

**Ana Carolina Stocco de Lima**

**Diagnóstico Molecular de Leishmaniose  
Tegumentar Americana: Identificação de  
espécies de *Leishmania* por SSUrDNA  
PCR e G6PD PCR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Maria de Castro Gomes

São Paulo

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lima, Ana Carolina Stocco de

Diagnóstico molecular de Leishmaniose Tegumentar Americana : identificação de espécies de *Leishmania* por SSUrDNA PCR e G6PD PCR / Ana Carolina Stocco de Lima. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Cláudia Maria de Castro Gomes.

Descritores: 1.Leishmaniose cutânea 2.Diagnóstico 3.Reação em cadeia da polimerase 4.*Leishmania (Viannia) braziliensis* 5.*Leishmania (Leishmania) amazonensis*

USP/FM/DBD-236/10

**Aos meus pais pelo incentivo e pelo esforço de toda uma vida.**

## **AGRADECIMENTOS**

O tópico de agradecimentos deste trabalho é para mim, sem dúvida, um dos mais importantes. Eu tive muita sorte nesses anos, encontrei em meu caminho pessoas muito especiais e dispostas a ajudar. Esse trabalho certamente não se concluiria sem a ajuda de cada uma delas.

Inicialmente gostaria de agradecer à Dra. Cláudia M.C. Gomes pela oportunidade e por acreditar na minha capacidade e no meu esforço. Incentivou-me nos momentos mais difíceis e naqueles em que eu pensei em desistir sempre vinha com palavras e conversas que abasteciam meu fôlego e me animavam a seguir em frente. Muito obrigada!

À professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter que me “adotou” todo esse tempo, me acolhendo em seu laboratório. Sempre disponível a esclarecer dúvidas, resolver problemas, enfim, em dividir sua rica e importante experiência com uma humildade admirável.

À professora Dra. Márcia Dalastra Laurenti pelos cuidados iniciais e pela confiança.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira pelas conversas esclarecedoras e pelas sugestões sempre bem vindas.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Pereira Corbett pela oportunidade e por toda ajuda prestada ao longo desses anos.

Ao professor e amigo Dr. Jorge Silva Bettencourt, pelo exemplo, incentivo e pelas boas conversas que sempre me estimularam.

A todos os amigos e colegas do LIM-50: Felipe, Tadeu, Michelli, Bruna, Thai, Mussya, Claudia Alessi, Edson, Lia e todos os alunos que por aqui passaram.

Gostaria de agradecer especialmente a imensurável ajuda da amiga Thaise Yumie Tomokane, que se empenhou sempre que eu precisei com muita dedicação e com carinho digno de uma irmã. Não tenho palavras pra expressar minha gratidão a você “Thaisia”!

Aos amigos e colegas do “Bat Lab”: Emerson, Ricardo, Marcos, Mário, Fernanda, Camila e Rafael pelas incontáveis orientações feitas dia a dia, o que foi imprescindível à realização do trabalho.

Às colegas Sandra, Esmeralda, Ângela e Cristina, do Laboratório de Imuno-histoquímica, pelo carinho e atenção de sempre.

Às professoras do Instituto de Biociências Dra. Célia Regina S. Garcia, Dra. Regina P. Markus, Dra. Ana Maria L. Castrucci e Dra. Zulma Felisbina da Silva Ferreira, pela disposição de seus laboratórios sempre que necessário.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Winter, do instituto de Biociências pela disposição da ultracentrífuga.

À dona Irani pelos preciosos cafezinhos.

Às secretárias do Programa Fisiopatologia Experimental , Sonia e Tânia, pelas muitas ajudas ao longo desses anos.

Às minhas tias Silvia e Gisele pelo amparo me dado nesses anos fora de casa.

Aos meus primos: Denis, Plínio, Michelle, Polyana, Bruna e Sabrina pelo carinho e pela cumplicidade.

Às boas amizades adquiridas e anexadas, que tornaram minha morada em São Paulo menos solitária: Lizandra Serafim, Tereza Ruiz, Marina Mancuso, André Marcelino, Nina Best, Fernanda Credídio, Simone Elias, André Bonfim, Marcel Vieira, Rafaela Gabani e Cleide C. Chad, Maíra Pombo, Emerson Castilho e Rafaela Lafraia.

Às antigas e eternas amigas Taís Ribeiro, Carol Kalil, Patrícia Mendes, Gabriela Ayrosa, Polyana Stocco e Danielle Gusmão pela preciosa amizade sem a qual a vida não teria o mesmo sabor.

Ao Daniel I pelo exemplo de ser humano, de força, amizade e pelo seu amor, que me faz alguém melhor a cada dia.

Aos meus pais Méri, e Marcos pelo apoio incondicional. Aos meus irmãos Juliana e Vinícius, pela amizade e pelo aconchego. Aos meus cunhados Tereza e Arto por completarem a família de forma tão prazerosa e à minha sobrinha Mariana que faz a minha vida mais feliz.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP (proc.06/56319-1) pela bolsa cedida e recursos disponibilizados a execução do trabalho.

Ao Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-50) pelo suporte dado à execução do trabalho.

## **Precisão**

O que me tranquiliza é que tudo o que existe, existe com uma precisão absoluta.

O que for do tamanho de uma cabeça de alfinete não transborda nem uma fração de milímetro além do tamanho de uma cabeça de alfinete.

Tudo o que existe é de uma grande exatidão. Pena é que a maior parte do que existe com essa exatidão nos é tecnicamente invisível.

O bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. Nós terminamos adivinhando, confusos, a perfeição.

**(Clarice Lispector).**

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1.	INTRODUÇÃO .....	2
1.1.	Ciclo de vida.....	5
1.2.	Epidemiologia.....	7
1.3.	Espécies de <i>Leishmania</i> causadoras de LTA no Brasil .....	9
1.4.	Formas clínicas da LTA.....	11
1.5.	Diagnóstico da LTA.....	13
1.6.	Justificativa.....	18
2.	OBJETIVOS .....	21
2.1.	Objetivo Geral .....	21
2.2.	Objetivos específicos .....	21
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1.	Organismos.....	23
3.2.	Plasmídeo .....	23
3.3.	Pacientes e biópsias .....	24
3.4.	Extração de DNA .....	25
3.4.1.	Extração de DNA de Plasmídeo .....	26
3.4.1.1.	Miniprep .....	27
3.4.1.2.	Maxiprep .....	27
3.4.1.3.	Purificação de DNA Plasmidial por centrifugação em gradiente de densidade de Cloreto de Césio/ Brometo de etídio.....	28
3.4.2.	Quantificação de ácidos nucleicos .....	29
3.4.3.	Preparo das curvas padrão .....	30
3.5.	Reação em cadeia da Polimerase (PCR).....	30
3.5.1.	Subunidade Menor do Ribossomo (SSUrDNA) PCR .....	31
3.5.2.	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase PCR.....	32
3.5.3.	PCR tendo como alvo sequências do hospedeiro. ....	33
3.5.3.1.	Beta actina .....	33
3.5.3.2.	SSUrDNA Humano PCR.....	34
3.6.	Clonagem e Sequenciamento do produto de PCR .....	34
3.6.1.	Ligação de produto de PCR em Plasmídeo.....	34
3.6.2.	Transformação e seleção de bactérias.....	35
3.6.3.	Reação de Sequenciamento .....	36
3.7.	Clivagem de DNA por enzimas de restrição.....	36
3.8.	Eletoforese.....	37
3.9.	PCR em Tempo Real .....	38
4.	RESULTADOS .....	41
4.1.	Subunidade Menor do Ribossomo (SSUrDNA) PCR .....	41
4.2.	Sequenciamento de produtos de PCR.....	43

4.3.	Glicose 6-Fosfato Desidrogenase PCR.....	44
4.4.	PCR tendo como alvo sequências do hospedeiro.....	46
4.4.1.	Beta actina.....	47
4.4.2.	SSUrDNA Humano PCR .....	47
4.5.	PCR em tempo real.....	48
5.	DISCUSSÃO .....	52
5.1.	Aplicações das ferramentas moleculares em material fixado em formalina e embebido em parafina.....	52
5.2.	Detecção e identificação de <i>Leishmania</i> .....	55
5.3.	Quantificação de parasitas.....	57
6.	CONCLUSÕES .....	60
7.	REFERÊNCIAS.....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> <b>A:</b> Formas promastigotas. <b>B:</b> Formas amastigotas. <b>C:</b> Figura esquemática evidenciando o cinetoplasto (seta azul).....	2
<b>Figura 2:</b> Distribuição de casos confirmados de LTA por região do Brasil....	4
<b>Figura 3:</b> Representatividade dos Estados do Pará e Maranhão na casuística nacional.....	5
<b>Figura 4:</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. ....	6
<b>Figura 5:</b> Gel ilustrativo de SSUrDNA PCR (A) e Nested PCR (B): <b>A:</b> produtos de PCR fracionados em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: <i>C. fasciculata</i> , Linha 7: <i>L. (L.) amazonensis</i> e Linha 8: controle negativo. <b>PP:</b> Marcador de peso molecular 100 pb. <b>B:</b> Produtos de SSUrDNA Nested PCR: Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: <i>C. fasciculata</i> , Linha 7: <i>L. (L.) amazonensis</i> e Linhas 8 e 9: Controles negativos das reações de PCR e Nested PCR, respectivamente.....	42
<b>Figura 6:</b> Figura ilustrativa da região de SNPs de acordo com Uliana et al, 1994. L.a. = <i>L. (L.) amazonensis</i> ; L.V. = <i>Leishmania (Viannia)</i> sp.; L.c. = <i>L. (L.) chagasi</i> . ....	43
<b>Figura 7:</b> Alinhamento das sequências obtidas a partir das amostras utilizadas no estudo. ....	44
<b>Figura 8:</b> Produtos de Semi-Nested PCR <i>ISVB</i> das amostras do Maranhão em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras; Linha 6: <i>L. (V.) braziliensis</i> ; Linha 7: <i>L. (V.) guyanensis</i> ; Linhas 8 e 9: Controles negativos PCR e Semi Nested, respectivamente. ....	45
<b>Figura 9:</b> Produtos de Semi-Nested PCR <i>G6PD</i> (237 pb) em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: <i>L. (V.) braziliensis</i> , Linha 7: <i>L. (V.) guyanensis</i> , Linha 8: <i>L. (L.) amazonensis</i> , Linhas 9 e 10: controles negativos de PCR e Semi-Nested PCR, respectivamente.....	46
<b>Figura 10:</b> Produtos de Semi-Nested PCR <i>ISVB</i> das amostras do Pará em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras; Linha 6: <i>L. (V.) braziliensis</i> ; Linha 7: <i>L. (V.) guyanensis</i> ; Linhas 8 e 9: controles negativos PCR e Semi-Nested, respectivamente. ....	46
<b>Figura 11:</b> Produtos de Beta actina PCR: PP: padrão de peso molecular, 1 a 13 amostras; 14: controle positivo e 15: controle negativo. ....	47
<b>Figura 12:</b> Produtos de SSUrDNA PCR humano em gel de agarose 2%. <b>PP:</b> Marcador de peso molecular; Linhas 1 a 9: amostras; Linha 10: controle negativo e Linha 11: controle positivo.....	48
<b>Figura 13:</b> Curva padrão para o ensaio de <i>G6PD</i> relacionando o logaritmo do número de cópias com o ciclo limiar da reação. ....	48
<b>Figura 14:</b> Curva padrão para o ensaio de <i>GAPDH</i> relacionando o logaritmo do número de cópias com o ciclo limiar da reação. ....	49
<b>Figura 15:</b> Taxa do número de parasitas normalizada pelo número de células do hospedeiro em amostras de LTA do Estado do Maranhão.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Oligonucleotídeos utilizados no estudo .....	31
<b>Tabela 2:</b> Número de amostras submetidas e número de resultados positivos nos ensaios de G6PD PCR e SSUrDNA PCR e Nested PCR. ....	41
<b>Tabela 3:</b> Dados obtidos nas reações de PCR em tempo real para os ensaios de G6PD e GAPDH. ....	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

DNA- ácido desoxirribonucléico

EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA- Ensaio imunoenzimático

GAPDH- gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase

G6PD- gliceraldeído 6- fosfato desidrogenase

IDRM- Intradermo reação de Montenegro

IFI- imunofluorescência Indireta

kDNA- DNA do cinetoplasto

RNA- ácido ribonucléico

LCAD- Leishmaniose cutânea anérgica difusa

LCDB- Leishmaniose cutânea disseminada borderline

LCL- Leishmaniose cutânea localizada

LCM- Leishmaniose cutânea mucosa

LM- Leishmaniose mucosa

LT- Leishmaniose tegumentar

LTA- Leishmaniose tegumentar americana

M- molar

mg- miligramas

mM- milimolar

ml- mililitros

nm- nanômetros

OMS- Organização Mundial da Saúde

pb- pares de bases

PCR- Reação em cadeia da polimerase

cPCR- PCR convencional

qPCR- PCR quantitativo

PCR-RFLP- PCR associado à análise de restrição de fragmentos polimórficos

pmol- picomol

qsp- quantidade suficiente para

rpm- rotações por minuto

SDS- Dodecil sulfato de sódio

SSUrDNA- subunidade menor do RNA ribossomal

Tris- hidroximetil aminometano

TAE- tris-acetato-EDTA

TE- Tris-EDTA

V- volumes

µl- microlitro

xg- força centrífuga

µm- micrômetros

## RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) representa um sério problema de saúde pública. No Brasil muitas espécies são reconhecidas como patogênicas para o homem, portanto o diagnóstico diferencial é necessário para compreender o perfil epidemiológico da LTA em áreas endêmicas. Com o objetivo de identificar espécies de *Leishmania* utilizando ferramentas moleculares, cinquenta e três biópsias de pele de pacientes com LTA, fixadas em formalina e incluídas em parafina dos Estados do Pará (N=33) e Maranhão (20) foram submetidos a diferentes protocolos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a identificação dos agentes causadores. Biópsias foram desparafinizadas e o DNA foi extraído usando o protocolo de fenol-clorofórmio, quantificado e submetido a reações de PCR, com base na sequência de nucleotídeos codificadora do RNA que compõe a subunidade menor do ribossomo (SSUrDNA) e da enzima Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD). O alvo G6PD foi utilizado tanto em reações de PCR convencional (cPCR), como de PCR quantitativo (qPCR). As reações de cPCR e Nested PCR SSUrDNA apresentaram resultado positivo para o gênero *Leishmania* em 40 (83,3%) das amostras submetidas. Vinte e sete desses produtos de PCR foram sequenciados, sendo 17 identificados como *L.(L.) amazonensis* e 10 como *L.(Viannia) sp.* A cPCR G6PD identificou 9 amostras como *L.(V.) braziliensis*, sendo 7 do Maranhão (36%) e 2 do Pará (6%). O DNA de *L.(Viannia) sp.* foi quantificado em quatro amostras do Maranhão através da reação de qPCR G6PD, mesmo esse alvo sendo de cópia única. Esses resultados indicam que sequências específicas de *Leishmania sp.* presentes em múltiplas cópias devem ser escolhidas para a aplicação de cPCR em DNA provindo de amostras parafinadas, uma vez que é freqüente casos de LTA com baixo parasitismo e conseqüentemente, pequenas concentrações de DNA. E ainda a cPCR SSUrDNA pode ser um bom alvo para estudos diagnósticos e epidemiológicos. A qPCR G6PD permitiu a detecção, identificação e quantificação de *L. (Viannia) sp.* em uma única etapa de amplificação em quatro amostras que apresentaram

resultados positivos somente na Nested ou Semi-Nested PCR, demonstrando uma maior sensibilidade oferecida pela q PCR.

**Palavras-Chave:** Leishmaniose Cutânea, Diagnóstico, Reação em Cadeia da Polimerase, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

## Abstract

American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) presents a serious problem of public health. In Brazil many species are recognized as pathogenic to humans, therefore differential diagnostic is necessary to understand the epidemiological profile of ACL in endemic areas. Fifty-three paraffin-embedded skin biopsies of ACL patients from Pará (N=33) and Maranhão (20) States, were submitted to different protocols of polymerase chain reaction (PCR) for identification of their causative agents. Biopsies were deparaffinized and DNA were extracted using phenol-chloroform, quantified and submitted to PCR reaction, using small subunit coding sequence (SSUrDNA) and enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD). The target of G6PD was used both in conventional PCR reactions (cPCR) and quantitative PCR (qPCR). The reactions of cPCR and Nested PCR SSUrDNA showed positive result for the genus *Leishmania* in 40 (83.3%) of the samples. Twenty-seven positive samples were submitted to sequencing and 10 were identified as *L. (Viannia) sp.* and 17 as *L. (L.) amazonensis*. The G6PD PCR identified 9 samples as *L. (V.) braziliensis*, 2 from Pará (6%) and 7 from Maranhão (35%). Four samples were quantified in G6PD qPCR, even this is a single copy. These results indicate that specific sequences from *Leishmania sp.* present in multiple copies should be chosen in relation to those from unique copies in paraffin-embedded tissues, once is frequent cases of ACL with low parasitism, consequently small DNA concentrations and that SSUrDNA can be a good target to diagnostic and epidemiologic studies of ACL. The qPCR allowed the detection and identification of *L. (Viannia) sp.* in a single round of amplification in four samples that when showed positive results only in the Nested or Semi Nested cPCR suggesting a higher sensitivity offered by qPCR.

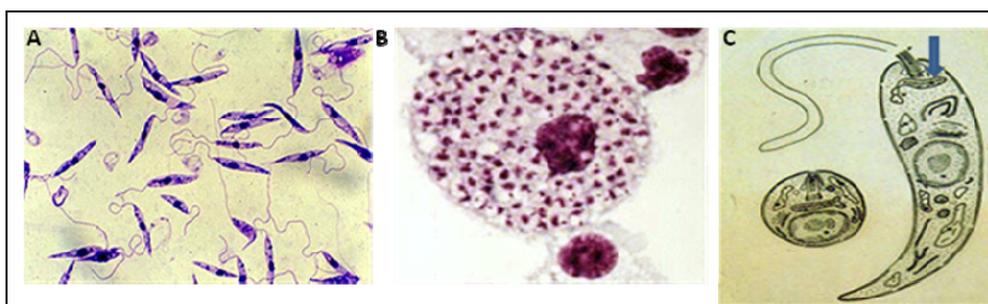
**Key-Words:** Cutaneous Leishmaniasis, Diagnosis, Polimerase Chain Reaction, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas causadores das doenças conhecidas por leishmanioses. Estes organismos pertencem à ordem Kinetoplastida, caracterizada principalmente pela presença de uma única mitocôndria diferenciada, rica em DNA, chamada cinetoplasto (Rodgers *et.al.*, 1990). O cinetoplasto localiza-se anteriormente ao corpo basal do flagelo, geralmente único e localizado na extremidade anterior do organismo (Figura 1 A).



**Figura 1:** A: Formas promastigotas. B: Macrófago infectado com formas amastigotas. C: Figura esquemática das duas formas: amastigota e promastigota, evidenciando o cinetoplasto (seta azul).

O parasita possui em seu ciclo de vida dois hospedeiros, um invertebrado e o outro vertebrado. Os hospedeiros invertebrados são fêmeas de insetos flebotomíneos, pertencentes à ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo que, somente o segundo ocorre nas Américas. Os hospedeiros vertebrados compreendem mamíferos que podem ser silvestres ou urbanos (Silveira *et. al.*, 1991; Brandão-Filho *et.al.*, 2003). O parasita apresenta duas formas de vida: no hospedeiro invertebrado ocorre na forma

extracelular flagelada, promastigota (Figura 1A e B) e no hospedeiro vertebrado, em sua forma intracelular obrigatória, denominada amastigota, arredondada, com o flagelo restrito a uma bolsa flagelar (Figura 1A e C). As formas amastigotas habitam exclusivamente células do sistema mononuclear fagocitário, sendo o macrófago a sua principal célula hospedeira (Alexander *et.al.*, 1999; Michalick, 2002).

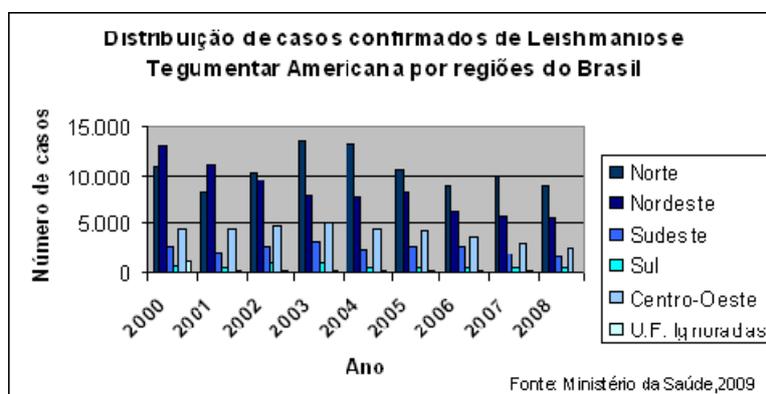
As leishmanioses consistem em um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (Brasil, 2007). São encontradas duas principais formas: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV) e esta variação clínica é determinada pela espécie do parasita causador, exceto na presença de imunodeficiência, onde espécies responsáveis por uma forma clínica podem causar outra forma da doença (Sampaio *et. al.*, 1997).

A leishmaniose tegumentar é uma doença de manifestação espectral, variando de uma forma cutânea localizada (LCL), forma anérgica difusa (LCAD), mucosa (LCM) e as intermediárias denominadas Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB) (Silveira, 2004).

As leishmanioses ocorrem em cinco continentes: Américas, Ásia, África e Europa e recentemente foi descrita na Oceania (Dougall *et.al.*, 2009). Atinge aproximadamente 88 países. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), um significativo aumento no número de casos da doença vem sendo registrado, mesmo sua notificação sendo compulsória em somente 32 países. Apesar da subnotificação da doença, estimam-se que

dois milhões de casos novos surjam a cada ano, sendo 1,5 milhões de casos de leishmaniose tegumentar e 500.000 de leishmaniose visceral (WHO, 2006).

No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) apresenta-se em franca expansão geográfica. Na década de 80 foram registrados casos em 19 unidades federadas e em 2003 todos os Estados apresentaram autoctonia. A partir da década de 80 nota-se um aumento do número de casos registrados, variando de 3.000 a 35.748 casos em 1995 (Brasil, 2006). As regiões Norte e Nordeste são responsáveis por cerca de 80% da casuística nacional (Figura 2).



**Figura 2:** Distribuição de casos confirmados de LTA por região do Brasil.

Na região Nordeste, os Estados do Maranhão, Ceará e Bahia são os principais responsáveis pela alta incidência da doença (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2000b). Foram registrados no Estado do Maranhão nos últimos oito anos, 30.929 casos, representando aproximadamente 40% do total de casos da região Nordeste (Figura 3). A região amazônica constitui a de

maior importância na casuística do Estado. A expansão da doença vem junto com uma fase de intensa devastação da floresta (Martins *et. al.*, 2004).

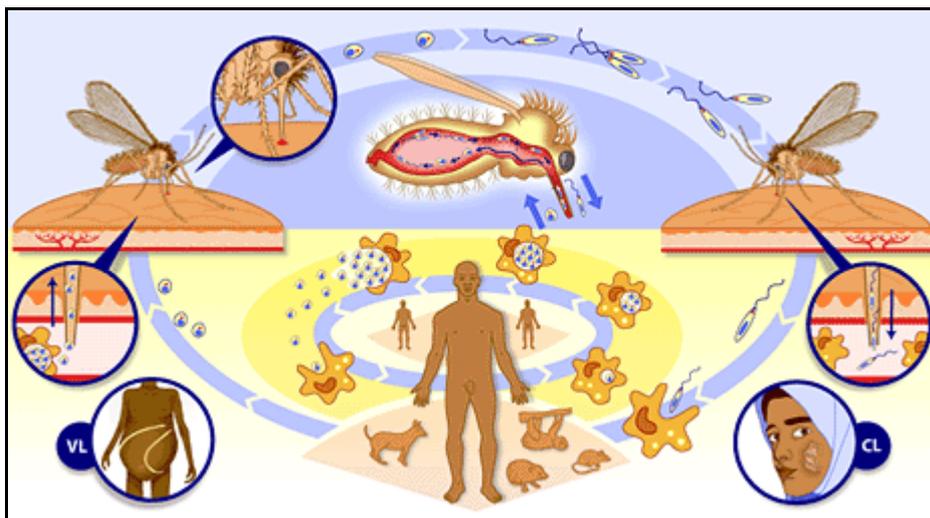
O Estado do Pará registrou, entre os anos de 1991 e 2001 cerca de 10.300 casos de LTA, sendo que 7.014 foram detectados em 2001 (Brasil, 2002).



**Figura 3:** Representatividade dos Estados do Pará e Maranhão na casuística nacional.

### 1.1. Ciclo de vida

O ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* (Figura 4) se inicia quando ao realizar o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, o inseto vetor ingere junto com o sangue formas amastigotas.



**Figura 4:** Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

No intestino do inseto, essas sofrem diferenciação em formas promastigotas procíclicas, que estão sob constante divisão binária e aderidas à parede do intestino do inseto, evitando assim, sua expulsão. Essas formas diferenciam-se na forma infectante, chamada promastigota metacíclica, por meio de um processo denominado metaciclogênese, adquirindo características que vão auxiliar na evasão da complexa barreira imune do hospedeiro vertebrado. As promastigotas metacíclicas migram para a parte anterior do aparelho digestório do inseto (esôfago, faringe e probóscida) devido a sua incapacidade de se ligar a parede do intestino e a alta capacidade de locomoção (Oliveira *et. al.*, 2003). No próximo repasto sanguíneo, os parasitas acumulados na região anterior do aparelho digestório são regurgitados no local da picada, juntamente com a saliva do vetor, que contém Maxadilan, um peptídeo vasodilatador e imunomodulador (Brodie *et. al.*, 2007). No vertebrado, grande parte desses organismos é eliminada pelo sistema complemento do hospedeiro nesta fase, porém,

algumas formas metacíclicas infectantes, ao escaparem desses mecanismos de defesa inespecíficos, são fagocitadas por algumas células, dentre elas, os macrófagos. Quando interiorizadas, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, resistentes ao ambiente ácido dos fagolisossomos, organela que se forma após a fusão de lisossomos ao fagossomo. Inicia-se um processo de divisão binária no interior dos macrófagos até causar rompimento desses, e assim, amastigotas são liberados para o meio extracelular e poderão ser fagocitados por outros macrófagos, expandindo a infecção. Depois de estabelecida a infecção, ocorre a disseminação por via linfática e/ ou sanguínea, facilitando assim, a infecção de novos flebótomos durante a hematofagia (Silveira, 2001; Michalick , 2002).

## **1.2. Epidemiologia**

O ciclo de vida desses organismos ocorre, inicialmente, em áreas rurais, entre flebótomos e mamíferos silvestres. Alguns fatores vêm contribuindo para que o homem passe a fazer parte deste ciclo como hospedeiro vertebrado para a *Leishmania*. O primeiro fator é a entrada do homem em ambientes silvestres, uma prática muito antiga e esse contato vem aumentando consideravelmente no decorrer dos anos. Atividades de caça, pesquisa, mineração, ecoturismo, entre outras, coloca o homem em contato com ambientes de vegetação primária, onde o ciclo está estabelecido, tornando-o um possível alvo de hematofagia para a fêmea do flebótomo e assim, um hospedeiro acidental para o parasita. Esse quadro

ilustra o perfil epidemiológico chamado de rural ou puramente silvestre (Brasil, 2007).

Um segundo fator importante é a colonização em zonas rurais e ou periurbanas, onde famílias inteiras se expõem ao risco de infecção. É inevitável nesse cenário, alterações ambientais que favoreçam o contato do homem com um vetor possivelmente infectado. Um fator agravante é a criação de animais domésticos como o cão, cavalos e galinhas, atrativos potenciais para os flebotomíneos (Oliveira-Pereira *et.al.*, 2008). Essa situação ilustra o perfil epidemiológico da leishmaniose denominado silvestre modificado (Lainson, 1994; Falqueto *et.al.*, 1991) Nesse contexto há espaço para enquadrar também o perfil peri-doméstico ou doméstico, visto que as zonas rurais consistem de ambientes silvestres modificados e é relatado na literatura a ocorrência de LTA em indivíduos cuja ocupação não está relacionada a atividades silvestres e também a ocorrência de LTA em indivíduos do sexo feminino e em crianças menores de 5 anos (Marzochi & Marzochi, 1994; Martins *et. al.*, 2004).

O terceiro perfil epidemiológico, chamado de urbano, é relativamente recente e está relacionado diretamente à exploração desordenada das áreas de floresta, onde essas são degradadas ao ponto de reduzir bruscamente os nichos disponíveis tanto aos vetores quanto aos mamíferos. Em paralelo temos o crescimento das cidades, que cada vez mais se expandem para estas regiões degradadas, o que causa, com o tempo, a adaptação do inseto vetor ao ambiente urbano e com isso o estabelecimento do ciclo em regiões bem urbanizadas. Algumas grandes cidades brasileiras já notificam casos de

LTA ou LV, como por exemplo, Belo Horizonte, Campinas, Cotia e Rio de Janeiro (Bevilacqua *et. al.*, 2001; Savani *et. al.*, 2004; Silva e Cunha, 2007).

### 1.3. Espécies de *Leishmania* causadoras de LTA no Brasil

A classificação das espécies de *Leishmania* como pertencentes aos subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* foi feita por Lainson & Shaw em 1987, de acordo com a posição ocupada pelo parasita no intestino do inseto vetor. Os parasitas do subgênero *L. (Leishmania)* ocupam a porção media e anterior do intestino durante sua passagem pelo hospedeiro invertebrado, enquanto que os organismos pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)*, ocupam todo o intestino do inseto. Pesquisas recentes utilizando ferramentas moleculares têm validado a classificação com a constatação de diferenças entre indivíduos dos dois subgêneros (Cupolillo *et. al.*, 1994; Ishikawa *et al* 2002).

No Brasil existem sete espécies causadoras de LTA. Seis espécies pertencem ao subgênero *L. (Viannia)*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lindenbergi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) peruviana*. A espécie pertencente ao subgênero *L. (Leishmania)* é *L. (L.) amazonensis*. As duas espécies de maior importância médica e em saúde pública no Brasil são *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (Brasil, 2007),

*Leishmania (V.) braziliensis* ocorre em todos os Estados brasileiros e é a principal espécie responsável pela LTA na América do Sul. É

responsável pela forma clínica localizada, que pode resultar na severa forma Leishmaniose cutâneo-mucosa que ocorre comumente na forma de recidiva da doença, às vezes anos após a cura da lesão primária (Lessa *et. al.*, 2007). As principais espécies de flebótomos associadas à transmissão de *L. (V.) braziliensis* são: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. complexa*, *Lu. wellcomei* e *Lu. Intermedia*, entretanto a doença pode ser transmitida por outras espécies de flebótomos. (Gomes *et.al.*, 1994; Rebêlo *et.al*, 1999; Pita-Pereira *et.al.*, 2009).

O parasita foi também, isolado de roedores silvestres dos gêneros *Bolomys* e *Nectomys* e de roedores sinantrópicos como o *Rattus rattus*, o *Canis familiaris* (Brandão-Filho *et. al.*, 2003). Até o presente momento, o papel desses animais domésticos ainda não foi bem esclarecido na transmissão de LTA, mas a presença do parasita neles, nos alerta a respeito do possível papel de reservatório e manutenção do ciclo doméstico e/ou urbano da LTA (Madeira *et. al.*, 2003; Andrade *et. al.*, 2006; Brasil, 2007).

*Leishmania (Leishmania) amazonensis*, é uma espécie de importância no cenário da LTA no Brasil, apesar de sua prevalência não ser muito alta dentre os casos de LTA. *L. (L.) amazonensis* é responsável pela forma cutânea localizada, porém, pode causar também as formas Leishmaniose Cutânea Disseminada Borderline (LCDB) e a Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa (LCAD) (Lainson *et. al.*,1994; Moraes & Silveira, 1994; Silveira *et. al.*2004).

*Leishmania (L.) amazonensis* foi isolado de roedores silvestres dos gêneros *Proechymis* e *Oryzomys* e os principais vetores associados a essa

espécies são *Lu. flaviscutellata*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva*. A *Lu. flaviscutellata* é considerada o principal vetor e apresenta hábitos alimentares pouco antropofílicos e por isso *L. (L.) amazonensis* tem uma baixa prevalência dentre os casos de LTA (Rêbello *et al.*, 1999). *L. (L.) amazonensis* ocorre em áreas úmidas de floresta primária e secundária da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão) e nas regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Sul do Brasil (Brasil, 2007).

As outras espécies do subgênero *Viannia* causadoras da LTA no homem, apresentam basicamente o perfil silvestre e resultam em infecções em trabalhadores que adentram estes ambientes. Ocorrem basicamente em florestas das regiões Norte e Nordeste (Brasil, 2002). Dados sobre infecções causadas por essas espécies são bastante limitados na literatura (Grimaldi JR *et al.*, 1991; Shaw, 1994; Marzochi & Marzochi, 1994; Silveira *et al.* 2002).

#### **1.4. Formas clínicas da LTA**

A LTA é uma doença espectral que pode apresentar diferentes perfis e o que determina essa resolução é a interação entre a espécie do parasita presente e o perfil imunogenético do hospedeiro (Almeida *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2008a). No centro do espectro da LTA temos a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), caracterizada por única ou múltiplas lesões tendo como agente etiológico qualquer espécie do gênero *Leishmania* que ocorra nas Américas. Normalmente os pacientes portadores dessa forma da

doença apresentam uma resposta celular equilibrada, tendendo ao perfil de resistência (Silveira, 2001). Nesse aspecto vale ressaltar que o estímulo antigênico do parasita também é importante na modulação da resposta e que infecções causadas por *L. (L.) amazonensis* apresentam baixa hipersensibilidade tardia observada através da Intradermo Reação de Montenegro (IDRM), que busca avaliar a resposta celular do indivíduo, ao contrário das espécies do subgênero *Viannia* que comumente reagem ao teste de Montenegro (Silveira 1998).

A Leishmaniose Cutâneo-Mucosa (LCM) ou Mucosa (LM) representam uma das formas clínicas mais severas da LTA, estando associadas a uma forte resposta celular e representando o pólo de hipersensibilidade no espectro da LTA (Romero et.al., 1995). Essas formas clínicas da doença estão associadas principalmente a *L. (V.) braziliensis* e ocorre geralmente como uma recidiva da doença em pacientes que apresentaram LCL (Llanos-Cuentas et.al., 1984; Velozo et. al., 2006). A LCM ou LM acometem de 3 a 5% de pacientes com LCL. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de LCM são: a falta de tratamento ou o tratamento inadequado da LCL por *L. (V.) braziliensis*, a presença de lesões acima da pélvis, grandes úlceras cutâneas e a aquisição de alguma imunodeficiência mesmo após muitos anos a cura da LCL (Sampaio et. al., 2002; Lessa et. al., 2007; Tuon et. al., 2007).

A forma denominada Leishmaniose Cutânea Anérgica Difusa representa o pólo de hipossensibilidade da doença. A LCAD é altamente desfigurante, caracterizada por lesões nodulares ricas em parasitas, que

podem estar distribuídas por todo o corpo do indivíduo. Frequentemente esses indivíduos apresentam resultado negativo no IDRM e falha ao tratamento convencional (Lainson & Shaw, 1978; Costa *et al*, 1992; Silveira, 2001; Silveira *et. al.* 2004). No Brasil a forma LCAD está associada à *L. (L.) amazonensis* (Silveira *et. al.*, 2008a).

Entre os dois pólos descritos acima e a forma central LCL, está a forma intermediária denominada Leishmaniose Cutânea Disseminada “Borderline” (LCDB). Essa é caracterizada por uma resposta imune celular parcialmente inibida. Está associada principalmente às espécies *L.(L.) amazonensis* e a *L.(V.) braziliensis*, e o agente etiológico parece ser importante na disseminação da doença. As características dessa forma clínica como carga parasitária e resposta imune celular são semelhantes a forma central LCL (Silveira *et al.*, 2004; 2008a, 2008b).

### **1.5. Diagnóstico da LTA**

A LTA não possui um método diagnóstico que seja considerado padrão ouro. Portanto, o diagnóstico de LTA inclui aspectos clínicos e laboratoriais (Vega-Lopez *et. al.*, 2003; Lemrani *et. al.*, 2009).

O primeiro desses aspectos a ser avaliado é o clínico (Carvalho *et. al.*, 2003; Garcia *et. al.*, 2005). O diagnóstico clínico deve observar as características da lesão em associação com a anamnese. É muito importante que o médico tenha experiência para minimizar as chances de

um diagnóstico errôneo. Lesões cutâneas podem ser diagnosticadas erroneamente como úlceras tropicais, sífilis, tuberculose cutânea, neoplasias cutâneas. Lesões mucosas devem ser diferenciadas de paracoccidioidomicose, hanseníase virchowiana, boubá, sífilis terciária, granuloma médio facial, dentre outras. Devido à variedade de doenças com sintomas e lesões semelhantes, torna-se de extrema importância o diagnóstico diferencial (Gontijo & Carvalho, 2003; Brasil, 2000a).

No que se refere ao diagnóstico laboratorial, os métodos parasitológicos, que buscam a visualização do parasita, são os mais eficientes para se concluir o diagnóstico de LTA. Esses são realizados a partir de material de escarificação, aspiração ou biópsia de lesão. Os métodos diretos consistem de lâminas coradas com *Giemsa* ou Coloração de *Leishman* (Brasil, 2002).

Entretanto, essas técnicas são pouco sensíveis e suscetíveis a resultados falso negativos, uma vez que em algumas espécies de *Leishmania* apresentam um baixo número de parasitas e também pela chance de visualização do parasita ser inversamente proporcional ao tempo de lesão (Weigle *et. al.*, 2002; Marfurt *et. al.*, 2003; Carvalho *et. al.*, 2007). Os métodos indiretos de demonstração do parasita consistem no isolamento deste a partir da lesão, que pode ser feito tanto em meio de cultura artificial ou em animais experimentais. O isolamento de algumas espécies de *Leishmania* de importância clínica, como por exemplo, *L. (V.) braziliensis*, nem sempre é realizado com sucesso (Andrade *et.al.*, 2005). Outro contratempo encontrado é a facilidade de contaminação da cultura, sendo

essa técnica um procedimento executável somente em laboratórios referência, não sendo facilmente realizado em condições de campo. Contudo, o isolamento de *Leishmania* quando realizado com sucesso, confere um diagnóstico absolutamente seguro.

As técnicas imunológicas constituem outra abordagem diagnóstica muito utilizada. Para a LTA as técnicas mais utilizadas são a IDRM, imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA). A IDRM avalia a resposta de hipersensibilidade celular tardia através do inóculo de antígenos de *Leishmania* no antebraço esquerdo. Após 48 ou 72 horas, a resposta é avaliada, sendo considerada positiva, quando a induração resultante for superior a 5 milímetros (mm). A IDRM é positiva em aproximadamente 90% dos casos. Em áreas de ocorrência de *L. (L.) amazonensis*, a positividade costuma ser menor. A reação continua positiva mesmo após anos da cura clínica, não servindo de critério diagnóstico para recidivas (Basano *et. al* 2004; Brasil, 2007).

As reações de IFI e ELISA expressam os níveis de anticorpos circulantes. Após o tratamento e cura, em ambas as formas da doença, os títulos podem cair ou desaparecer. Entretanto, em alguns casos é possível detectar títulos significantes de anticorpos em indivíduos sem recidiva ou moradores sadios de área endêmica. Por isso a avaliação de anticorpos isoladamente não é um bom critério diagnóstico (Brasil, 2007).

As técnicas de biologia molecular surgem nesse contexto como ferramentas valiosas para o diagnóstico devido à sua alta especificidade, que consiste na construção de sondas baseadas em sequências exclusivas

de DNA de determinados organismos, para assim, se chegar a uma “identidade genética” do mesmo. Dentre as técnicas moleculares, o ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem se destacado por sua sensibilidade e especificidade. Os principais alvos utilizados são DNA cinetoplasto (kDNA), sequências de DNA codificadoras de RNA ribossômico (rDNA), locus do mini-exon, locus da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), sequências teloméricas, entre outras (Singh, 2006; Bensoussan, 2006; Schonian *et. al.*, 2003; Castilho *et. al.*, 2003; Uliana *et. al.*, 1994; Fernandez *et. al.*, 1994).

A escolha do alvo a ser utilizado deve levar em consideração os objetivos da pesquisa. Nem sempre é possível a escolha de um alvo que confira sensibilidade e especificidade ao mesmo tempo. O alvo ideal deve possuir sequências repetitivas para conferir sensibilidade ao ensaio, mas ao mesmo tempo sequências variáveis, que permitam a identificação de grupos ou até mesmo espécies (Floeter-Winter & Shaw, 2004). Às vezes torna-se necessária a utilização de mais de um alvo, ou então a associação de técnicas, como por exemplo, a análise de restrição de fragmentos polimórficos (PCR-RFLP) para possibilitar a detecção e identificação de *Leishmania* (Volpini *et. al.*, 2004; Bracho *et. al.*, 2007).

A região do DNA codificadora do RNA presente na subunidade menor do ribossomo (SSUrDNA) constitui um bom alvo para aplicação com fins diagnósticos, uma vez que está presente em aproximadamente 100 cópias nos genoma dos tripanosomatídeos, conferindo um ensaio de alta sensibilidade (Uliana *et. al.*, 1991).

A Glicose-6-fosfato–desidrogenase (G6PD) é uma enzima que atua na via das pentoses (PPP), cujos produtos são vitais para o organismo, como por exemplo, para a síntese de nucleotídeos, proteínas, entre outros. Dentre os produtos está a Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo-P (NADPH), tendo função de doador de elétrons para redução na biossíntese e é também importante na defesa contra o estresse oxidativo que o parasita enfrenta dentro da célula hospedeira. Estudos realizados mostraram haver isoformas da G6PD para *Leishmania*, possibilitando, através de sequências peculiares localizadas no locus dessa enzima, diferenciar os organismos pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* e ainda, através da isoforma G6PD-7 identificar a espécie *L. (V.) braziliensis* (Barrett, 1997; Cupolillo *et. al.*, 1994; 1997). A partir dessa observação, Castilho *et. al.* (2002) determinaram as sequências de G6PD de algumas cepas referência de *Leishmania*, e com base nas diferenças encontradas desenharam oligonucleotídeos para PCR que possibilita a distinção dos organismos pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* e dentre esses, com base numa diferença de três pares de base (pb), identificar a espécie *L. (V.) braziliensis*.

A reação de PCR em tempo real (qPCR) permite a detecção, identificação e quantificação de organismos. Essa técnica oferece vantagens frente ao PCR convencional (cPCR). Dentre as vantagens está uma maior sensibilidade, uso de pequenas quantidades de amostra que podem estar fragmentadas ou degradadas, como tecidos processados de arquivos e a quantificação de organismos ou de expressão de genes. Isso contribui substancialmente com pesquisas que abrangem epidemiologia, estudos de

vetores e reservatórios, uso de modelos animais, avaliação da eficácia de tratamentos, dentre outras (Nicolas *et. al.*, 2002)

A qPCR tem sido aplicada também em estudos retrospectivos, utilizando tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina, que possuem comumente o material genético comprometido (Schander & Halanych, 2003). Estudos tem validado a qPCR como valiosa ferramenta a ser utilizada nesse tipo de amostra, possibilitando a utilização de DNA e RNA obtidos a partir de bancos amostrais, estocados as vezes, por décadas (Castiglione *et. al* 2007).

## **1.6. Justificativa**

Devido à existência da diversidade de espécies de *Leishmania* causadoras de LTA, torna-se importante que seja realizada a identificação das espécies desse parasita. Apesar do número considerável de pesquisas nessa área, ainda hoje, poucos são os ensaios capazes de chegar a uma identificação taxonômica.

A identificação de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* pelo uso de ferramentas moleculares pode levar à simplificação de estudos epidemiológicos em regiões onde ocorre simpatria desses organismos. A rapidez e sensibilidade desse método também são de extrema importância para o início do tratamento precoce, mais adequado e menos nocivo ao

paciente, uma vez que esses parasita podem causar manifestações graves, como a LCM, LCDB e LCAD.

A possibilidade da utilização de amostras parafinadas provenientes de bancos de Instituições de Ensino e Pesquisa, muitas vezes já sem utilidade específica, abre um amplo leque de pesquisas nesse material. A utilização de amostras de bancos confere vantagens como, por exemplo, grupos experimentais prontamente formados, economia de tempo e de recursos com etapas de coleta e processamento das amostras, além de permitirem a correlação com os dados clínicos levantados na ocasião da coleta e mesmo com testes de identificação de parasitas utilizados no momento de coleta

A distinção entre *L.(V.) braziliensis* e *L.(L.) amazonensis* em grupos amostrais já formados e estocados há tempos em Instituições de Ensino e Pesquisa, pode fornecer resultados valiosos com relação a aspectos históricos, epidemiológicos e clínicos de diferentes regiões do país. A quantificação dos parasitas nas amostras, associada a identificação dos mesmos e aos dados clínicos e imunológicos, podem auxiliar no entendimento da patogenia da LTA.

# **OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Identificar espécies de *Leishmania* em amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina, através de G6PD PCR e SSUrDNA PCR e; quantificar *Leishmania (Viannia)* sp. por meio de PCR em tempo real e correlacionar com dados clínicos dos pacientes

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Detectar *Leishmania* pela técnica de PCR no alvo SSUrDNA, em amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina.

2.2.2. Identificar parasitas pertencentes ao subgênero *Viannia*, distinguindo *L. (V.) braziliensis* das demais *L. (Viannia)* sp., através da G6PD PCR.

2.2.3. Identificar *L. (Viannia)* sp. e *L. (L.) amazonensis* por polimorfismo de sequência SSUrDNA.

2.2.4. Quantificar parasitas em amostras parafinadas por meio de G6PD PCR em Tempo Real e correlacionar com dados clínicos.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Organismos

Foram utilizadas neste estudo as seguintes cepas referência: *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/75/M2269), *L. (L.) chagasi* (MCER/BR/81/M6445), *L. (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/75/M4147) e *Crithidia fasciculata* (ATCC 0267).

Para os procedimentos de clonagem, foi utilizada a bactéria *Escherichia coli* da linhagem SURE (“Stop Unwanted Rearrangement Events”)- Estratagene-endA1 glnV44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 uvrC e14-  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 F'[ proAB+ lacIq lacZ $\Delta$ M15 Tn10].

#### 3.2. Plasmídeo

Foi utilizado o plasmídeo PGEM-T easy (Promega) para a clonagem de produtos de PCR.

### 3.3. Pacientes e biópsias

As biópsias foram coletadas de pacientes atendidos no ambulatório do programa de leishmanioses do Instituto Evandro Chagas, em Belém, Estado do Pará e no Núcleo de Doenças Tropicais e Medicina Social da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), São Luis, Estado do Maranhão. Foram utilizadas no estudo um total de 53 amostras sendo 33 biópsias pertencentes à primeira instituição e 20 à segunda. Os dados clínicos e diagnósticos dos pacientes oriundos dos Estados do Maranhão e Pará constam no ANEXO A e ANEXO B, respectivamente. Os pacientes foram submetidos a exame clínico e laboratorial para diagnóstico de leishmaniose tegumentar americana. A participação dos pacientes foi feita de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP/CNS), resolução 196/96, do Comitê de Ética em Pesquisa da referida instituição local (ANEXO C).

Os pacientes com diagnóstico positivo receberam tratamento específico para a doença. As biópsias de lesões cutâneas foram coletadas com “punch” de 2 ou de 4 milímetros (mm) de largura após anestesia local com xilocaína a 2%. Em seguida, as biópsias foram fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina para a aplicação de técnicas histopatológicas, imunológicas.

### 3.4. Extração de DNA

A partir dessa etapa da pesquisa, as atividades foram realizadas em colaboração com o laboratório de Fisiologia de Tripanossomatídeos do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências-USP, sob supervisão da professora Dra. Lucile Maria Floeter-Winter

O protocolo de extração de DNA foi realizado com base em Uliana *et. al.* (1991) com algumas modificações.

Para as culturas de *Leishmania*, partiu-se de 10 mililitros (mL) de cultura de promastigotas em fase estacionária e as células foram colhidas a 3.000 ×g por 5 minutos.

Para as biópsias embebidas em parafina, foram realizadas três secções de aproximadamente 10 µm nos blocos com lâmina de bisturi descartável e os fragmentos foram colocados em tubos tipo “eppendorfs”. Aos tubos foi adicionado 1 volume (V) de Xilol a 95°C, em seguida os tubos foram incubados a 37°C por 40 minutos, para a retirada da parafina dos tecidos. Depois se realizou centrifugação a 10.621 ×g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado em local apropriado e essa etapa repetida por mais uma vez. O precipitado foi lavado por duas vezes em 0,5 V de etanol absoluto para a retirada do Xilol.

Foi acrescentado aos tubos 0,5 V de solução estoque DP (1M Tris – HCl pH 8,0; 0,5 M EDTA pH 8,0; Tween 20) e 2 unidades de proteinase K para a lise celular e digestão proteica, respectivamente, em incubação a

37°C por duas horas para material provindo de cultura de parasitas e “overnight” (aproximadamente 18 horas) para material de biópsia parafinada. Em seguida realizou-se extração orgânica, acrescentando-se 0,25 V de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e 0,25 V de fenol. Os tubos foram levados ao vórtex e depois centrifugados a 13.000 ×g por 5 minutos. A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos foi transferida para outro tubo e 0,5 V de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) foi adicionado. A centrifugação foi repetida e a fase aquosa recuperada. O DNA foi precipitado pela adição de 0,1 V de 3M acetato de sódio e 2 V de etanol absoluto gelado e incubação a – 20°C por 1 hora, seguido de centrifugação a 13.000 ×g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado lavado em 70% etanol a 13.000 ×g por 10 minutos. Após o descarte do álcool, os tubos foram mantidos abertos até ficarem secos. Os “pellets” foram ressuspensos em 50 µL tampão Tris-EDTA (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) e mantidos a 4°C.

#### **3.4.1. Extração de DNA de Plasmídeo**

As extrações de DNA do plasmídeo tanto em pequena quanto em grande escala, foram feitas de acordo com Sambrook & Russel (2001).

#### **3.4.1.1. Miniprep**

Na extração em pequena escala, as células foram colhidas por centrifugação 3.000 ×g por 30 segundos. Adicionou-se 1 V da solução 1 (50 mM tris-HCL pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0 e 100 µg/mL de RNase) e os tubos levados ao vórtex. Em seguida adicionou-se 1 V de solução 2 (0,2M de NaOH e 1% SDS) e homogeneizou-se cuidadosamente. Foi adicionado então 1 V de solução 3 (3M acetato de potássio) e o tubo invertido 10 vezes lentamente. Realizou-se incubação no gelo por 10 minutos e em seguida centrifugou-se a 14000×g por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e precipitado com 2V de isopropanol e colhido por centrifugação por 15 minutos a 14000 ×g. Em seguida, o precipitado foi lavado com 2,5 V de etanol 70% por 10 minutos a 12000 ×g e o etanol descartado. Os tubos ficaram abertos até a completa evaporação do etanol e o precipitado ressuspense em tampão TE.

#### **3.4.1.2. Maxiprep**

A extração de DNA plasmidial para o preparo das curvas-padrão para as reações de PCR em tempo real, foi feita a partir de 400 ml de cultura. As células foram colhidas a 3000 ×g por 15 minutos a 4°C. Em seguida foram ressuspensas em 100 mL de tampão STE (10mM Tris-Cl pH 8.0, 0.1M NaCl e 1mM EDTA pH 8.0) e novamente centrifugadas a 3000 ×g por 15 minutos

a 4°C e ressuspensas em 0,018 V de solução 1 (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8.0 e 10mM EDTA pH8,0). Após homogeneização em vórtex, foi adicionada lisozima (10 mg/mL). Em seguida 0,4 V de solução 2 (0,2N NaOH E 1% SDS) foi adicionado e lentamente homogeneizado. Foi adicionado 0,2 V de solução 3 (5M acetato de potássio e ácido acético glacial) e cuidadosamente homogeneizado. Realizou-se incubação a -2°C por 10 minutos e em seguida centrifugação por 5 minutos a 5000 ×g a 4°C. O sobrenadante foi filtrado e adicionou-se 0,6 V isopropanol e o DNA precipitado por 30 minutos a 15.000 ×g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o precipitado lavado em etanol 70% seguido do descarte do mesmo. O tubo permaneceu aberto até a secagem e o precipitado foi ressuspensão em 5 mL de TE.

#### **3.4.1.3. Purificação de DNA Plasmidial por centrifugação em gradiente de densidade de Cloreto de Césio/ Brometo de etídio**

O DNA obtido pela extração em grande escala foi submetido a centrifugação em gradiente de Cloreto de Césio(CsCl)/ Brometo de etídio. O protocolo foi feito de acordo com Sambrook & Russel (2001) e Little (1991).

Foi adicionado 1 g de césio para cada ml de solução de DNA. Para cada 10 ml de solução DNA/CsCl adicionou-se 8 mg de brometo de etídio. Essa mistura foi centrifugada por 5 minutos a 6869 ×g. O sobrenadante foi transferido para tubo de ultracentrífuga e realizada ultracentrifugação por 18

horas e 30 minutos a 20°C, em rotor de ângulo fixo TLA-110. A ultracentrifugação foi feita em 38.584 ×g por 4:45 horas, 37.0561 ×g por 15 minutos, 34.0928 ×g por 30 minutos, 31.2530 ×g por 1 hora e 29.8794 ×g por aproximadamente 12 horas.

A banda referente ao DNA circular foi recuperada utilizando seringa e agulha 21 gauge. O DNA foi lavado por 7X em 1V de 1-Butanol saturado com 1 M NaCl em centrifugação a 20.600 ×g por 3 minutos para a retirada do brometo de etídio. A amostra foi dialisada por 48 horas com trocas sucessivas de tampão TE, para a retirada do Cloreto de Césio.

Em seguida realizou-se a quantificação em espectrofotômetro GeneQuant™ Pro (Amersham Biosciences).

#### **3.4.2. Quantificação de ácidos nucleicos**

O DNA obtido das extrações de biópsias, culturas de parasitas e Plasmídeos foi quantificado por espectrofotometria pela medida de absorbância em 260 nm. A concentração de DNA das cepas referência de *Leishmania* sp. foi ajustada em 50 nanogramas por microlitro (ng/μL). Os aparelhos utilizados para a quantificação foram GeneQuant™ Pro (Amersham Biosciences) ou Nanodrop ND 1000 (Bioscience). A pureza com relação a proteínas foi determinada pela razão das leituras em 260 nM e 280 nM.

### 3.4.3. Preparo das curvas padrão

DNA de plasmídeos contendo o alvo de quantificação foi preparado como descrito no item 3.6. Em seguida os plasmídeos foram linearizados por clivagem com enzima de restrição NCO1 (Fermentas). Após a purificação da reação, realizou-se a quantificação do DNA e então se iniciou o cálculo para se chegar a uma correspondência entre a massa plasmidial e o número de cópias do inserto. Uma vez estabelecida essa razão, o DNA plasmidial foi diluído em uma concentração referente a  $10^8$  cópias em 10  $\mu$ L e a partir dessa concentração, foi realizada uma diluição de uma ordem de grandeza para se ter até 100 cópias em 10  $\mu$ L. As curvas foram obtidas em duplicata para cada experimento.

### 3.5. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram preparadas em um volume final de 50  $\mu$ L, utilizando 100 nanomolar (nM) de cada oligonucleotídeo, 0,2 milimolar (mM) de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs), 2mM cloreto de magnésio, tampão de enzima, 2 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas). Foram adicionados de 25 a 50 ng de DNA das amostras e 100 ng de DNA controle. Os oligonucleotídeos utilizados nesse estudo e suas condições estão na Tabela 1.

Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de

agarose como descrito no item 3.8.

**Tabela 1:** Descrição dos oligonucleotídeos utilizados e condições de uso na reação.

Oligonucleotídeo	Sequência	Orientação	Temperatura de associação	Número de ciclos	Tempo de extensão	Tamanho do fragmento (pb)
S4	5'-GAT CCA GCT GCA GGT TCA CC -3'	Anti-sense	55°C	40	45"	540
S12	5'-GGT TGA TTC CGT CAA CGG AC -3'	Sense	55°C	40	45"	540
S17	5'-CCA AGC TGC CCA GTAGAA T -3'	Sense	55°C	40	45"	439
S18	5'-TGC GGC GGATAA AAC ACC-3'	Anti-sense	55°C	40	45"	439
G6PD-ISVA	5'-GTC GGT TAT CCT ATT CGG GTC-3'	Sense	60°C	30	30"	336
G6PD-ISVC	5'-ATC ACA ATG ATG GTC AAC GCA C-3'	Anti-sense	*	30	30"	*
G6PD-ISVB	5'-TAC TCG CCA TGT CGG AGG-3'	Sense	67°C	30	30"	234
G6PD-ISVNB	5'-TAC TGC CCA TGT CGT CG-3'	Sense	63°C	30	30"	137
18 S HUMANO-F	5'-CTA CCA CAT CCA AGG AAG GC-3'	Sense	60°C	40	XX	181
18 S HUMANO-R	5'-TGG AAT TAC CGC GGC TGC-3'	Anti-sense	60°C	40	XX	181
LVF	5' TTGATCACTGGTACATGCATTAAG-3'	Sense	68°C 50	50	30"	101
LVR	5'-CTCGTCCAGAAATGCAGCAC-3'	Anti-Sense	50	50	30"	101
GAPDH-F	5'-GTGGGCAAGGTCATC-3'	Sense	60°C	50	30"	144
GAPDH-R	5'-CTGCTTCAACCCTTCTTGAT-3'	Anti-Sense	60°C	50	30"	144
T7	5'-ATTATGCTGAGTGATATCCC-3'	Sense	55°C	50	20"	xxx
SP6	5'-TAAGATATCA CAGTGGATTTA -3'	Anti-Sense	55°C	50	20"	xxx
PC04	5'-CAACTTCATCCACGTTCAACC-3	Anti-sense	58°C	30	30"	267
GH20	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'	Sense	58°C	30	30"	267

\*= O tamanho do fragmento e a temperatura de associação dependem do outro oligonucleotídeo usado em conjunto.

XXX= O tamanho varia de acordo com o plasmídeo utilizado, a sequência inserida e a eficiência da reação de sequenciamento.

### 3.5.1. Subunidade Menor do Ribossomo (SSUrDNA) PCR

Esse ensaio consiste de uma reação de PCR utilizando os oligonucleotídeos S4 e S12 que amplificam um fragmento comum a todos os Tripanosomatídeos. Um segundo par de oligonucleotídeos S17 e S18, foi utilizado através de uma reação de PCR ou Nested PCR, que permitiu a amplificação de um fragmento comum somente aos indivíduos pertencentes ao gênero *Leishmania* sp. O DNA de *Crithidia fasciculata* foi utilizado como controle dessa reação, uma vez que esse apresenta amplificação no ensaio

com oligonucleotídeos S4 e S12 e não apresenta amplificação no ensaio com o segundo par de oligonucleotídeos (S17 e S18).

As reações de SSUrDNA PCR e SSUrDNA Nested PCR consistiram de uma etapa de desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos, seguida de uma série de 40 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 1 minuto. As temperaturas de associação dos oligonucleotídeos e tempo de extensão estão na Tabela 1. Por último foi realizada uma extensão final à 72°C por 10 minutos e as reações mantidas a 4°C.

### **3.5.2. Glicose 6-Fosfato Desidrogenase PCR**

A realização da PCR com os iniciadores externos ISVC-ISVA consistiu de uma primeira etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de uma série de 30 ciclos compostos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, associação a 60°C por um minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. Por último foi realizada uma extensão final a 72 °C por 10 minutos e as reações mantidas a 4°C. Em seguida foram realizadas reações de Semi-Nested PCR utilizando o oligonucleotídeo ISVB, que identifica organismos como *L. (V.) braziliensis*. E em paralelo, outra reação de Semi-Nested PCR com o oligonucleotídeo ISVNB, que amplifica para os outros organismos do subgênero *L. (Viannia)*. Ambas as reações de Semi-Nested PCR foram feitas com o oligonucleotídeo externo ISVC. As condições para

esses ensaios foram as mesmas da PCR, exceto pelas temperaturas de associação, que estão discriminadas na Tabela 1.

### **3.5.3. PCR tendo como alvo seqüências do hospedeiro.**

Com o objetivo de se verificar se o DNA extraído das amostras estava íntegro e passível de ser amplificado nas reações de PCR foram realizadas reações de PCR tendo como alvo seqüências gênicas dos hospedeiros humano e/ou mamífero. Essas reações serviram como um controle de resultados falso negativos.

#### **3.5.3.1. Beta actina**

Foram utilizados os oligonucleotídeos GH20 e PC04 (Scott *et. al.*, 2003) que amplificam um fragmento de 267 pb. Foi seguido o protocolo básico, adicionado 5 µL de DNA das amostras e 50 ng do DNA Humano (IOF/FMUSP/2016) como controle positivo e mix sem adição de DNA como controle negativo. A reação foi feita com uma desnaturação inicial do DNA realizada a 94 °C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94° por 1 minuto, associação dos oligonucleotídeos a 58°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. Após o trigésimo ciclo, realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos, as reações foram mantidas a 4° C até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose.

### 3.5.3.2. SSUrDNA Humano PCR

Foram realizadas reações de SSUrDNA PCR tendo como alvo sequências humanas. Os oligonucleotídeos utilizados nesse ensaio foram 18SHF e 18SHR. O mix foi preparado em um volume final de 50 µl, com oligonucleotídeos na concentração de 100 nM. As reações consistiram de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação a 95° por 15 segundos e uma etapa a 60°C por um minuto que compreendeu os passos de associação e extensão.

## 3.6. Clonagem e Sequenciamento do produto de PCR

Os produtos da reação de PCR com o alvo de DNA ribossômico para *Leishmania* sp. foram clonados em bactéria *E. coli* SURE utilizando o plasmídeo PGEM T easy (PROMEGA) e seqüenciados pelo método de terminação de cadeia, utilizando o Kit Big Die Terminator Plus (Applied Biosystems).

### 3.6.1. Ligação de produto de PCR em Plasmídeo

Produtos de PCR de *Leishmania* foram clonados em bactéria *E. coli* utilizando o plasmídeo pGEM T easy (Promega). A reação de ligação foi realizada utilizando 3 unidades da enzima T4 ligase (Promega) em 1X

tampão de ligase. Foi utilizada relação molar de extremidades de fragmento: vetor de 3:1. A incubação foi feita por uma hora a temperatura ambiente.

### **3.6.2. Transformação e seleção de bactérias**

A próxima etapa chamada de transformação consiste da inserção do plasmídeo pGEM T-easy (Promega) em bactéria *E coli* (SURE), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fisiologia de Tripanosomatídeos, chefiado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Lucile Maria Floeter-Winter Floeter-Winter. Após a adição da reação de ligação ao criotubo com as bactérias, foi realizada uma incubação por 10 minutos em gelo, seguida de choque térmico a 42°C. Foram adicionados 800 µL de meio SOB (2% Triptona, 0,5% Extrato de levedura, 10mM NaCl ; 2,5 mM Kcl ; 10mM MgCl<sub>2</sub> ; 10 mM MgSO<sub>4</sub> pH 6,8-7,0) e incubação realizada a 37°C por 60 minutos. As bactérias foram semeadas em placas contendo meio SOB AIX (ampicilina, IPTG e X Gal) e incubadas por 12 horas a 37°C.

Clones foram selecionados e cultivados individualmente em 3 mL de meio SOB + 10% de ampicilina e incubados por 37°C em rotação de 250 rpm por 18 horas. Em seguida, os clones foram digeridos por 2 unidades da enzima de restrição Eco R1 (Fermentas), para a verificação da presença do inserto e checagem do tamanho do mesmo. As digestões foram visualizadas através de eletroforese.

### **3.6.3. Reação de Sequenciamento**

Uma vez certificado a presença do inserto de interesse, os clones selecionados foram submetidos à reação de seqüenciamento de DNA.

A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o método de terminação de cadeia utilizando o Kit Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

Utilizou-se 3,2 picomol (pmol) dos oligonucleotídeos T7 e SP6 e 100 ng de DNA do plasmídeo. A reação de seqüenciamento foi realizada com uma etapa inicial a 96°C por 1 minuto e 30 segundos, seguida de 50 ciclos de 96°C por 20 segundos, 55°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos em termociclador Techgene (Techne). Os produtos dessa reação foram lidos em seqüenciador ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) para a determinação das sequências no Serviço de Sequenciamento do Instituto de Química da USP. As sequências de nucleotídeos obtidas foram alinhadas para a localização de SNPs presentes nessa região do SSUrDNA.

### **3.7. Clivagem de DNA por enzimas de restrição**

Para a checagem do DNA plasmidial obtido através do protocolo de miniprep, realizou-se digestão do DNA com enzima de restrição. As reações foram preparadas em um volume final de 10 µL, contendo 2 unidades da

enzima ECO R1, 1× tampão da enzima, 3 µL de DNA plasmidial e água qsp. por uma hora a 37°C.

A clivagem do DNA plasmidial extraído em grande escala foi feita com ECO R1 num volume final de 20 µL, nas mesmas concentrações e condições descritas acima.

Para a linearização do plasmídeo a ser utilizado no preparo da curva padrão foram utilizadas 10 unidades da enzima NCO1, 1× tampão Tango, 33 ng do DNA plasmidial. A reação foi incubada a 37°C por 2 horas, seguida de inativação da enzima a 65°C por 20 minutos.

### **3.8. Eletroforese**

Os produtos das reações de PCR e da clivagem de DNA por enzimas de restrição foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% preparada com tampão TAE 1× (10mM Tris-Acetato, 1mM EDTA) corados com 0,25 % Brometo de Etídio (400 µg/mL). As corridas foram feitas a 6,66 volts/cm (Gibco BRL Electrophoresis Power Supply- model 250) em tampão 1× TAE, até o corante de amostra azul de bromofenol percorrer 2/3 do comprimento do gel.

Para visualização, os géis foram iluminados com lâmpada UV 260 nm de um transluminador (Gibco). As imagens foram adquiridas com uma máquina KODAK Easy Share C743 com o filtro laranja.

### 3.9. PCR em Tempo Real

Para as reações de PCR em tempo real foram utilizadas oligonucleotídeos que amplificavam uma região do gene que codifica para a enzima Glicose 6-Fosfato Desidrogenase, de acordo com Castilho *et. al* 2008. Os oligonucleotídeos utilizados foram LVF e LVR (Tabela 1), que amplificam um fragmento de 101 pares de bases em organismos pertencentes ao subgênero *L. (Viannia)* sp. As reações foram feitas em um volume final de 25 µL com oligonucleotídeos a 100 nM e 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Foram adicionados 50 ng de DNA por amostra e cada amostra corrida em duplicata. A reação constou de uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos.

Em paralelo foram realizadas reações de PCR em tempo real com oligonucleotídeos GAPDH-F e GAPDH-R, específicos para uma sequência da enzima Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase (GAPDH) de mamíferos, com o objetivo de quantificar também o número de cópias do DNA do hospedeiro. Os oligonucleotídeos foram utilizados a 100 nM. Cinquenta nanogramas de DNA de cada amostra foi adicionada à placa. As amostras foram analisadas em duplicatas. As reações apresentaram um ciclo inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 30 segundos e 61°C por 30 segundos.

Para todos os ensaios foram obtidas curvas padrão. Essas consistiram de soluções do plasmídeo pGEM T Easy (Promega) contendo o

amplicon específico para cada reação. Nas curvas de GAPDH, a concentração do plasmídeo variou de 10 a  $10^7$  cópias por reação. E nas curvas de G6PD as variações foram de 1 a  $10^6$  cópias por reação. O Termociclador utilizado foi o modelo 7300 real-Time PCR System (Applied Biosystems). O cálculo dos números absolutos de cópias para amostras de cada ensaio foi feito levando-se em consideração a eficiência ( $E = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$ ) da reação.

# **RESULTADOS**

---

## 4. RESULTADOS

A Tabela 2 sumariza o número de amostras submetidas aos ensaios de SSUrDNA e G6PD PCR e o número de resultados positivos obtidos.

**Tabela 2:** Número de amostras submetidas e número de resultados positivos nos ensaios de G6PD PCR e SSUrDNA PCR e Nested PCR.

Ensaio	Número de amostras positivas por Estado	
	Pará (33)*	Maranhão (20)*
PCR G6PD	2	20
Semi-Nested G6PD <i>ISVB</i>	2	7
Semi-Nested G6PD <i>ISVNB</i>	0	0
	Pará (33)*	Maranhão (15)*
SSUrDNA PCR	10	0
SSUrDNA Nested PCR	30	10

\* = número total de amostras submetidas

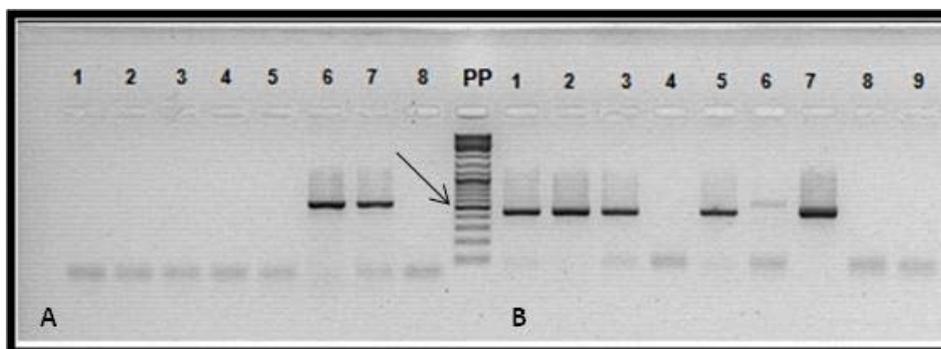
### 4.1. Subunidade Menor do Ribossomo (SSUrDNA) PCR

Para este método, foram analisadas 48 amostras no estudo, sendo 33 casos oriundos do Pará e 15 casos do Estado do Maranhão.

A análise do SSUrDNA dos 33 casos do Pará mostrou uma positividade de 10 amostras para o gênero *Leishmania*. Quando submetidas à Nested PCR, as 23 amostras inicialmente negativas apresentaram resultados positivos para 20 amostras e somente 3

apresentaram resultado negativo. Assim, reação tendo como alvo o SSUrDNA de *Leishmania* possibilitou a detecção de *Leishmania* em aproximadamente 91% das amostras do estado do Pará.

As 15 amostras do Maranhão só apresentaram resultados positivos quando submetidas à reação de Nested PCR. Dez casos (66%) apresentaram resultado positivo para a amplificação do DNA de organismos do gênero *Leishmania* (Figura 5).

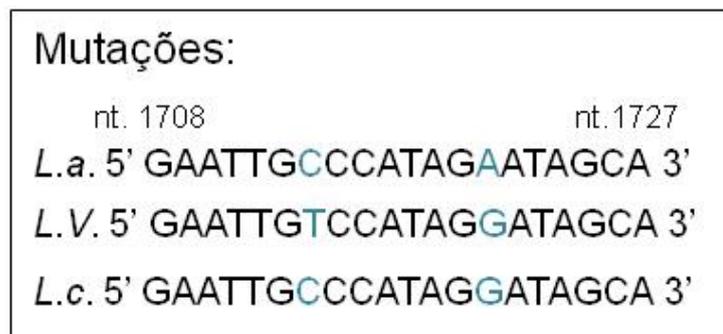


**Figura 5:** Gel ilustrativo de SSUrDNA PCR (A) e Nested PCR (B): **A:** produtos de PCR fracionados em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: *C. fasciculata*, Linha 7: *L. (L.) amazonensis* e Linha 8: controle negativo. **PP:** Marcador de peso molecular 100 pb (seta: 500 pb). **B:** Produtos de SSUrDNA Nested PCR: Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: *C. fasciculata*, Linha 7: *L. (L.) amazonensis* e Linhas 8 e 9: Controles negativos das reações de PCR e Nested PCR, respectivamente.

Das 48 amostras submetidas ao SSUrDNA PCR, foi possível detectar *Leishmania* sp. em 40 amostras, isto é, 83,3%.

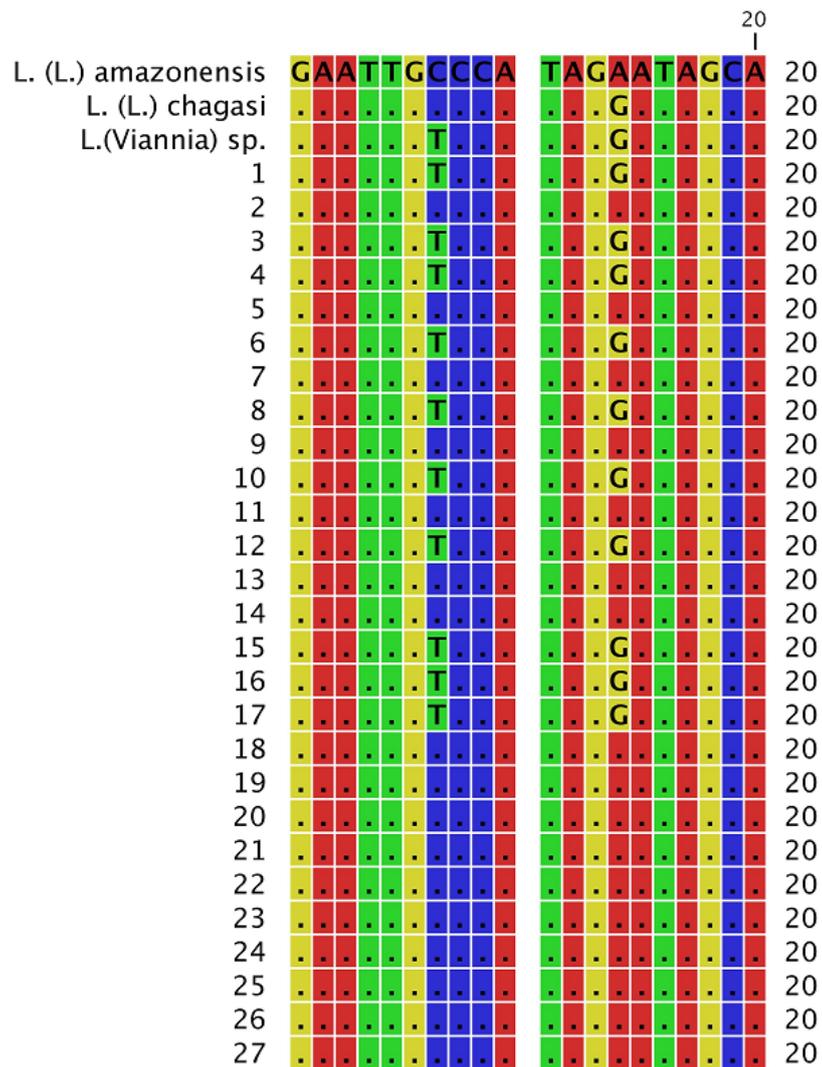
## 4.2. Sequenciamento de produtos de PCR

Na reação de SSUrDNA PCR foram utilizados pares de oligonucleotídeos que amplificam uma região que apresenta polimorfismo de um único nucleotídeo (SNPs), com ilustrado na Figura 6, possibilitando assim, a distinção de grupos e espécies de *Leishmania* (Uliana *et. al.*, 1994).



**Figura 6:** Região de SNPs com polimorfismo nas diferentes espécies de *Leishmania*. L.a. = *L. (L.) amazonensis*; L.V. = *Leishmania (Viannia) sp.*; L.c. = *L. (L.) chagasi*.

Os produtos da reação SSUrDNA PCR foram clonados e sequenciados. As sequências foram alinhadas e a região com a diferença foi analisada em 27 amostras do Pará, como apresentado na Figura 7. A análise dos resultados mostrou que de vinte e sete amostras seqüenciadas, dez foram identificadas como pertencentes ao subgênero *Viannia* e dezessete foram identificadas como *L. (L.) amazonensis*.



**Figura 7:** Alinhamento das sequências obtidas a partir das amostras utilizadas no estudo.

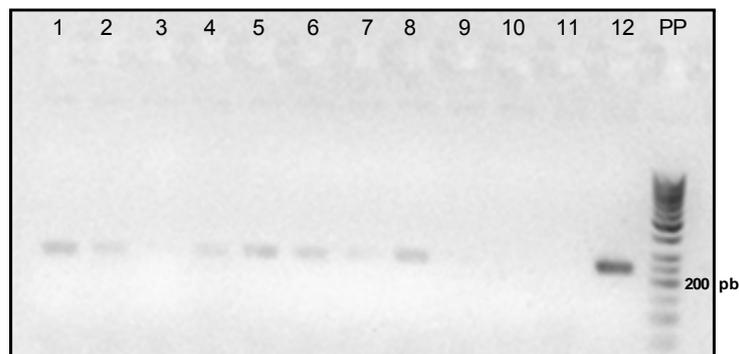
### 4.3. Glicose 6-Fosfato Desidrogenase PCR

Foram submetidas a essa reação 33 amostras do Estado do Pará e 20 amostras do Estado do Maranhão.

Todas as amostras do Estado do Maranhão apresentaram resultados negativos quando submetidas ao ensaio de PCR com os

oligonucleotídeos ISVA-ISVC. Quando submetidas ao ensaio de Semi-Nested PCR, sete amostras (35%) apresentaram resultado positivo para o ensaio ISVC-ISVB (Figura 8) e foram então classificadas como *L. (V.) braziliensis*. Já no ensaio ISVC-ISVNB todas as amostras apresentaram resultado negativo (Figura 9).

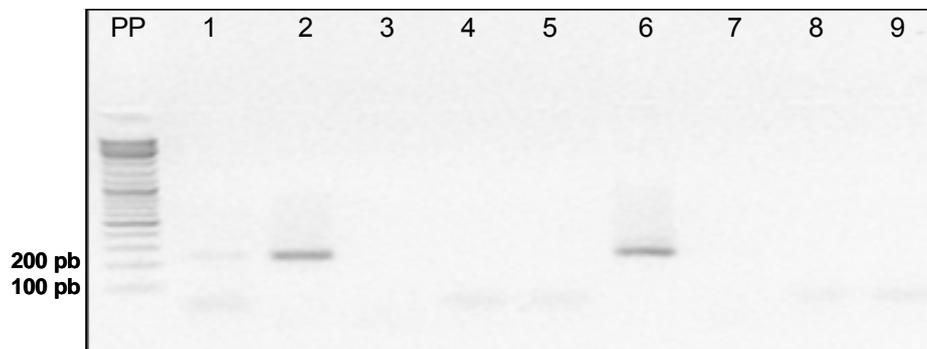
Duas das amostras do Pará (6%) apresentaram resultado positivo para o ensaio de PCR. Quando realizado o ensaio de Semi-Nested PCR, as mesmas duas amostras foram classificadas como *L. (V.) braziliensis* (Figura 10) e nenhuma amostra apresentou resultado positivo para o ensaio com ISVNB.



**Figura 8:** Produtos de Semi-Nested PCR *ISVB* das amostras do Maranhão em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 8: amostras; Linha 9: *L. (V.) guyanensis*; Linhas 10 e 11: Controles negativos PCR e Semi Nested, respectivamente; Linha 12: *L.(V) braziliensis*.



**Figura 9:** Produtos de Semi-Nested PCR G6PD (237 pb) em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras, Linha 6: *L. (V.) braziliensis*, Linha 7: *L. (V.) guyanensis*, Linha 8: *L. (L.) amazonensis*, Linhas 9 e 10: controles negativos de PCR e Semi-Nested PCR, respectivamente.



**Figura 10:** Produtos de Semi-Nested PCR ISVB das amostras do Pará em gel de agarose 2%. Linhas 1 a 5: amostras; Linha 6: *L. (V.) braziliensis*; Linha 7: *L. (V.) guyanensis*; Linhas 8 e 9: controles negativos PCR e Semi-Nested, respectivamente.

#### 4.4. PCR tendo como alvo sequências do hospedeiro.

Com o objetivo de se verificar a integridade do DNA extraído das amostras, foram realizadas reações tendo como alvo sequências gênicas dos hospedeiros mamífero ou humano. Essas reações serviram como um controle para resultados falso negativos.

#### 4.4.1. Beta actina

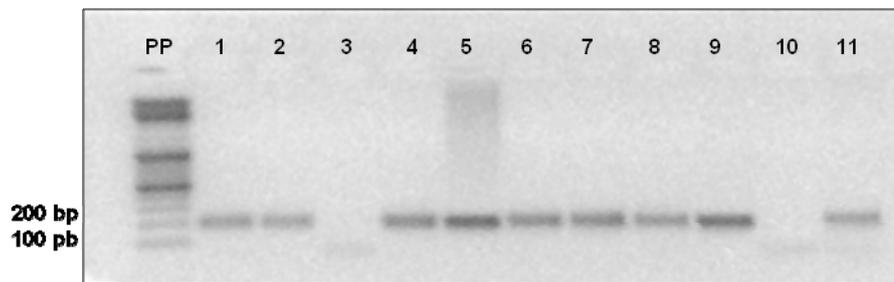
O ensaio de PCR para o gene da Beta Actina foi realizado em todas as amostras do estado do Pará e nenhuma amostra apresentou resultado positivo (Figura 11).



**Figura 11:** Produtos de Beta actina PCR: PP: padrão de peso molecular, 1 a 13 amostras; 14: controle positivo e 15: controle negativo.

#### 4.4.2. SSUrDNA Humano PCR

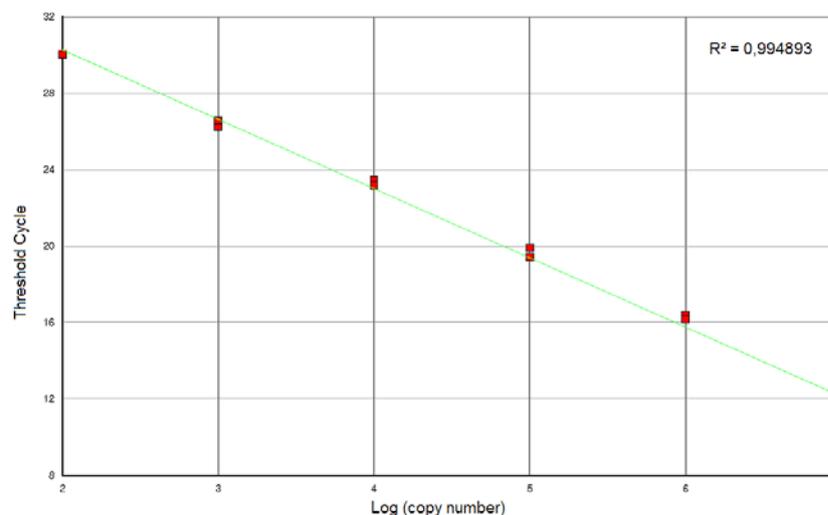
Todas as amostras (53) foram submetidas a essa reação. Cinquenta amostras (94,3%) apresentaram resultado positivo para a reação de PCR tendo como alvo sequência ribossômica humana (Figura 12).



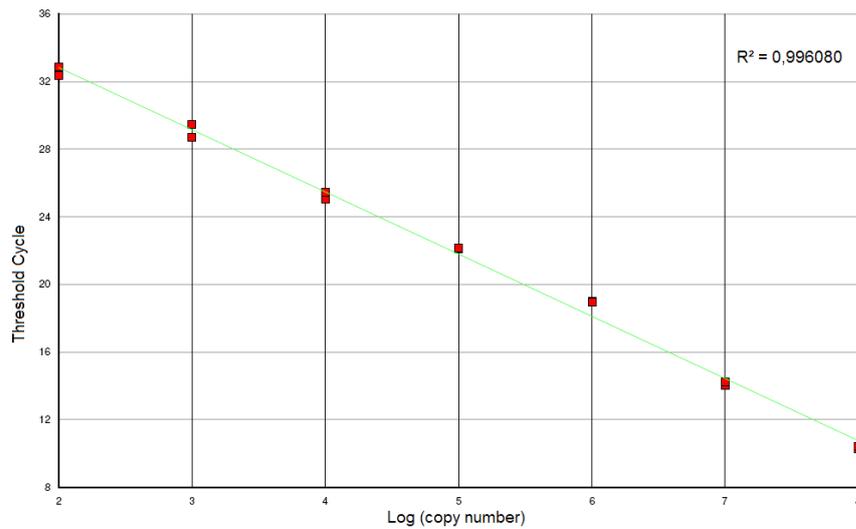
**Figura 12:** Produtos de SSUrDNA PCR humano em gel de agarose 2%. **PP:** Marcador de peso molecular; Linhas 1 a 9: amostras; Linha 10: controle negativo e Linha 11: controle positivo.

#### 4.5. PCR em tempo real

As curvas padrão para os ensaios de G6PD e GAPDH apresentaram uma boa correlação linear na faixa de  $10^2$  a  $10^7$  cópias para G6PD (Figura 13) e na faixa de  $10^2$  a  $10^8$  cópias para GAPDH (figura 14).



**Figura 13:** Curva padrão para o ensaio de G6PD relacionando o logaritmo do número de cópias com o ciclo limiar da reação.



**Figura 14:** Curva padrão para o ensaio de GAPDH relacionando o logaritmo do número de cópias com o ciclo limiar da reação.

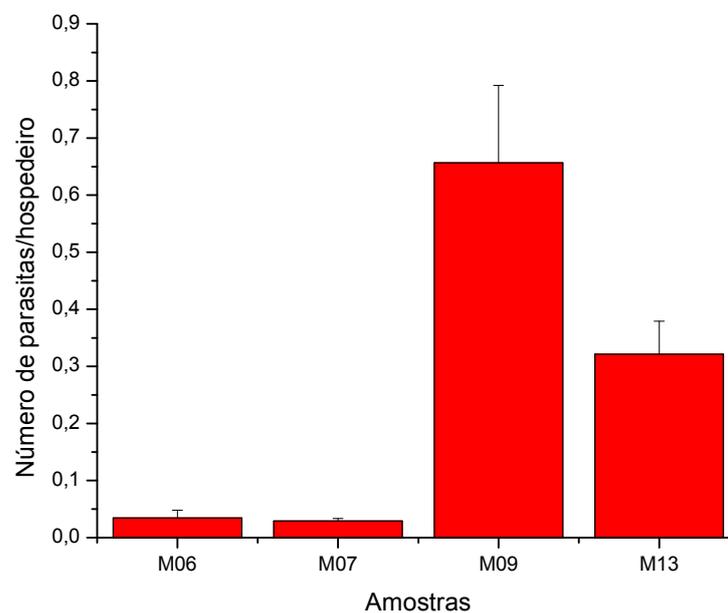
Os resultados obtidos para as amostras, assim como os valores de  $R^2$  das curvas padrão, estão mostrados na Tabela 2. O “plot” de dissociação mostrou a fluorescência como um pico único, indicando a formação de um único produto

**Tabela 3:** Dados obtidos nas reações de PCR em tempo real para os ensaios de G6PD e GAPDH.

Paciente	Razão de parasitas/hospedeiro	G6PD $R^2$	GAPDH $R^2$
M06	0,3304	0,9956	0,9505
M07	0,0291	0,9949	0,9628
M09	0,6565	0,9949	0,9676
M013	0,3213	0,9981	0,9676

A partir do valor obtido para o número de cópias de G6PD, estimou-se o número de parasitas dividindo o número de cópias por dois, visto que G6PD é um gene de cópia única e os organismos do gênero *Leishmania* são diplóides (Castilho *et. al.*, 2008). O mesmo foi feito para o gene GAPDH de mamíferos.

Após a quantificação do número de parasitas e de células do hospedeiro no qPCR, calculamos a partir desses valores a razão entre o número de parasitas por célula hospedeira. Os dados estão apresentados na Figura 15.



**Figura 15:** Número de parasitas normalizado pelo número de células do hospedeiro em amostras de pacientes com LTA do Estado do Maranhão, através do qPCR.

# DISCUSSÃO

---

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Aplicações das ferramentas moleculares em material fixado em formalina e embebido em parafina

A fixação de tecidos em formaldeído causa uma série de alterações moleculares na estrutura de ácidos nucleicos que podem resultar em diferentes conformações estruturais. Essas alterações compreendem ligações entre DNA e proteínas, hidrólise de ligações n-glicosídicas gerando locais apurínicos ou apirimídicos e hidrólise de ligações fosfodiéster, que geram fragmentos de polidesoxirribose (Srinivasan *et.al.*, 2002). São descritas na literatura etapas do processamento que contribuem para as alterações e assim puderam ser testadas formas de minimizar os danos. Fatores como o tempo de fixação, a qualidade e tratamento do formaldeído, a temperatura em que se realiza a fixação e a adição de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ao fixador, colaboram para diminuir a taxa de degradação (Castiglione *et.al.*, 1990; Schander & Halanych, 2003; Barea *et.al.*, 2004).

A reação de PCR tendo como alvo o lócus da enzima G6PD possibilitou a identificação de somente duas amostras do Pará (6%). Por outro lado, as amostras do Maranhão quando submetidas a G6PD PCR apresentaram resultados mais satisfatórios. Segundo Weigle *et. al.*,(2001) a taxa de resultados falso negativos em PCR realizada em biópsias

parafinadas pode estar relacionada a uma pobre estabilidade do DNA nesse tipo de amostra, o que pode explicar a baixa sensibilidade apresentada por esse método.

Pela aplicação da G6PD PCR, foi possível a identificação de 7 amostras do Maranhão (35%) como *L. (V.) braziliensis*. A partir desses resultados pode-se sugerir que a condição de fixação do material é de suma importância para a qualidade dos ácidos nucléicos obtidos de amostras parafinadas. As amostras do Estado do Pará datam da década de 80 e foram fixadas em formaldeído não tamponado (Silveira FT., comunicação pessoal). O uso de formaldeído não tamponado é uma condição extremamente adversa à manutenção da qualidade e integridade dos ácidos nucléicos em uma amostra (Tokuda *et.al.*, 1990). Já as amostras do Estado do Maranhão datam de 2001 e foram fixadas com formaldeído tamponado.

A SSUrDNA PCR mostrou ser uma ferramenta eficaz a ser utilizada em amostras possivelmente degradadas, uma vez que identificou 91% das amostras do Pará. Apesar das melhores condições de fixação das amostras do Maranhão, a reação SSUrDNA PCR possibilitou somente a identificação de 10 amostras (66%). Amato *et.al.* (2009), obtiveram 90,9% de positividade ao testar o mesmo ensaio em amostras parafinadas. Os resultados obtidos nesta dissertação confirmam a eficiência da SSUrDNA PCR e Nested PCR nesse tipo de amostra.

A alta eficiência de detecção da SSUrDNA PCR em biópsias parafinadas e estocadas há quase 30 anos, mostra que essa ferramenta pode favorecer estudos retrospectivos. Savani *et. al.* (2005), obtiveram bons

resultados quando utilizaram a reação SSUrDNA PCR em tecidos frescos como sangue e medula óssea, também considerados problemáticos quanto à amplificação por PCR, por conterem inibidores da reação. Volpini *et.al.* (2006), submeteram lâminas de um acervo de mais de 36 anos a reação PCR-RFLP tendo como alvo seqüências de minicírculos de kDNA e obtiveram 83,2% de detecção. Deste modo, acredita-se aprimoramento de ferramentas eficientes para a utilização em material de acervos de amostras abre um rico e vasto leque de pesquisa e aproveitamento de material, muitas vezes, inutilizado.

As evidências de degradação do DNA amostral observadas nas amostras do Pará, são corroboradas pelos resultados obtidos a partir das reações de PCR com alvos do hospedeiro. O primeiro alvo testado foi o gene da Beta actina, alvo de cópia única, onde as amostras não apresentaram amplificação. Quando essas foram submetidas a PCR tendo como alvo seqüências de DNA que codificam RNA ribossômico humano, presentes em alto número de cópias, passaram a apresentar resultados positivos. Lehmann & Kreipe (2001) ao avaliar a eficiência de amplificação de seqüências DNA obtidos a partir de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, destacam a importância do tamanho do fragmento a ser amplificado quando se trabalha com material degenerado, uma vez que a amplificação de fragmentos resulta em um sucesso maior na reação. No presente estudo obteve-se sucesso na amplificação do produto da SSUrDNA PCR (181 pb) quando comparado a beta actina PCR, que gerava um fragmento de 267 pb. Entretanto, observamos maior eficiência de

amplificação para a SSUrDNA PCR do parasita que amplifica um fragmento de 550 pb em relação ao PCR beta actina do hospedeiro. Esse resultado sugere que o DNA do parasita pode estar mais protegido do que o do hospedeiro, e que número de cópias presentes na amostra é também muito importante para o sucesso da amplificação (Mortarino et.al., 2004; Antinori et.al, 2009).

## **5.2. Detecção e identificação de *Leishmania***

A PCR pode ser aplicada com fins diagnósticos, epidemiológicos e taxonômicos. Muitas são as vantagens oferecidas por essa técnica: sensibilidade, especificidade, multiplicidade de alvos a serem explorados e a possibilidade de distinção entre grupos e às vezes, espécies. É também uma metodologia rápida e pode ser aplicada a vários tipos de amostras, permitindo assim, a realização de estudos abrangendo pacientes, reservatórios silvestres e insetos vetores (Degraeve *et.al.*, 1994; Oliveira *et.al.*, 2003; Silva *et.al.*,2005; Brandão-Filho & Shaw, 2006).

O ensaio que tem como alvo a sequência que codifica a enzima da G6PD permite a identificação de *L. (V.) braziliensis*. Essa identificação é de grande valia, pois essa é a espécie responsável por uma das formas mais severa da LTA, a LCM, que normalmente é recidiva. A identificação de *L. (V.) braziliensis* pode orientar o médico a alguns procedimentos, como por exemplo, a não tratar topicamente lesões cutâneas caudadas por *L. (V.)*

*braziliensis* e sim optar pela quimioterapia sistêmica, evitando assim, um processo de metástase (Silveira *et.al.*, 2008a). Outra medida a ser tomada após o diagnóstico de LCL por *L. (V.) braziliensis* é o acompanhamento do paciente por um longo período de tempo, mesmo após a cura da lesão, para em caso de recidiva , se fazer um diagnóstico precoce.

O sequenciamento do amplicon gerado na SSUrDNA PCR possibilita a identificação de *L. (L.) amazonensis*, segunda espécie de maior importância no Brasil, e responsável por três formas clínicas distintas da LTA, inclusive pela LCAD. Essa espécie ocorre comumente em simpatria com *L. (V.) braziliensis*, responsável pela LCM, como referido acima. Ambas as espécies podem apresentar os quadros clínicos de LCL e LCDB, portanto a identificação do agente etiológico é importante para o acompanhamento clínico do paciente (Ishikawa *et.al.*, 2002). Identificar a partir do sequenciamento do produto de uma reação de PCR, altamente sensível, amplia o grupo amostral e ainda confere certeza no resultado, uma vez que as sequências obtidas são comparadas com sequências referência.

A partir do sequenciamento dos produtos da reação SSUrDNA PCR, 62,9% das amostras do Estado do Pará foram identificadas como *L. (L.) amazonensis*. A maior positividade dos casos para *L. (L.) amazonensis* deve-se, provavelmente, ao fato da amostragem ser originada de um acervo onde as amostras estavam organizadas. A ocorrência de casos de LTA por *L. (L.) amazonensis* é normalmente baixa, pois seu inseto vetor tem baixa antropofilia quando comparado ao vetor de *L. (V.) braziliensis* (Basano & Camargo, 2004).

### 5.3. Quantificação de parasitas

Conseguiu-se identificar e quantificar parasitas em quatro amostras do banco do Maranhão através de qPCR tendo como alvo o lócus da enzima G6PD. Alguns autores sugerem que alvos de cópia única não são muito eficientes à aplicação de estudos epidemiológicos e diagnósticos (Mortarino *et.al.*, 2004; Antinori *et.al.*, 2009). No entanto, no nosso estudo a qPCR G6PD se mostrou passível de aplicação, mesmo quando empregada em material potencialmente degradado. Castilho *et.al.* (2008) ao aplicar a qPCR G6PD em amostras frescas para determinação da carga parasitária, encontrou uma ótima correlação com o ensaio de diluição limitante, método bastante utilizado para determinação do número de parasitas por massa de tecido, mas impossível de ser aplicada quando as amostras coletadas passam por fixação.

A qPCR possibilitou a detecção e identificação de *L. (Viannia)* sp. em uma única etapa de amplificação nas quatro amostras analisadas. Essas mesmas quatro amostras, quando submetidas ao SSUrDNA PCR convencional, só apresentaram resultados positivos na reação de SSUrDNA Nested-PCR. Isso sugere uma maior sensibilidade oferecida pela qPCR, visto que, o ensaio tendo como alvo a subunidade menor do ribossomo está presente em aproximadamente uma centena de cópias e o gene da G6PD, apenas em uma cópia por genoma do parasita.

Na nossa amostragem, fatores que poderiam influenciar na carga parasitária, como o tempo de evolução da lesão, são semelhantes, variando

de 2 a 4 meses (ANEXO A). Não foi possível relacionar a carga parasitária com os testes diagnósticos e dados clínicos dos pacientes. No entanto, o número de amostras submetido à qPCR foi pequeno e talvez uma amostragem maior possa começar a indicar tendências entre os fatores observados e a quantidade de parasitas na lesão.

Embora nossos resultados não tenham permitido uma análise de correlação entre os dados, pode-se observar que a qPCR G6PD mostrou ser uma reação sensível e passível de ser aplicada em amostras parafinadas. Portanto, a utilização dessa ferramenta em um grupo amostral maior e mais diverso pode conferir resultados bastante significantes relacionados à clínica, imunologia e epidemiologia da LTA.

# **CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

A PCR constitui uma boa ferramenta para estudos retrospectivos em amostras fixadas em formaldeído em incluídas em parafina. Para esse tipo de aplicação, observou-se que é mais importante a utilização de genes que presentes em muitas cópias do que o tamanho do fragmento gerado pelos oligonucleotídeos, uma vez que obteve-se a amplificação de um fragmento de aproximadamente 500 pb de *Leishmania* sp. e não se obteve sucesso na amplificação de um fragmento da Beta actina do hospedeiro com 267 pb.

A SSUrDNA PCR associada ao seqüenciamento de seu produto mostrou ser a melhor ferramenta para a detecção e identificação de *Leishmania* em amostras fixadas de forma inadequada para aplicação de técnicas de biologia molecular e estocadas por longos períodos de tempo.

A utilização da PCR e Semi-Nested tendo como alvo o locus da enzima G6PD mostrou ser passível de aplicação em amostra fixadas em formalina e embedidas em parafina, quando essas foram processadas adequadamente, possibilitando assim a identificação de *L. (V.) braziliensis* e sua distinção de outras espécies do subgênero *Viannia*.

A qPCR tendo como alvo o locus da enzima G6PD se mostrou eficiente na detecção e quantificação de *Leishmania* em DNA obtido de amostras parafinadas e pode ser usada como valiosa ferramenta em uma ampla gama de estudos.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A

### Amostras do Estado do Maranhão

Identificação da amostra	Idade (anos)	Sexo	Tempo evolução (meses)	IDRM	Esfregaço	IHQ	Tipo lesão	Número lesão	SSUrDNA PCR	SSUrDNA Nested PCR	G6PD PCR	Semi-Nested /SVB	Semi-Nested /SVNB	qPCR <i>Viannia</i> (número de parasitas/células do hospedeiro)	Classificação
M01	18	M	3	POS	NEG	NR	Cutânea/ulcerada	1	NR	NR	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M02	30	M	3	POS	POS	POS	Cutânea/ulcerada	2	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M03	31	M	3	POS	POS	POS	Cutânea/ulcerada	1	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NR	Inconclusivo
M04	39	M	1	POS	NR	NR	Cutânea/nodular	25	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NR	--
M05	NC	M	4	POS	NR	NR	Cutânea/ulcerada	1	NR	NR	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M06	NC	M	3	POS	NEG	NR	Cutânea	4	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	0,3304	<i>L. (Viannia) sp.</i>
M07	53	M	3	POS	POS	POS	Cutânea/ulcerada	1	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	0,0291	<i>L. (Viannia) sp.</i>
M08	18	M	3	POS	NEG	NR	Cutânea/ulcerada	1	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NR	Inconclusivo
M09	17	F	2	NR	POS	NR	Cutânea/ulcerada	2	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	0,6565	<i>L. (Viannia) sp.</i>
M10	17	F	3	NR	NEG	NR	Cutânea/ulcerada	1	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M11	30	M	3	POS	NEG	NR	Cutânea/ulcerada	3	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NR	--
M12	41	M	3	POS	NEG	POS	Cutânea/ulcerada	1	NEG	NR	NEG	NEG	NEG	NR	--
M13	19	F	4	POS	POS	POS	Cutânea/ulcerada	2	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	0,3213	<i>L. (Viannia) sp.</i>
M14	62	M	2	POS	POS	NR	Ulcerada	1	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M15	34	M	3	POS	POS	NR	Cutânea/ulcerada	2	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M16	51	F	4	POS	POS	NR	Cutânea/ulcerada	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NR	--
M17	20	F	5	POS	NEG	NR	Ulcerada	3	NR	NR	NEG	NEG	NEG	NR	--
M18	22	F	3	POS	NEG	NR	Infiltrativa	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NR	--
M19	15	M	3	POS	POS	NR	Cutânea/ulcerada	4	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NR	Inconclusivo
M20	47	M	2	POS	POS	NR	Cutânea/ulcerada	5	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NR	<i>L. (V.) braziliensis</i>

Legenda: F = feminino; M = masculino; POS = positivo; NEG = negativo; NR = não realizado

## ANEXO B

### Amostras do Estado do Pará

Identificação da amostra	Idade (anos)	Sexo	IDRM	Forma clínica	SSUrDNA PCR	SSUrDNA Nested PCR	G6PD PCR	Semi-Nested ISVB	Semi-Nested ISVNB	Sequenciamento	Classificação
P01	28	M	NEG	LC	POS	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P02	23	M	POS	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P03	27	M	POS	LC	POS	POS	NEG	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P04	41	M	POS	LCAD	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P05					NEG	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P06	28	M	POS	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P07	28	M	POS	LCAD	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P08	56	M	POS	LC	POS	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P09	30	M	POS	LC	POS	POS	NEG	NEG	NEG	--	--
P10	27	M		LC	POS	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P11	25	M	POS	LC	POS	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P12	36	M	POS	LC	POS	POS	NR	NEG	NEG	--	--
P13	23	M	POS	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P14	39	M	POS	LC	POS	POS	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P15	18	M	POS	LC	POS	POS	POS	POS	NEG	--	L. (V.) braziliensis
P16	78	M	NEG	LC	POS	POS	POS	POS	NEG	--	L. (V.) braziliensis
P17	20	M	POS	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P18	30	M		LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P19	55	M	POS	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P20	39	M	POS	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P21	24	M	NEG	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P22					NEG	POS	NR	NEG	NEG	--	--
P23	24	M	NEG	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P24	21	M	POS	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P25	34	M	POS	LC	NEG	NEG	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P26	23	M	POS	LCM	NEG	POS	NR	NEG	NEG	--	--
P27	39	M	POS	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P28	12	M		LCAD	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.
P29	38	M		LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	--	--
P30	34	M	POS	LC	NEG	NEG	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P31	22	M	POS	LC	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	--	--
P32	17	M	POS	LC	NEG	NEG	NR	NEG	NEG	L. (L.) amazonensis	L. (L.) amazonensis
P33	18	F	POS	LC	NEG	POS	NR	NEG	NEG	Viannia sp.	Viannia sp.

Legenda: F = feminino; M = masculino; POS = positivo; NEG = negativo; NR = não realizado; LC = leishmaniose cutânea; LCD = Leishmaniose cutânea difusa; LCM = leishmaniose cutânea mucosa; LCAD = leishmaniose cutânea anérgica difusa.

## ANEXO C



## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 03/10/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0804/07**, intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE LEISHMANIA PERTENCENTES AO SUBGÊNERO VIANNIA CAUSADORAS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA PELO USO DE FERRAMENTAS MOLECULARES**" apresentado pela Área de **FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

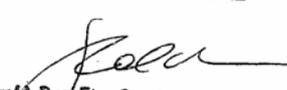
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **CLAUDIA MARIA DE CASTRO GOMES**

Pesquisador (a) Executante: **ANA CAROLINA STOCCO DE LIMA**

Encaminhe-se à CPG-FMUSP  
para as devidas providências.  
S.P., 03/10/07

CAPPesq, 05 de Outubro de 2007

  
Prof.<sup>ª</sup> Dra. Elia Garcia Caldin  
Vice Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Ciências  
Fisiopatologia Experimental

  
Prof. Dr. Eduardo Massad  
Presidente da Comissão  
de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa

## **REFERÊNCIAS**

---

## 7. REFERÊNCIAS

Alexander J, Satoskar AR, Russel DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.*1999; 18: 2993-3002.

Almeida MC, Vilhena VV, Barral A, Barral-Neto M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98 (7):861-870.

Antinori S, Calattini S, Piolini R, Longhi E, Bestetti G, Cascio A, Parravicini C, Corbellino M. Is Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) More Useful Than a Conventional PCR for the Clinical Management of Leishmaniasis? *Am. J. Trop. Med. Hyg.*2009; 81(1): 46-51.

Amato VS, Tuon FF, Andrade Jr HF, Bacha H, Pagliari C, Fernandes ER, Duarte MIS, Neto VA, Zampieri RA, Floeter-Winter LM *et.al.* Immunohistochemistry and polymerase chain reaction on paraffin embedded material improve the diagnosis of cutaneous leishmaniasis in the Amazon region. *Int J Dermatol.*2009; 48:1091-1095.

Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, Junior JFM *et.al.* Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.*2005; 38 (3):229-233

"

Andrade HM, Reis AB, Santos SL, Volpini AC, Marques MJ, Romanha AJ. Use of PCR-RFLP to identify *Leishmania* species in naturally-infected dogs. *Vet Parasitol* 2006: 231-238.

Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para a utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev. Bras.hematol.hemoter.* 2004; 26(4): 247-281.

Barret R. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol Today.*1997;13(1):11-16

Basano AS & Camargo LMA. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*2004; 7(3):328-337.

Bevilacqua PD, Paixão HH, Modena CM, Castro MCPS. Urbanização da leishmaniose visceral em Belo Horizonte. *Arq. Bras.Med. Vet.Zootec.* 2001; 53(1):1-8.

Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, Parra MR. Polimerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2007; 102(5): 549-554.

Brandão-Filho SP, Britto ME, Carvalho FG, Ishikawa EA, Cupolillo E, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania* (*V. braziliensis*) in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji, Pernambuco State, Brasil. *Trans. R. Soc.Trop. Med.Hyg.* 2003; 97(3): 291-296.

"

Brandão Filho SP, Shaw JJ. Molecular tools versus parasite isolation for evaluating the hosts of *Leishmania braziliensis*. *Trends Parasitol.*2006; 22(11): 500-501.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Doenças infecciosas parasitárias, guia de bolso. Ministério da Saúde; 2000a

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília:Ministério da Saúde; 2000b.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília. Ministério da Saúde. 2002.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana, Diagnóstico Clínico e Diferencial. Brasília. Editora do Ministério da Saúde. 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília. Editora do Ministério da Saúde.2007.

Brodie TM, Smith MC, Morris RV, Titus RG. Immunomodulatory Effects of the *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Protein Maxadilan on Mouse Macrophages. *Infect. Immun.* 2007; 75(5): 2359-2365.

Castiglione F, Degl'Innocenti DR, Taddei A, Garbini F, Buccoliero MD, Raspollini MR, *et.al.* Real-time PCR Analysis of RNA Extracted From

"

Formalin-fixed and Paraffin-embedded Tissues: Effects of the Fixation on Outcome Reliability. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2007; 15(3):338-342

Castilho TM, Shaw JJ and Floeter-Winter LM. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *J Clin Microbiol* 2002; 41(2): 540-46.

Castilho TM, Camargo LMA, Mc-Mahon-Pratt D, Shaw JJ and Floeter-WinterLM. A Real Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Identification and Quantification of American *Leishmania* Species on Basis of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2008; 78: 122-32.

Costa JM, Saldanha AC, de Melo e Silva AC, Serra Neto A, Galvão CE, Pedroso e Silva Cde M, da Silva AR. The current status of diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) in the state of Maranhão. II. The epidemiological and clinico-evolutionary aspects. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1992; 25(2):115-23.

Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general Classification of World *Leishmania* Using Numerical Zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*1994; 50(3): 296-311.

Cupolillo E, Grimaldo Jr G, Momen H. Genetic diversity among *Leishmania* (*Viannia*) parasites. *Ann Trop Med Parasitol*. 1997; 91(6):617-626.

"

Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopez U. Use of Molecular Probes and PCR for Detection and Typing of *Leishmania*- a Mini-Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1994; 98(3): 463-469.

Falqueto A, Sessa PA, Varejão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86: 499-500.

Floeter-Winter LM, Shaw JJ. New horizons in the identification and taxonomy of the *Leishmania* and the diagnoses of the leishmaniasis: the expansion of molecular techniques. *Res. Adv. in Microbiology.* 2004; 63-79.

Gomes AC. Sand fly vectorial ecology in the State of São Paulo. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1994; 89(3):457-60.

Gontijo B, Cravalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36(1):71-80.

Grimaldi G Jr, McMahan-Pratt D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol.* 1991; 2:73-118.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet.* 1999; 354: 1191-1199. Ishikawa EAY, Silveira FT, Magalhães ALP, Guerra Jr. RB, Mello MN, Gomes R, Silveira TG, Shaw JJ. Genetic variation in populations of *Leishmania* species in Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 2002; 96: 1111-1121.

Lainson R, Shaw JJ. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 1978; 273:595-600.

"

Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, Souza AAA, Braga RR, Ishikawa EAY. The Dermal Leishmaniasis of Brazil, with Special Reference to the Eco-epidemiology of the Disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 83(3): 435-443.

Lehmann U & Kreipe H. Real-Time Analysis of DNA and RNA Extracted from Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Biopsies. *Methods*. 2001; 25: 409-418.

Llanos-Cuentas EA, Marsden PD, Cuba CC, Barreto AC, Campos M. Possible risk factors in development of mucosal lesions in leishmaniasis. *Lancet*. 1984; 2(8397):295.

Lemrani M, Hamdi S, Laamrani A, Hassar M. PCR detection of *Leishmania* in skin biopsies. *J.Infect. Developing Countries*.2008; 3(2):115-122.

Lessa MM, Lessa HÁ, Castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007; 73(6): 843-847.

Little SE (Beckman Instruments) [on line]. Plasmid Separations in Tabletop Ultracentrifuges Using Fixed-Angle Rotors. Beckman Instruments; 1991. Available from:

<http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/DS-814.pdf>

Madeira MF, Uchôa CMA, Leal CA, Silva RMM, Duarte R, Magalhães CM, Serra CMB. *Leishmania (Viannia) braziliensis* em cães naturalmente infectados. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop*.2003; 36(5): 551-555.

"

"

Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and Differentiation of *Leishmania* Species in Clinical Samples by PCR Amplification of the Miniexon Sequence and Subsequent Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *J.Clin.Microbiol.* 2003; 41(7): 3147-3153.

Martins LM, Rebêlo JMM, Santos MCFV, Costa JML, Silva AR, Ferreira LA. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar no Município de Buriticupu, Amazônia do Maranhão, Brasil, 1996 a 1998. *Cad. Saúde Pública* .2004; 20(3):735-743.

Marzochi MC & Marzochi KB. Tegumentary and visceral leishmaniases in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 1994;10:359-75.

Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J.Clin.Microbiol.*2004; 42(11):5249-5255.

Moraes MAP & Sliveira FT. Histopatologia da forma Localizada de Leishmaniose Cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Inst. Med. trop.* 1994; 36(5):459-463.

Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C, Quantitative PCR in the diagnosis of *Leishmania*, *Parassitologia.* 2004; 46(1-2): 163-167.

Michalick MSM. Leishmaniose Tegumentar Americana. **In:** Neves DP. Parasitologia Humana. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. 33-53.

"

Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G. Real-Time PCR for Detection and Quantification of *Leishmania* in Mouse Tissues. *J.Clin.Microbiol.*2002; 40(5): 1666-1669.

Oliveira CI ; Báfica A; Oliveira F; Favali CBF; Correa T; Freitas LAR; Nascimento E; Costa, JM & Barral A. Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis *Clin. Infect. Dis.* 2003; 37: 149-153.

Oliveira-Pereira YN, Moraes JLP, Lorosa ES, Rêbello JMM. Preferência alimentar sanguínea de flebotomíneos da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 2008; 24(9): 2183-2186.

Pita-Pereira D, Souza GD, Zwetsch A, Calves CR, Britto C, Rangel EF. Short Report: First Report of *Lutzomyia (Nyssomyia) neivai* (Diptera: Psychodidae:Phlebotominae) Naturally Infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a Periurban Area of South Brazil Using a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2009; 80(4): 593-595.

Quaresma PF, Murta SMF, Frerreira EC, Rocha-Lima ACVM, Xavier AAP, Gontijo CMF. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Identification of *Leishmania* species by PCR-RFLP and quantification of parasites DNA by real-time PCR. *Acta Trop.* 2009: 289-294.

Rêbello JMC, Leonardo FS, Costa JML, Pereira YNO, Silva FS. Flebotomíneos (Dyptera, Psychodide) de área endêmica de leishmaniose na região dos cerrados, Estado do Maranhão, Brasil. *Cad. Saúde Pública.* 1999; 15(3): 623-630.

"

"

Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of Kinetoplast as a Tool in the Detection and Diagnosis of *Leishmania*. *Exp. Parasitol* .1990; 71: 267-275.

Romero GA, Lessa HA, Macêdo VO, de Carvalho EM, Marsden PD. Delayed skin healing of cutaneous leishmaniasis after clinical cure of mucosal surfaces. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1996; 29(3):285.

Ryan L, Lainson R, Shaw JJ, Wallbanks KR. The transmission of suprapylarian *Leishmania* by the bite of experimentally infected sand flies (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.1987; 82(3): 425-430.

Sambrook J and Russel D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3<sup>a</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Sampaio RNR, Pires JA, Sampaio JHD, Magalhães AV. Visceralização da leishmaniose cutaneomucosa disseminada causada pela *Leishmania Viannia braziliensis* em paciente imunocompetente. *An. Bras. Dermatol*. 1997; 72 (6):579-582.

Sampaio RNR, Salaro CP, Resende P, Paula CDR. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. *Rer.Soc.Bras.Med.Trop*.2002; 35(6): 651-654.

Savani ESMM, Camargo MCGO, Carvalho MR, Zampieri RA, Santos MG, D'Áuria SRN, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. The first Record in the Americas of an autochthonous case of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in

"

"

a domestic cat (*Felix catus*) from Cotia County, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2004: 229-233.

Schander C & Halanych KM. DNA, PCR and formalized animal tissue- a short review and protocols. *Org. Divers. Evol.*2003; 3: 195-205.

Scott JAG, Marston EL, Hall AJ, Marsh K. Diagnosis of Pneumococcal Pneumonia by *psaA* PCR Analysis of Lung Aspirates from Adult Patients in Kenya. *J. Clin Pathol* 2003; 41(6): 2554-59.

Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol.*2005; 21(12):550-552.

Silva LMR, Cunha PR. A urbanização da leishmaniose tegumentar americana no município de Campinas- São Paulo (SP) e região: magnitude do problema e desafios. *An Bras Dermatol.* 2007; 82(6):515-519.

Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga R, Ishikawa EEA, Souza AAA. Leishmaniose Cutanea na Amazônia: Isolamento de *Leishmania (Viannia) lainsoni* do Roedor *Agouti paca* (RODENTIA: DASYPROCTIDAE), no Estado do Pará, Brasil. *Rev. Med. Inst. Trop.* 1991; 33(1): 18-22.

Silveira FT, Blackwell JM, Ishikawa EA, Braga RR, Shaw JJ, Quinnell RJ, Soong L, Kima P, McMahon-Pratt D, Black GF, Shaw M-A. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol.*1998; 20: 19-26.

"

Silveira FT. Patogenia da leishmaniose tegumentar americana: caracterização clínica, histopatológica e imunopatológica da leishmaniose cutânea disseminada, com ênfase na doença causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2001.

Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004; 99(3): 239-251.

Silveira FT, Müller SR, Souza AA, Lainson RL, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. 2008. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. *Revista Paraense de Medicina*. 2008a; 22(1):9-20.

Silveira FT, Lainson R, Gomes CMC, Laurenti MD, Corbett CEP. Reviewing the role of the dendritic Langerhans cells in the immunopathogenesis of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008b; 102:1075-1080.

Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am. J. Pathol*. 2002; 161(6): 1961-1971.

Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994; 89(3):471-8.

"

Tokuda Y, Nakamura T, Satonaka K, Maeda S, Doi K, Baba S, Sugiyama T. Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues in formaldehyde. *J. Clin Pathol* 1990; 43: 748-51.

Tuon FF, Amato VB, Floeter-Winter, LM, Zampieri RA, Amato Neto V, França FOS, Shikanai-Yasuda MA. Cutaneous leishmaniasis reactivation 2 years after treatment caused by systemic corticosteroids-first report. *Int J Dermatol.* 2007; 46:628-630.

Uliana SRB, Affonso MLT, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: Genus identification Based on a Specific Sequence of the 18S Ribosomal RNA Sequence. *Exp. Parasitol.* 1991; 72: 157-163.

Uliana SRB, Nelson K, Beverley SM, Camargo EP and Floeter-Winter LM. Discrimination Amongst *Leishmania* by Polimerase Chain reaction and Hybridization with Small Subunit Ribossomal DNA Derived Oligonucleotides. *J.Euk. Microbiol* 1994; 41(4): 324-30.

Uliana SRB, Ishikawa E, Stempliuk VA, Souza A, Shaw JJ, Floeter-Winter. Geographical distribution of neotropical *Leishmania* of the subgenus *Leishmania* analysed by ribosomal oligonucleotide probes. *Trans. R. Soc.Trop. Med.Hyg.*2000; 94: 261-264.

Vega-López F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Infectious Disease.* 2003; 16(2):97-101.

Velozo D, Cabral A, Ribeiro MCM, Motta JOC, Costa IMC, Sampaio RNR. Leishmaniose mucosa fatal em criança. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81(3): 255-259.

"

Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. 2006 . *Acta Trop.* 90: 31-37.

Weigle KA, Labrada LA, Losano C, Santrich C, Barker D. PCR-based Diagnosis of Acute and Chronic Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 40(2): 601-606.

World Health Organization (WHO). Control of Leishmaniasis. [on line]. 2006. Disponível em: [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB118/B118\\_4-en.pdf](http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB118/B118_4-en.pdf)