

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA

**DEPARTAMENTO DE DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS**

JAQUELINE ALVES DELPRETE

**Identificação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar por
meio de técnicas moleculares tendo como alvo o gene *hsp70* e a região
ITS1**

São Paulo

2023

Jaqueline Alves Delprete

**Identificação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar
por meio de técnicas moleculares tendo como alvo o gene *hsp70* e
a região ITS1**

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 de novembro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP.

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

Programa de Doenças Infecciosas e
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. José Angelo
Lauletta Lindoso

Coorientadora: Dra. Lúcia Maria
Almeida Braz

São Paulo

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Delprete, Jaqueline Alves
Identificação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar por meio de técnicas moleculares tendo como alvo o gene hsp70 e a região ITS1 / Jaqueline Alves Delprete. -- São Paulo, 2023.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.
Coorientadora: Lúcia Maria Almeida Braz.

Descritores: 1.Leishmaniose tegumentar americana
2.Leishmania 3.Proteína de choque térmico HSP70
4.Reação em cadeia da polimerase 5.Polimorfismo de fragmento de restrição 6.Sequenciamento

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e sem a qual nada seria possível.

Ao meu companheiro Leandro, por todo amor, apoio e compreensão.

Ao meu orientador e Prof. Dr. José Angelo Lauletta Lindoso, pela oportunidade, orientação, paciência e amizade.

À minha coorientadora Dra. Lúcia Maria Almeida Braz pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Aos médicos e médicas do Ambulatório de Dermatopatias Infecto-parasitárias do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, por coletarem as amostras dos pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar.

Ao Dr. Ricardo Andrade Zampieri, por sugerir e ceder um par de oligonucleotídeos.

Ao Dr. Adriano Cappellazzo Coelho, por ceder cepas e DNA de *Leishmania* e por responder meus e-mails repletos de dúvidas.

À MsC. Edite H. Y. Kanashiro, por me ensinar a cultivar cepas de *Leishmania*.

À Prof. Dra. Hiro Goto por permitir que eu utilizasse toda estrutura de seu laboratório.

À Prof. Dra. Thelma Suely Okay por ceder espaço em seu laboratório e disponibilizar o transiluminador.

Ao Dr. Antônio Charlys Costa, pelos ensinamentos em análise de sequenciamento.

À Dra. Vania Lúcia da Matta e sua aluna Natália Uehara pelos ensinamentos e sugestões.

À MsC. Natália Godoy pela ajuda e apoio.

Aos alunos e amigos Emilly Henrique dos Santos, Luiz Henrique Camargo, Vinícius Alves de Lima, Helen Lucila de Sá, Mayumi Fujimori, Bernardina Amorín e Elda Dantas por estarem sempre presentes e me proporcionarem um ambiente de trabalho agradável.

Aos membros da banca de qualificação, Dr. Ricardo Andrade Zampieri, Dr. Adriano Cappellazzo Coelho e Dra. Camila Malta Romano pelas valiosas contribuições e sugestões.

Aos funcionários dos laboratórios de Soroepidemiologia e de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical, por todo apoio, em especial, Dra. Ana Maria Duarte, Dra. Izilda Curado, Dra. Kelly Kanunfre, Mussya Rocha, Dra. Lícia Natal e Dra. Sandra Regina Castro.

À FAPESP por financiar este projeto (Processo nº 2019/19375-0).

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização dessa dissertação e que me incentivaram neste projeto tão desafiador.

Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta.

Carl Sagan

RESUMO

Delprete JA. Identificação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar por meio de técnicas moleculares, tendo como alvos o gene *hsp70* e a região ITS1 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2023.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode ser causada por diferentes espécies de *Leishmania*, podendo haver diferentes manifestações clínicas decorrentes da espécie do parasito envolvido e, da resposta imune do hospedeiro. No Brasil são descritas oito espécies circulantes de *Leishmania*, principalmente na região norte do país, que podem causar desde forma cutânea localizada até a forma mucosa. Identificar as espécies de *Leishmania* a partir de amostras de lesão pode contribuir para melhor escolha terapêutica, pois sabidamente diferentes espécies de *Leishmania* são mais sensíveis a diferentes medicamentos. Ademais, a utilização de técnicas moleculares permite a melhor identificação do parasito, contribuindo não só para definição da espécie como também para identificar espécies que comumente não são descritas como causadoras de determinada forma clínica. Neste trabalho buscamos identificar espécies de *Leishmania* causadoras de lesão cutânea ou mucosa, utilizando-se amostras de uma corte de pacientes atendidos no Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Duzentas e onze amostras de lesão cutânea ou mucosa de pacientes com suspeita clínica de LTA foram submetidas a reação em cadeia da polimerase utilizando-se o gene codificador da proteína do choque térmico de 70kDa (*hsp70*) e a região do espaçador interno transcrito (ITS1) como alvos para diagnóstico e posteriormente, as amostras positivas, foram submetidas ao polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição e ao sequenciamento pelo método de Sanger para identificação da espécie. Oitenta e quatro amostras amplificaram na PCR para os alvos, confirmando o diagnóstico de LTA, sendo 18 amostras de leishmaniose mucosa (LM), 62 amostras de leishmaniose cutânea localizada (LCL) e 4 de leishmaniose muco-cutânea (LMC). A caracterização da espécie de *Leishmania* foi melhor obtida utilizando-se a técnica de sequenciamento de Sanger, tendo como gene alvo *hsp 70* ou a região ITS-1 com 98,8 % de concordância. Dezoito amostras de LM foram caracterizadas como *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Das 62 amostras de LCL, 56 amostras foram caracterizadas como *L. (V.) braziliensis*, três foram caracterizadas como *L. (L.) amazonensis*, três foram caracterizadas como *L. (V.) guyanensis*, uma caracterizada como *L. (L.) infantum*. Das 4 amostras de LCM, 3 foram caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* e uma amostra caracterizada como *L. (L.) amazonensis*. Somente uma amostra de LCL foi identificada como *L. (V.) guyanensis* / *L. (V.)*

panamensis com o alvo ITS1, sendo identificada como *L. (V.) guyanensis* pelo gene alvo *hsp70*. A PCR-RFLP, com gene alvo *hsp70*, utilizando-se a enzima *HaeIII* apresentou padrão de restrição característico das espécies identificadas pelo sequenciamento. A PCR-RFLP, tendo como alvo a região ITS1, com a enzima *HaeIII*, não diferenciou as espécies do subgênero *Viannia*. Nossos resultados confirmam que *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie causadora de LM no Brasil e que diferentes espécies de *Leishmania* podem causar LCL, inclusive a *L. (L.) infantum*.

Palavras chaves: Leishmaniose tegumentar americana. *Leishmania*. Proteína de choque térmico HSP70. Reação em cadeia da polimerase. Polimorfismo de fragmento de restrição. Sequenciamento. Especificidade da espécie.

ABSTRACT

Delprete JA. Identification of species that cause tegumentary leishmaniasis by molecular techniques, targeting the *hsp70* gene and ITS1 region [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2023.

American tegumentary leishmaniasis (ATL) can be caused by different species of *Leishmania* and there may be different clinical manifestations resulting from the species of parasite involved and the host's immune response. In Brazil, eight species of *Leishmania* are described, mainly in the Northern region of the country, which can cause from a localized cutaneous form to a mucosal form. Identifying *Leishmania* species from lesion samples can contribute to a better therapeutic choice, as different *Leishmania* species are known to be more sensitive to different drugs. Furthermore, the use of molecular techniques favors a better identification of the parasite, contributing not only to defining the species but also to identifying species that are not commonly described as causing a certain clinical form. In this work, we proposed to identify species of *Leishmania* that cause cutaneous or mucosal lesions, using samples from a group of patients seen at Instituto de Infectologia Emilio Ribas. Two hundred and eleven samples of cutaneous or mucosal lesions from patients with clinical suspicion of ATL were subjected to polymerase chain reaction using the 70kDa heat shock protein coding gene (*hsp70*) and the transcribed internal spacer region (ITS1) as targets for diagnosis and subsequently, the positive samples were submitted to restriction fragment length polymorphism and sequencing by the Sanger method for species identification. Eighty-four samples amplified in PCR for the targets, confirming the diagnosis of ACL, being 18 samples of mucosal leishmaniasis (ML), 62 samples of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) and 4 of mucocutaneous leishmaniasis (MCL). The characterization of the *Leishmania* species was better obtained using the Sanger sequencing technique, with the target gene *hsp 70* or the ITS-1 region with 98.8% agreement. Eighteen LM strains were characterized as *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Of the 62 LCL samples, 56 samples were characterized as *L. (V.) braziliensis*, three were characterized as *L. (L.) amazonensis*, three were characterized as *L. (V.) guyanensis*, one characterized as *L. (L.) infantum*, of the 4 MCL samples, 3 were characterized as *L. (V.) braziliensis* and one sample characterized as *L. (L.) amazonensis*. Only one LCL sample was identified as *L. (V.) guyanensis* / *L. (V.) panamensis* with the ITS1 target, being identified as *L. (V.) guyanensis* by the *hsp70* target gene. PCR-RFLP, with the target gene *hsp70*, using the *HaeIII* enzyme, showed a restriction pattern characteristic of the species identified by sequencing. PCR-RFLP, targeting

the ITS1 region, with the *HaeIII* enzyme, did not differentiate the species of the subgenus *Viannia*. Our results confirm that *L. (V.) braziliensis* is the main specie causing ML in Brazil and that different species of *Leishmania* can cause LCL, including *L. (L.) infantum*.

Keywords: American tegumentary leishmaniasis. *Leishmania*. Heat shock protein hsp70. Polymerase chain reaction. Restriction fragment length polymorphism. Sequencing. Species specificity.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Provável local de infecção dos pacientes que foram positivos na PCR.....42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Descrição dos protocolos utilizados para as diferentes reações de PCR..... 26
- Tabela 2** - Identificação de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar, pela técnica de sequenciamento Sanger pós PCR-ITS1. 333
- Tabela 3** - Identificação de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP com o gene *hsp70*, utilizando-se amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar. 36
- Tabela 4** - Identificação de espécies de *Leishmania* por sequenciamento Sanger pós PCR-*hsp70*..... 38
- Tabela 5** - Identificação de espécies de *Leishmania* pelas diferentes técnicas, utilizando-se amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar. 39
- Tabela 6** - Diagnóstico dos pacientes que não amplificaram na PCR convencional..... 40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR para o gene da β -globina.	30
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR-ITS1 convencional.	31
Figura 3 - Eletroforese em gel Nusieve de amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar submetidas ao RFLP pós PCR-ITS1.	32
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR- <i>hsp70</i> convencional (primers F25/R1310).....	34
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar submetidas à PCR- <i>hsp70</i> convencional (primers <i>hsp70cF/hsp70cR</i>)..	35
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar submetidas à nested PCR- <i>hsp70</i> convencional..	35
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar submetidas ao RFLP pós PCR- <i>hsp70</i>	37
Figura 8 - Distribuição geográfica das espécies de <i>Leishmania</i> identificadas no sequenciamento Sanger pós PCR- <i>hsp70</i>	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BLASTn	Basic local alignment search tool nucleotide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
EUA/USA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g6pd	Gene da desidrogenase glicose-6-fosfato
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HRM	High resolution melting (Dissociação em alta resolução)
hsp	Heat shock protein (Proteína de choque térmico)
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IMT	Instituto de Medicina Tropical
IRT	Tipagem da região intergênica
ITS	Internal transcriber spacer (espaçador transcrito interno)
kDNA	DNA do cinetoplasto
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PB	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PM	Padrão de peso molecular
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
rRNA	RNA ribossomal
SFB	Soro fetal bovino
SSUrRNA	RNA da subunidade ribossômica
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UV-VIS	Luz ultravioleta visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo Geral	23
3.2. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Sujeitos de Pesquisa	23
4.2. Materiais	24
4.2.1. Amostras clínicas de pacientes com suspeita leishmaniose tegumentar	24
4.2.2. Amostras de cultura de promastigotas de cepas referência.	24
4.3. Métodos	24
4.3.1. Cultura de promastigotas	24
4.3.2. Extração e quantificação de DNA	24
4.3.3. PCR convencional para o gene β -globina	25
4.3.4. PCR convencional para a região ITS1	25
4.3.5. Nested PCR para o gene alvo <i>hsp70</i>	26
4.3.6. Eletroforese em gel de agarose	27
4.3.7. PCR-RFLP-ITS1	27
4.3.8. PCR-RFLP- <i>hsp70</i>	28
4.3.9. Purificação e sequenciamento dos fragmentos obtidos na PCR-ITS1convencional	28
4.4. Aspectos Éticos	29
5. RESULTADOS	30
5.1. Detecção de DNA íntegro extraído de amostras clínicas, tendo como alvo o gene da β -globina	30
5.2. Técnica de PCR-convencional para o gene alvo ITS1	31
5.3. RFLP dos amplificados da PCR ITS-1	31
5.4. Técnica de sequenciamento Sanger dos amplificados da PCR ITS-1	32
5.5. Técnica de PCR-convencional para o gene alvo <i>hsp70</i>	33
5.6. RFLP dos amplificados da <i>nested</i> PCR- <i>hsp70</i>	36
5.7. Técnica de sequenciamento Sanger dos amplificados da PCR- <i>hsp70</i>	37
5.8. Comparação das metodologias para determinação da espécie de <i>Leishmania</i> causadora de leishmaniose tegumentar	38
5.9. Amostras de pacientes que não tiveram DNA do parasito amplificado por PCR	39
5.10. Local de procedência dos pacientes com diagnóstico de LTA	41
5.11. Identificação das espécies de <i>Leishmania</i> de acordo com o local de procedência	41
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÃO	52
8. ANEXOS	53

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grave problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (1).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão entre as sete doenças tropicais mais importantes (2) e a segunda doença causada por protozoário de importância em saúde pública, superada apenas pela malária. É estimado que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de 2 milhões de novos casos de diferentes formas clínicas. Apesar das leishmanioses ocorrerem em 98 países, sua notificação é compulsória em apenas 34% deles. Nas Américas, a leishmaniose tegumentar (LT) está presente em 18 países com ocorrência média anual de 53.387 casos (3), sendo associada ao deslocamento populacional, às condições precárias de habitação e falta de recursos de saneamento básico, afetando populações mais vulneráveis. Também está ligada a mudanças ambientais, como o desmatamento, construção de barragens, novos esquemas de irrigação e urbanização e migração de pessoas não imunes a áreas endêmicas (4). No Brasil, a LT ocorre de forma autóctone nas cinco regiões políticas, com maior prevalência na região Norte (1), sendo o estado do Pará com maior casuística e um dos estados com maior diversidade de espécies do parasito.

As leishmanioses são causadas por parasitos inicialmente descritos por Ross em 1903 (14), os quais são transmitidos por dípteros dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*.

As leishmânias são protozoários flagelados, posicionados taxonomicamente da seguinte forma: Reino Protista; Sub-Reino Protozoa; Filo Sarcomastigophora; Sub-Filo Mastigophora; Classe Zoomastigophorea; Ordem Kinetoplastida; Sub-Ordem Trypanosomatida; Família Trypanosomatidae; gênero *Leishmania*. As espécies do gênero *Leishmania* são agrupadas em dois subgêneros, cada um englobando várias espécies: no subgênero *Viannia*, as leishmânias apresentam crescimento pobre em meio de cultura e desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo, aderidos à parede, na região do piloro; já no subgênero *Leishmania*, as leishmânias crescem facilmente em cultura e se desenvolvem no intestino médio e anterior do flebotomíneo (5). Nas Américas são reconhecidas 11 espécies causadoras da

leishmaniose tegumentar em humanos, sendo sete delas identificadas no Brasil: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) amazonensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*, (1). No Brasil, a principal espécie causadora de doença tegumentar é a *Leishmania (V.) braziliensis* (1), porém pode ser causada pelas diferentes espécies descritas no Brasil, incluindo a *L. (L.) infantum* (6). Outras espécies de *Leishmania* podem causar doença tegumentar nas Américas, tais como *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. colombiensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) panamensis* (7). No Brasil a *Leishmania (V.) utingensis* foi descrita como causadora de lesão cutânea no estado do Pará e Roraima (7,8), porém sem outros relatos. Também *L. martiniquensis* e *L. orientalis* pertencentes ao subgênero *Mundinia* podem causar leishmaniose tegumentar (9), porém sem descrição de ocorrência no Brasil (10).

As características clínicas da LT são diversas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e fatores do hospedeiro, incluindo o estado imunológico. A LT pode se apresentar como:

- a) leishmaniose cutânea localizada: forma mais prevalente onde as lesões aparecem em uma área exposta, variando em número de um a dez, caracterizada principalmente por lesão ulcerada com bordas nítidas e centro limpo;
- b) leishmaniose recidiva cútis: caracterizada por lesão com área central epitelizada e bordas com sinais de atividade;
- c) leishmaniose cutânea disseminada: caracterizada por múltiplas lesões pleomórficas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo,
- d) leishmaniose cutânea difusa: condição rara com lesões ricas em parasitos, caracterizada por lesões nodulares, não ulceradas.
- e) leishmaniose mucocutânea: também conhecida como espúndia, caracterizada por comprometimento de cavidade nasal, podendo atingir a cavidade oral e faríngea, evoluindo potencialmente para lesões desfigurantes (11).

A correlação de características clínicas e espécies de *Leishmania* não é simples porque, em algumas áreas, muitas espécies diferentes coexistem e, além disso, a identificação de espécies geralmente não é realizada para amostras clínicas devido à complexidade dos procedimentos laboratoriais, bem como sua acessibilidade. (11).

As leishmanioses tegumentares são clinicamente diagnosticadas quando

apresentam suas manifestações clássicas: formas cutâneas ou mucosas. Porém, a correta identificação dos agentes etiológicos é fundamental em estudos epidemiológicos, ecológicos, clínicos e farmacológicos (12). O diagnóstico laboratorial é baseado na visualização do parasito por microscopia, pelo cultivo em meio adequado para o crescimento de *Leishmania*, pela detecção de biomoléculas do parasito ou ainda, indiretamente pela detecção de anticorpos produzidos pelo hospedeiro (13). A demonstração direta por microscopia é o procedimento de primeira escolha por ser mais rápido, de menor custo e simples execução (1); baseia-se na observação de amastigotas pela citologia em aspirado, esfregaços ou raspado de lesões e apresenta sensibilidade e especificidade variáveis decorrente do tempo de evolução da lesão, das condições de espécime clínica e da qualificação do técnico responsável pela leitura da lâmina (15,16). A obtenção de uma cultura de parasitos originada de material de biópsia não é simples, pois é muito comum a contaminação da cultura pela presença de organismos oportunistas na lesão (13). A intradermorreação de Montenegro (IDRM) consiste em uma injeção intradérmica de uma solução contendo uma preparação antigênica de promastigotas que produz uma reação alérgica, traduzindo uma resposta de hipersensibilidade cutânea tardia. Este teste tende a mostrar resultados positivos dentro de 3 meses da infecção, não tendo, entretanto, positividade frequente em infecções agudas e em formas anérgicas como a leishmaniose cutânea difusa. (17, 18). Segundo GUEDES et al. 2017, é importante afirmar também que a IDRM é um método fácil de realizar, de baixo custo, que não requer equipamentos sofisticados e pode ser realizado *in loco* (19). No entanto, este teste encontra-se suspenso no Brasil devido à interrupção da produção do antígeno pelo laboratório de referência (20). Métodos sorológicos têm sido empregados como alternativa para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, no entanto apresentam sensibilidade e especificidade variáveis dependente do antígeno utilizado e da forma clínica, além disso, a reatividade cruzada com outras doenças e baixos títulos de anticorpos são os principais entraves para uso das técnicas sorológicas (21). Ademais, observa-se sensibilidade variável devido às diferenças antigênicas entre as espécies de *Leishmania* (22). O método padrão ouro aceito pelo Ministério da Saúde para identificação de espécies de *Leishmania* é o de migração eletroforética de isoenzimas. Apesar de ser uma ferramenta com elevada especificidade, o seu desenvolvimento é bastante difícil, pois requer grande quantidade de promastigotas, e necessita de laboratório especializado para realização da técnica (23). Atualmente

o laboratório de referência para realização desta técnica é o Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro (24).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) se destaca por ser uma técnica simples, com maior especificidade e sensibilidade do que métodos diagnósticos convencionais, podendo ser realizada a partir de qualquer amostra biológica (25). A PCR tem sido empregada no diagnóstico das diferentes formas clínicas de LT, principalmente naquelas em que há baixa carga parasitária na lesão (1).

A identificação da espécie de *Leishmania* causadora da lesão é de suma importância principalmente para identificação de espécies circulantes em determinadas regiões e para detecção de entrada de novas espécies em regiões onde havia circulação somente de espécies já bem conhecidas (26). Ademais, diferentes espécies de *Leishmania* são mais suscetíveis a determinado tratamento, como no caso da *L. (V.) guyanensis* ser mais sensível à pentamidina e *L. (V.) braziliensis* ser mais sensível ao antimonialpentavalente (1). Sendo assim, ferramentas moleculares que discriminem as espécies vem sendo usadas e dentre as quais destaca-se a PCR-RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphisms*); esta técnica baseia-se na clivagem de moléculas de DNA por enzimas de restrição gerando fragmentos de diferentes tamanhos e números que podem ser visualizados em géis na forma de bandas, chamadas de perfil de digestão. Para cada segmento de DNA é possível definir essas enzimas que fornecerão fragmentos em número e tamanhos desejados (27).

Devido à necessidade de metodologias capazes de discriminar espécies de *Leishmania* iniciou-se o desenvolvimento de testes de PCR em tempo real aliado a High Resolution Melting (HRM), método que detecta diferenças na composição nucleotídica de produtos de qPCR (13).

Outro método usado para discriminar espécies é o sequenciamento dos produtos obtidos na PCR, pois esta metodologia identifica os polimorfismos encontrados no fragmento amplificado (13).

A atual disponibilidade de bancos de informações biológicas tais como sequências nucleotídicas originadas do sequenciamento de genomas, sequências preditas de peptídeos e acervos de modelos estruturais de proteínas, tem permitido a escolha de uma grande diversidade de alvos para a detecção específica de diferentes patógenos. (13).

Assim como a metodologia utilizada, é importante obter-se uma técnica robusta

com especificidade e sensibilidade adequadas; a escolha do gene alvo também é fundamental para desenvolver um teste com alta acurácia, pois dependendo do número de cópias do gene e quão conservadas são as cópias, pode-se obter resultados distintos.(28).

Diversas sequências alvos foram descritas para a detecção de DNA de *Leishmania*, sendo os mais frequentes: o DNA do mini-círculo do cinetoplasto (kDNA) (29), o RNA da subunidade ribossômica (SSUrRNA) (30), gene da desidrogenase de glicose-6-fosfato (g6pd) (31), o espaçador transcrito interno (ITS) (32, 33), e o gene *hsp70* (34, 35). A região de ITS-1 (internal transcribed spacer1) do gene do RNA ribossômico é amplamente estudada, por apresentar um número adequado de polimorfismos para a distinção, pelo menos, ao nível de espécie. Separa os sítios 18S (gene da subunidade menor) e 26S (gene da subunidade maior), incluindo duas regiões: o ITS1 e o ITS2 do RNA ribossomal (rRNA), e a sequência codificante 5.8S. Esta região possui alto nível de variação intra e interespecífica, sendo utilizadas para o estudo da genética populacional, através da técnica IRT (Tipagem da Região Intergênica). É possível o diagnóstico diferencial da maioria das espécies causadoras da leishmaniose pela digestão com a enzima de restrição *HaeIII* do fragmento amplificado por PCR da região ITS-1 (33, 36, 37) principalmente aquelas do subgênero *Leishmania*.

As “Heat-shock-proteins” (HSP) são proteínas de choque térmico de expressão constitutiva e induzida, produzidas pelo estresse, por células eucarióticas e procarióticas(38). As HSPs identificam a estrutura alterada, reparam, montam e translocam peptídeos alterados através da membrana celular, com o propósito de garantir a funcionalidade das proteínas defeituosas (39). A HSP70 está envolvida no processo em que o parasito adquire mecanismos de termotolerância, como resposta ao choque térmico. Devido às suas características, o gene *hsp70* tem sido apresentado em ensaios de PCR-RFLP como uma ferramenta universal para a discriminação das espécies de *Leishmania*. Os ensaios com a utilização da enzima *HaeIII* demonstraram utilidade na diferenciação das espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* (34, 35, 40, 41).

Apesar do entendimento de que há resposta terapêutica diferenciada, em decorrência da forma clínica e da espécie de *Leishmania*, a identificação da espécie não é um exame realizado na prática clínica para orientar o tratamento adequado. As

drogas atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde do Brasil para o tratamento da LT são as seguintes: antimoniato de meglumina, isetionato de pentamidina, anfotericina B e miltefosina (1, 4).

Apesar de haver descrição de vários métodos e diferentes alvos para o diagnóstico espécie-específico de *Leishmania* não há, até um momento, uma metodologia padronizada que possa ser empregada na prática clínica, sendo necessário a definição de um protocolo que utilize genes alvos com capacidade de discriminação ao nível da espécie e que possa ser útil para definição de espécies circulantes e causadoras de lesão.

2. JUSTIFICATIVA

Diferentes métodos laboratoriais são empregados para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar, porém com sensibilidade variável decorrente da forma clínica e da espécie de *Leishmania* envolvida. Os métodos sorológicos apresentam baixa sensibilidade e especificidade para todas as formas clínicas de LT. Os métodos parasitológicos apresentam sensibilidade e especificidade variada decorrente da espécie de *Leishmania* e da forma clínica. A pesquisa direta apresenta sensibilidade elevada na leishmaniose cutânea difusa (onde há abundância parasitária na lesão), porém tem baixa sensibilidade na forma mucosa (onde há baixa carga parasitária) e apresenta sensibilidade variável na forma cutânea localizada, decorrente do tempo de evolução da lesão e da experiência do técnico responsável pela leitura da lâmina.

Entre as estratégias para melhorar o diagnóstico das leishmanioses, as técnicas moleculares foram as que mais avançaram por apresentarem diversas vantagens, tais como: possibilidade de detecção de DNA do parasito mesmo quando há baixa carga parasitária e possibilidade de discriminação de espécie. A identificação da espécie de *Leishmania* causadora da lesão é de suma importância diante da diferente sensibilidade das espécies à terapêutica. Existem diversos métodos moleculares que exploram as características do DNA do parasito, no entanto, não há um consenso sobre qual melhor alvo ou técnica molecular para a discriminação das espécies da *Leishmania*.

Diante do exposto, propusemos a utilização da PCR-RFLP e sequenciamento dos amplificadores da região do espaçador interno transcrito (ITS-1) e do gene alvo *hsp70* para o diagnóstico espécie-específico da leishmaniose tegumentar. Apesar de cada técnica ter sua particularidade, a finalidade é identificar as diferentes espécies circulantes e potencialmente, orientar a terapêutica mais adequada baseada na espécie de *Leishmania* identificada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar as técnicas moleculares: PCR-RFLP e sequenciamento, tendo como alvos o gene *hsp70* e a região do espaçador interno transcrito (ITS1), no diagnóstico espécie-específico da leishmaniose tegumentar, em amostras de lesões cutâneas e mucosa de pacientes de uma coorte do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo.

3.2. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar o desempenho do ensaio PCR-ITS1-RFLP com a enzima *HaeIII* na caracterização das espécies causadoras da LT;
- 2- Avaliar o desempenho do ensaio PCR-*hsp70*-RFLP com a enzima *HaeIII* na caracterização das espécies causadoras da LT;
- 3- Avaliar o desempenho do sequenciamento dos amplificadores da PCR-ITS1 na caracterização das espécies causadoras da LT;
- 4- Avaliar o desempenho do sequenciamento dos amplificadores da PCR-*hsp70* na caracterização das espécies causadoras da LT.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sujeitos de Pesquisa

Para composição da coorte deste estudo retrospectivo, foram selecionados 211 pacientes com lesão cutânea e/ou mucosa suspeitas de leishmaniose tegumentar atendidos no ambulatório de dermatopatiasinfec-to-parasitárias e de mucosas do Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Estes pacientes foram devidamente esclarecidos sobre o projeto e, ao concordarem em participar, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2. Materiais

4.2.1. Amostras clínicas de pacientes com suspeita leishmaniose tegumentar

Foram utilizadas amostras clínicas obtidas de pacientes com suspeita de LT no período de março de 2018 a março de 2022. As biópsias das lesões foram realizadas de acordo com a rotina estabelecida no IIER por médicos especializados e armazenadas em tubo cônico contendo solução fisiológica 0,9% e enviadas para diagnóstico de LT para o laboratório de Protozoologia do IMT-FMUSP onde foi mantida em geladeira em temperatura de 2 a 8°C.

4.2.2. Amostras de cultura de promastigotas de cepas referência.

Foram utilizadas amostras de cepas referência, gentilmente cedidas por MsC Edite Y. Kanashiro do Laboratório de Soroepidemiologia do IMT-USP e pelo Prof. Dr. Adriano C. Coelho do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP. Foram usadas as seguintes cepas:

- a) *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269)
- b) *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MCER/BR/1981/M6445)
- c) *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903)
- d) *Leishmania (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147)
- e) *Leishmania (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533)

4.3. Métodos

4.3.1. Cultura de promastigotas

As cepas de *Leishmania* foram descongeladas e cultivadas a 26°C em meio M199 (Sigma-Aldrich, USA) acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) até alcançarem a concentração de 10^7 parasito/mL. As promastigotas foram centrifugadas a 2.000 x g por 10 minutos, a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento utilizado para extração de DNA.

4.3.2. Extração e quantificação de DNA

As amostras de cepas referência e as amostras clínicas foram submetidas ao procedimento de extração de DNA utilizando-se o Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen/Alemanha), de acordo com

as recomendações do fabricante. A amostra da lesão foi fragmentada com bisturi e misturada com 200µL do tampão ATL (tampão de lise tecidual) e colocada em termobloco a 56°C por 24h. Posteriormente foi adicionado 180µL do tampão AL (tampão de lise) e 20µL de proteinase K, aquecida em termobloco (Labnet Internacional/EUA) por 10 minutos a 56°C. A mistura foi homogeneizada e adicionado 200µL de etanol absoluto e transferida para coluna de extração. Após centrifugação a 6.000 x g por 1 minuto, o filtrado foi desprezado, feita duas lavagens consecutivas com tampão de lavagem 1 e tampão de lavagem 2. Após centrifugação a 20.000 x g por 3 minutos o pellet foi ressuspensão em tampão de eluição “AE” e armazenado a -20°C. Para extração de DNA a partir de promastigotas de *Leishmania*, de cepas referência, o processo foi iniciado a partir da adição do tampão AL, não sendo necessária a incubação anterior com tampão ATL, como feito com as amostras clínicas.

Os DNAs extraídos foram quantificados no equipamento de espectrofotometria UV-VIS modelo Nanodrop ND 1000 (ThermoScientific/EUA). Foi utilizado 2 µL do tampão de eluição “AE” como branco e 2µL de DNA da amostra a ser quantificada.

4.3.3. PCR convencional para o gene β-globina

Os DNAs extraídos das amostras foram submetidos à PCR convencional com o gene da β-globina a fim de verificar a integridade. Foram utilizados os seguintes iniciadores: GH20 5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC 3' e PC04 5' CAACTTCATCCACGTTACC 3', descritos por Bell et al. (1993) que gera um fragmento de 268pb. As condições das reações de PCR estão apresentadas na tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler gradiente thermocycler (Eppendorf/Alemanha) com um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 25 ciclos (10 segundos a 94°C; 20 segundos a 57°C; 45 segundos a 72°C) e uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.3.4. PCR convencional para a região ITS1

Foram utilizados os seguintes iniciadores: LITSR 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3' e L5.8S5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3', descritos por SCHONIAN (2003) que gera um fragmento de 320pb. As condições das reações de PCR estão apresentadas na tabela 1. A reação foi realizada em termociclador Mastercycler Gradiente Thermocycler (Eppendorf, Alemanha) com um ciclo inicial de 6 minutos a 94°C, 35 ciclos (20 segundos a 94°C; 30 segundos a 53°C; 60 segundos a 72°C;) e uma extensão final de 1 minuto a 72°C.

Tabela 1 - Descrição dos protocolos utilizados para as diferentes reações de PCR.

Reagentes	β -globina	ITS1	Pré-amplificação <i>hsp70</i>	<i>hsp70</i>
Tampão da enzima (Promega, Wiscosin/USA)	1X	1X	1X	1X
dNTP (Promega, Wiscosin/USA)	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
MgCl ₂ (Promega, Wiscosin/USA)	1,5M	4,0mM	1,5M	1,5mM
PC04	0,2mM	-	-	-
GH20	0,2mM	-	-	-
LITSR	-	0,4mM	-	-
L5.8S	-	0,4mM	-	-
<i>hsp70</i> -preamp-F	-	-	0,2mM	-
<i>hsp70</i> -preamp-R	-	-	0,2mM	-
<i>hsp70</i> cF	-	-	-	0,2mM
<i>hsp70</i> cR	-	-	-	0,2mM
Tap polimerase (GoTaq® Hot Start, Promega, Wiscosin/USA)	1U	2U	1U	1U
DNA da amostra	50ng	100ng	100ng	0,5uL do produto de pré-amplificação
Volume Final	10uL	25uL	10uL	25uL

4.3.5. Nested PCR para o gene alvo *hsp70*

Inicialmente foi realizada uma pré-amplificação utilizando os oligoiniciadores *hsp70*-preamp-F GGCATCCTGAACGTGTCCG e *hsp70*-preamp-R

ATCTTGGTCATGATCGGGTTGCAT descritos por Zampieri (2019). Posteriormente os produtos obtidos na pré-amplificação foram utilizados para amplificação dos iniciadores hsp70CF 5' GGACGAGATCGAGCGCATGGT 3' e hsp70CR 5' TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG 3', descritos por Graça et al. (2012) que gera um fragmento de 234pb. As condições da reação de PCR estão apresentadas na tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler gradiente thermocycler (Eppendorf/Alemanha) com um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos (30 segundos a 94°C; 1 minuto a 61°C; 3 minutos a 72°C) e uma extensão final de 8 minutos a 72°C.

4.3.6. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose (Agargen/Espanha) a 2% preparado com tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) [1X]. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 ou 50 pb (Sinapse Inc./EUA) e uma alíquota de 7µL (6,5µL da amostra e 0,5µL de azul de bromofenol) foi submetida à eletroforese em cuba horizontal (Loccus/Brasil) a 80V durante 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10µL em 100mL de TAE 1x) por 15 minutos e observado em transiluminador UVP High Performance UV Transilluminator (Fischer Scientific/EUA).

4.3.7. PCR-RFLP-ITS1

Os produtos obtidos na PCR-ITS1 foram submetidos à digestão com a enzima de restrição *Hae*III FastDigest® (ThermoFisher Scientific/EUA) de acordo com as instruções do fabricante: 5µL da amostra foram digeridos a 37°C por 3 minutos com 1µL (10 U) da enzima de restrição, 2µL de tampão e 10µL de água ultrapura. Posteriormente foi realizada a inativação da enzima na temperatura de 80°C por 20 minutos. Os fragmentos foram submetidos à corrida em gel de agarose Nusieve (Lonza/EUA) a 4%, submetidos a 80V em tampão TAE 1x por 90 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,1 mg (10µL em 100mL de TAE 1x) por 15 minutos, e observado em transiluminador *UVP High Performance UV Transilluminator* (Fischer Scientific/EUA).

4.3.8. PCR-RFLP-*hsp70*

Os produtos obtidos na PCR-*hsp70* foram submetidos à digestão com a enzima de restrição HaeIII FastDigest® (ThermoFisher Scientific/EUA) de acordo com as instruções do fabricante: 5µL da amostra foram digeridos a 37°C por 3 minutos com 1µL (10 U) da enzima de restrição, 2µL de tampão específico (Kit da enzima) e 10µl de água ultrapura. Posteriormente foi realizada a inativação da enzima a 80°C por 20 minutos. Os fragmentos foram submetidos à corrida em gel de agarose (Argagen/Espanha) a 3%, submetidos a 80V em tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x por 90 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,1 mg (10µL em 100mL de TAE 1x) por 15 minutos, e observado em transiluminador *UVP High Performance UV Transilluminator*(Fischer Scientific/EUA).

4.3.9. Purificação e sequenciamento dos fragmentos obtidos na PCR-ITS1 convencional

Os fragmentos amplificados na PCR convencional foram purificados utilizando-se o GeneClean II Kit (MP Biomedicals/EUA) conforme recomendações do fabricante. Resumidamente: o DNA foi ressuspense em iodeto de sódio na proporção de 1:3. e adicionado solução *GlassMilk*. A mistura foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, homogeneizando a cada minuto. Após centrifugação a 2.500 x g por 5 segundos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspense em 500uL de solução *new wash* e centrifugado a 2.500 x g por 5 segundos. Após descarte do sobrenadante, o pellet foi seco em termobloco a 55°C. O DNA foi eluído em água ultrapura adicionada na mesma quantidade de *GlassMilk* e armazenado até a realização do sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo de acordo com protocolo estabelecido, utilizando os oligonucleotídeos LITSR/L5.8S a 2,5µM (El Tai, 2001) para o alvo ITS1 e *hsp70CF/hsp70CR* (Graça et al., 2012) para o alvo *hsp70*.

As sequências forward e reverse de cada gene foram analisadas no programa BioEdit (versão 7.2.5) Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). As sequências consenso obtidas foram submetidas à ferramenta online BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para avaliação da similaridade com as sequências já depositadas no *genbank*.

4.4. Aspectos Éticos

Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do IIER (CAAE: 07801112.1.0000.0061) e pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) (CAAE: 47217419.0.0000.0068).

5. RESULTADOS

5.1. Detecção de DNA total íntegro extraído de amostras clínicas, tendo como alvo o gene da β -globina.

As amostras clínicas foram inicialmente avaliadas quanto à qualidade do DNA extraído, utilizando-se o gene housekeeping da β -globina. Observamos que o DNA de todas as amostras usadas neste projeto, amplificaram uma banda de 268pb, conforme figura 1.

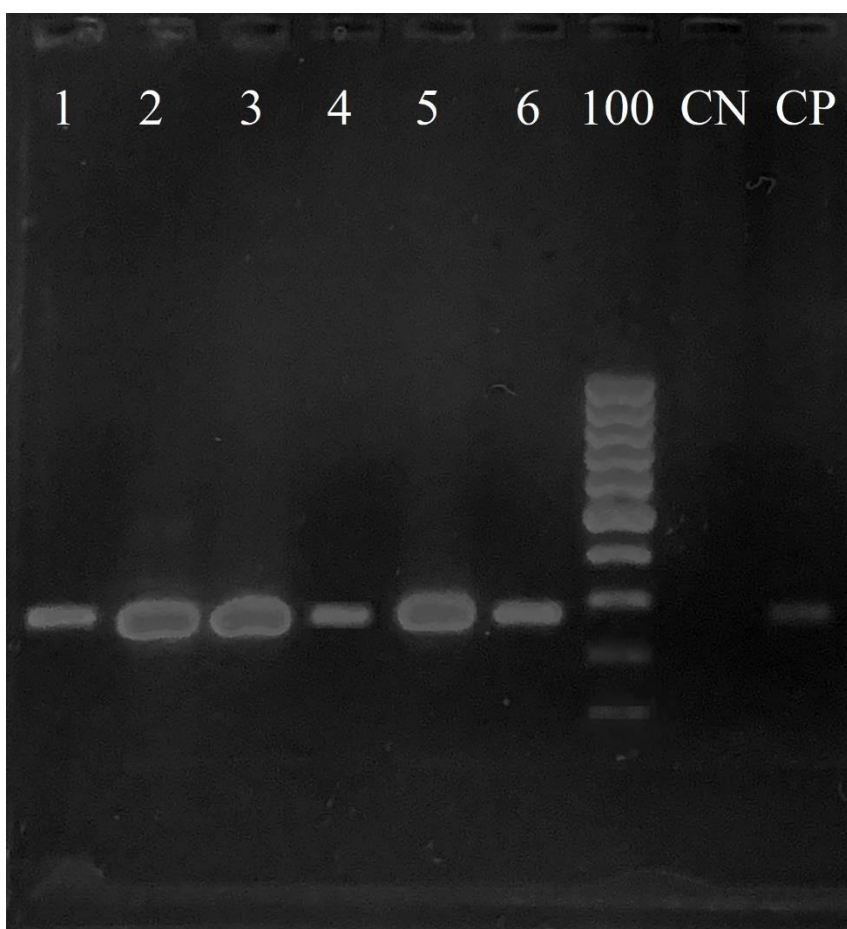


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR para o gene da β -globina. **100**: Padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb); **CP**: Controle positivo; **CN**: Controle negativo. **Colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6**: Amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar.

5.2. Técnica de PCR-convencional para o gene alvo ITS1

Das 211 amostras de lesão tegumentares analisadas, 84 (4 de lesão mucocutânea, 18 de lesão mucosa e 62 de lesão cutânea) amostras tiveram o DNA do parasito amplificado pela técnica de PCR-ITS1, produzindo um fragmento de 320pb, conforme **Figura 2**.



Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose, representativo, de amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR-ITS1 convencional. **50**: Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb); **La**: Controle positivo de *L. amazonensis*; **CN**: Controle negativo. **Colunas 3, 4, 5, 6 e 9**: Amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar e que amplificaram o gênero *Leishmania* (320 pb). **Colunas 1, 2, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17**: Amostras de pacientes com suspeita de leishmaniose tegumentar que não amplificaram o gênero *Leishmania* (320 pb).

5.3. RFLP dos amplificadores da PCR ITS-1

Todas as 84 amostras que amplificaram, correspondente à amplificação da sequência ITS-1, foram submetidas ao RFLP, e 46,42% (39/84) delas apresentaram padrão de corte condizente com o subgênero *Viannia*. Uma amostra apresentou padrão de corte condizente com *L. (L.) amazonensis* e 52,38% (44/84) não foram identificadas após o RFLP. Na Figura 3 é possível visualizar os fragmentos após RFLP-PCR-ITS1.



Figura 3- Eletroforese em gel Nusieve, representativo, de amostras de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar submetidas ao RFLP pós PCR-ITS1. **50:** Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb); **100:** Padrão de peso molecular de 100 pb. **CN:** Controle negativo; **Colunas 3, 6, 7, 8, 11:** Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que apresentaram bandas condizentes com o subgênero *Viannia* (150pb-160pb); **Coluna 9:** Amostras de paciente com leishmaniose tegumentar que apresentou bandas condizentes com *L. amazonensis* (140pb-190pb). **Colunas: 1, 2, 4, 5, 10 e 12:** Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar cujos amplificadores não apresentaram fragmentos. **La:** controles positivos de *L. amazonensis*; **Lb:** controle positivo de *L. braziliensis*.

5.4. Técnica de sequenciamento Sanger dos amplificadores da PCR ITS-1

As 84 amostras que amplificaram para a sequência ITS1 foram submetidas ao sequenciamento Sanger, sendo possível identificar 4 espécies de *Leishmania*. O maior percentual foi de *L. (V.) braziliensis* detectada em 91,7 % (77/84) das amostras de leishmaniose tegumentar; *L. (L.) amazonensis* foi detectada em 3,5% (3/84), *L. (V.) guyanensis* em 2,3% (2/84) e *L. (L.) infantum* foi identificada em 1,2% (1/84) das amostras. Uma amostra demonstrou o mesmo perfil de similaridade com duas espécies: *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*, conforme tabela 2.

Tabela 2 - Identificação de espécies de *Leishmania* em amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar, pela técnica de sequenciamento Sanger pós PCR-ITS1.

Espécies	Amostras	Porcentagem
<i>L. (V.) braziliensis</i>	77	91,7%
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3	3,5%
<i>L. (V.) guyanensis</i>	2	2,4%
<i>L. (L.) infantum</i>	1	1,2%
<i>L. (V.) guyanensis/panamensis</i>	1	1,2%
Total de amostras	84	100%

5.5. Técnica de PCR-convencional para o gene alvo *hsp70*

Inicialmente foram utilizados os oligoiniciadores F25/R1310 descritos por Montalvo et al. 2012, por apresentarem um potencial para diferenciar espécies de *Leishmania*, considerado um marcador robusto. Quando da padronização desta metodologia utilizando-se amostras de cepas referências e amostras clínicas com diagnóstico confirmado de leishmaniose tegumentar, observamos presença de grande quantidade de bandas inespecíficas no gel de agarose (Figura 3). Diante disto, realizamos algumas tentativas mudando a concentração de $MgCl_2$, dos oligoiniciadores F25/R1310 e da enzima Taq DNA polimerase, além de alterarmos também a quantidade de ciclos e temperatura de associação, porém, não obtivemos sucesso. No entanto, optamos por não mais utilizar estes oligoiniciadores.

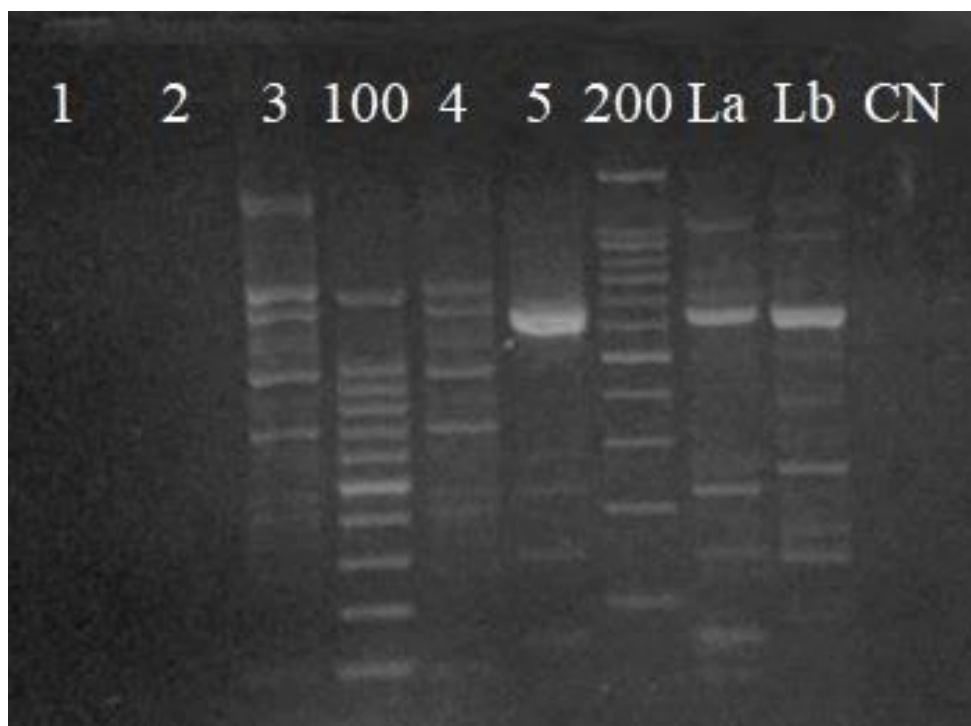


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose, representativo, de amostras de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR-*hsp70* convencional (primers F25/R1310). **100**: Padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb); **200**: Padrão de peso molecular de 200 pares de bases (pb); **La**: Controle positivo de *L. amazonensis*; **Lb**: Controle positivo de *L. braziliensis*; **CN**: Controle negativo. **Colunas 1 e 2**: Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que não amplificaram. **Colunas 3, 4 e 5**: Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que tiveram várias bandas amplificadas, sendo a banda de interesse a de 1286pb.

Diante dos resultados acima, optamos por usar a metodologia descrita por Graça et al., (2012) para o gene alvo *hsp70* (*hsp70cF/hsp70cR*); padronizamos as condições da PCR em nosso laboratório e obtivemos amplificadas correspondentes à banda de 234pb e ausência de bandas inespecíficas. Observamos que utilizando a amplificação com os oligoiniciadores acima referidos obtivemos menor sensibilidade quando comparamos com o alvo ITS-1 (Figura 4). Diante desta menor detecção de DNA de *Leishmania* com o gene *hsp70*, optamos por realizarmos uma pré-amplificação, utilizando-se os oligoiniciadores (pre-ampF e pre-ampR), descritos por Zampieri (2019) e posterior amplificação com os oligoiniciadores descritos por Graça et al (2012), caracterizando-se assim uma nested-PCR. Desta forma obtivemos 100% de amplificação (figura 5) das amostras que foram também positivas com o alvo ITS-1.



Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar submetidas à PCR-*hsp70* convencional (primers *hsp70cF/hsp70cR*). **100**: Padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb); **La**: Controle positivo de *L. amazonensis*; **Lb**: Controle positivo de *L. braziliensis*; **CN**: Controle negativo. **Colunas 1, 2, 11 e 12**: Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que amplificaram o gênero *Leishmania* (234 pb). **Colunas 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10**: Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que não amplificaram o gênero *Leishmania* (234 pb).

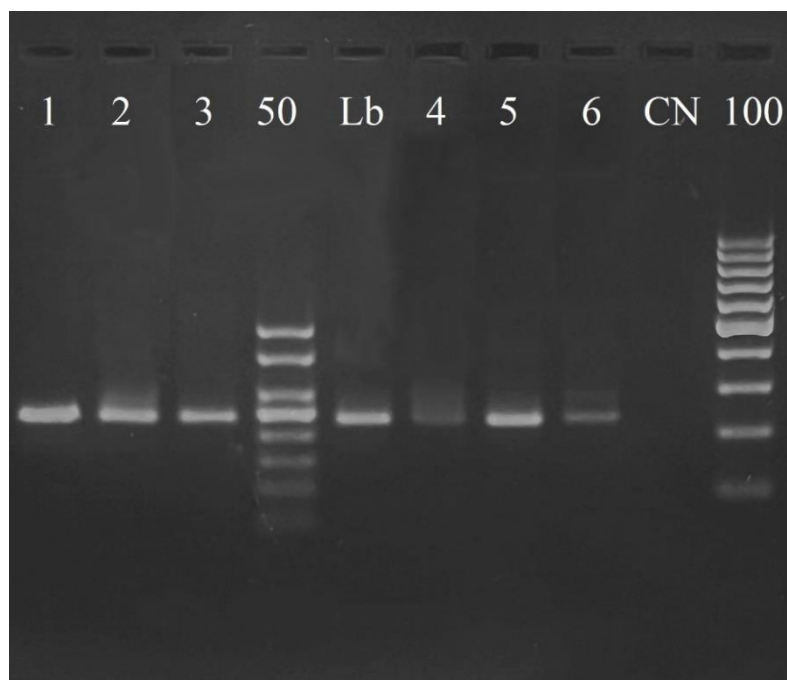


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose de amostras de pacientes com diagnóstico de

leishmaniose tegumentar submetidas à nested PCR-*hsp70* convencional. **50**:Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb); **100**:Padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb); **Lb**: Controle positivo de *L. braziliensis*; **CN**: Controle negativo. **Colunas 1, 2, 3, 4, 5 e 6**: Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que amplificaram o gênero *Leishmania* (234 pb).

5.6. RFLP dos amplificados da nested PCR-*hsp70*

As 84 amostras amplificadas com o gene alvo *hsp70* foram submetidas à RFLP e identificadas como se segue: 91,7% (77/84) apresentaram padrão de corte para as espécies (*L. (V.) braziliensis/L. (V.) naiffi*); 3,6% (3/84) apresentaram padrão de corte condizente com *L. (L.) amazonensis*; 1,1% (1/84) com *L. (L.) infantum* e 3,6% (3/84) *L. (V.) guyanensis* (Tabela 3). Na figura 7 é possível visualizar os fragmentos obtidos na RFLP-*hsp70*.

Tabela 3 - Identificação de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP com o gene *hsp70*, utilizando-se amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar.

Espécies	Amostras	Percentagem
<i>L. (V.) braziliensis/L. (V.) naiffi</i>	77	91,7%
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3	3,6%
<i>L. (V.) guyanensis</i>	3	3,6%
<i>L. (L.) infantum</i>	1	1,1%
Total de amostras	84	100%

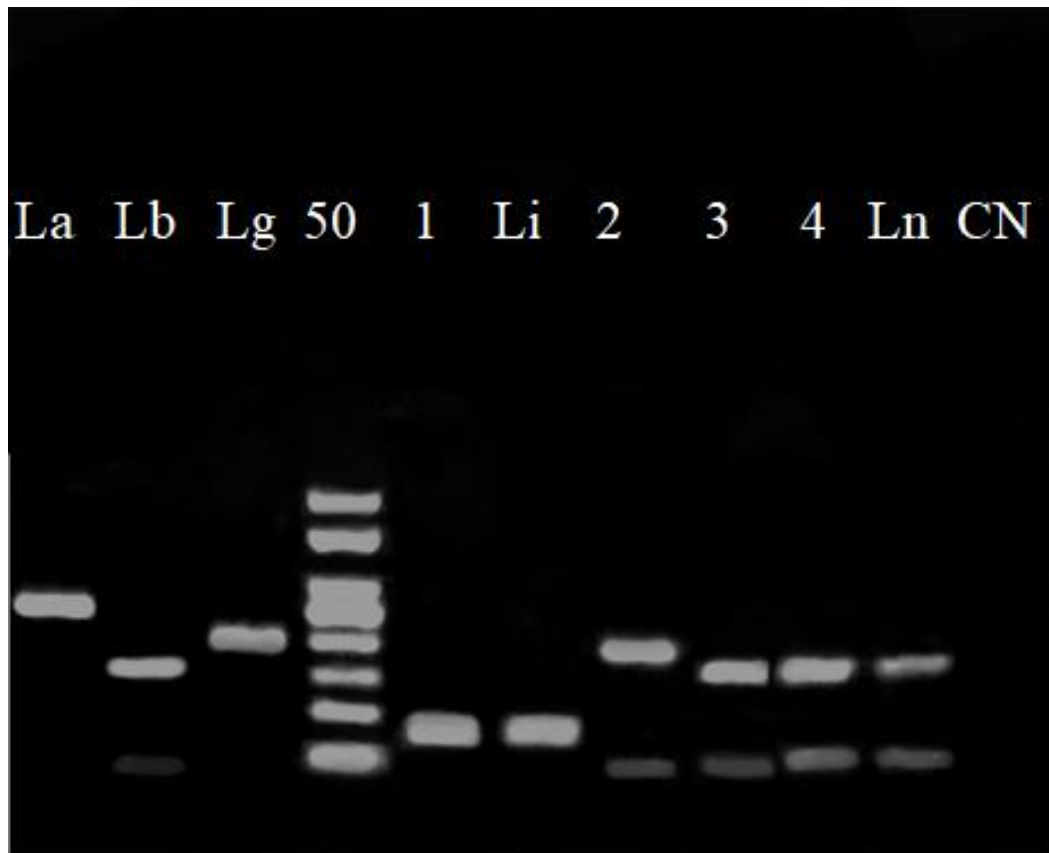


Figura 7- Eletroforese em gel de agarose, representativo, de amostras de pacientes com diagnóstico de leishmaniose tegumentar submetidas ao RFLP pós PCR-*hsp70*. **50:** Padrão de peso molecular de 50 pares de bases (pb); **CN:** Controlenegativo; **Coluna 1:** Amostra de pacientes com leishmaniose tegumentar que apresentou fragmentos condizentes com *L. infantum*; **Coluna 2:** Amostra de paciente com leishmaniose tegumentar que apresentou fragmentos condizentes com *L. guyanensis*. **Colunas: 3 e 4:** Amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar que apresentaram bandas condizentes com o padrão de corte de *L. braziliensis* / *L. naiffi*. **La:** controle positivos de *L. amazonensis*; **Lb:** controle positivo de *L. braziliensis*; **Lg:** controle positivo de *L. guyanensis*; **Li:** controle positivo de *L. infantum* e **Ln:** controle positivo de *L. naiffi*.

5.7. Técnica de sequenciamento Sanger dos amplificadas da PCR-*hsp70*

As 84 amostras que amplificaram para a sequência *hsp70* foram submetidas ao sequenciamento Sanger, sendo possível identificar 4 espécies de *Leishmania*. O maior percentual foi de *L. (V.) braziliensis* detectada em 91,7% (77/84) das amostras de leishmaniose tegumentar; *L. (L.) amazonensis* foi detectada em 3,5% (3/84), *L. (V.) guyanensis* em 3,5%

(3/84) e *L. (L.) infantum* foi identificada em 1,2% (1/84) das amostras, conforme tabela 4.

Tabela 4 - Identificação de espécies de *Leishmania* por sequenciamento Sanger pós PCR-*hsp70*.

Espécies	Amostras	Porcentagem
<i>L. (V.) braziliensis</i>	77	91,67%
<i>L. (L.) amazonensis</i>	3	3,57%
<i>L.(V.) guyanensis</i>	3	3,57%
<i>L. (L.) infantum</i>	1	1,19%
Total de amostras	84	100%

5.8. Comparação das metodologias para determinação da espécie de *Leishmania* causadora de leishmaniose tegumentar

Ao compararmos as diferentes metodologias para discriminação de espécies de *Leishmania*, observamos que o sequenciamento do gene alvo *hsp70* apresentou melhor resultado, sendo que em 100% das amostras, a espécie de *Leishmania* foi identificada. Quando foi utilizado o sequenciamento do alvo ITS-1, obtivemos 98,80% de identificação das amostras. A metodologia PCR-RFLP *hsp70* identificou as amostras de *L. amazonensis* e de *L. infantum*. Com relação as espécies do subgênero *Viannia* esta metodologia discrimina *L. braziliensis* e *L. guyanensis* de outras espécies, porém não discrimina *L. braziliensis* de *L. naiffi* (Tabela 5). A metodologia utilizando-se PCR-RFLP-ITS1 identificou somente uma amostra como sendo de *L. amazonensis*, não discriminando nenhuma outra espécie. Trinta e nove amostras foram identificadas com sendo do subgênero *Viannia* e em 44 amostras não houve nenhum padrão de restrição, com a enzima HAE III.

Quando analisamos a concordância entre as metodologias, houve 100% de concordância entre sequenciamento ITS1, PCR-RFLP-*hsp70* e sequenciamento *hsp70* na identificação de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum*. Houve concordância de 100% entre PCR-RFLP-*hsp70* e sequenciamento *hsp* na identificação de *L. guyanensis* (Tabela 5). Uma amostra foi caracterizada como sendo *L. guyanensis* pela técnica de PCR-RFLP *hsp70* e sequenciamento *hsp 70*, porém, na técnica de sequenciamento ITS-1 essa mesma amostra foi identificada como sendo *L.guyanensis/L.panamensis*.

Tabela 5 - Identificação de espécies de *Leishmania* pelas diferentes técnicas, utilizando-se amostras clínicas de pacientes com leishmaniose tegumentar.

Espécie de <i>Leishmania</i>	PCR-RFLP ITS-1	Sequenciamento ITS-1	PCR-RFLP Hsp70	Sequenciamento Hsp70
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i>	46.4% (subgênero <i>Viannia</i>)	91,7% (<i>L.b</i>)	91,7% (<i>L.b/L.n</i>)	91,7% (<i>L.b</i>)
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>amazonensis</i>	1,2%	3,5% (<i>L.a</i>)	3,5% (<i>L.a</i>)	3,5% (<i>L.a</i>)
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis</i>	46.4% (subgênero <i>Viannia</i>)	2,3% (<i>L.g</i>)	3,5% (<i>L.g</i>)	3,5% (<i>L.g</i>)
<i>Leishmania</i> (<i>Leishmania</i>) <i>infantum</i>	0%	1,2% (<i>L.i</i>)	1,2% (<i>L.i</i>)	1,2% (<i>L.i</i>)
<i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>guyanensis/L.</i> <i>panamensis</i>	0%	1,2% (<i>L.g/L.p</i>)	0 %	0 %
Não identificada	52.4%	0 %	0 %	0 %
Total	100%	100%	100%	100%

5.9. Amostras de pacientes que não tiveram DNA de parasito amplificado por PCR

Das 211 amostras suspeita de LT, como mostrado anteriormente, 84 apresentaram amplificação de DNA de *Leishmania*, sendo que 127 não apresentaram amplificação para o alvo ITS-1. Das amostras consideradas negativas para *Leishmania* pela PCR, 101 eram amostras de lesão de pacientes com outras doenças conforme tabela 6, sendo descartado diagnóstico de LT. No entanto, 26 amostras que foram negativas na PCR para *Leishmania*, tiveram o diagnóstico de LT (18 de leishmaniose cutânea localizada e 8 de leishmaniose mucosa) confirmado por outras metodologias, sendo 20 por imunistoquímica, 6 por anatomopatológico.

Tabela 6 - Diagnóstico dos pacientes que não amplificaram na PCR convencional.

Diagnóstico	Quantidade	Porcentagem
Úlcera crônica da pele não classificada, em outra parte	21	16,5%
Esporotricose	19	15,0%
Leishmaniose cutânea	18	14,2%
Úlcera dos membros inferiores não classificada	11	8,7%
Leishmaniose mucosa	8	6,3%
Varizes dos membros inferiores com úlcera e inflamação	6	4,7%
Fissura, entalhe ou fenda nasal	5	3,9%
Carcinoma	3	2,4%
Dermatite atópica	3	2,4%
Eczema crônico	3	2,4%
Outras alterações de pele não especificadas	3	2,4%
Outros transtornos do nariz e dos seios paranasais	3	2,4%
Piodermite	2	1,6%
Rinite crônica	2	1,6%
Abscesso cutâneo, furúnculo e carbúnculo	1	0,8%
Afecções da pele e do tecido subcutâneo, não especificados	1	0,8%
Afecções hipertróficas da pele	1	0,8%
Celulite da face	1	0,8%
Criptococose cutânea	1	0,8%
Esquistossomose não especificada	1	0,8%
Estenose e insuficiência dos canais lacrimais	1	0,8%
Granuloma piogênico	1	0,8%
Hanseníase virchowiana nasal	1	0,8%
Impetigo	1	0,8%
Infecção localizada da pele e do tecido subcutâneo, não especificada	1	0,8%
Intoxicação por substâncias de uso tópico que atuam sobre a pele e a mucosa	1	0,8%
Neoplasia maligna do assoalho da boca	1	0,8%
Outras dermatites	1	0,8%
Outras formas de prurigo	1	0,8%
Papiloma invertido	1	0,8%
Paracoccidioidomicose	1	0,8%

Reação à picada de inseto	1	0,8%
Tuberculose da laringe	1	0,8%
Vestibulite	1	0,8%

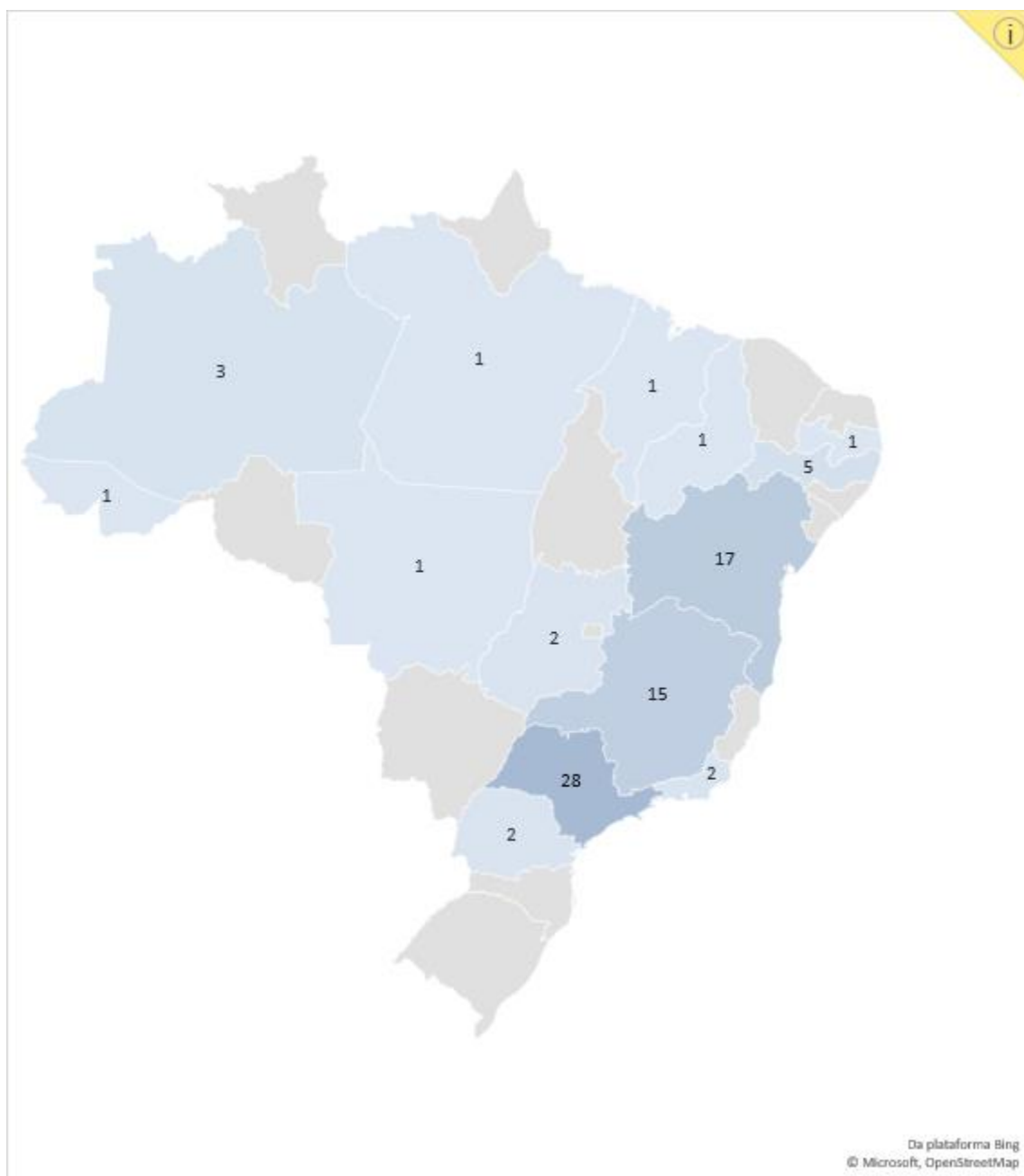
5.10. Local de procedência dos pacientes com diagnóstico de LTA

Ao analisarmos a procedência dos pacientes com diagnóstico de LTA confirmado por PCR, observamos que 28 pacientes eram procedentes de São Paulo, 17 da Bahia, 15 de Minas Gerais, 5 de Pernambuco, 3 do Amazonas, 2 do Rio de Janeiro, 2 de Goiás, 2 do Paraná, 1 do Maranhão, 1 do Acre, 1 do Pará, 1 do Piauí, 1 da Paraíba, 3 da Bolívia e 1 da Venezuela (Gráfico 1).

5.11. Identificação das espécies de *Leishmania* de acordo com o local de procedência

L. braziliensis foi identificada em 27 amostras de pacientes procedentes de São Paulo, 16 amostras de pacientes procedentes da Bahia, e todas as amostras de pacientes procedentes de Minas Gerais (15 amostras), Pernambuco (cinco amostras), Rio de Janeiro (duas amostras), Paraná (duas amostras), Goiás (duas amostras), Mato Grosso (uma amostra), Maranhão (uma amostra), Pará (uma amostra) e Bolívia (três amostras). *L. amazonensis* foi identificada em uma amostra de paciente procedente de Presidente Prudente - SP, em uma amostra de paciente procedente do Piauí e em uma amostra de paciente procedente da Bahia. *L. guyanensis* foi identificada em uma amostra de paciente procedente do Acre, em uma amostra de paciente procedente do Amazonas e em uma amostra de paciente procedente da Venezuela. *L. infantum* foi identificada em uma amostra de paciente procedente da Paraíba (gráfico 2).

Gráfico 1. Provável local de infecção dos pacientes que foram positivos na PCR convencional.



*Três pacientes são procedentes da Bolívia e um da Venezuela.

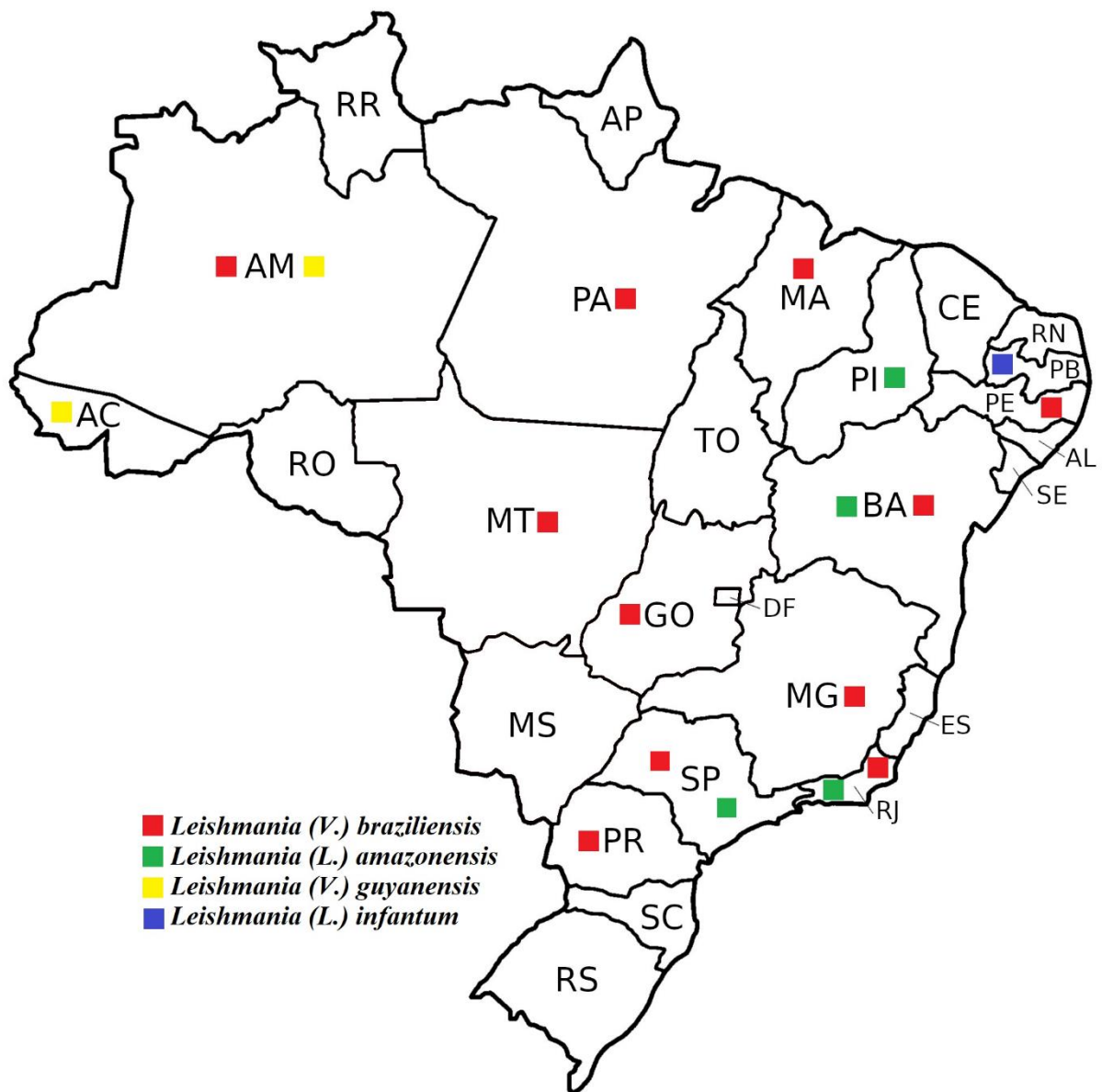


Figura 8 - Distribuição geográfica das espécies de *Leishmania* identificadas no sequenciamento Sanger pós PCR-hsp70.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho identificamos diferentes espécies de *Leishmania* causando leishmaniose tegumentar americana, utilizando-se diretamente espécime clínica de pacientes atendidos num centro especializado no atendimento de doenças infecto-parasitárias. A identificação das quatro espécies de *Leishmania* foi feita por meio de PCR-RFLP e sequenciamento Sanger. É importante ressaltar que a realização deste trabalho com amostras procedentes do centro de referência em atendimento de doenças infecciosas, possivelmente reflita a diversidade de formas clínicas de LTA e de espécies de *Leishmania* circulantes no Brasil, visto que foram incluídos pacientes provenientes de 13 estados brasileiros, das cinco regiões geográficas e ainda participantes provenientes de dois países da América Latina (Bolívia e Venezuela). Ademais a utilização de dois alvos e duas diferentes técnicas, para identificação das espécies, assegurou a verdadeira espécie de *Leishmania* envolvida no desencadeamento da lesão.

A identificação correta da espécie de *Leishmania* causadora de lesão tegumentar em uma determinada região geográfica é fundamental para fins taxonômicos, escolha da melhor terapêutica e ainda para ações de vigilância epidemiológica (48,49). Diversas técnicas são utilizadas para o diagnóstico de LTA e identificação de *Leishmania*, utilizando diferentes espécimes clínicos e diferentes abordagens. Pesquisa direta por microscopia e cultura de parasita podem confirmar o diagnóstico de LTA, demonstrando a presença do parasito em lesões, porém não discrimina a espécie de *Leishmania* envolvida (46). Os métodos mais comumente utilizados para identificação da espécie são migração eletroforética de isoenzimas e análise molecular (12, 47, 71). Análise de isoenzimas é considerado o método padrão, porém utiliza formas promastigotas obtidas de cultura, o que nem sempre é possível devido à baixa sensibilidade da cultura, secundária a contaminação por bactérias e escassa quantidade de parasitos em determinadas formas clínicas (leishmaniose mucosa) (46). Métodos moleculares utilizando diversos alvos genômicos para identificação de *Leishmania* são os mais comumente empregados (50, 51, 53). Análise por PCR-RFLP de múltiplos alvos tem sido empregados, objetivando uma identificação prática de *Leishmania*, sem a necessidade de uso de equipamentos mais caros e menos acessíveis (52). Sequenciamento de genes ou de regiões intergênicas também tem sido empregado, porém é mais caro e menos acessível. Apesar da expansão do uso dessas metodologias utilizadas para identificação de patógenos, ainda há uma falta de conhecimento da melhor metodologia e do melhor alvo a ser utilizado para identificação de *Leishmania*. Neste estudo utilizamos dois diferentes alvos e duas diferentes técnicas

moleculares para identificação de *Leishmania*, a partir de amostras clínicas de pacientes com suspeita de LTA. Os alvos moleculares escolhidos foram ITS1 e *hsp70*, utilizando as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento Sanger. Em nosso estudo, utilizando-se a PCR-RFLP ITS1, com a enzima *HaeIII* não foi possível identificar as espécies, somente o subgênero em 46,4% (39/84) das amostras e *L. amazonensis* em uma amostra. Também Satow, 2016 utilizando o mesmo alvo (ITS1 com a enzima *HaeIII*) obteve resultados semelhantes, distinguindo o subgênero *Leishmania* do subgênero *Viannia*, não distinguindo as espécies (69). Bilbao-Ramos et al, 2020 usando essa mesma abordagem para identificação de *Leishmania* em amostras de pacientes com LTA, da Bolívia, identificaram dois padrões distintos eletroforéticos, um padrão correspondente a *L. amazonensis* e outro padrão correspondente ao subgênero *Viannia* sem distinção entre espécies (54). Conter et al 2019 em uma revisão sistemática descrevem que os oligonucleotídeos desenhados para região ITS1, permitem identificar espécies do subgênero *Leishmania*, principalmente as espécies *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica*, porém não encontraram dados de identificação de espécies do subgênero *Viannia*, o que corrobora os nossos resultados, em que apenas conseguimos distinguir o subgênero, sem identificar espécies (55). Diversos autores têm utilizado a região ITS1 com PCR-RFLP para identificação de espécies de *Leishmania* no velho mundo, permitindo diferenciar as diferentes espécies do subgênero *Leishmania* que causam doença tegumentar (46, 56, 57, 58, 59, 60) tais como *Leishmania major* e *L. tropica*, as quais apresentam fragmentos de 220 e 140 pb e de 200 e 60 pb respectivamente, o que favorece esta abordagem para identificação de *Leishmania* no velho mundo (61). Claramente esta abordagem não permite distinguir espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, provavelmente devido o número e local do sítio de restrição da enzima *HaeIII* ser semelhante nessas espécies, apresentando somente um padrão de restrição enzimático, quando visualizado no gel de agarose. Estes dados sugerem que a abordagem PCR-RFLP-ITS1 possa ser usada para detecção de DNA de *Leishmania* em espécimes clínicos, porém não deva ser usado para identificação de espécies do subgênero *Viannia*, o mais prevalente nas Américas causador de leishmaniose tegumentar. Nas Américas, Silva et al, (2006) usaram PCR-RFLP-ITS1 com a enzima *Sau3AI* e identificaram 13 amostras com padrões compatíveis com as cepas de referência de *L. (V.) lainsoni* e 28 com *L. (V.) braziliensis* ou *L. (V.) guyanensis*, pois esta metodologia não permitiu discriminar *L. (V.) braziliensis* de *L. (V.) guyanensis* (48). Provavelmente a utilização da enzima *Sau3AI* permitiu que tenha sido observado padrão distinto de painel eletroforético, pois o sítio de restrição entre as duas enzimas (*HaeIII* e *Sau3AI*) é diferente.

Outros alvos são mais promissores para identificação de espécies de *Leishmania*,

principalmente aquelas do subgênero *Viannia*. Dentre esses alvos destacamos o gene *hsp70* por ser altamente conservado e que tem sido usado para estudos taxonômicos e filogenéticos de *Leishmania*. Graça et al (2012) e Montalvo et al (2012) utilizando oligoiniciadores do gene *hsp70* e PCR-RFLP com enzima *HaeIII* identificaram espécies do subgênero *Viannia*, permitindo distinguí-las (40,41). Utilizando essa mesma abordagem com os oligoiniciadores descritos por Graça et al (2012) conseguimos distinguir 4 diferentes espécies de *Leishmania* em nossa casuística, inclusive com identificação de *L. infantum* causando doença tegumentar, corroborando os achados descritos por Graça et al (2012). No entanto, quando utilizamos os oligoiniciadores descritos por Montalvo et al (2012) não obtivemos o mesmo êxito. Alguns fatores podem ter contribuído para esta diferença entre os oligoiniciadores. Primeiramente, quando utilizamos o protocolo descrito por Montalvo et al (2012) observamos que quando da amplificação do DNA de *Leishmania*, obtivemos vários fragmentos de banda, sem termos usado enzima de restrição e certamente este padrão interferiria no padrão de bandas que obteríamos quando da realização da PCR-RFLP. Outro fator que pode ter contribuído para esta diferença se refere ao tamanho fragmento esperado, pois o amplificado do protocolo descrito por Montalvo geraria um fragmento inicial de 1286pb enquanto o tamanho do fragmento gerado, usando-se o protocolo descrito por Graça et al (2012) é de 234pb. Satow et al (2016) utilizando PCR-RFLP-*hsp70*, com as enzimas *HaeIII* e *BstUI*, identificou padrão de restrição diferente para cinco espécies de *Leishmania* de cepa padrão (69). Utilizando a mesma abordagem em 21 amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar identificou *L. braziliensis* em 18 amostras, *L. naiffi* em uma amostra e duas amostras apresentaram perfis eletroforéticos não condizentes com nenhuma das cinco espécies de *Leishmania* de cepa de referência. Em nosso estudo, utilizando-se os mesmos oligoiniciadores descritos por Graça et al (2012) na PCR-RFLP com a enzima *HaeIII* pudemos distinguir 4 espécies de *Leishmania* causando leishmaniose tegumentar na casuística estudada, sendo 91,7% *L. braziliensis*, 3,6% *L. amazonensis*, 3,6% *L. guyanensis* e 1,1% *L. infantum*. Estes nossos resultados corroboram os resultados obtidos anteriormente por outros autores, em que a abordagem de PCR-RFLP-*hsp70* com *HaeIII* pode ser usada como importante ferramenta para distinção de espécies causadoras de LTA, identificando não só as espécies do subgênero *Viannia*, como também identificando espécies do subgênero *Leishmania* como causadoras de LTA, entre elas a *L. infantum*. Muvdi-Arenas et al, (2020) identificaram *L. (V.) braziliensis* em 88%, *L. (V.) panamensis* em 8%, e *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* em 2% em amostras de pacientes com LTA utilizando a mesma abordagem usada neste nosso estudo (PCR-RFLP-*hsp70* com a enzima *HaeIII*) corroborando nossos achados de que esta abordagem é útil na identificação de espécies de

ambos os subgêneros (72). Apesar de haver menos cópias do gene *hsp70*, este se apresenta como excelente alvo para estudos de taxonomia em *Leishmania*, por ser um gene altamente conservado em sequência e função, e de suma importância como chaperonas moleculares (63).

Ao longo dos anos tem-se buscado diferentes metodologias para melhor identificação de espécies de patógenos. Certamente, entre essas metodologias, a que melhor permite distinguir diferentes espécies de um mesmo parasito é o sequenciamento do genoma, seja de parte dele ou do todo. Porém, esta metodologia não está acessível a todos os serviços de saúde, em decorrência de custo elevado, necessidade de equipamento específico e ainda de pessoal treinado. Por meio do sequenciamento de diferentes fragmentos de DNA é possível identificar as espécies pela simples mudança de uma base numa determinada posição do fragmento analisado. Através do sequenciamento dos amplificadores na PCR-ITS1 foi possível identificar a espécie de *Leishmania* em 98,8% (83/84) das amostras analisadas e em 100% quando utilizamos o *hsp70* em nossa casuística. Quando comparamos o sequenciamento da região ITS1 pelo método Sanger com a ITS1-PCR-RFLP (*HaeIII*) houve uma diferença substancial, visto que no sequenciamento foi possível definir 98,8% das amostras e com a PCR-RFLP-ITS1 pudemos distinguir somente subgêneros e em uma única amostra definimos a espécie. Esta diferença pode ser devido a enzima *HaeIII* que foi usada na PCR-RFLP-ITS1, a qual não identificou sítios de restrição para que possa ter feito a fragmentação do DNA. Talvez se fosse usada uma outra enzima, poderíamos ter obtido padrão eletroforético distinto entre as espécies de *Leishmania*, visto que o sequenciamento Sanger permitiu distinguí-las, havendo, portanto, diferença na sequência do fragmento da região analisada, permitindo identificar as seguintes espécies de *Leishmania*: *L. (V.) braziliensis* detectada em 91,6% (77/84) das amostras; *L. (L.) amazonensis* em 3,6% (3/84), *L. (V.) guyanensis* em 2,4% (2/84) e *L. (L.) infantum* em 1,2% (1/84). Um dado interessante se refere a uma amostra, em que o sequenciamento ITS1 não distinguiu *L. (V.) guyanensis* de *L. (V.) panamensis* de um paciente proveniente da Venezuela. Uma hipótese para isto pode ser a coinfeção por duas espécies numa mesma lesão ou devido à similaridade na sequência dessas duas espécies na região ITS1. Ao utilizarmos outra abordagem para identificação de espécie de *Leishmania*, na referida amostra, obtivemos a identificação de *L. guyanensis*, sendo que a diferenciação entre *L. guyanensis* e *L. panamensis* nem sempre será determinada pelo sequenciamento amplificado de 320pb da região ITS1.

Ao compararmos as diferentes técnicas de identificação para identificação de *Leishmania*, a partir de amostras de lesão de LTA, claramente observamos que o sequenciamento seja da região ITS1, como do gene alvo *hsp70*, é uma técnica mais robusta para esta finalidade. No entanto a PCR-RFLP-*hsp70* apresenta resultados semelhantes ao do sequenciamento Sanger do

mesmo gene alvo. Esta informação é fundamental, pois como já descrito anteriormente, a técnica de sequenciamento necessita de equipamentos mais sofisticados, requer mão de obra especializada e está pouco disponível para uso na rotina. A PCR-RFLP-*hsp70* é mais trabalhosa e apresenta maior risco de contaminação da amostra devido a maior manipulação da mesma, no entanto está mais disponível para uso e não requer, por exemplo, uso de equipamento para sequenciamento das amostras. Apesar das diferenças na execução das técnicas, mesmo que em ambas haja necessidade de extração de DNA e realização de PCR, não se pode afirmar qual seria mais dispendiosa para realização em centros de atendimento de pacientes, pois não há estudo disponíveis que comparem os gastos para realização de cada uma das técnicas.

Após analisarmos as quatro metodologias aqui utilizadas para identificação das espécies de *Leishmania* e concluirmos que o sequenciamento da região ITS1 ou do gene *hsp70* seriam as melhores ferramentas a serem empregadas, partimos para relacionarmos as espécies de *Leishmania* com as formas clínicas de LTA e com o local provável de infecção. Das 84 amostras, em que houve detecção de DNA de *Leishmania*, 18 (21,4%) eram de leishmaniose mucosa causada por *L. braziliensis*, 4 (4,8%) de leishmaniose muco-cutânea, sendo 3 *L. braziliensis* e uma *L. amazonensis*. Das 84 amostras, 62 (73,8%) eram de leishmaniose cutânea localizada, sendo 56 *L. braziliensis*, 2 *L. amazonensis*, 3 *L. guyanensis* e 1 *L. infantum*. Esses nossos achados revelam a diversidade de espécies de *Leishmania* que causam LTA nas Américas. Os nossos achados corroboram o que já foi descrito anteriormente, em que diferentes espécies de *Leishmania* causam lesão tegumentar no Novo Mundo (7, 11) prevalecendo espécies do subgênero *Viannia* e mais precisamente a espécie *L. braziliensis*, como a principal causadora de LTA nas Américas (26) incluindo a leishmaniose mucosa e muco-cutânea. Cabe ressaltar, que em nossa casuística não detectamos nenhuma espécie de *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lainsoni* e *L. lindenberg*.

Com a utilização de ferramentas robustas de identificação de *Leishmania* é possível não só confirmar as principais espécies causadoras de LTA, como identificar espécie que comumente não está relacionada com determinada forma clínica. Nesta nossa casuística identificamos *L. infantum* em uma amostra de um paciente procedente do estado da Paraíba, o qual era cuidador de um cão que faleceu de leishmaniose visceral. Este achado chama atenção para a importância de espécies viscerotrópicas causarem doença tegumentar no Brasil, como já demonstrado por outros autores (6). Ademais a descrição de *L. infantum* causando doença tegumentar necessita de melhor avaliação molecular objetivando identificar diferentes cepas podem causar doença visceral ou tegumentar, como descrito no continente Europeu (45) e na América Central (44).

Ao avaliarmos a procedência dos participantes deste estudo, houve uma diversidade de prováveis locais de infecção, pois houve participantes das cinco regiões geográficas brasileiras, além de 3 pacientes procedentes da Bolívia e um procedente da Venezuela. *L. braziliensis* foi identificada nas 3 amostras dos pacientes procedentes da Bolívia, em todas as amostras procedentes de Minas Gerais (15 amostras) em 27 das 28 amostras procedentes de São Paulo e em 15 das 17 amostras procedentes da Bahia, além de haver sido detectada em amostras do Pará, do Maranhão, do Rio de Janeiro, Paraná, Mato Grosso e Goiás. Estes resultados confirmam a ampla distribuição de *L. braziliensis* no Brasil e na Bolívia, como principal agente etiológico de LTA. *L. amazonensis* também está amplamente distribuída no Brasil, pois foi identificada em amostras de São Paulo, Bahia e Piauí. *L. guyanensis* está restrita a região Norte do Brasil, pois foi encontrada somente em amostras procedentes do Amazonas e do Pará e ademais em uma amostra da Venezuela. Essas informações de identificação de espécie de *Leishmania* de acordo com a procedência é necessária, não só para fins de ecoepidemiologia, como também para auxiliar na tomada de decisão dos programas de controle de LTA, pois sabidamente as diferentes espécies de *Leishmania* circulam em diferentes reservatórios e são transmitidas por espécies diferentes de flebotomíneos (1). Conhecendo-se a espécie circulante em uma determinada região é possível não somente indicar a melhor escolha terapêutica em decorrência da espécie do parasito, como também poder-se-á desenvolver programas de controle vetorial e de reservatórios.

Apesar de ferramentas robustas para identificação de espécie de *Leishmania* (PCR-RFLP e sequenciamento) estas podem apresentar sensibilidade variável. Nesta nossa casuística das 211 amostras incluídas neste estudo, 110 tiveram diagnóstico de LTA confirmado por alguma metodologia, porém em 26 amostras não houve amplificação de DNA de *Leishmania* utilizando-se como alvo a região ITS 1. Este resultado nos permitiu inferir uma sensibilidade de 76% e uma especificidade de 100% pois todas as amostras em que o diagnóstico de LTA não foi confirmado, não obtivemos amplificação de DNA de *Leishmania*. A sensibilidade encontrada, utilizando-se os alvos ITS 1 e *hsp70* pode ser considerada baixa, quando avaliamos que em 20 amostras em que não houve amplificação de DNA de *Leishmania*, a imunistoquímica foi positiva e em outras 6 amostras a confirmação foi pelo achado anatomopatológico. Alguns fatores podem contribuir para que não se observe uma sensibilidade mais elevada, devendo-se levar em consideração o tempo de evolução da lesão, o tamanho do fragmento da lesão encaminhado para realização de PCR e ainda o número de cópias do alvo analisado, pois é descrito entre 20 à 200 cópias para o ITS1 e de 1 à 7 cópias para *hsp70* (64,65,66,70). Quando são usados genes alvos com maior número de cópias, por exemplo

kDNA que tem cerca de 20.000 cópias a sensibilidade é próximo a 100 % conforme descrito por Satow et al 2013(69). Satow et al 2013, utilizando o gene alvo kDNA obteve 87,5% de sensibilidade, porém quando as mesmas amostras foram analisadas com o alvo ITS 1 a sensibilidade foi de 85,7 % e de 68,4% utilizando o gene alvo *hsp70* (62). Em nosso estudo obtivemos uma sensibilidade mais baixa com o alvo ITS1, porém no estudo de Satow houve reamplificação da PCR-ITS1. Provavelmente este fator, reamplificação, foi determinante para diferença na sensibilidade nestes dois estudos, pois na primeira rodada de PCR-ITS1, Satow obteve sensibilidade de 57,1%. Acreditamos que se reamplificássemos o produto de PCR obtido com a primeira análise, teríamos uma sensibilidade maior, porém não utilizamos esta abordagem. Em relação as formas clínicas, houve diferença na sensibilidade, sendo de 77,5% na forma cutânea e 69% na forma mucosa. Esta diferença de sensibilidade entre as formas clínicas pode ser em decorrência da maior quantidade de parasitos, pois sabidamente a forma mucosa apresenta escassez parasitária em relação a forma cutânea (1). Outro fato que pode ser considerado se refere ao tamanho do fragmento da lesão disponibilizado para detecção de DNA de *Leishmania*, pois em amostras de lesão cutânea o fragmento obtido é maior quando comparado ao fragmento de lesão mucosa.

Em conjunto, os nossos resultados permitem inferir que tanto a PCR-RFLP-*hsp70* (*Hae*III), sequenciamento ITS1 e sequenciamento *hsp70* são ferramentas de grande valia e adequadas para identificação de espécies de *Leishmania* causadoras de diferentes formas clínicas de LTA de diferentes regiões geográficas.

A obtenção dos resultados, aqui descritos, podem subsidiar pesquisas futuras que visem melhorar as metodologias para estudos taxonômicos de *Leishmania*. Certamente a utilização de dados mais robustos permitirá conhecermos melhor a ecoepidemiologia da LTA, mas também poderá auxiliar na tomada de decisão terapêutica e de políticas públicas de controle de leishmaniose tegumentar.

Apesar de todo o empenho, para obtenção dos melhores resultados possíveis, este estudo apresenta limitações, tais como: a) uso de amostras de conveniência, que pode induzir um viés de representação das amostras e b) não utilização de um método, que pudesse ser usado como referência no diagnóstico da LTA, como por exemplo, a PCR tendo como alvo o kDNA, que apresenta maior número de cópias, o que permitiria analisarmos melhor a sensibilidade dos métodos aqui usados.

Apesar das limitações, este estudo realizado com espécimes clínicas reflete o que acontece no cotidiano nos centros de atendimentos de pacientes e reforça a importância de que outros estudos sejam realizados para definição do melhor alvo e da melhor metodologia para o

diagnóstico espécie específico de leishmaniose, pois até o momento não dispomos de método padronizado e validado para uso na prática clínica.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

O sequenciamento do gene *hsp70* de 234pb permitiu identificar a espécie de *Leishmania* em todas as amostras clínicas analisadas, diferenciando as entre as várias espécies de *Leishmania* de ambos os subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*.

A PCR-RFLP *hsp70* com enzima *HaeIII* é capaz de identificar espécies de *Leishmania* causadoras de LTA, porém não é possível diferenciar *L. braziliensis* de *L. naiffi*;

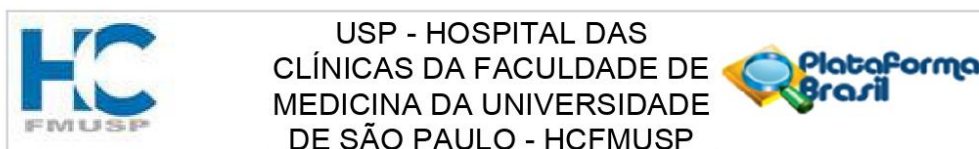
O sequenciamento da região ITS1 de 320pb permitiu identificar espécies de *Leishmania* causadoras de LTA, porém não foi possível discriminar *L. guyanensis* de *L. panamensis* em uma das amostras analisadas;

A PCR-RFLP-ITS1 com a enzima *HaeIII* não permite identificar espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, causadoras de LTA;

Em conclusão a ferramenta mais robusta, usada neste estudo para diagnóstico espécie-específico de LTA, foi o sequenciamento do fragmento de 234pb do gene *hsp70*.

8. ANEXOS

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação de espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), por meio de técnicas moleculares, tendo como alvos os genes ITS1 e HSP70

Pesquisador: José Angelo Lauletta Lindoso

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 47217419.0.0000.0068

Instituição Proponente: Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.741.118

Apresentação do Projeto:

Trata-se de análise molecular de leishmanias obtidas de pacientes do II E.Ribas, estocadas vivas, e que se encontram disponíveis para o estudo. O uso dos dados dos prontuários dos pacientes complementa a pesquisa e pode fornecer dados adicionais a especificação das amostras propostas, como dados clínicos ou epidemiológicos.

Objetivo da Pesquisa:

Identificação de espécies causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA), por meio de técnicas moleculares, tendo como alvos os genes ITS1 e HSP70

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos no projeto, desde que a confidencialidades da análise dos prontuários seja mantida

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Adequada

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE é destinado a novos diagnósticos e está adequadamente redigido

Recomendações:

Aprovação

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 4.741.118

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1420844.pdf	24/05/2021 14:21:54		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Declaracao_de_Confidencialidade_Protocolo_17_2021.pdf	24/05/2021 14:21:05	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Protocolo_17_2021.pdf	24/05/2021 14:20:55	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Protocolo_17_2021.pdf	24/05/2021 14:20:44	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	22/09/2019 20:10:25	JACQUELINE ALVES DELPRETE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Leishmaniose Tegumentar Americana. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
2. Torres-Guerrero, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. *F1000 Research*, 2017.
3. OMS. Informe Epidemiológico das Américas. Informe Leishmanioses nº 10. Organização Pan-Americana da Saúde, 2021.
4. Ramos, MC & Elias, FTS. Parecer Técnico Científico - Miltefosina para tratamento de leishmaniose tegumentar americana: Evidências de eficácia e segurança. Programa de evidências para políticas e tecnologias em saúde. Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Ministério da Saúde. Brasília, 2015.
5. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: Academic Press; 1987. p. 12-120.
6. Lyra, Marcelo Rosandiskiet al. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, vol.57, n.5, 2015.
7. Lainson, Ralph. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, v. 1, n. 2, p. 13- 32, jun. 2010.
8. De Almeida, J.V., De Souza, C.F., Fuzari, A.A. et al. Diagnosis and identification of *Leishmania* species in patients with cutaneous leishmaniasis in the state of Roraima, Brazil's Amazon Region. *Parasites Vectors* 14, 32 (2021).
9. Jariyapan N, Daroontum T, Jaiwong K, Chanmol W, Intakhan N, Sor-Suwan S, Siriyasatien P, Bates MD, Bates PA. *Leishmania (Mundinia) orientalis* n. sp. (Trypanosomatidae), a parasite from Thailand responsible for localised cutaneous leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2018 Jun 18;11(1):351
10. Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG, Shaw JJ. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and

Endotrypanum. *Parasitology*. 2018 Apr;145(4):430-442. doi: 10.1017/S0031182016002092. Epub 2016 Dec 15. PMID: 27976601.

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

12.Reithinger R, Dujardin JC. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. *J ClinMicrobiol*. 2006;45(1):21-5. Machado PR, et al. 2011. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 105:438–444.

13.Zampieri, R.A. Análise comparativa de métodos moleculares de detecção e identificação de *Leishmania* spp. e desenvolvimento de metodologia para o diagnóstico de leishmanioses. Tese, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

14. Ross, R. Further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal*, 1903. LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick- Kendrick R, editors. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London: AcademicPress; 1987. p. 12-120.

15.Ashford, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol*.30, 1269–1281, 2000.

16.Weigle KA, Labrada LA, Lozano C, Santrich C, Barker DC. PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*). *J Clin Microbiol*. 2002 Feb;40(2):601-6.

17.Skraba, C et al .Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*,Uberaba , v. 48, n. 4, p. 437-444, Aug. 2015.

18.Gomes CM, Morais OO, Roselino AM, De Paula NA, Soares KA, Sampaio RNR. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentar leishmaniasis. *An BrasDermatol*. 2014;89(5):701-9.

19.Guedes, Deborah Carbonera et al. New strategy to improve quality control of Montenegro skin test at the production level. *Rev.Soc. Bras. Med. Trop.*,Uberaba , v. 50, n. 6,p. 788-794, Dec. 2017.

20.Braz, Lúcia Maria Almeida. Tegumentaryleishmaniasis diagnosis: what happenedwith MST (Montenegro Skin Test) in Brazil?. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo*, v.61, e17, 2019.

21. Kar K. Serodiagnosis of Leishmaniasis. *Crit Rev Microb* 1995; 21: 123-52.
22. Romero GAS, Orge MGO, Guerra MVF, Paes MG, Macedo VO. Resposta de anticorpos em pacientes com leishmaniose cutânea infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis* ou *Leishmania (Viannia) guyanensis* no Brasil. *Acta Trop.* 2005; 93: 49-56.
23. Cortes SJC 2008. Diversidade genética da população parasitária de *Leishmania* em Portugal, Tese de Doutorado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 163pp.
24. Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: OPS; 2019.
25. Ashford D.A; Bozza, M.; Freire, M.; Miranda, J.C.; Sherlock L; Eulálio, C.; Lopes, U; Fernandes, O.; Degraive, H.; Badaror. Comparison of the polymerase chain reaction on the detection of canine visceral leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53:251-255, 1995.
26. Gontijo B, Carvalho M de LR de. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop* [Internet]. 2003Jan;36 (Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2003 36(1).
27. Andrade, C.R. Resposta imune anti-proteínas de choque térmico na leishmaniose visceral. Tese de Doutorado em Medicina Tropical, UFPE, 1997.
28. Pereira-Chioccola, V.L. Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. Laboratório de Biologia Molecular de Fungos e Parasitas. Diretoria de Parasitologia. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, SP, Brasil. *Bepa*, v. 6. n. 68, p. 4- 13, agosto, 2009.
29. Lopes M, Inga R, Cangalaya M, Echevarria J, Llanos-Cuentas A, Orrego C, Arevalo J. Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg.* 1993 Sep;49(3):348-56.
30. Uliana SR, Affonso MH, Camargo EP, Floeter-Winter LM. *Leishmania*: genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Exp Parasitol.* 1991 Feb;72(2):157-63.
31. Castilho TM, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. New PCR assay using glucose-6- phosphate

dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb;41(2):540-6.

32.El Tai NO, El Fari M, Mauricio I, Miles MA, Oskam L, et al. (2001) *Leishmania donovani*: polimorfismos intraespecíficos de aislados sudaneses revelados por análisis basadas em PCR e secuenciamento de DNA. *Exp Parasitol* 97: 35–44.

33.Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Sschweynoch C, Schallig H, Presber W, Jaffe C. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Infect Dis* 47: 349-358, 2003.

34.Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K, Dujardin JC. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2004 May;42(5):2294-7

35.Montalvo AM, Fraga J, Monzote L, et al. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. *Parasitology*, 2010.

36.Cupolillo E, Brahim LR & Toaldo CB. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3126–3132, 2003.

37.Godoy NS, Demarchi AV, Maia RS, Okay TS, Braz, Braz, LMA. Unusual Clinical Manifestations of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi* in an HIV-coinfected patient and the relevance of ITS1-PCR-RFLP: A Case Report. *Iran J Parasitol*. 2018;13(4):655–660.

38.Macfarlane J. et al. Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70 Kda heat shock protein family. *Eur. J. Biochem*. 190: 377-384, 1990.

39.Quijada L, Soto M, Alonso C, Requena JM. Identification of a putative regulatory element in the 3'-untranslated region that controls expression of HSP70 in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110:79–91.

40.Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* . 2012;31: 1453.

41. Graça GC et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 107, n. 5, p. 664-674, ago. 2012
42. Trindade, MAJ; Silva, L.L.C; Braz, LMA; Amato VS; NAAFS N & Sotto, MN. Post-kala-azar dermal leishmaniasis and leprosy: case report and literature review. *BMC Infectious Diseases* (2015), 15: 543
43. Godoy NS, Lima-Junior MSC, Lindoso JAL, Pereira-Chiocola VL, Okay TS, Braz LMA. A PCR and RFLP-based molecular diagnostic algorithm for visceral leishmaniasis. *Asian Pacific J Trop Medicine*. 2020;13(2):62-70
44. Sosa-Ochoa W, Zúniga C, Chaves LF, Araujo FGV, Sandoval PCM, Ribeiro MVL, Corbett CEP, Silveira TF, Dalastra LM. Clinical and Immunological Features of Human *Leishmania (L.) infantum*-Infection, Novel Insights Honduras, Central America. *Pathogens*. 2020; 9(7):554.
45. Campino., Abranches P. 2002. Leishmaniose cutânea. Uma doença rara em Portugal? *Acta Médica Portuguesa*, 15: 387-390.
46. Doni NY, Gurses G, Dikme R, Aksoy M, Yildiz Zeyrek F, Simsek Z, Satoskar AR, Varikuty S, Yesilova Y. 2020. Cutaneous Leishmaniasis due to Three *Leishmania* Species Among Syrian Refugees in Sanliurfa, Southeastern Turkey. *Acta Parasitol*. 65:936-948.
47. Evans TG, Krug EC, Wilson ME, Vasconcelos AW, Alencar JE & Pearson RD. 1989. Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 84(2) 157-66.
48. Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. 2006. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. II(9): 1388-1398
49. Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajon JF. 1992, Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *The Journal of Infectious Diseases*, 165 (3) 528-534.
50. Tavares CAP, Fernandes AP, Melo MN. 2003. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 3(5) 657-667.
51. Vega-Lopez F, 2003. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect Dis* 16(2)97-101.

52. Kato H, Gomez EA, Seki C, Furumoto H, Martini-Robles L, Muzzio J, Calvopiña M, Velez L, Kubo M, Tabbabi A, Yamamoto DS, Hashiguchi Y. 2019. PLoS Negl Trop Dis. PCR-RFLP analyses of Leishmania species causing cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis revealed distribution of genetically complex strains with hybrid and mito-nuclear discordance in Ecuador.13(5): e0007403
53. Singh S, Sivakumar R.2003 Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med 49(1) 55-60.
54. Bilbao-Ramos P, Dea-Ayuela MA, Cardenas-Alegría O, Salamanca E, Santalla-Vargas JA, Benito C, Flores N, Bolás-Fernández F. 2017. Leishmaniasis in the major endemic region of Plurinational State of Bolivia: Species identification, phylogeography and drug susceptibility implications. Acta Trop.176:150–161
55. Conter CC, Mota CA, Santos BA, Braga LS, Terron MS, Navasconi TR, Fernandes BSF, Demarchi IGD, Castro KRR, Aristides SMA, Lonardon MVC, Teixeira JJV, Silveira TGV, 2019. PCR primers designed for new world Leishmania: A systematic review, Experimental Parasitology, Volume 207, 107773, 0014-4894.
56. Hajjarian H, Vasigheh F, Mohebbali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S. 2011. Direct diagnosis of Leishmania species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. J Clin Lab Anal. 25: 20-24.
57. Hezari F, Niyyati M, Seyyed Tabaei SJ, Mohebbali M, Moin Vaziri V, Behniafar H, Azargashb E, Taghipour N. 2016. Frequency of cutaneous leishmaniasis and species identification in suspected individuals from Golestan Province, Northern Iran in 2014. Iran J Public Health. 45 (10):1348-1354.
58. Kermanjani A, Akhlaghi L, Oormazdi H, Hadighi R. 2017. Isolation and identification of cutaneous leishmaniasis species by PCR-RFLP in Ilam province, the west of Iran. J Parasit Dis. Mar, 2017. 41(1): 175–179
59. Lorestani RZ, Arjmand R, Saki J, Jelowdar A, Salmanzadeh S. 2020. Genotyping the causative agents of cutaneous leishmaniasis in Ahvaz southwest of Iran. J Parasit Dis. 44 (2):436-440
60. Ertabaklar H, Ertug S, Çaliskan SO, Bozdogan B. 2016. Determination of Leishmania Species by PCR-RFLP in the Smear Samples Taken from the Lesions of Cutaneous Leishmaniasis Cases. Mikrobiyol Bul. 50(2): 300-306

61. Silva NL, de Silva VNH, Deerasinghe ATH, Rathnapala UL, Itoh M, Takagi H, Weerasooriya MV, Kato H, Yahathugoda TC. 2022. Development of a highly sensitive nested PCR and its application for the diagnosis of Cutaneous leishmaniasis in Sri Lanka. *Microorganisms*. 10(5), 990;
62. Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, et al. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Rev Inst Med trop S Paulo [Internet]*. 2013Nov;55(Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 2013 55(6)).
63. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002 Mar 8;295(5561):1852-8. doi: 10.1126/science.1068408. PMID: 11884745.
64. Odiwuor SOC, Saad AA, De Doncker S, Maes I, Laurent T, et al. (2011) Universal PCR assays for the differential detection of all Old World *Leishmania* species. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30: 209–218.
65. Schonian G, Fari ME, Lewin S, Schweynoch C, Presber W (2001) Molecular Epidemiology and Population Genetics in *Leishmania*. *Med Microbiol Immunol* 190: 61–63.
66. Zurita AI, Rodríguez J, Piñero JE, Pacheco R, Carmelo E, del Castillo A, Valladares B. Cloning and characterization of the *Leishmania (Viannia) braziliensis* Hsp70 gene. Diagnostic use of the C-terminal fragment rLb70(513-663). *J Parasitol*. 2003 Apr;89(2):372-8. doi: 10.1645/0022-3395(2003)089[0372:CACOTL]2.0.CO;2. PMID: 12760657.
67. Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Cruz AM, Costa SCG, Catanho M, et al. Use of PCR in diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1819-23.
68. Andrade ASR, Gomes RF, Fernandes O, Melo MN. Use of DNA-based diagnostic methods for human leishmaniasis in Minas Gerais, Brasil. *Acta Trop*. 2001; 78(1): 261-7.
69. Satow, Marcela Miura. Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo; 2016
70. Folgueira C, Cañavate C, Chicharro C, Requena JM. Genomic organization and expression of the HSP70 locus in New and Old World *Leishmania* species. *Parasitology*. 2007 Mar;134(Pt 3):369-77.

71. Ardehali S, Moattari A, Hatam GR, Hosseini SMH, Sharifi 2000. Characterization of Leishmania isolated in Iran:1. Serotyping with species specific monoclonal antibodies. 75(3): 301-307
72. Muvdi-Arenas S, Ovalle-Bracho C. 2019. Leishmaniasis mucosa: una enfermedad olvidada, descripción e identificación de especies en 50 casos colombianos. Revista Del instituto Nacional de Salud Biomedica, 39: 58-65