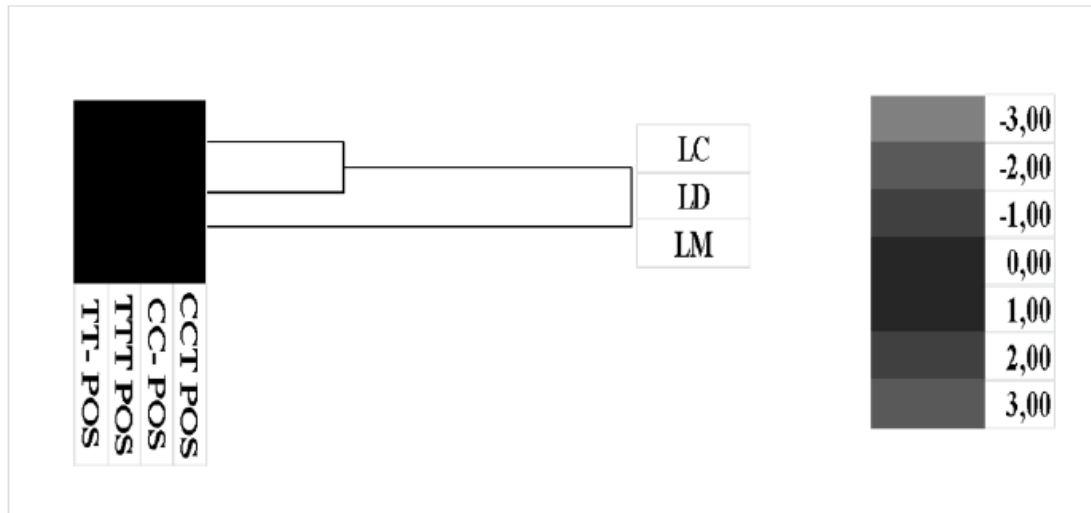
### VIII. 1. Identificação dos Polimorfismos em isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra

**Tabela 2.** Lista de haplótipos (alelos) do locus CHR24/3074 encontrados em pelo menos 10% dos isolados de *L. (V.) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra-BA entre os períodos de 1992 – 2001 e 2008 – 2011.

HAPLÓTIPOS	POSIÇÕES POLIMÓRFICAS E BASES NUCLETÍDICAS (SNP's e Indl's)	FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS (%)	HAPLÓTIPOS	FREQUÊNCIA DOS HAPLÓTIPOS (%)	POSIÇÕES POLIMÓRFICAS E BASES NUCLETÍDICAS (SNP's e Indl's)
1992 - 2001			2008 - 2011		
AGTAACT	99 A/G	34/35 (97%)	CGCTTGCAATG	16/120 (13%)	22 C/G
GAAG-TC	120 G/A	8/35 (23%)	CGTTCAGTAA	48/120 (40%)	25 G/Indel
	136 T/A		CGCTTGCAAAG	116/120 (97%)	177 C/T
	197 A/G		G-CTTGTAAG	27/120 (23%)	211 T/C
	207 A/Indel				312 T/C
	537 C/T				650 C/A
	672 T/C				688 C/T
					711 A/T
					727 A/G
					737 T/A
					748 G/A

**Tabela 3.** Frequência dos haplótipos encontrados em pelo menos 10% dos isolados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* obtidos de pacientes de LTA de Corte de Pedra-BA entre os períodos de 1992 – 2001 e 2008 - 2011 no locus CHR28/425451.

POSIÇÃO/POLIMORFISMO			HAPLÓTIPOS/FREQUÊNCIAS (%)			
30 C/T	286 C/T	545 T/INDEL	1992 - 2001		2008 - 2011	
C	C	–	CC-	11%	CC-	11%
C	C	T	CCT	71%	CCT	75%
T	T	–	TT-	80%	TT-	35%
T	T	T			TTT	11%



**Figura 4.** Frequência combinada dos quatro alelos (i.e. CCT/CC- e TTT/TT-) do locus CHR28/425451 nas três formas de LTA a partir da Análise de Agregação por Distâncias Euclidianas.

### **VIII. 2. Distinção de subpopulações de *L. (V.) braziliensis* com diferentes representações entre formas LTA, de acordo com os haplótipos no locus CHR28/425451**

**Tabela 4.** Frequências alélicas encontradas nos loci CHR24/3074 e CHR28/425451 entre 2008 e 2011 estratificados por formas de LTA (i. e. LC, LD, LM).

CHR24/3074	CGCTTGCAATG	CGCTTGCAATG	CGTICACTGAA	CGTICACTGAA	CGCTTGCAAAG	CGCTTGCAAAG	G-CITGTAAAG	G-CITGTAAAG
	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo	positivo	negativo
LC (n = 85)	11	74	34	51	82	3	22	63
LD (n = 26)	3	23	11	15	25	1	2	24
LM (n = 9)	2	7	3	6	9	0	3	6
LC (%)	12,9	87,1	40,0	60,0	96,5	3,5	25,9	74,1
LD (%)	11,5	88,5	42,3	57,7	96,2	3,8	7,7	92,3
LM (%)	22,2	77,8	33,3	66,7	100,0	0	33,3	66,7

CHR28/425451	CCT positivo	CCT negativo	CC- positivo	CC- negativo	TTT positivo	TTT negativo	TT- positivo	TT- negativo
	LC (n = 83)	68	15	12	71	11	72	51
LD (n = 21)	17	4	0	21	3	18	9	12
LM (n = 9)	7	2	0	9	0	9	8	1
LC (%)	81,9	18,1	14,5	85,5	13,3	86,7	61,4	38,6
LD (%)	81	19	0	100	14,3	85,7	42,9	57,1
LM (%)	77,8	22,2	0	100	0	100	88,9	11,1

**Tabela 5.** Resumo das comparações significantes envolvendo os alelos mais frequentes nos *loci* CHR24/3074 e CHR28/425451

<b>CHR24/3074</b>		
<b>G-CTTGTAAG</b>	<b>P*</b>	<b>OR</b>
<b>LD x LM + LC</b>	0,0309*	0,23
<b>LM + LC x LD</b>	0,0309*	4,35
<b>Metastática x LC</b>	NS (0,1252)	0,48
<b>LC x LD</b>	0,0378*	4,19
<b>LD x LM</b>	NS (0,0946)	0,17
<b>CHR28/425451</b>		
<b>CC-</b>	<b>P*</b>	<b>OR</b>
<b>Metastática x LC</b>	0,0196	0,09
<b>LC x Metastática</b>	0,0196	10,66
<b>TT-</b>	<b>P*</b>	<b>OR</b>
<b>Metastática x LC</b>	NS	0,82
<b>LM x LC</b>	NS (0,0987)	5,02
<b>LM x LD</b>	0,0238	10,67

Teste Exato de Fisher  
 \*NS = Não Significante

### VIII. 3. Associação da Carga Parasitária com Aspectos Clínicos e a Resposta Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Americana

**Tabela 6.** Aspectos demográficos em Pacientes com diferentes formas clínicas de LTA

		FORMAS CLÍNICAS DA LTA			Valor p
		LC	LM	LD	
Nº DE PACIENTES		139 (71,3%)	11 (5,6%)	44 (22,6%)	0,2289
SEXO	MASCULINO	105 (75,6%)	10 (91,0%)	37 (84,1%)	0,0625
	FEMININO	34 (24,46%)	1 (9,09%)	7 (15,9%)	
IDADE	0 - 14	8 (5,8%)	1 (9,09%)	0	0,9345
	15 - 50	125 (89,9%)	6 (54,6%)	34 (77,2%)	
	>50	6 (4,3%)	4 (36,3%)	10 (22,7%)	
DURAÇÃO DA DOENÇA	< 30 DIAS	102 (73,3%)	2/7 (28,6%)	9/35 (25,7%)	0,3922
	30 - 60 DIAS	25 (17,9%)	4/7 (57,1%)	19/35 (54,3%)	
	> 60 DIAS	12 (8,6%)	1/7 (14,3%)	7/35 (20%)	
IDRM (mm)	POSITIVO	132/138 (95,7%)	9/10 (90%)	24/42 (57,1%)	0,3304
	NEGATIVO	6/138 (4,3%)	1/10 (10%)	18/42 (42,9%)	

\*Variações no número amostral devido à ausência dos respectivos dados.

**Tabela 7.** Associação entre a Carga Parasitária com Aspectos Demográficos, Clínicos e Resposta Terapêutica com Antimonial Pentavalente em Pacientes com LC

			CARGA PARASITÁRIA			VALOR P
			MEDIANA	QUARTIS (25%-75%)	DESVIO PADRÃO	
DURAÇÃO DA DOENÇA (n = 139)	< 30 DIAS	102 (73,38%)	55,52	8,438- 455,7		0,3393
	30 - 60 DIAS	25 (17,98%)	120	19,74 - 496,5	52,37	
	≥ 60 DIAS	2 (1,43%)	48,47	7,095 - 161,8		
NÚMERO DE LESÕES (n = 139)	1 a 3	135 (97,12%)	66,18	10,31 - 440,2	92,63	0,3511
	> 3	4 (2,87%)	14,33	8,813 - 588,7		
ÁREA DA MAIOR LESÃO (mm2) (n = 132)	≤ 100 mm2	44 (33,33%)	59,64	14,17 - 297,9		0,9698
	100 - 500 mm2	63 (47,72%)	54,2	8,650 - 448,8	19	
	> 500 mm2	25 (18,93%)	66,18	9,310 - 593,5		
NÚMERO DE CURSOS ANTIMONIAL (n = 136)	< 2	94 (69,11%)	38,38	8,573 - 264,6		*0,0038
	> 2	42 (30,88%)	178,9	42,30 - 1677	36,77	
RESPOSTA TERAPÊUTICA (90 DIAS) (n = 128)	CURA	45 (35,15%)	26,69	8,495 - 264,0	-	*0,0381

Kruskal-Wallis  
Anova Test t  
\*Valor de p<0.05

**Tabela 8.** Frequências de Resultados Positivos ou Negativos ao PCR, IDRM, Cultura de *Leishmania* e Histopatologia

	LTA		LC		LM		LD	
	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -	PCR +	PCR -
<b>IDRM +</b>	87%	100%	96%	100%	90%	100%	57%	100%
<b>IDRM -</b>	13%	0%	4%	0%	10%	0%	43%	0%
<b>CULTURA +</b>	60%	15%	58%	17%	71%	0%	60%	29%
<b>CULTURA -</b>	40%	85%	41%	83%	29%	100%	40%	71%
<b>HISTOPATOLOGIA +</b>	68%	45%	59%	30%	33%	33%	84%	100%
<b>HISTOPATOLOGIA -</b>	32%	55%	41%	70%	67%	67%	16%	0%

**Tabela 9:** Concordância entre qPCR e outros Métodos Diagnósticos Estratificada por Forma de LTA

	PCR							
	CONCORDÂNCIA POSITIVA				CONCORDÂNCIA NEGATIVA			
	LTA	LC	LM	LD	LTA	LC	LM	LD
<b>IDRM</b>	87%	96%	90%	57%	100%	100%	100%	100%
<b>CULTURA</b>	60%	59%	71%	60%	15%	17%	0%	29%
<b>HISTOPATOLOGIA</b>	68%	59%	33%	84%	45%	30%	33%	100%