

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
NÚCLEO DE SAÚDE DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO E DOUTORADO EM
BIOLOGIA EXPERIMENTAL – PGBIOEXP**

CRISTIANE BATISTA MATTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COMPARATIVA DOS GENES γ GCS,
GSH2, TRYR E ODC EM ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

**PORTO VELHO/RO
2016**

CRISTIANE BATISTA MATTOS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COMPARATIVA DOS GENES γ GCS,
GSH2, TRYR E ODC EM ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
graduação em Biologia Experimental *Stricto
sensu* da Universidade Federal de Rondônia,
para obtenção do título de Mestre em Biologia
Experimental.

Orientador: Dr. Ricardo de Godoi Mattos
Ferreira

**PORTO VELHO/RO
2016**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Mestre.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA COMPARATIVA DOS GENES γ GCS, GSH2, TRYR E ODC EM ISOLADOS DE *LEISHMANIA* DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Defesa Pública realizada em 25 de maio de 2016

Banca Examinadora:

Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira
(Pesquisador - Fiocruz Rondônia)

Dra. Carla Freire Celedônio Fernandes
(Pesquisadora - Fiocruz Rondônia)

Dra. Rubiani Pagotto
(Professora – Universidade Federal de Rondônia)

Suplentes:

Dr. Christian Collins Kuehn
(Professor – Universidade Federal de Rondônia)

Dra. Carolina Bioni Garcia Teles
(Pesquisadora - Fiocruz Rondônia)

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

M444a

Mattos, Cristiane Batista.

Avaliação da expressão gênica comparativa dos genes γ GCS, GSH2, TRYR e ODC em isolados de *Leishmania* de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana/Cristiane Batista Mattos, Porto Velho/RO, 2016.
173f.

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, Rondônia, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

1. *Leishmania* 2. Expressão gênica 3. PCR em tempo real. I. Título.

CDU: 54

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11-549

A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho original.
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força que me concedeu para realizar esse trabalho e por ter colocado pessoas tão importantes nesses 2 anos de muito trabalho.

Ao meu orientador Dr. Ricardo de Godoi, pelo apoio, paciência, confiança, ensinamentos e conhecimentos compartilhados que foram essenciais para minha formação como futura pesquisadora.

Aos professores do Programa de Pós graduação em Biologia Experimental Carla Freire Celedônio, Andreimar Martins Soares, Leonardo de Azevedo Calderon, Mauro Shugiro Tada, Rubiani Pagotto, Maria Manuela da Fonseca Moura, Ricardo de Godoi Mattos Ferreira, Genimar Rebouças Julião, Quintino Moura Dias Jr., Joana Darc Neves, Najla Benevides Matos, Deusilene Sousa Vieira, Alexandre de Almeida e Silva, Jansen Fernandes de Medeiros e Juliana Pavan Zuliani pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos meus colegas do laboratório de Epidemiologia genética da Fiocruz, Gabriel, Carolina, Kátia, Helen, Iasmin, Flávia, Yoda e em especial a Lilian por ter atuado como orientadora, sendo essa participação fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de mestrado da turma 2014, do qual tive a imensa honra de compartilhar conhecimentos, dificuldades e aprendizados, em especial, Carolina, Glaucilene, Daiane, Fátima, Neriane e Michelle.

À Fapero e à Capes pelo fomento.

À Fiocruz Rondônia por proporcionar e financiar parte da execução deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.	25
TABELA 2. IDENTIFICAÇÃO, ORIGEM GEOGRÁFICA E FORMA CLÍNICA RELACIONADAS AS CEPAS DE LEISHMANIA UTILIZADAS NESTE ESTUDO.	32
TABELA 3. REAGENTES UTILIZADOS PARA SÍNTESE DE cDNA.	35
TABELA 4. CONDIÇÕES PARA SÍNTESE DE cDNA.	35
TABELA 5. GENES AVALIADOS NOS EXPERIMENTOS DE EXPRESSÃO.	37
TABELA 6. REAGENTES DA qPCR.	38
TABELA 7. CONDIÇÕES DA qPCR.	39
TABELA 8. VALORES DE ΔCQ MÉDIO COM OS GENES CONTROLES.	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. CICLO BIOLÓGICO DE LEISHMANIA SPP.	15
FIGURA 2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE LT.....	17
FIGURA 3. LT NOS PAÍSES QUE MAIS CONCENTRAM CASOS NOTIFICADOS NAS AMÉRICAS, DE 2010 A 2013.	19
FIGURA 4. CASOS DE LT NOTIFICADOS NO BRASIL DE 2003 A 2013.	20
FIGURA 5. CASOS NOTIFICADOS DE LT NA REGIÃO NORTE DE 2003 A 2013.	21
FIGURA 6. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MATURAÇÃO DE mRNA POR TRANS SPLICING E POLIADENILAÇÃO.	26
FIGURA 7. MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO ANTIMONIAL EM <i>LEISHMANIA</i>	28
FIGURA 8. PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>L. BRAZILIENSIS</i>	41
FIGURA 9. PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>L. GUYANENSIS</i>	42
FIGURA 10. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE γ GCS 43	43
FIGURA 11. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE γ GCS 43	43
FIGURA 12. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE TRYR 44	44
FIGURA 13. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE TRYR 44	44
FIGURA 14. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE GSH2 45	45
FIGURA 15. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE GSH2 45	45
FIGURA 16. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE ODC..... 46	46
FIGURA 17. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE ODC 46	46
FIGURA 18. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE ACTIN 47	47
FIGURA 19. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE ACTIN..... 47	47
FIGURA 20. GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO DE S8..... 48	48
FIGURA 21. CURVA DE DISSOCIAÇÃO DE S8..... 48	48
FIGURA 22. EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO DO cDNA..... 49	49
FIGURA 23. EXPRESSÃO GÊNICA EM <i>L. BRAZILIENSIS</i> E <i>L. GUYANENSIS</i> 52	52
FIGURA 24. VARIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE AS ESPÉCIES DE LEISHMANIA ESTUDADAS E AS FASES DE CRESCIMENTO. 53	53

FIGURA 25. VARIAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE AS FASES DE CRESCIMENTO E EM RNA EXTRAÍDO DE LESÃO NAS CEPAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> E <i>L. GUYANENSIS</i>	56
FIGURA 26. ANÁLISE DE AGRUPAMENTOS DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CEPAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> E <i>L. GUYANENSIS</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CLIOC	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
Cq	Ciclo de quantificação
DFMO	DL- α -difluorometilornitina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
GSH2	Gene da glutathiona sintetase
IL	Intralesional
IM	Intramuscular
IV	Intravenosa
LB	<i>Leishmania braziliensis</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LG	<i>Leishmania guyanensis</i>
LM	Leishmaniose mucosa
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
ODC	Gene da ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
S8	Gene da ribossomal 40S
SbV	Antimonial pentavalente
SFB	Soro fetal bovino
TRYR	Gene da tripanotiona redutase
γ GCS	Gene da gama glutamincisteína sintetase

Sumário

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	14
1.2 Espécies de <i>Leishmania</i>	16
1.3 Leishmaniose tegumentar.....	16
1.4 Epidemiologia de Leishmaniose tegumentar	19
1.5 Diagnóstico e tratamento de Leishmaniose tegumentar	21
1.6 Genoma de <i>Leishmania</i>	26
1.7 Genes de <i>Leishmania</i> envolvidos no metabolismo dos antimoniais pentavalentes.....	28
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 METODOLOGIA	32
3.1 Aspectos éticos.....	32
3.2 Casuística	32
3.3 Obtenção e manutenção das culturas de <i>Leishmania</i>	33
3.4 Obtenção do perfil de crescimento das espécies de <i>Leishmania</i> em cultura.....	33
3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	34
3.6 PCR Quantitativo	36
3.7 Análises dos dados	39
4 RESULTADOS.....	41
4.1 Perfil de crescimento de <i>Leishmania</i>	41
4.2 Padronização da qPCR.....	42
4.2.1. Otimização da concentração de oligonucleotídeos.	42
4.2.2. Eficiência da amplificação do cDNA.	49
4.3 Perfil de variação da expressão gênica nos isolados de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	50
4.3.1 Expressão dos genes em <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>.	51
4.3.2 Variação na expressão gênica entre as cepas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i> e as fases de crescimento.	52
4.3.3. Variação na expressão gênica entre as fases de crescimento e em RNA extraído de lesão nas cepas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>.	54
4.3.4. Análise de agrupamentos do perfil de expressão gênica em cepas de <i>L. braziliensis</i> e <i>L. guyanensis</i>	54
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS	64

RESUMO

A leishmaniose é uma doença de caráter antroponozootico presente em regiões tropicais e subtropicais. Cerca de 1,3 milhões de novos casos são notificados anualmente em 98 países, com aproximadamente 30 mil mortes por ano. A Leishmaniose tegumentar (LT) apresenta diversas manifestações clínicas, as mais frequentes são a leishmaniose cutânea e a leishmaniose mucosa, provocadas por espécies do gênero *Leishmania*, dentre elas *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. O tratamento de LT é feito com antimoniais pentavalentes (SbV), porém nos últimos anos tem aumentado o número de casos de resistência ao tratamento. Os genes yGCS, ODC, GSH2 e TRYR codificam proteínas com funções envolvidas no metabolismo da droga. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão gênica comparativa desses genes em cepas de *Leishmania* de pacientes atendidos no Hospital de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON. Foram analisadas 22 cepas de *L. braziliensis* e 15 de *L. guyanensis* realizadas em ensaios de PCR em tempo real. Foi obtido o perfil da curva de crescimento das duas espécies analisadas para realizar a coleta de RNA nas fases logarítmica tardia e estacionária. A concentração ideal dos iniciadores para os genes e a eficiência de cDNA foram obtidas para padronização da técnica utilizada. O gene ODC apresentou maior expressão entre os genes avaliados e o gene yGCS apresentou a menor expressão. Entre as espécies de *Leishmania* foi observada variação significativa nos genes yGCS e ODC. Os genes GSH2 e TRYR não apresentaram variação significativa na expressão em nenhuma das variáveis analisadas. Entre as fases logarítmica tardia e a estacionária (de L.b e L.g) não foi observada diferença significativa. Quando comparada a expressão gênica entre cultura e RNA extraído da lesão foi observada variação significativa para os genes yGCS e ODC. Em todas as análises, inclusive no *heatmap* foi observada variação na expressão gênica intra espécie. A partir dos resultados obtidos, fica reforçada a importância da obtenção de informações clínicas dos pacientes em relação a cura clínica ou falha terapêutica e visando compará-las com dados de expressão gênica dos isolados e os dados de expressão gênica obtidos do RNA extraídos da lesão.

Palavras-chaves: *Leishmania*, Expressão gênica e PCR em tempo real

ABSTRACT

Leishmaniasis is an anthroponotic disease present in tropical and subtropical regions. About 1.3 million of new cases have been reported per year in 98 countries with approximately 30,000 deaths. Cutaneous Leishmaniasis (LT) has several clinical manifestations, but cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis forms are the most frequent. The disease is caused by species of the *Leishmania* genus, e.g. *L. braziliensis*, *L. guyanensis* and *L. amazonensis*. The treatment is based on pentavalent antimonials (SbV), but in recent years the number of cases of resistance has increased. The genes yGCS, ODC, GSH2 and TRYR encode proteins with functions involved in drug metabolism. The objective of this study was to evaluate the comparative gene expression of those genes in *Leishmania* strains isolated from patients of the Tropical Medicine Hospital of Rondônia - CEMETRON. 22 *L. braziliensis* strains and 15 *L. guyanensis* were analyzed by real time PCR assays. The profile of the growth curve was obtained for both species analyzed to collect the RNA in the late logarithmic and stationary phases. The optimal concentration of primers for the genes and cDNA efficiency were obtained on the standardization of the techniques. The ODC gene showed higher expression among genes evaluated and yGCS gene presented the lowest expression profile. Between the species of *Leishmania* there was no significant variation on the expression profiles of yGCS and ODC genes. The GSH2 and TRYR genes showed no significant change in expression for any of the variables. Comparing the late logarithmic and the stationary phase there was no significant difference. When compared gene expression between culture and RNA extracted from the lesion was observed significant changes for yGCS and ODC genes. Intra species variation in gene expression was observed in heatmap analysis. The presented results reinforces the importance of obtaining and comparing clinical information of patients regarding clinical cure or treatment failure with the gene expression data of the isolated and gene expression data obtained from RNA extracted from injury.

Keywords: Leishmania, gene expression and real time PCR

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de caráter antroponótico, presentes em regiões tropicais e subtropicais, em especial nos países em desenvolvimento. São causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas ao homem por meio da fêmea de flebotomíneos infectadas no momento do repasto sanguíneo (QUEIROZ et al., 2012). As leishmanioses são divididas em dois grupos, Leishmaniose Tegumentar (LT) com manifestações cutâneas e mucosas e Leishmaniose Visceral (LV) que atinge preferencialmente órgãos viscerais (MURRAY et al., 2005).

As leishmanioses constituem um problema de saúde pública e segundo a OMS estão entre as seis infecções parasitárias mais importantes do mundo. Estima-se que há 1,3 milhões de novos casos no mundo distribuídos em 98 países, com cerca de 30 mil mortes por ano (WHO, 2015). São consideradas doenças negligenciadas com poucos investimentos financeiros e atenção das autoridades públicas para implementação de atividades de pesquisa, prevenção e controle da doença (SANTOS et al., 2012).

1.1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

As *Leishmanias* são parasitas heteróxicos. Os hospedeiros vertebrados são representados por uma variedade de mamíferos no ambiente silvestre e no ambiente doméstico. Nos últimos anos os reservatórios domésticos tem atuado como um fator de grande relevância para infecções em regiões urbanas, representando mudanças no cenário epidemiológico da patologia (BRASIL, 2013; CANTACESSI et al., 2015). Os hospedeiros invertebrados são insetos, dípteros (1,5 a 2 mm de tamanho), pertencentes a família Psychodidae e aos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. Esses dois gêneros de importância médica são responsáveis pela transmissão dos parasitas *Leishmania* patogênicos ao ser humano (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012).

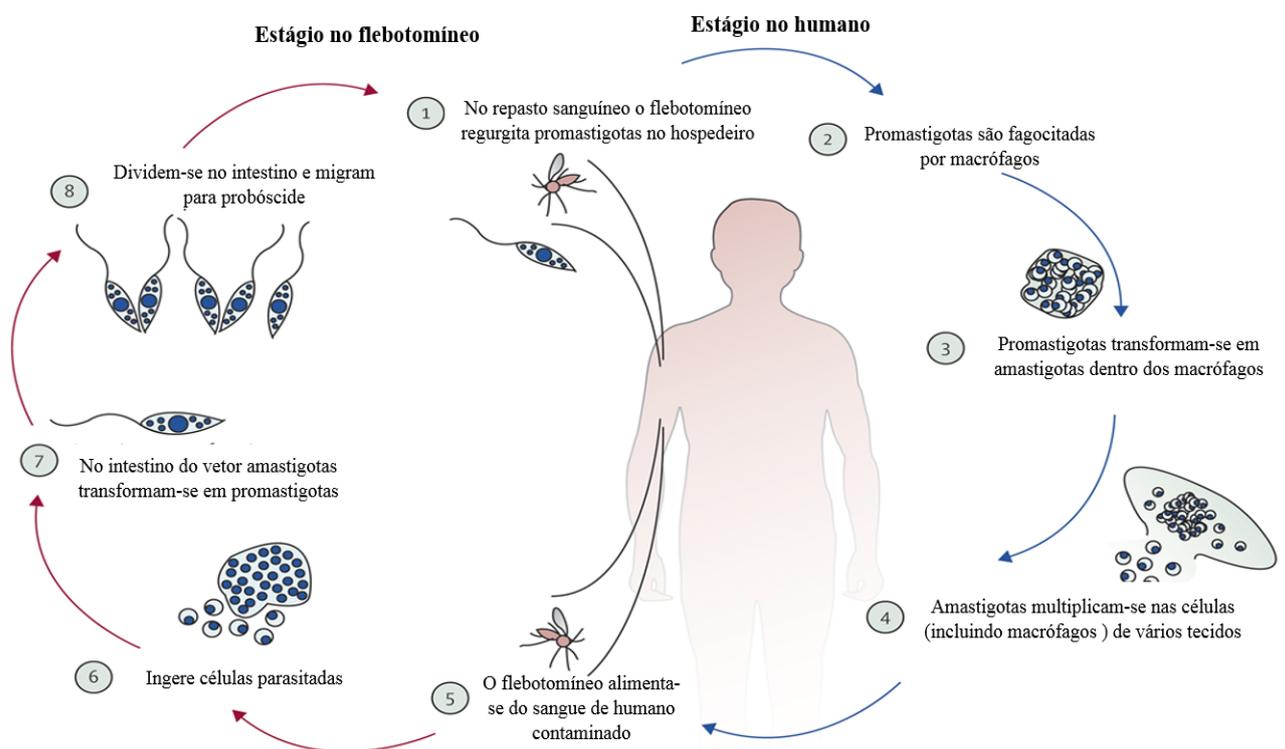
A infecção em humanos ocorre após o repasto sanguíneo da fêmea de flebotomíneo contaminada. As formas transmitidas ao hospedeiro vertebrado são as promastigotas metacíclicas, que caracterizam-se por serem longas, flageladas, móveis e extracelulares. Dentro dos fagocitossomos de macrófagos, as promastigotas se diferenciam em amastigotas. As

amastigotas são formas arredondadas, com flagelo interno, imóveis e obrigatoriamente intracelulares (HOARE; WALLACE, 1966).

Ao sugar sangue do hospedeiro infectado com *Leishmania*, o vetor ingere as formas amastigotas de *Leishmania* que irão se diferenciar em promastigotas não infectantes no intestino do inseto. Essas sofrem um processo de maturação, na qual darão origem as formas metacíclicas (infectantes), por meio do processo de metaciclo gênese. O ciclo é completado quando há um novo repasto sanguíneo e as formas promastigotas são inoculadas no hospedeiro vertebrado (Figura 1) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O processo de metaciclo gênese ocorre também em meio de cultura de *Leishmania* no período de crescimento, entre a fase logarítmica e a fase estacionária. Nesse processo, além do parasita se tornar infectivo, ocorrem diversas alterações morfológicas, na expressão de genes e na estrutura bioquímica dos lipofosfoglicanos presentes na superfície celular (SILVA et al., 2015).

Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



As setas em azul representam o estágio de *Leishmania* spp. no humano e as setas vermelhas representam o estágio no flebotomíneo. As formas arredondadas são as amastigotas e as formas ovais com presença de flagelos são as promastigotas. Adaptado de REITHINGER et al., 2007.

1.2 Espécies de *Leishmania*

O agente etiológico das leishmanioses pertence ao Reino Protozoa; filo Mastigophora; ordem Kinetoplastida; família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*. Esse gênero é subdividido em dois subgêneros, *Leishmania (Leishmania)* e *Leishmania (Viannia)*. Os subgêneros foram classificados inicialmente de acordo com a região onde o parasita se desenvolve no intestino do vetor (LAINSON; SHAW, 1987), classificação posteriormente corroborada por características moleculares do parasita (RIOUX et al., 1990; CUPOLILLO; GRIMALDI; MOMEN, 1994).

Foram relatadas vinte e duas espécies de *Leishmania*, relacionadas por causar infecções em humanos. Essas espécies estão amplamente distribuídas, principalmente nos países pouco desenvolvidos em regiões tropicais e subtropicais (WHO, 2015).

No Brasil foram identificadas oito espécies de *Leishmania* patogênicas ao ser humano, sendo duas do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) infantum*, o único agente etiológico da LV no Brasil e *L. (L.) amazonensis*. As seis espécies do subgênero *Viannia* são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawi* e *L. (Viannia) lindenbergi*. Das oito espécies identificadas no Brasil, sete ocorrem na Amazônia brasileira, sendo os agentes causadores de LT (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; BRASIL, 2013).

1.3 Leishmaniose tegumentar

A LT é um dos tipos de leishmaniose e apresenta uma variedade de manifestações clínicas, sendo considerada uma doença polimórfica e espectral da pele, baseada nos aspectos clínicos, imunológicos e histopatológicos (BITTENCOURT; BARRAL, 1991). Essas diferenças na apresentação clínica, em geral, estão associadas ao sistema imunológico individual do hospedeiro e as diferentes espécies de *Leishmania*. As principais manifestações de LT são classificadas como: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) (DANTAS et al., 2014).

A LC apresenta diferentes formas clínicas, sendo (i) localizada, lesão típica na forma de úlcera indolor, de bordo elevado e fundo granuloso, são consideradas lesões primárias, que quando não tratadas podem resultar em curas espontâneas (figura 2A) (MARTINS et al.,

2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014); (ii) disseminada, forma mais rara de LC que pode ser observada em até 2% dos casos de LT, caracterizada com a presença de úlceras múltiplas e pequenas que acometem vários segmentos corporais, resultantes da disseminação hematogênica ou linfática (figura 2B) (COSTA et al., 2009); (iii) difusa, caracterizada por lesões nodulares não ulceradas, precedidas por úlcera única que evolui com disseminação linfática, ocorrem em pacientes anérgicos com deficiência na resposta imune celular (figura 2C) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A LM é a uma manifestação grave da forma cutânea, que afeta principalmente as regiões mucosas da boca, nariz e faringe. A presença do parasita nas regiões mucosas decorre de metástase ou migração dos parasitas da lesão localizada para os tecidos nasais. Esse tipo de lesão pode surgir de meses a anos após a resolução da lesão cutânea de evolução crônicas e pode estar relacionada com tratamento inadequado (figura 2D) (BRASIL, 2013; DANTAS et al., 2014; MARTINS et al., 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Figura 2. Manifestações clínicas de LT



Fotos: Laboratório Epidemiologia Genética/Fiocruz-RO. A Figura apresenta as manifestações clínicas de LT: (A) lesão cutânea localizada, (B) lesão cutânea disseminada, (C) lesão cutânea difusa e (D) lesão mucosa nasal.

No Brasil as três espécies mais frequentes de *Leishmania* responsáveis por essa diversidade de manifestações clínicas causadoras de LT são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (BRASIL, 2013)

A *L. braziliensis* é a espécie predominante como agente etiológico, possui o maior potencial patogênico ao homem e está relacionada com as lesões cutâneas localizadas que pode evoluir para manifestações clínicas mais graves, de longa evolução com lesões cutâneas ou lesões destrutivas nas mucosas (GRIMALDI; DAVID; MCMAHON-PRATT, 1987; VERGEL et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010). A *L. braziliensis* está presente em todas regiões brasileiras e é transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos com diversos reservatórios no meio ambiente. Essa diversidade de ambientes, vetores e reservatórios, pode estar associada a variabilidade genética intra espécie de *L. braziliensis* (CUPOLILLO et al., 2003).

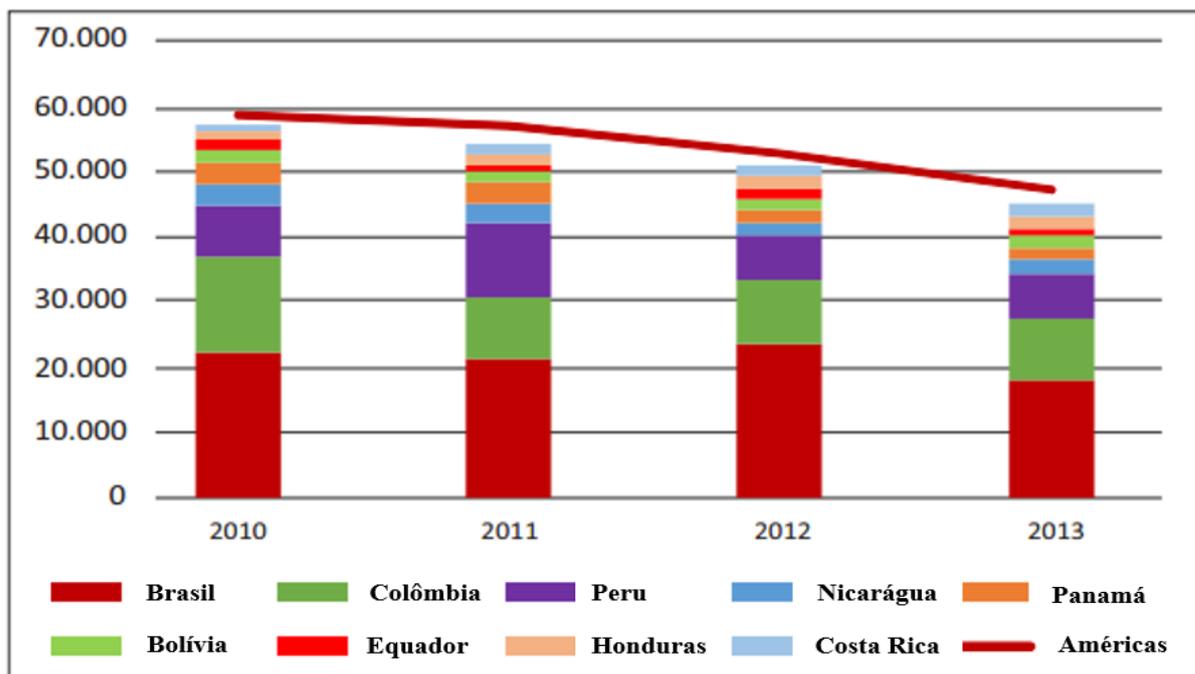
A *L. guyanensis* é endêmica da região amazônica brasileira, com maior ocorrência no estado do Amazonas, mas relatada também nos estados Acre, Amapá, Pará e Rondônia. A principal manifestação clínica dessa espécie está relacionada à leishmaniose disseminada, com úlceras pequenas e numerosas. (GRIMALDI; TESH; MCMAHON-PRATT, 1989; MATTA et al., 2009; GUERRA et al., 2011; TELES et al., 2015). São raros os casos relatados afetando as mucosas, no entanto nos estados de Rondônia e Amazonas foram identificadas casos de leishmaniose mucosa causada *L. guyanensis* (CANTANHÊDE et al., 2015).

A *L. amazonensis* foi identificada em várias regiões brasileiras e está envolvida com uma variedade de manifestações clínicas, que vão desde lesões cutâneas com as formas cutâneas anérgicas difusas em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular e lesões na mucosa (BARRAL et al., 1991; COSTA et al., 2009; LAINSON, 2010).

1.4 Epidemiologia de LT

A LT nas Américas representa um importante problema de saúde pública, devido a sua distribuição geográfica, bem como ao ciclo de transmissão bastante complexo, que envolve uma diversidade de espécies patogênicas, vetores, reservatórios e condições ambientais favoráveis a transmissão da doença. A doença está distribuída em 18 países da América, com mais de 70% dos casos concentrados em apenas 4 países, representados pelo Brasil, Colômbia, Peru e Nicarágua (Figura 3). Apesar do elevado número de casos registrados em poucos países, é possível observar uma redução anual na ocorrência dessa doença, principalmente nos países com maiores número de registros (PAHO, 2015).

Figura 3. LT nos países que mais concentram casos notificados nas Américas, de 2010 a 2013.



Fonte: PAHO/OMS. SisLeish: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses.

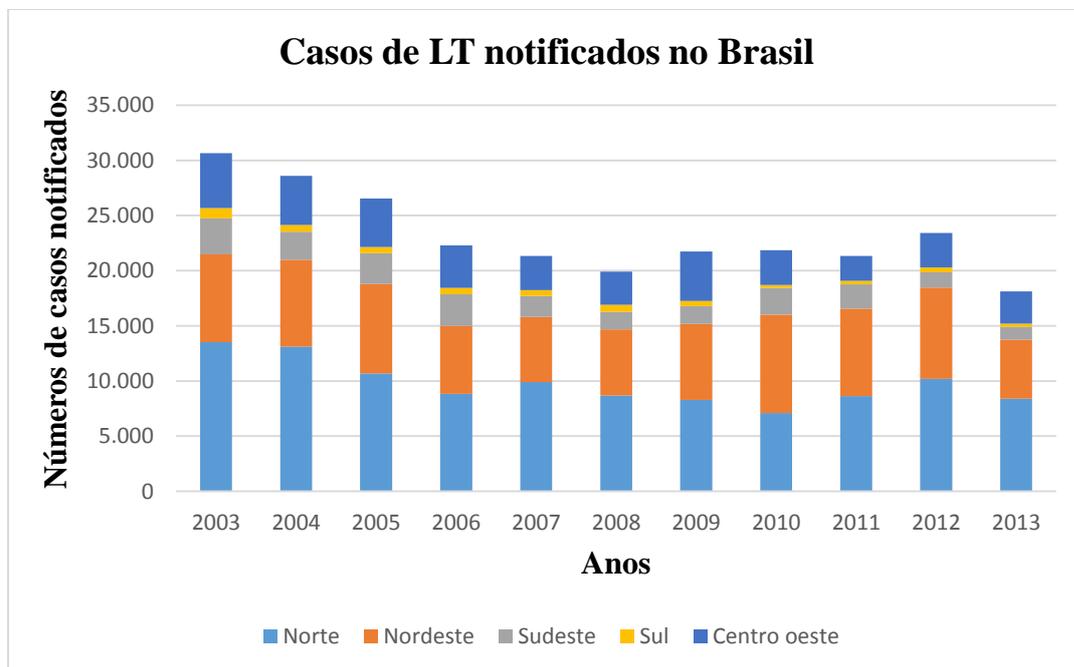
No Brasil, a LT apresenta ampla distribuição com registros de casos em todas as regiões brasileiras, sendo confirmada a autoctonia em todas unidades federadas do país no ano de 2003 (Figura 4) (BRASIL, 2015).

O perfil epidemiológico de LT no Brasil tem apresentado mudanças significativas. Inicialmente acometia pessoas em contato com floresta e atualmente os casos relatados estão associados a transmissão em zonas rurais desmatadas e em regiões periurbanas. Essas

mudanças são mantidas pelos casos oriundos de focos antigos ou de áreas próximas aos mesmos e o aparecimento de surtos epidêmicos decorrentes de atividades econômicas e ocupação populacional nas áreas periféricas (GUERRA et al., 2011; BRASIL, 2013).

A região Norte tem apresentado o maior número de casos entre as regiões brasileiras (41,95% do total de casos registrados, entre o período de 2003 a 2013), e com coeficientes de detecção superior as demais regiões (58,1 por 100.000 habitantes, entre o período de 2003 a 2013), conforme demonstrado na Figura 4 (BRASIL, 2015). Assim como no Brasil, a região Norte também apresentou uma redução no número de casos notificados (BRASIL, 2015).

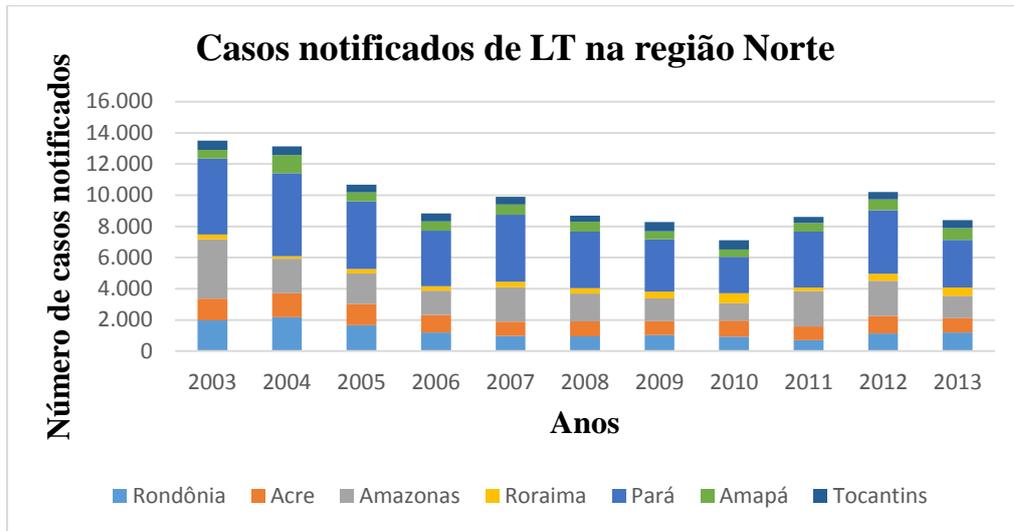
Figura 4. Casos de LT notificados no Brasil de 2003 a 2013.



Número de casos de LT notificados no Brasil por Região no período de 2003 a 2013.
Fonte: Sinan/SVS/MS.

Entre os estados da região Norte, o Pará possui o maior número de casos registrados, seguido do Amazonas e posteriormente Rondônia que tem apresentado cerca de 1200 casos anualmente com coeficiente de detecção de 69,6 por 100.000 habitantes (BRASIL, 2015). Ao contrário do cenário nacional que vem apresentando uma redução, Rondônia tem apresentado um aumento de casos notificados entre os anos de 2011 a 2013 (Figura 5).

Figura 5. Casos notificados de LT na região Norte de 2003 a 2013.



Número de casos de LT notificados na região Norte por Estado no período de 2003 a 2013.
Fonte: Sinan/SVS/MS.

1.5 Diagnóstico e tratamento de LT

O diagnóstico de LT é realizado por meio da associação dos dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. O diagnóstico laboratorial visa a confirmação dos achados clínicos e auxilia nas informações epidemiológicas por meio da identificação das espécies circulantes em determinada região, orientando quanto às medidas a serem adotadas para o controle e o agravo (BRASIL, 2013). O diagnóstico laboratorial tem sido uma ferramenta crucial para a otimização do tratamento, no entanto, apresenta algumas limitações, como a falta de uma técnica padrão-ouro, que apresente sensibilidade, especificidade, rapidez com custos acessíveis (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

No Brasil, os testes laboratoriais para LT recomendados pelo Ministério da Saúde são constituídos por 3 grupos de exames: o parasitológico, imunológico e molecular (BRASIL, 2013).

Exame parasitológico - É um teste qualitativo onde a demonstração do parasita é feita por meio de exame direto, sendo esse o de primeira escolha dentre os parasitológicos, devido aos custos baixos, rapidez e fácil execução. A sensibilidade do teste está associada ao tempo de evolução da doença e aos casos de infecções recorrentes. O isolamento em cultivo *in vitro* pode ser utilizado para confirmação do parasita, mas sua eficiência é reduzida (BRASIL, 2013).

Exames imunológicos - O teste intradérmico (intradermoreação de monte negro - IDMN) consiste em uma solução antigênica de promastigota injetada intradérmica, onde será avaliada a resposta da hipersensibilidade celular tardia, sendo considerado o teste de primeira escolha dentre os imunológicos. Atualmente entre os exames imunológicos destacam-se também os testes sorológicos que detectam a presença de anticorpos anti-*Leishmania* no soro. A problemática dos testes sorológicos é que estes podem apresentar reações cruzadas com outras doenças, principalmente causadas por tripanosomatídeos, tendo sua aplicação limitada em regiões endêmicas para os protozoários dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (GOMES et al., 2014).

Exames moleculares: Os testes moleculares possuem maior sensibilidade, especificidade e variedade de amostra biológica em relação aos outros. Consistem em detectar o material genético do parasita e permitem identificar espécies (BRASIL, 2013). Esse exame é pouco utilizado na rotina laboratorial devido ao elevado custo, falta de estrutura física e profissionais capacitados para execução dos testes, sendo sua utilização restrita aos centros de pesquisas (MÜLLER et al., 2015; PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Assim, o diagnóstico laboratorial para LT ainda apresenta algumas limitações quanto à sua implementação no sistema público de saúde, principalmente em relação às abordagens moleculares. Com isso, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápidos e confiáveis e sua associação ao tratamento adequado são de grande relevância para obtenção da cura clínica dos pacientes acometidos com LT (PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015).

Ainda não existem vacinas disponíveis contra as leishmanioses, apesar de diversas tentativas para o seu desenvolvimento nos últimos quarenta anos, a maioria foi interrompida na fase experimental (MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015). O *Leish-111F+MPL-SE* é o único candidato a vacina contra leishmanioses testada em humanos. Consiste em uma poliproteína recombinante composta por 3 antígenos de *Leishmania* (COLER et al., 2007; MODABBER, 2010). Em um ensaio clínico desse composto em área endêmica para *L. donovani* foi observado que o mesmo apresentou níveis de segurança e tolerância necessários para sua utilização, com indução de respostas específicas das células T contra esses antígenos (EVANS; KEDZIERSKI, 2012).

O tratamento de LT tem se baseado na administração de quimioterápicos. Os antimonialis pentavalentes (SbV) são as drogas de primeira escolha para o tratamento, estão

sendo utilizados desde 1947 em diversos países para os diferentes espectros da patologia (DECUYPERE et al., 2005; ADAUI et al., 2011). São dois tipos de SbV, o N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo o último não comercializado no Brasil. O mecanismo de ação ainda não está bem definido, mas as hipóteses são multifatoriais, relacionadas com a inibição da via glicolítica, síntese de ácidos graxos e fragmentação do DNA de *Leishmania* (KAUR; RAJPUT, 2014; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

O esquema terapêutico dos antimoniais pentavalentes pode variar de acordo com a manifestação clínica, espécie do parasita e evolução da doença. Os efeitos colaterais são comuns no tratamento, sendo os mais frequentes a cardiotoxicidade grave, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Alguns pacientes possuem restrições para utilização do SbV devido aos efeitos adversos. Dentre eles pacientes idosos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e portadores doença de chagas devem receber tratamento diferenciado (tabela1) (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Pacientes que respondem ao tratamento apresentam cura clínica no período de até 3 meses após iniciado, sendo necessário o acompanhamento clínico e laboratorial de 3 a 6 meses após tratamento, de acordo com a forma clínica (BRASIL, 2013; MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SHOWLER; BOGGILD, 2015).

Além dos antimoniais apresentarem restrições em relação ao uso para alguns grupos de pacientes, outra problemática importante está associada ao elevado número de casos descritos com resistência, sendo um impacto de relevância mundial no tratamento das leishmanioses (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Em várias regiões endêmicas para as leishmanioses foram identificadas cepas de *Leishmania* resistentes (VANAERSCHOT et al., 2014). A Índia registrou mais de 60% de casos resistentes na região de Bihar (SUNDAR et al., 2000), assim como na Colômbia onde foram isoladas cepas de *L. braziliensis* resistentes ao SbV (ROJAS et al., 2006).

Outras drogas têm sido utilizadas como fonte alternativa no tratamento da LT. Pentamidina é uma droga de segunda escolha, principalmente nos casos de resistência a SbV, a eficácia do tratamento está relacionada com algumas espécies de *Leishmania*, sendo sua utilização restrita devido a elevada toxicidade. A anfotericina B está disponível para tratamento em alguns casos, é um antifúngico que possui afinidade pelo ergosterol presente na membrana da célula parasitária. Disponível também na formulação de um complexo lipídico, que reduz os efeitos colaterais e melhora a farmacocinética, utilizada principalmente em casos de pacientes imunodeprimidos. A Miltefosina apresenta a vantagem de ser administrada por

via oral, dispensando a necessidade de internação hospitalar, e tem apresentado eficácia em alguns países onde é administrada. A Paromomicina apresenta diversos efeitos colaterais quando administrada via intramuscular, sendo utilizada apenas no tratamento de LV (tabela 1) (KAUR; RAJPUT, 2014; MENEZES et al., 2015).

O sucesso no tratamento depende de vários fatores. Alguns estudos evidenciam que fatores inerentes ao parasita sugerem mecanismos envolvidos na resistência de SbV (KAUR; RAJPUT, 2014). A redução *in vivo* de SbV tem sido um desses fatores, visto que a forma administrada para combater o parasito sem grandes efeitos colaterais é a pentavalente, mas a forma ativa do fármaco é a forma trivalente. O local onde a droga é reduzida, no macrófago ou no parasita, também não está esclarecido, sendo a redução um evento crítico para a eficácia da droga (MONTE-NETO et al., 2011). Níveis elevados de tripanotona, um tiol responsável pelo equilíbrio redox intracelular de tripanosomatídeos, são correlacionados com parasitas resistentes, pois esse antioxidante pode formar conjugados com o metal trivalente, favorecendo o efluxo da droga para o meio extracelular (RAI et al., 2013).

Tabela 1. Medicamentos utilizados no tratamento das leishmanioses.

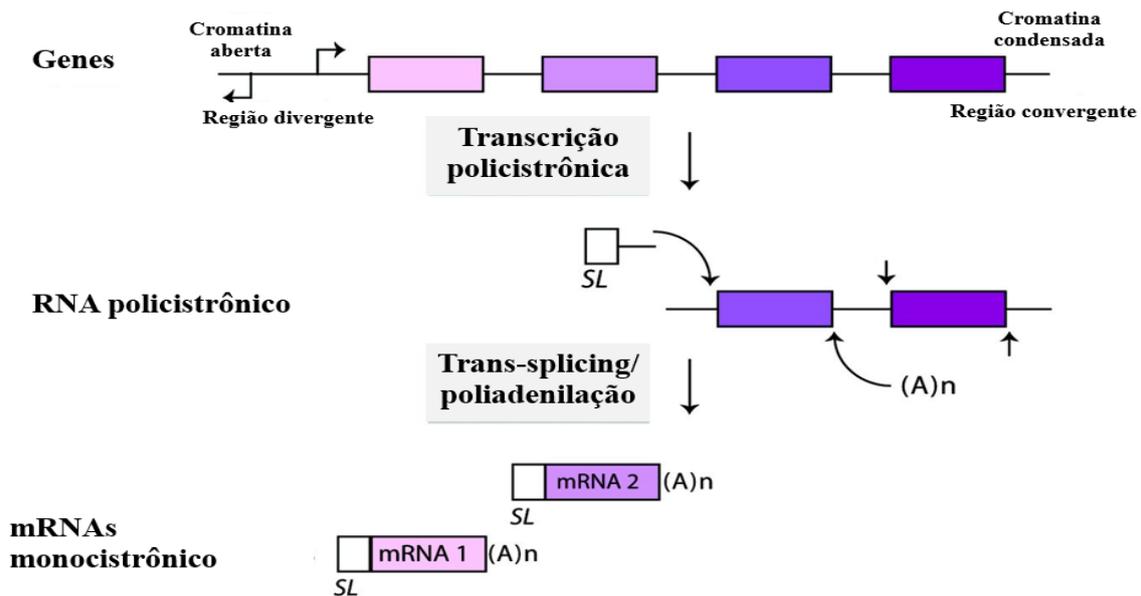
Drogas	Tratamento	Via de adm.	Eficácia	Efeitos adversos
Antimoniais pentavalentes	20 mg/kg diários por 20 dias.	IM, IV ou IL	35-95% (dependendo da área)	Cardiotoxicidade grave, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade
Pentamidina	3 mg/kg dias alternados – 7 doses	IM	35-96% (dependendo da espécie de <i>Leishmania</i>)	Hiperglicemia, como resultado de danos no pâncreas; hipotensão, taquicardia e alterações eletrocardiográficas.
Anfotericina B	0,75-1 mg / kg / dia (15-20 dias, diárias ou alternadamente)	IV	> 90%	Nefrotoxicidade grave, hipocalcemia, febre alta e reações relacionadas a infusão.
Anfotericina B lipossomal	10-30 mg/kg dose única (dose individual 3-5mg/kg/dose)	IV	> 97%	Leve e pouco frequente: nefrotoxicidade e calafrios.
Miltefosina	100-150 mg/dia (28 dias)	Oral	Ásia: 94% (Índia) 60% -93% (África)	Vômitos e diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade.
Paromomicina	15 mg/dia (21 dias) ou 20 mg/dia (17dias)	IM ou tópico	94% (Índia) 46-85% (África)	Nefrotoxicidade grave, ototoxicidade, hepatotoxicidade.

IV: administração intravenosa; IM: intramuscular; IL: administração intralesional. Fonte adaptada: (MENEZES et al., 2015).

1.6 Genoma de *Leishmania*

Os tripanossomatídeos em geral apresentam algumas características genômicas exclusivas do grupo entre os eucariotos, similares aos seus ancestrais, os procariotos. Possuem uma escassez de íntrons e agrupamento policistrônico, que são grandes agregados de genes que codificam proteínas com funções diferentes, separados por regiões intergênicas. Esses agrupamentos de genes possuem uma maquinaria transcricional simplificada, no qual há o processamento de mRNA por *trans-splicing* acoplado a poliadenilação (Figura 6). São co-transcritos pela RNA polimerase II, relatada em estudo por possuir uma baixa quantidade de fatores de transcrição (GAUDENZI et al., 2011).

Figura 6. Representação esquemática da maturação de mRNA por *trans splicing* e poliadenilação.



O esquema representa o processo de maturação do mRNA por trans-splicing e poliadenilação em tripanossomatídeos. A transcrição inicia em regiões de cromatina aberta e termina em regiões de cromatina condensada. Fonte adaptada: Gaudenzi et al., 2011.

L. major, foi a primeira espécie de *Leishmania* a ter o genoma sequenciado (IVENS et al., 2005). Atualmente estão disponíveis os genomas de *L. infantum* e *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. amazonensis*, dentre outros (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). A disponibilidade dessas sequências tem proporcionado análises comparativas detalhadas das espécies de *Leishmania*, associadas a patologia e aos seus diversos espectros (CANTACESSI et al., 2015).

Os genomas de *Leishmania* spp. apresentam de 34 a 36 cromossomos, dos quais 31 são altamente conservados (ROGERS et al., 2011). Um comparativo dos genomas de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* demonstrou um conteúdo, sintenia e arquitetura genética conservada (SMITH; PEACOCK; CRUZ, 2007). No sequenciamento realizado em *L. major* foi observado 911 genes de RNA, 39 pseudogenes e 8.272 genes codificadores de proteínas, dos quais 36% podem ser atribuídas com funções desconhecidas (IVENS et al., 2005). Em análise comparativa dos genomas das três espécies citadas acima, foram identificados genes, codificadores para proteínas que seriam espécie-específicos. Alguns estudos mostraram, *L. braziliensis* foi a espécie mais divergente geneticamente e biologicamente, com 47 genes espécie-específicos, com uma maquinaria de interferência mediada por RNA e elementos transponíveis exclusivo nesta espécie (IVENS et al., 2005; SMITH; PEACOCK; CRUZ, 2007).

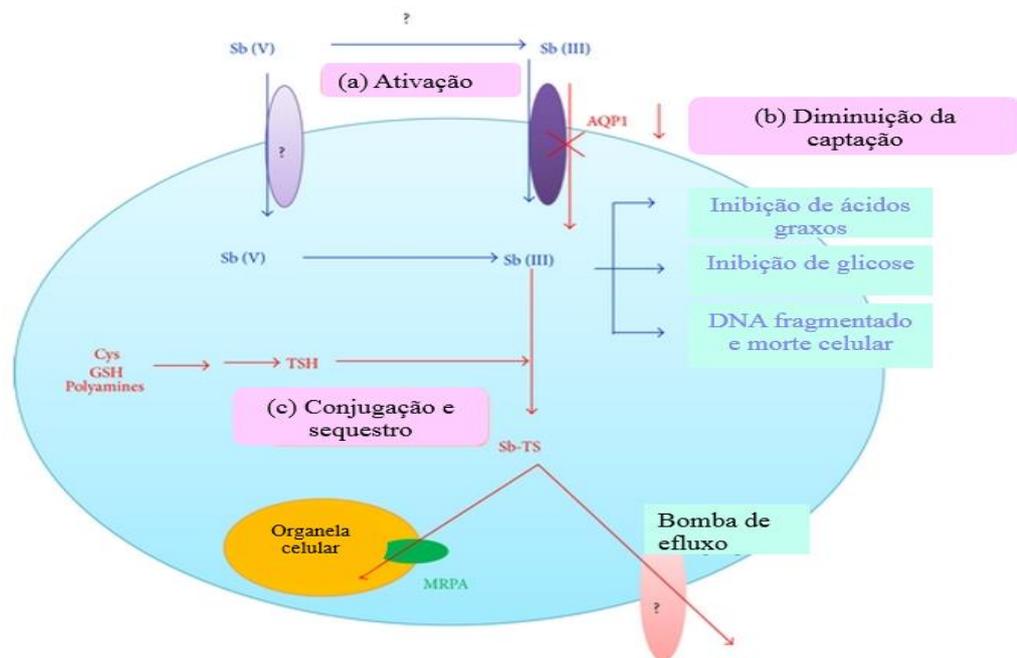
A regulação gênica em *Leishmania* é feita por um processo dependente de mecanismos de estabilização de RNA a nível pós transcricional. Essa regulação pós transcricional e regulação ao nível de tradução são pouco conhecidas, no entanto resultam em correlações variáveis entre os níveis de expressão do gene e da proteína (DEPLEDGE et al., 2009). Além disso, a aneuploidia pode aparecer com frequência no genoma de *Leishmania*, onde os números de cópias de cromossomos podem variar consideravelmente entre linhagens e espécies do parasita de diversas regiões geográficas (DOWNING et al., 2011). Num estudo com *L. mexicana* foi sugerido que até 15 cromossomos eram supranumerários. Cromossomos e genes duplicados podem estar relacionados a um aumento nos níveis de mRNA (ROGERS et al., 2011).

Nos últimos anos, alguns estudos de expressão gênica foram realizados com cepas de *L. major*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, com as técnicas de microarranjos e PCR em tempo real. Esses estudos evidenciaram um conjunto de genes expressos diferencialmente em estágio específico e espécie específico. Alguns desses genes avaliados possuem grande relevância na resposta ao tratamento, pois codificam proteínas com funções envolvidas no metabolismo e transporte dos antimoniais pentavalentes, droga de primeira escolha utilizada no tratamento das leishmanioses em geral (DECUYPERE et al., 2008; DEPLEDGE et al., 2009; ALCOLEA et al., 2010; TORRES et al., 2010; ADAUI et al., 2011; MONTE-NETO et al., 2011).

1.7 Genes de *Leishmania* envolvidos no metabolismo dos antimoniais pentavalentes

Espécies de *Leishmania* possuem proteínas envolvidas diretamente ou indiretamente na via de metabolização dos antimoniais, conseqüentemente podem estar relacionadas também com acumulação reduzida do fármaco ativo intracelular, sequestro do fármaco para o meio extracelular, redução dos níveis tóxicos na atividade microbicida, entre outros. Portanto genes que codificam essas proteínas possuem grande relevância no desenvolvimento da infecção e na resposta terapêutica (KAUR; RAJPUT, 2014).

Figura 7. Mecanismo de resistência ao antimônio em *Leishmania*.



O esquema representa os mecanismos de resistência antimônio em *Leishmania*. (a) Ativação: conversão de Sb (V) para Sb (III). (b) Diminuição da captação: diminuição da expressão de AQP1, um transportador de metal trivalente, reduz a absorção de Sb para dentro da célula e assim conferir resistência. (c) Conjugação e sequestro: níveis elevados de tiol pode formar conjugado com antimônio, favorecendo o sequestro do conjugado ou a extrusão. As linhas azuis indicam o possível mecanismo de ação da droga em cepas sensíveis de *Leishmania* e as linhas vermelhas representam possível mecanismo de resistência em cepas de *Leishmania*. Adaptada de (KAUR; RAJPUT, 2014).

Os tióis são agentes oxirredutores presente nas células de *Leishmania*, com funções importantes para sobrevivência do parasita no macrófago e no desenvolvimento da infecção. Possuem um duplo papel, são responsáveis por bloquear a ação microbicida do macrófago e atuam também na formação de conjugados com metais trivalentes, colaborando para o efluxo celular da droga via transportadores específicos. Em estudos comparativos com cepas de *L. donovani* sensíveis e cepas resistentes aos antimoniais, foi observado que as cepas resistentes

possuem níveis elevados de tióis, quando comparadas com cepas sensíveis. Alguns genes codificam proteínas que têm função relacionada ao metabolismo de tiol, entre eles, ornitina descarboxilase (ODC), gama glutamilcisteína sintetase (γ GCS), glutathiona sintetase (GSH2) e tripanotiona redutase (TRYR) (RAI et al., 2013).

A ODC é uma enzima limitante da via poliaminas. Essa via tem sido intensamente estudada em células de mamíferos, pois está relacionada a vários processos celulares fundamentais, tais como proliferação, diferenciação e síntese de macromoléculas (GILROY et al., 2011). Em tripanosomatídeos essa via atua como precursora na produção de tripanotiona, um tiol que combate o estresse oxidativo (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). A inibição de ODC por meio do DL- α -difluorometilornitina (DFMO) tem mostrado eficácia na cura para doença do sono causada por *Trypanosoma brucei*. Em teste *in vitro* com as formas promastigotas de *Leishmania* foi observado que a inibição dessa enzima interrompeu o crescimento do parasita. Os componentes enzimáticos da via de biossíntese das poliaminas, tal como a ODC podem ser alvos potenciais para o tratamento das leishmanioses (VAN NIEUWENHOVE et al., 1985).

A γ GCS atua na síntese de glutathiona, que é precursor de tripanotiona. O aumento na expressão do gene que codifica esta enzima tem sido correlacionado com cepas resistentes aos antimoniais em *Leishmania*, considerada um fator determinante para resistência desses parasitas. Outra análise comparativa realizada entre os níveis de tióis e a expressão do gene, mostrou que cepas resistentes com elevado níveis de tióis apresentaram uma superexpressão do gene γ GCS (SINGH; CHATTERJEE; SUNDAR, 2014). No entanto, em outro estudo realizado com *L. donovani* demonstrou que a regulação de tióis não é mediada por γ GCS, o envolvimento dessa enzima na regulação do agente oxirredutor ocorre apenas em isolados altamente resistentes. (RAI et al., 2013).

GSH2 atua na síntese de glutathiona, um tiol que desempenha papel importante na defesa celular contra o estresse oxidativo e na desintoxicação de drogas e vários xenobióticos nas células de organismos (GRONDIN et al., 1997; ADAUI et al., 2011). Produtos sintetizados por GSH2 são importantes para o mecanismo oxirredutor, no entanto, essa enzima não influencia diretamente no mecanismo de resistência a terapia. O aumento da expressão de GSH2 na célula de mamíferos tem sido associado a elevada atividade enzimática de γ GCS (GRONDIN et al., 1997).

A TRYR promove a síntese de tripanotona, o principal tiol presente exclusivamente em células de tripanosomatídeos. Essa restrição tem apresentado TRYR como um alvo ideal para o desenvolvimento de novas drogas. A TRYR é análoga a glutatona redutase, um antioxidante presente nas células de humanos, com exclusiva especificidade de substrato. Diante dessa especificidade, várias moléculas têm sido exploradas como inibidores. Por estar diretamente relacionada ao metabolismo de antioxidantes, estudos direcionados a resistência aos antimoniais têm mostrado que a regulação de tiol também é mediada pelo aumento da expressão do gene TRYR, sugerindo que essa molécula possui funções essenciais na infecção e na resposta terapêutica. (RAI et al., 2013; KUMAR; ENGWERDA, 2014).

O número de casos de falha terapêutica nos tratamentos com o medicamento de primeira escolha, SbV, vêm apresentando um aumento nos últimos anos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Além disso, alguns genes de *Leishmania* já descritos na literatura estão relacionados com a metabolização da droga, a exemplo dos quatro genes selecionados (GSH2, γ GCS, ODC e TRYR). A quantificação desses genes nos isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, espécies de maior interesse clínico no Brasil, pode nos fornecer informações importantes sobre a biologia desses organismos bem como em relação a resposta ao tratamento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão comparativa dos genes GSH2, γ GCS, ODC e TRYR em isolados de *Leishmania* de pacientes atendidos no Centro de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON.

2.2 Objetivos específicos

Comparar o perfil de expressão dos genes em isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*;

Avaliar a relação entre resultados de expressão gênica obtidos nos isolados com os resultados obtidos em amostras de RNA extraídos de lesão.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O projeto tem aprovação no comitê de ética no âmbito do projeto iniciado em 2011 com o título: *Verificação da Presença de Leishmaniavírus em amostras de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana atendidos no Centro de Medicina Tropical de Rondônia - CEMETRON*. Certificado de Apresentação para Apreciação Ética - CAAE nº 0020.0.046.000-11.

3.2 Casuística

Foram analisadas 22 cepas de *L. braziliensis* e 15 de *L. guyanensis*, sendo 26 dessas isoladas de pacientes com LT atendidos no ambulatório do CEMETRON, em Porto Velho, Rondônia no período de abril de 2014 a dezembro de 2015 e 11 cepas de *L. guyanensis* fornecidas pela Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz – CLIOC, isoladas de pacientes com LT do estado do Amazonas. As cepas utilizadas neste estudo estão disponíveis na CLIOC. Dados clínicos, origem geográfica de isolamento e identificação das cepas constam na tabela 2.

Tabela 2. Identificação, origem geográfica e forma clínica relacionadas as cepas de *Leishmania* utilizadas neste estudo.

Código CLIOC	Espécie do Parasito	Código Internacional	UF de Isolamento	Forma Clínica
IOC-L3477	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2013/500 LPM LTA	AM	LC
IOC-L3479	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2012/14 LCM LTA	AM	LCM
IOC-L3486	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2013/27 JNS LTA	AM	LC
IOC-L3487	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2013/29 AAS LTA	AM	LC
IOC-L3501	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2013/17 LTA JNV	AM	LC
IOC-L3503	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2013/33 LGS LTA	AM	LC
IOC-L3542	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/233CFS	AM	LCM
IOC-L3543	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/267RSN	AM	LC
IOC-L3460	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/3460	AM	LC
IOC-L3461	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/3461	AM	LC
IOC-L3354	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/3354	AM	LC
IOC-L3538	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/251	RO	LC
IOC-L3539	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2014/271	RO	LC
IOC-L3540	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/268	RO	LC
IOC-L3545	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/275	RO	LC
IOC-L 3546	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/276	RO	LC
IOC-L 3547	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/279	RO	LC
IOC-L 3548	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/281	RO	LC
IOC-L 3549	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/283	RO	LC
IOC-L 3562	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/308	RO	LC
IOC-L 3563	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/309	RO	LC
IOC-L 3564	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/310	RO	LC
IOC-L 3567	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/291	RO	LC
IOC-L 3568	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/297	RO	LC

IOC-L 3569	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/299	RO	LC
IOC-L 3570	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/303	RO	LC
IOC-L 3571	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2014/304	RO	LC
RO-L 412	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/412	RO	LC
RO-L391	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2015/391	RO	LC
RO-L285	<i>L.(V.) guyanensis</i>	MHOM/BR/2015/285	RO	LC
RO-L390	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/390	RO	LC
RO-L387	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/387	RO	LC
RO-L384	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/384	RO	LC
RO-L386	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/386	RO	LC
RO-L377	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/377	RO	LC
RO-L313	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/313	RO	LC
RO-L313	<i>L. (V.) braziliensis</i>	MHOM/BR/2015/314	RO	LC

CLIOC, Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz; UF, unidade federativa; AM, Amazonas; RO, Rondônia; LC, leishmaniose cutânea; LCM, leishmaniose cutâneo mucosa.

3.3 Obtenção e manutenção das culturas de *Leishmania*

As coletas para isolamento de *Leishmania* em cultura e de material para análise de RNA extraídos diretamente da lesão foram realizadas pelo Laboratório Epidemiologia Genética da Fiocruz/RO em parceria com o CEMETRON. As coletas de aspirado de lesão para isolamento de *Leishmania* em cultura foi realizada com seringa de volume total de 1 mL contendo solução fisiológica a 0,9%.

Os aspirados de lesão foram colocados em meio de cultura bifásico Neal, Novy, Nicolle-NNN ágar sangue com o meio líquido Schneider suplementado (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis – MO, EUA), seguido a padronização estabelecida pelo laboratório Epidemiologia Genética da Fiocruz/RO para crescimento dos parasitas em meio de cultura. Após o crescimento, as cepas foram armazenadas em criopreservação até o momento dos experimentos.

As coletas do material para análise de RNA de lesão foram realizadas com escovas cervicais estéreis colocadas diretamente em contato com as bordas das lesões conforme descrito por Cantanhêde e colaboradores (2015).

3.4 Obtenção do perfil de crescimento das espécies de *Leishmania* em cultura.

Para realização dos ensaios com expressão gênica em dois pontos no ciclo de vida de *Leishmania*, foi necessário obter o perfil de crescimento das espécies por meio da análise de uma curva de crescimento do parasita. Para observar esse perfil, foram utilizadas 2 cepas de *L. braziliensis* e 2 cepas de *L. guyanensis* em triplicata.

Após a retirada das cepas da criopreservação, essas foram colocadas em tubos tipo Falcon de 15 mL, contendo meio Schneider suplementado com 30% de soro fetal bovino inativado (SFB), 2% de urina humana filtrada e incubadas em estufas do tipo BOD (demanda bioquímica de oxigênio) durante quatro dias para adaptação. Após este período foram expandidas 1×10^6 de *Leishmania* para um novo tubo tipo Falcon de 15 mL com meio Schneider suplementado para um volume final de 5 mL e seu crescimento foi acompanhado diariamente. O meio de cultura utilizado continha estreptomicina em concentração de 50 mg/mL para inibição do crescimento de bactérias.

O perfil de crescimento foi obtido por meio da contagem de parasitas em câmara de Neubauer utilizando o corante eritrosina (0,01% em PBS) em intervalos de 24 horas num período de 8 dias. O número final de parasitas por mL no meio de cultura foi calculado com a seguinte fórmula: $n^\circ \text{ de parasitas/mL} = \text{média dos quadrantes} \times n^\circ \text{ da diluição} \times 10^4$ (fator de correção da câmara de Neubauer).

3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

A coleta de *Leishmania* para extração de RNA foi realizada nos quinto e sexto dias de crescimento para *L. braziliensis*, e no quarto e quinto dias para *L. guyanensis*, que correspondem as fases logarítmica tardia e estacionária determinadas para essas espécies após a avaliação das curvas de crescimento. A partir da contagem de parasitas realizadas em câmara Neubauer, foi obtido um número estimado de 1×10^6 parasitas e posteriormente suspenso em solução salina (PBS) para o volume final de 10 mL. O método de isolamento de RNA foi realizado utilizando o PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen®) de acordo com as instruções do fabricante.

Após a suspensão em PBS, a solução foi centrifugada a $2.000 \times g$ por 5 minutos à 4°C e então desprezado o sobrenadante. As células foram lisadas com tampão de lise contendo 1% de 2-mercaptoetanol. Em seguida, homogeneizadas com álcool 70% e filtradas em colunas de sílica através de centrifugação a $12.000 \times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente. Para o processo de lavagem foram utilizados tampões de lavagem fornecidos no kit de extração e posteriormente centrifugadas a $12.000 \times g$ por 30 segundos em temperatura ambiente. Em seguida foram realizadas duas eluições com $70 \mu\text{l}$ de água livre de RNAses adicionada no

centro da coluna e incubada em temperatura ambiente por 1 minuto, cada uma delas seguida de uma centrifugada 12.000 g x por 2 minutos em temperatura ambiente.

Após a extração, o RNA foi quantificado por meio da medida de absorbância e a pureza do RNA foi avaliada por espectrofotometria, ambos em um *NanoDrop* ND-2000 *Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*) (BEAUD et al., 2005).

O RNA extraído foi submetido à técnica de transcrição reversa (RT-PCR) utilizando a enzima SuperScript III (*Invitrogen*®) para obtenção do DNA complementar (cDNA), conforme a indicação do fabricante (Tabelas 3 e 4). Para síntese do cDNA foi utilizado oligo (DT) 18, um oligonucleotídeo que possui uma sequência alvo linear com 18 nucleotídeos de timidina que hibridiza simultaneamente com todos os RNAs mensageiros de eucariotos nas regiões da cauda poliadenosinas (cauda poli-A). Essas características proporcionam uma maior sensibilidade na reação e a utilização do mesmo cDNA para amplificação de todos os genes analisados.

Tabela 3. Reagentes utilizados para síntese de cDNA.

Componente	Concentração	Quantidade – volume final 20 µL
Primer Oligo (DT) 18 ²	0,5 µg/µL	1 µL
dNTP Mix ²	10mM (cada)	1 µL
RNA Total	150 ng	-----
Água DEPC (Kit) ²	q.s.p.	q.s.p.
Tampão RT ¹	10X	2 µL
SuperScript III™ ¹	200 U/ µL	1 µL
RNase OUT™ ²	40 U/ µL	0,5 µL
Água DEPC (Kit) ²	-----	6,5 µL

Fonte: Sigma-Aldrich® 1- Sigma, 2- Invitrogen

Tabela 4. Condições para síntese de cDNA.

Passos	Desnaturação	Pareamento	Síntese de cDNA	Desnaturação da enzima
Temperatura	70°C	23°C	37°C	94°C
Tempo	10 minutos	10 minutos	50 minutos	10 minutos
Volume			20 µL	

Fonte: Sigma-Aldrich®

3.6 PCR Quantitativo

A técnica PCR em tempo real (qPCR) tem sido empregada em diversos estudos de análises de expressão gênica. Possui alta sensibilidade e permite a quantificação de transcritos raros e pequenas mudanças na expressão gênica. Os métodos mais utilizados na quantificação de RNA por qPCR são: (i) quantificação absoluta, fornece o número de cópias do transcrito de interesse, a qual é obtida por meio de uma curva padrão e (ii) quantificação relativa, onde os níveis de expressão são mensurados por meio de gene alvo e gene controle, sendo que o controle deve apresentar níveis de expressão estáveis em diferentes análises (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; ANDERSEN; JENSEN; ØRNTOFT, 2004).

Neste estudo os resultados foram analisados com o método de quantificação relativa para avaliar a variação da expressão de quatro genes alvo utilizando dois genes controle. Os genes γ GCS, GSH2, ODC e TRYR (Tabela 5), que codificam proteínas com funções envolvidas no metabolismo de tiol e proliferação do parasita foram avaliados como genes alvos. Os genes ACTIN e S8 foram utilizados para normalização dos resultados, visto que esses são expressos constitutivamente em *Leishmania* (ADAUI et al., 2010). Os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas para garantir a reprodutibilidade dos ensaios.

Para obtenção de dados fiáveis oriundos da qPCR, faz se necessário o controle de alguns parâmetros. Foi determinado a concentração ideal dos oligonucleotídeos e a eficiência do cDNA. O gradiente de concentração testado foi de 100 η M, 200 η M, 300 η M, 400 η M, 500 η M, 600 η M e 700 η M de iniciadores senso e antisenso.

Tabela 5. Genes avaliados nos experimentos de expressão

Gene	Proteína	Sequência do oligonucleotídeo	Conc. final	Tamanho do fragmento	Tm
γGCS	Gama glutamincisteína sintetase	5' CTACGACTCTATCTCCATCTTCATCA 3'	200ηM	115	59.35
		5' CACACCAGCCTTCTCCAGC 3'			60.67
GSH2	Glutathiona sintetase	5' ACGAAGAGCGACGACCCA 3'	200ηM	158	60.98
		5' GTGACGCCGTAGATGCCA 3'			59.82
TRYR	Tripanotiona redutase	5' GAAAAGGATGGCGAGGTGC 3'	200ηM	76	59.20
		5' AGATGCCTACGCTCTGAATGAT 3'			59.37
ODC	Ornitina descarboxilase	5' CAGTCTGTCGTGCCGATGGA 3'	200ηM	121	62.21
		5' CGTTCAGCAGGAGAAGCGTC 3'			61.35
ACTIN^{1,2}	Actina	5' GGCGAACGAGGAGTCATTTG 3'	400ηM	99	59.28
		5' ATCAGCGACGGCTTGAACAG 3'			61.02
S8^{1,2}	Ribossomal 40S	5' CGACTTGGATGCGGGGA 3'	400ηM	111	59.01
		5' GGCGAAGCCTTGTTACAG 3'			59.44

¹Genes considerados constitutivos em *Leishmania*. Oligonucleotídeos desenhados por (ADAUI et al., 2011). Tm: Temperatura de *melting*. ²Oligonucleotídeos desenhados por (DECUYPERE, 2007).

A eficiência do cDNA foi obtida por meio de diluições seriadas em 5 pontos. 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 com todos os genes e calculada através do *slope* com a função logarítmica da curva de calibração, conforme descrito por Livak e Schmittgen (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para o teste de expressão gênica foi utilizado o detector SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Os iniciadores senso e antiseno dos genes estão especificados na Tabela 5. As triplicatas foram colocadas em tubos ópticos da MicroAmp® de 0.2 mL. Para controle da reação foi incluído um controle negativo sem amostra de cDNA por gene. Os experimentos foram realizados no equipamento 7500 *Fast Real-Time PCR System* conforme descrito nas Tabelas 6 e 7.

Para análise de expressão de RNA extraídos da lesão foram utilizados os mesmos genes descritos na Tabela 5, com o mesmo sistema de detecção, SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®). Os experimentos moleculares dessa análise estão contidos em um outro projeto do Laboratório Epidemiologia Genética/FIOCRUZ/RO, sendo utilizado neste estudo os dados para comparações entre as variáveis avaliadas, a expressão gênica de RNA extraído da lesão versus expressão gênica em cultura.

Tabela 6. Reagentes da qPCR.

Componente	Concentração	Quantidade
SYBR® Green	1x	12,5 µL
Oligonucleotídeos senso/antiseno	200ηM a 400 ηM*	0,50 µL a 1 µL*
cDNA	150 ηg de RNA total	2 µL
Água Mili-Q	q.s.p.	q.s.p.
Volume final	-----	25 µL

*Concentração e quantidade variáveis de acordo com o gene, ver na Tabela 5.

Tabela 7. Condições da qPCR

Passos	Ativação da enzima por aquecimento	Ciclos (40)	
		Desnaturação	Pareamento/extensão
Temperatura	95°C	95°C	60°C
Tempo	10 minutos	15 segundos	1 minuto

Fonte: Applied Biosystems®

3.7 Análises dos dados

A análise de dados oriundos de qPCR por quantificação relativa pode ser realizada de diversas formas, até o momento não há um consenso em relação a melhor a ser utilizada (BUSTIN et al., 2009). Neste estudo foi utilizado o método de Cq (ciclo de quantificação) comparativo. O Cq é definido pelo ponto onde o sinal da fluorescência atravessa um limiar. Os dados do Cq apresentam a fase exponencial da amplificação, sendo esse valor inversamente proporcional a quantidade de amplificação na reação. O método comparativo é dado pela equação $2^{-\Delta\Delta C_T} = [(Cq \text{ gene de interesse} - Cq \text{ do gene controle}) \text{ amostra A} - (Cq \text{ gene de interesse} - Cq \text{ do gene controle}) \text{ amostra B}]$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Após a obtenção dos dados de expressão de cada gene nas diferentes fases da curva de crescimento, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) dois fatores, que avalia se há diferença estatisticamente significativa entre as variáveis, fase de crescimento (estacionária e tardia), RNA extraído da lesão e espécie do parasita. Posteriormente foi aplicado o pós teste de *Tukey*, que realiza múltiplas comparações, indicando quais médias apresentaram diferenças significativas no teste de ANOVA. Essas análises foram realizadas com o programa *GraphPad Prism* v.6.0.

A análise da variação na expressão gênica entre as fases de crescimento e RNA extraídos da lesão foi realizada por meio dos valores de *fold-change* com quatro comparações diferentes: (i) fase logarítmica tardia *versus* estacionária, (ii) fase logarítmica tardia *versus* RNA extraído da lesão, (iii) fase estacionária *versus* RNA extraído da lesão e (iv) fase logarítmica tardia e estacionária *versus* RNA extraído da lesão. Para visualização dessas comparações foram produzidos gráficos do tipo *heatmap*, baseados em distância euclidiana e em agrupamento hierárquico, por meio da biblioteca *gplots*, utilizando a linguagem de

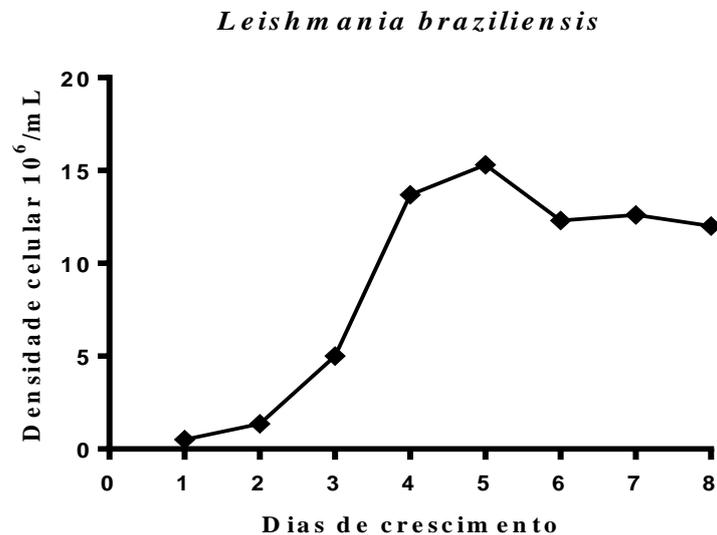
programação R, na versão 3.2.4, dentro do ambiente de desenvolvimento Rstudio na versão 0.98.50. Os valores de *fold-change* foram plotados de forma linear, com tons de verde ou vermelho atribuídos a cada valor, onde os genes subexpressos foram representados pelos tons de vermelho (valores negativos) e os genes superexpressos foram representados pelos tons verdes (valores positivos). O algoritmo agrupa na horizontal genes com perfis de expressão similares e na vertical o agrupamento entre as cepas de *Leishmania*.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de crescimento de *Leishmania*

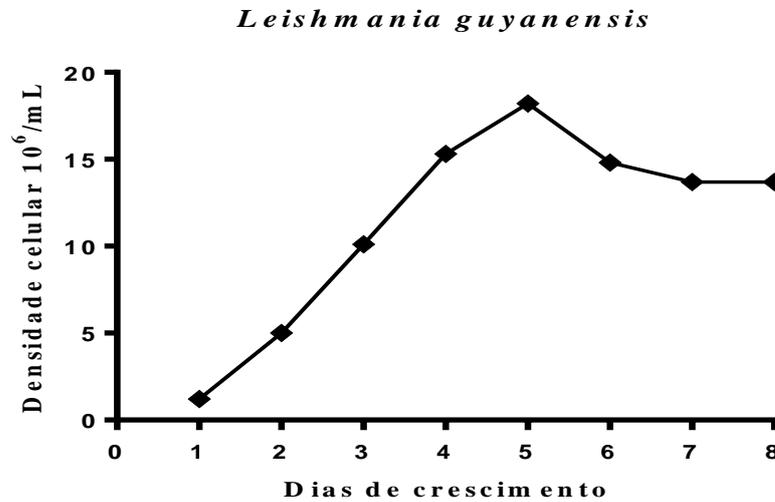
A curva de crescimento foi observada diariamente durante oito dias com contagens em câmara de Neubauer. A espécie *L. braziliensis* atingiu a fase logarítmica tardia no 5º dia de crescimento e a fase estacionária no 6º dia de crescimento (Figura 8). A espécie *L. guyanensis* atingiu a fase logarítmica tardia no 4º dia de crescimento e fase estacionária no 5º dia de crescimento (Figura 9).

Figura 8. Perfil de crescimento de *L. braziliensis*.



Os parasitas foram cultivados a 23°C em meio Schneider contendo 30% soro fetal bovino (SFB) e 2% de urina humana.

Figura 9. Perfil de crescimento de *L.guyanensis*.



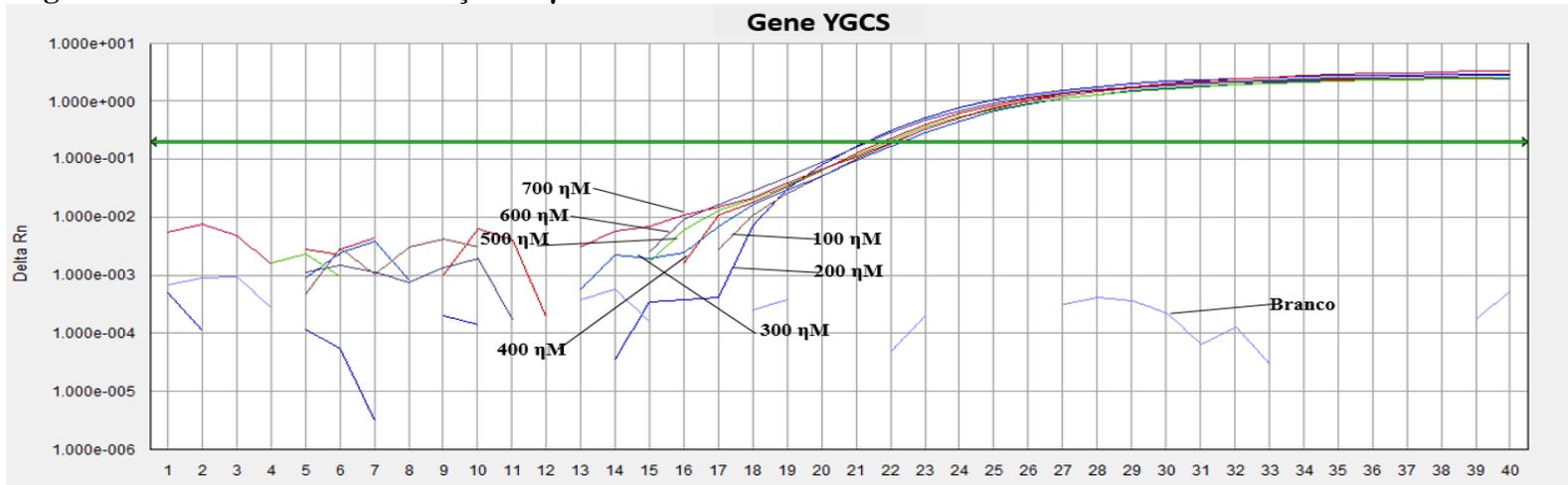
Os parasitas foram cultivados a 23°C em meio Schneider contendo 30% soro fetal bovino (SFB) e 2% de urina humana.

4.2 Padronização da qPCR.

4.2.1. Otimização da concentração de oligonucleotídeos.

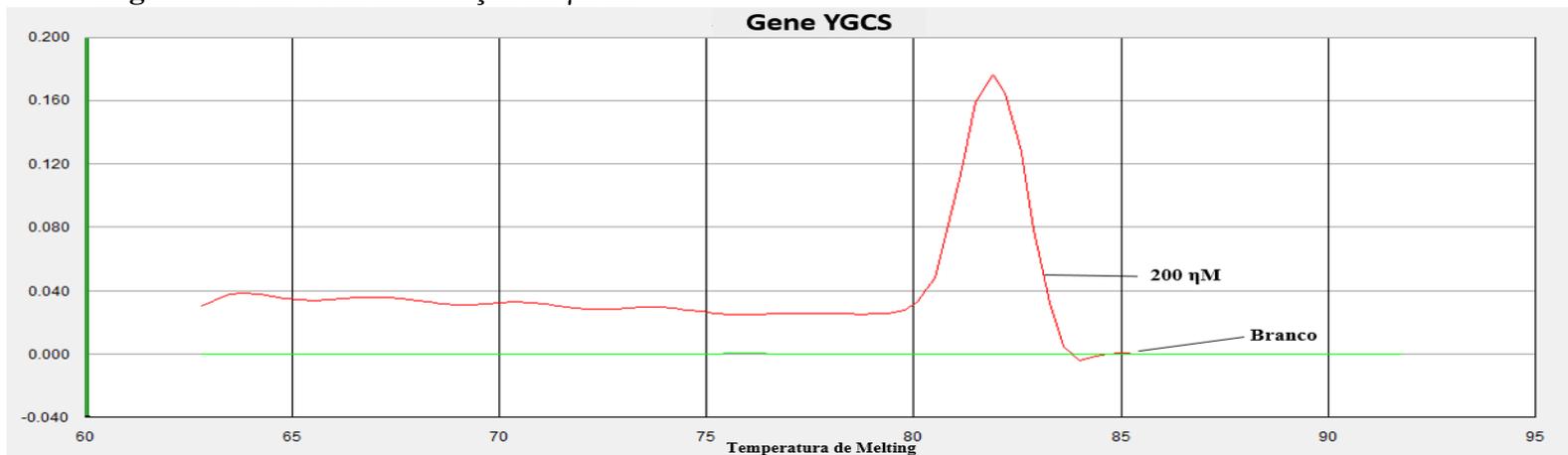
A avaliação para concentração ideal dos iniciadores foi realizada por meio de dados obtidos da qPCR, que avaliaram a amplificação e a curva de dissociação de cada gene em todas concentrações. As reações para os genes γ -GCS, TRYR, GSH2 e ODC apresentaram uma amplificação ideal na concentração de 200 η M e as reações para os genes ACTIN e S8 apresentaram uma amplificação ideal na concentração de 400 η M na PCR em tempo real (Figura 10 a 21).

Figura 10. Gradiente de concentração de γ GCS

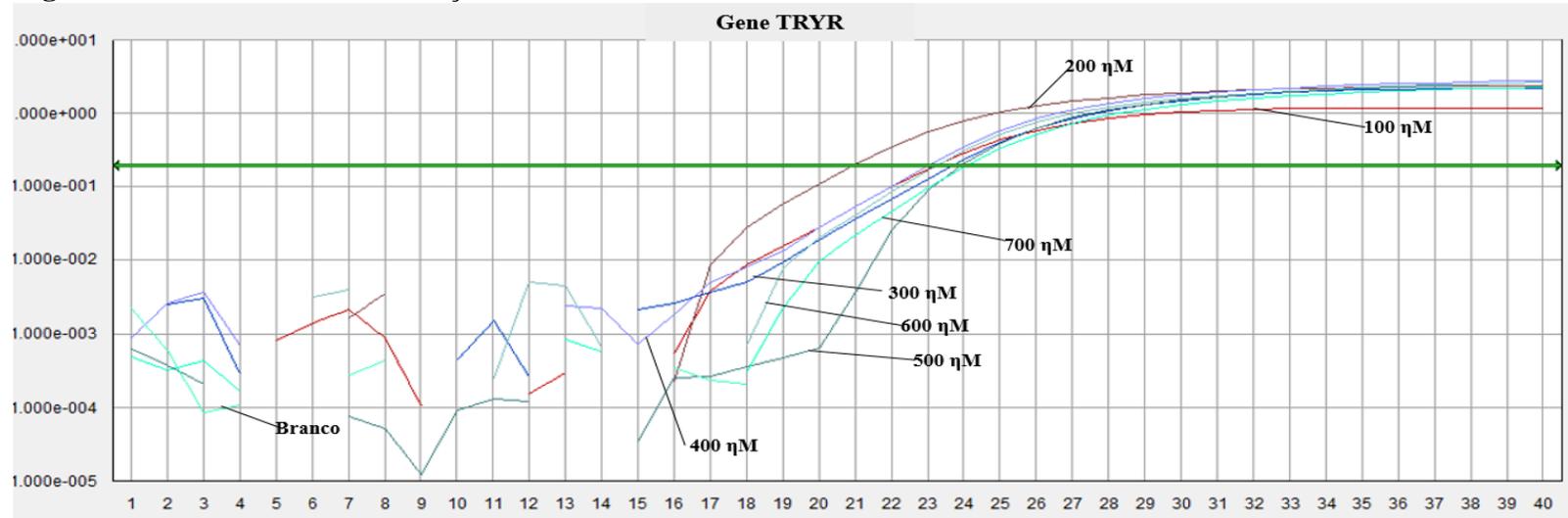


A figura representa o gradiente de concentração para o gene γ GCS. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 200 η M.

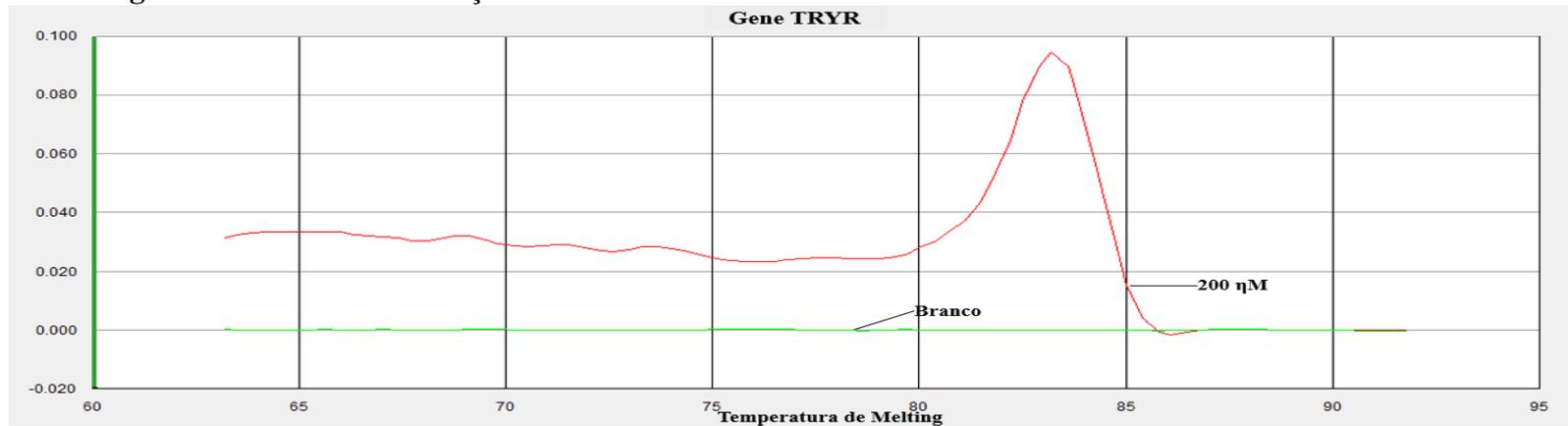
Figura 11. Curva de dissociação de γ GCS



A figura representa a curva de dissociação para o gene YGCS, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

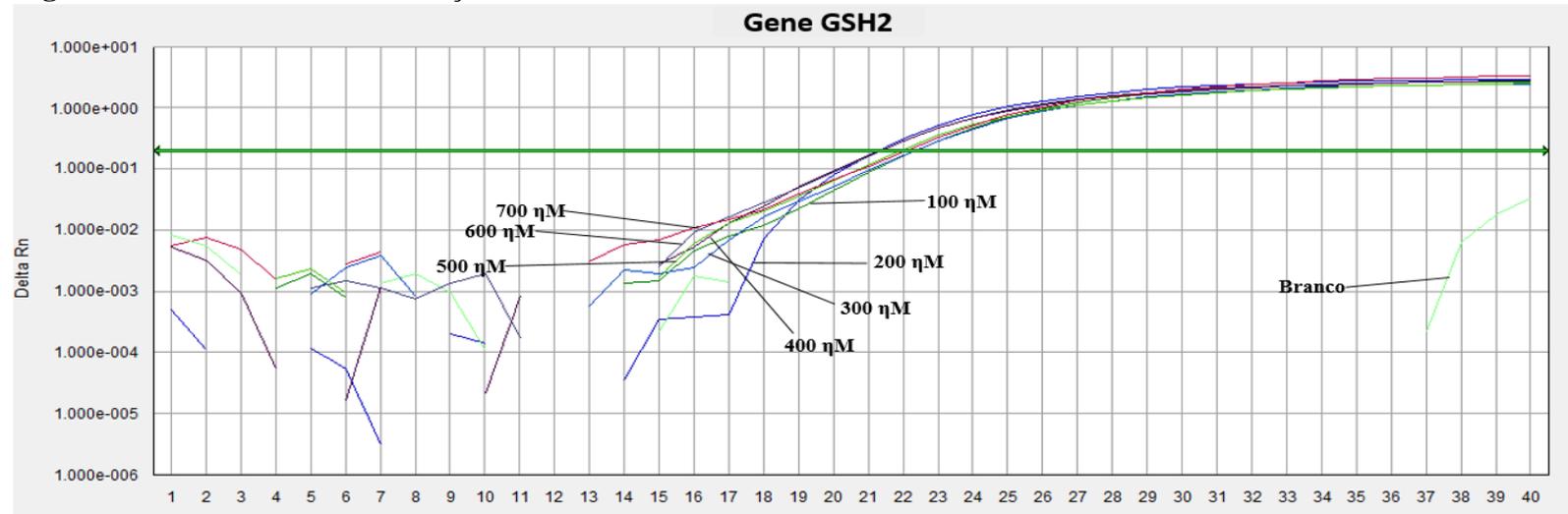
Figura 12. Gradiente de concentração de TRYR

A figura representa o gradiente de concentração para o gene TRYR. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e a abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 200 η M.

Figura 13. Curva de dissociação de TRYR

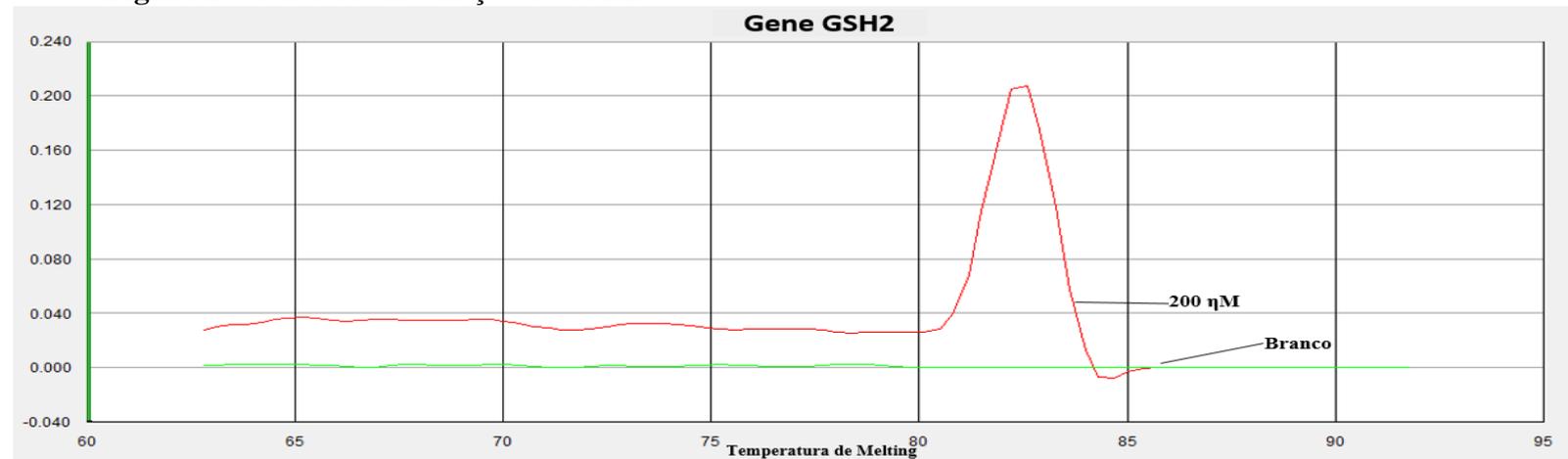
A figura representa a curva de dissociação para o gene TRYR, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

Figura 14. Gradiente de concentração de GSH2



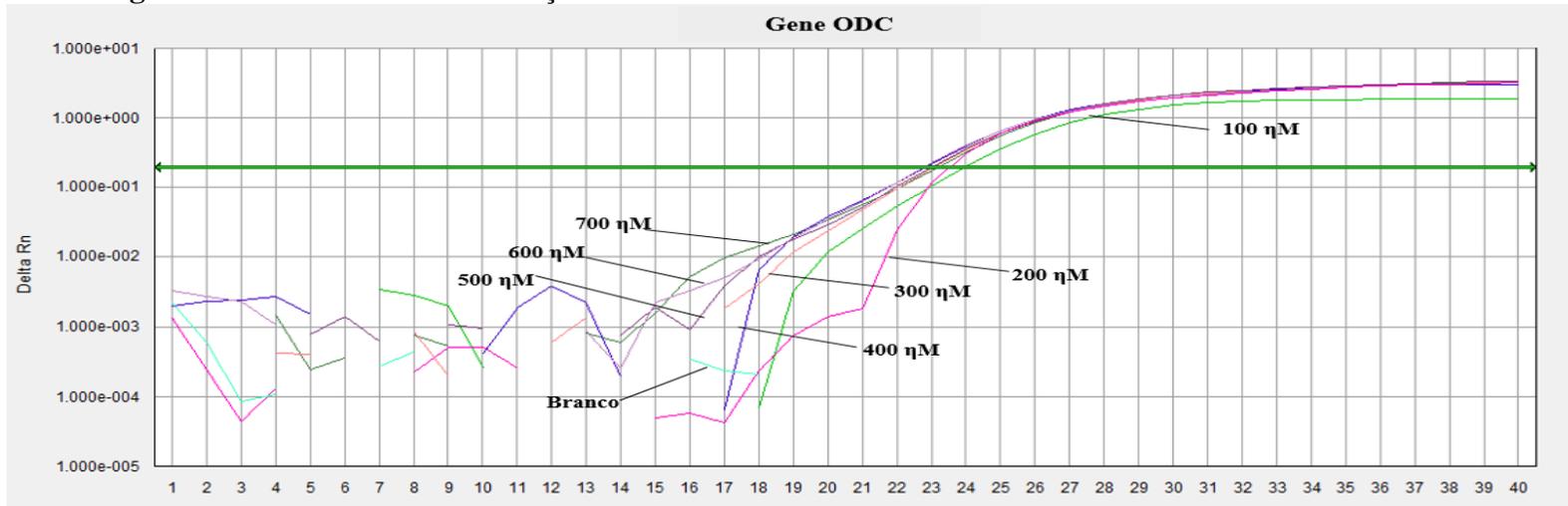
A figura representa o gradiente de concentração para o gene GSH2. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 200ηM.

Figura 15. Curva de dissociação de GSH2



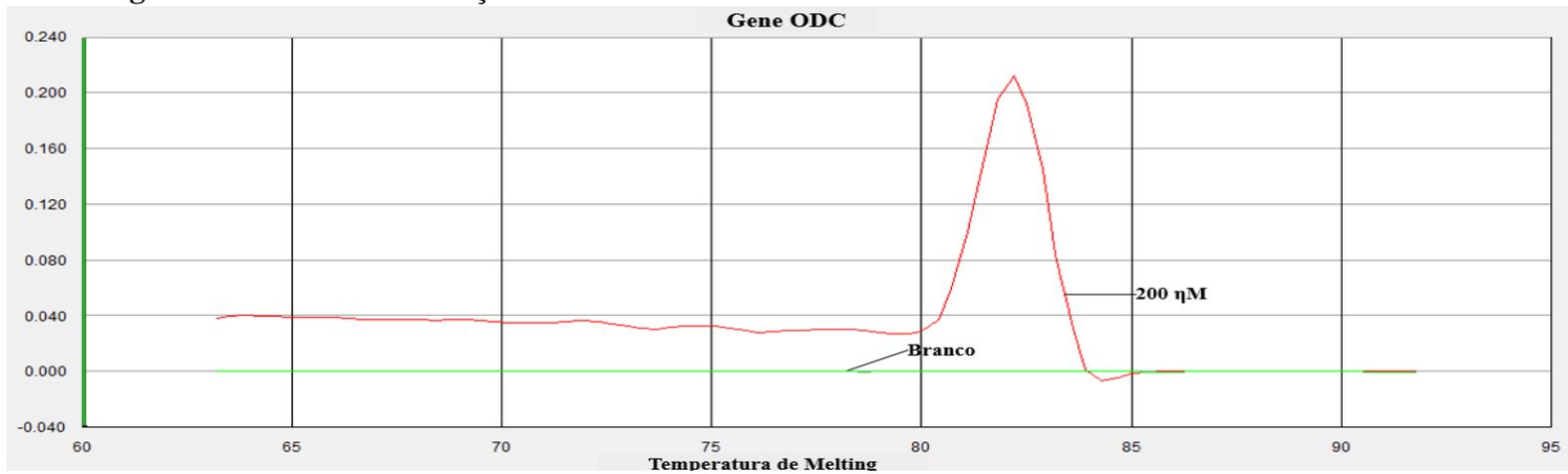
A figura representa curva de dissociação para o gene GSH2, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

Figura 16. Gradiente de concentração de ODC

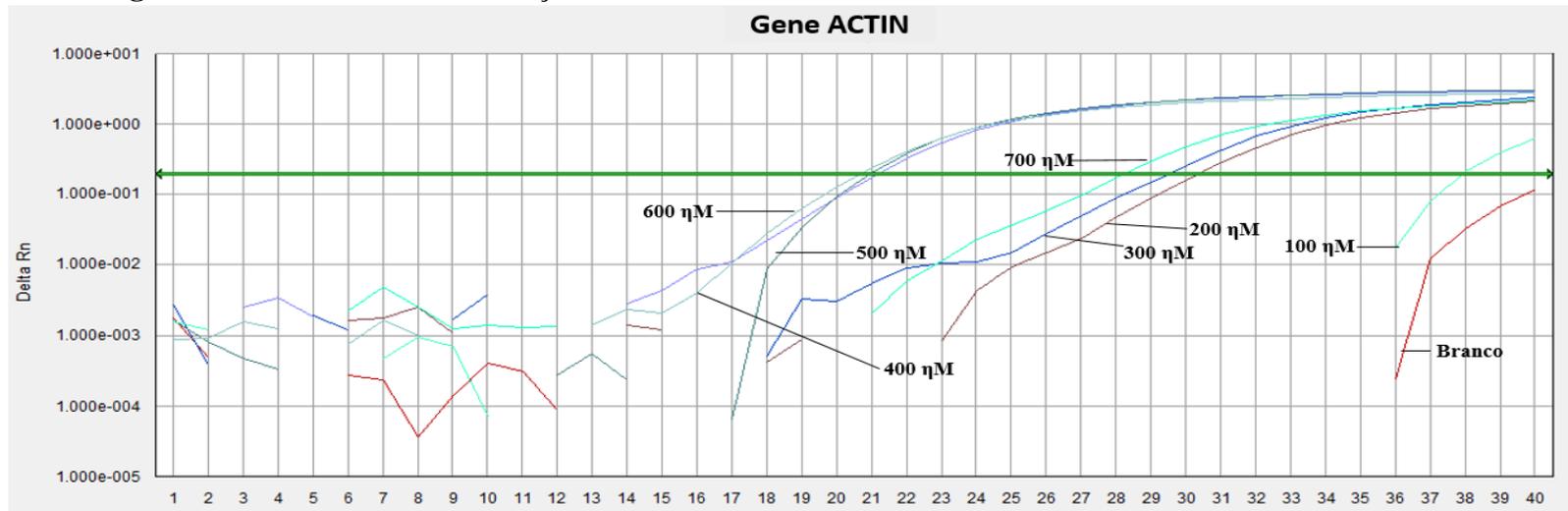


A figura representa o gradiente de concentração para o gene ODC. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 200ηM.

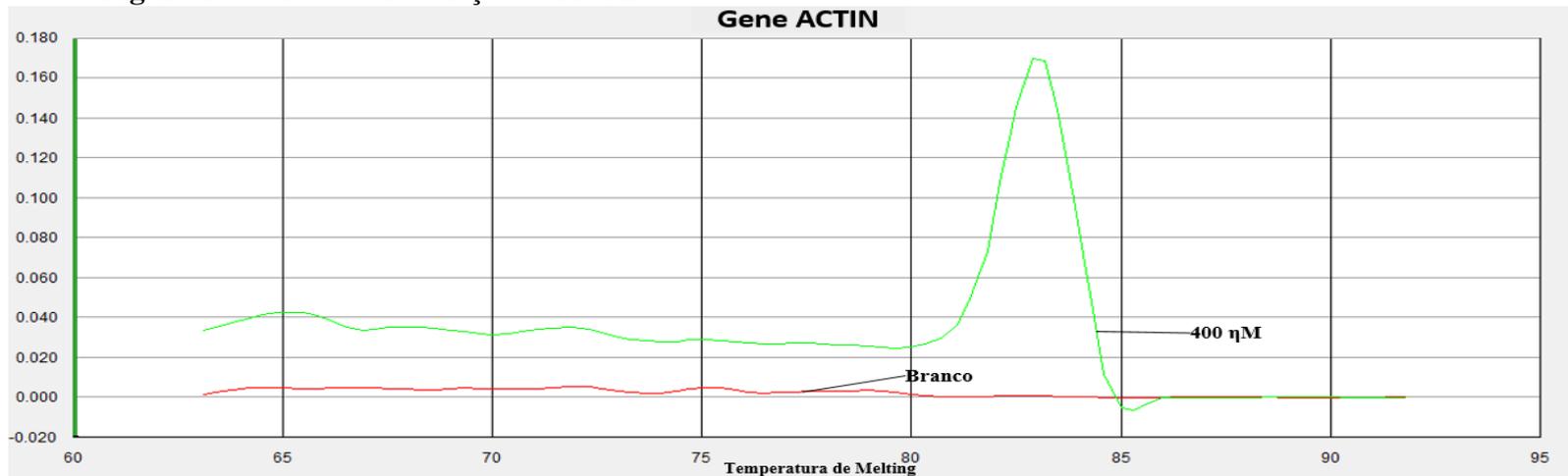
Figura 17. Curva de dissociação de ODC



A figura representa curva de dissociação para o gene ODC, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

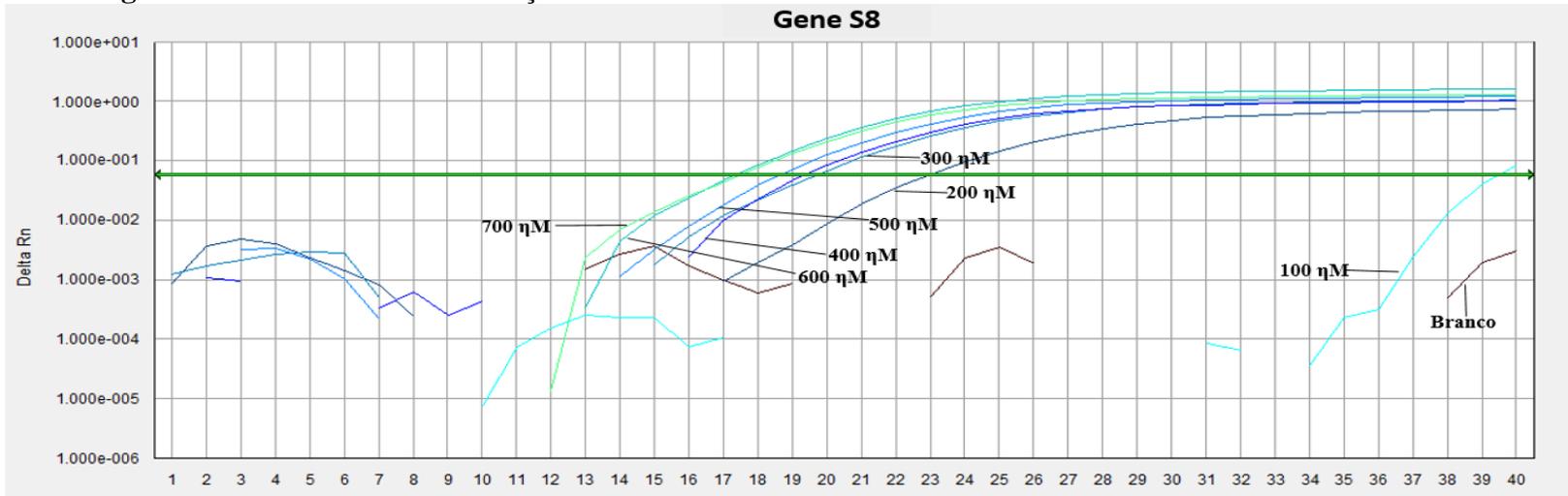
Figura 18. Gradiente de concentração de ACTIN

A figura representa o gradiente de concentração para o gene ACTIN. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 400ηM.

Figura 19. Curva de dissociação de ACTIN

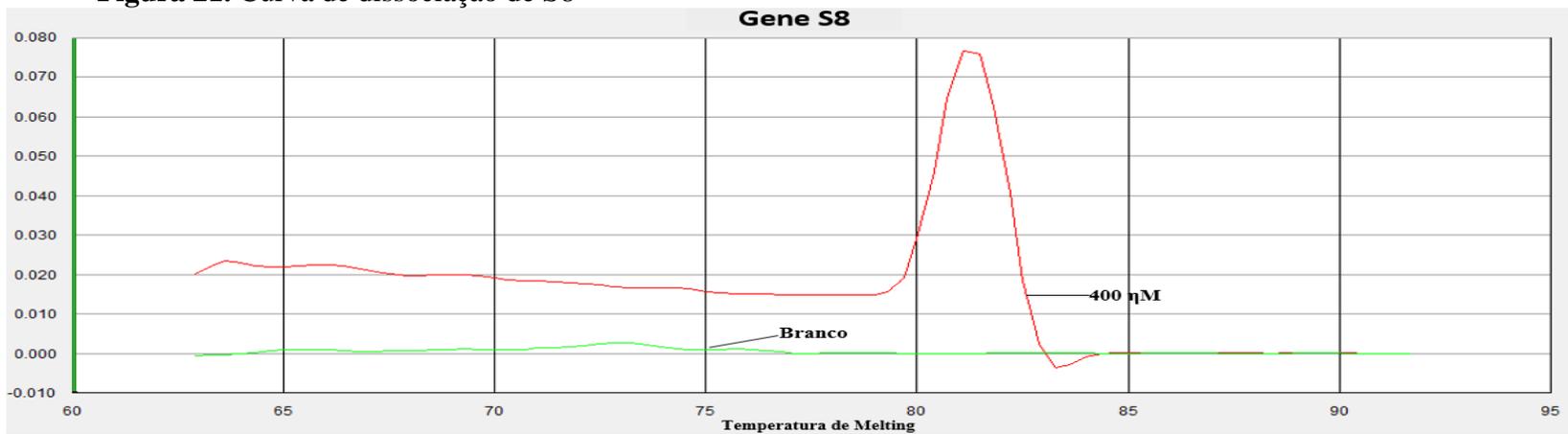
A figura representa curva de dissociação para o gene ACTIN, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

Figura 20. Gradiente de concentração de S8



A figura representa o gradiente de concentração para o gene S8. A linha verde representa o limiar de amplificação. A Ordenada representa a fluorescência dada por Delta Rn e abscissa representa os ciclos de amplificação. A concentração ideal definida para esse gene foi de 400ηM.

Figura 21. Curva de dissociação de S8

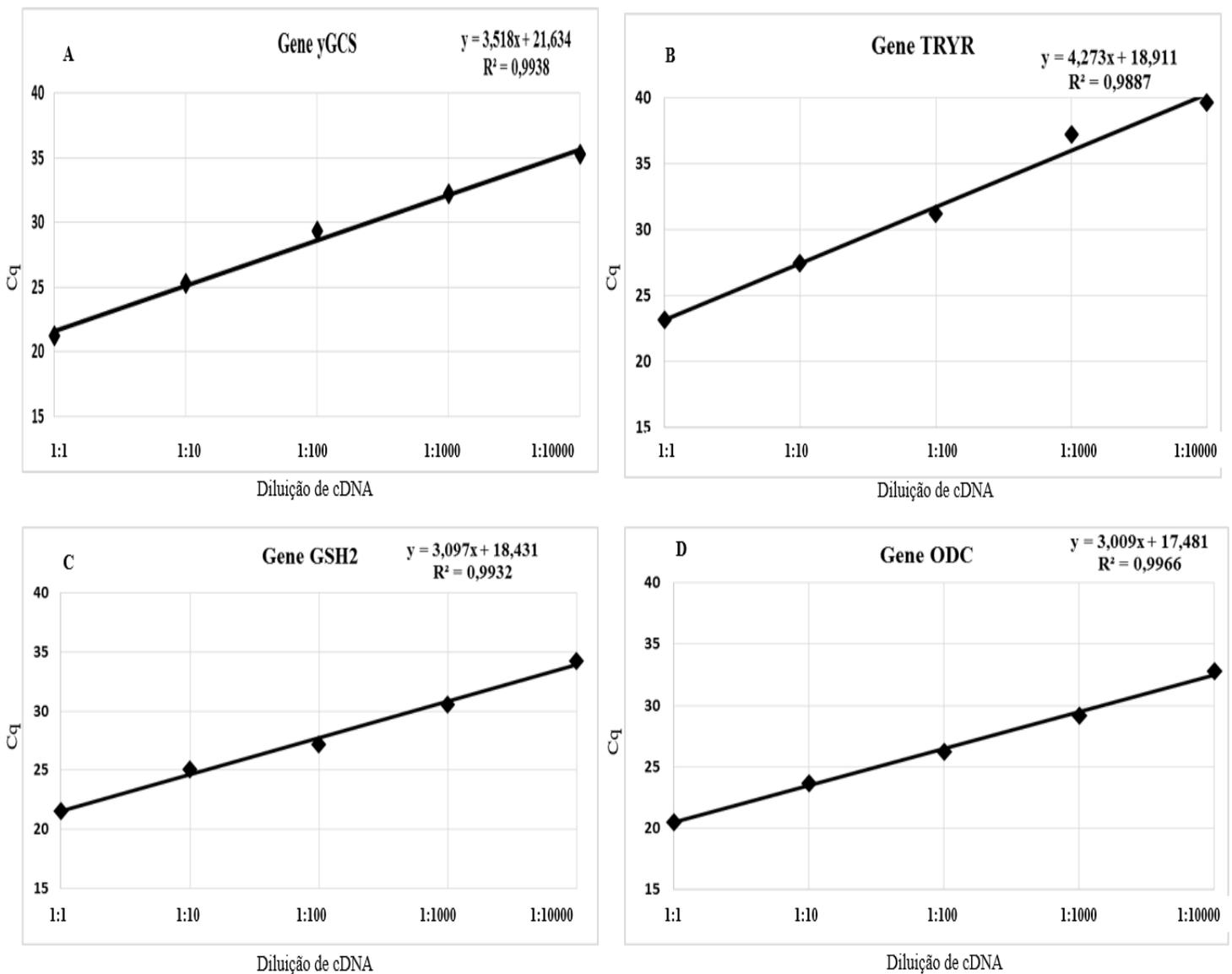


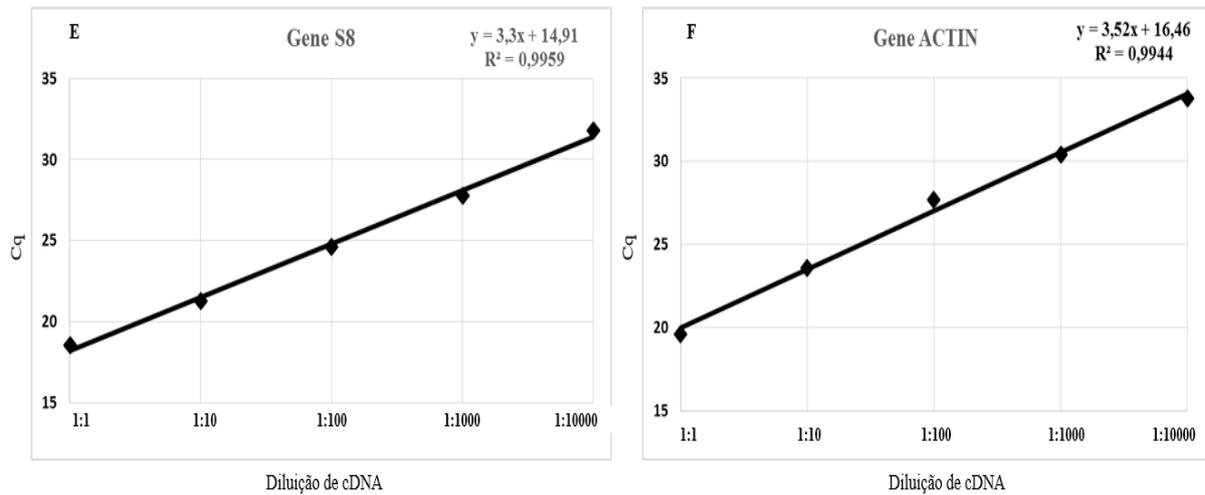
A figura representa curva de dissociação para o gene ACTIN, que apresenta uma temperatura de *melting* entre 80°C e 85°C, sugestiva de uma boa amplificação, sem formação de dímeros. A ordenada representa a derivada e a abscissa representa a temperatura de *melting*.

4.2.2. Eficiência de amplificação do cDNA.

A eficiência de amplificação do cDNA foi obtida por meio de diluições seriadas em 5 pontos, testada com todos os genes em estudo. Os valores obtidos expressam bons resultados na curva de calibração com uma eficiência próxima de 1 nos pontos analisados, considerando que 1 representa uma eficiência de 100%. Os valores de eficiência estão na Figura 22 representados por R^2 .

Figura 22. Eficiência de amplificação do cDNA.





A figura representa a curva de calibração com os genes. A ordenada apresenta os valores de Cq e abscissa apresenta as diluições de cDNA. A figura A representa curva de calibração para o gene γ GCS (A), TRYR (B), GSH2 (C), ODC (D), ACTIN (E) e S8 (F).

4.3 Perfil de variação da expressão gênica nos isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

A qPCR foi realizada com 22 cepas de *L. braziliensis* e 15 cepas de *L. guyanensis*, nas fases de crescimento logarítmica tardia e estacionária. Para avaliar a variação da expressão nessas cepas foi utilizada a metodologia do Cq comparativo, dada pela equação $\Delta C_T: Cq \text{ gene de interesse} - Cq \text{ do gene controle}$. Foram obtidos valores de Cq dos genes γ GCS, GSH2, TRYR e ODC, utilizando como controle os genes ACTIN e S8 (tabela 8). O gene ACTIN candidato a gene controle apresentou valores de Cq com uma variação significativa nas cepas. Portanto os cálculos para perfil de expressão neste trabalho foram realizados apenas com o gene S8 como controle.

Tabela 8. Valores de ΔCq médio com os genes controles.

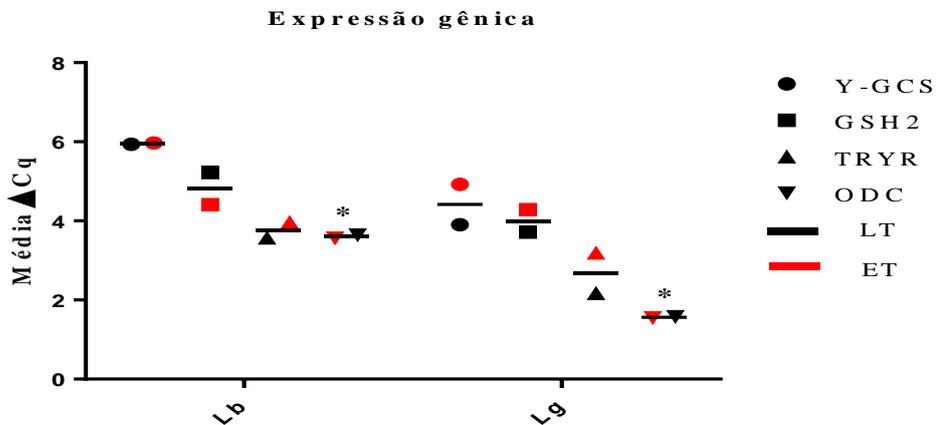
GENE	FASE	ESPÉCIE	N	ACTIN	S8
				ΔCq MÉDIO	ΔCq MÉDIO
γ GCS	LOG. TD	L.b.	22	3,00801409	5,937908029
		L.g.	15	2,510997778	3,902220222
	EST.	L.b.	22	3,702689079	5,968486061
		L.g.	15	3,580109089	4,925664667
GSH2	LOG. TD	L.b.	22	2,296586364	5,226480303
		L.g.	15	2,322555111	3,713777556
	EST.	L.b.	22	2,182485413	4,412988621
		L.g.	15	2,939553533	4,285109111
TRYR	LOG. TD	L.b.	22	0,763290152	3,571517424
		L.g.	15	0,780221778	2,171444222
	EST.	L.b.	22	1,807135413	3,965912106
		L.g.	15	1,8447802	3,190335778
ODC	LOG. TD	L.b.	22	0,637725455	3,640649697
		L.g.	15	0,187888667	1,579111111
	EST.	L.b.	22	1,304360794	3,563716485
		L.g.	15	0,201889333	1,547444911

A tabela apresenta os valores de ΔCq médio com os genes controles, ACTIN e S8. LOG. TD representa a fase logarítmica tardia, EST. a fase estacionária, L.b., *L. braziliensis*, L.g., *L. guyanensis* e N, o número de isolados analisados.

4.3.1 Expressão dos genes em *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Foi analisada o perfil de variação da expressão gênica nos 37 isolados, quanto as espécies de *Leishmania* e as fases de crescimento dado pelo valor de ΔCq . O valor de ΔCq é inversamente proporcional ao perfil de expressão. Neste estudo foi observado que o gene γ GCS apresentou o menor perfil de expressão entre os genes nas duas espécies de *Leishmania*. O gene ODC apresentou o maior perfil de expressão entre os genes nas duas espécies, no entanto houve diferença significativa entre as espécies ($p = 0,0003$). Entre as fases de crescimento não foi observada diferença estatística significativa no perfil de expressão. (Figura 23).

Figura 23. Expressão gênica em *L.braziliensis* e *L. guyanensis*.



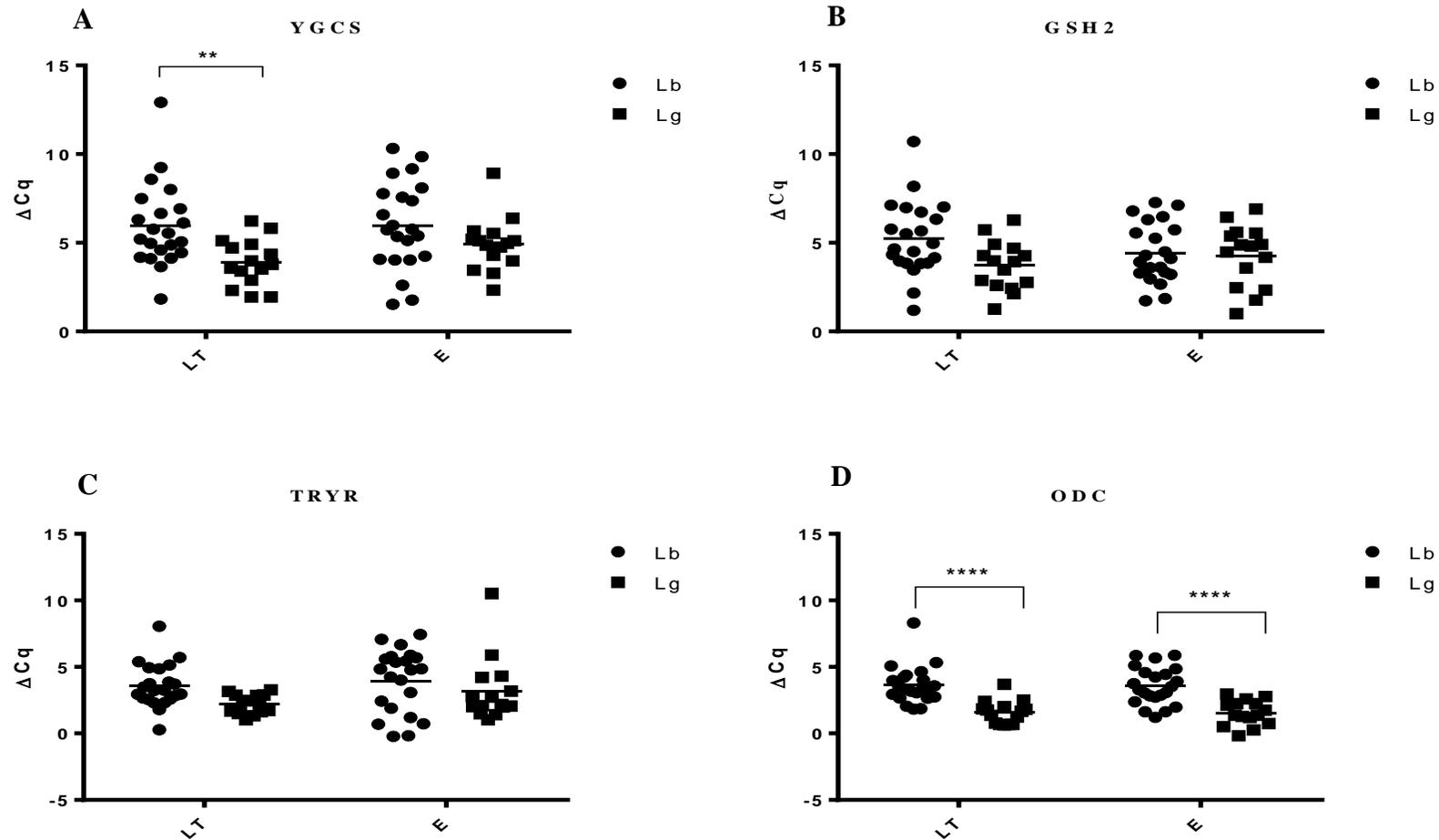
A figura representa o perfil de expressão dos genes γ GCS, GSH2, TRIR e ODC. A ordenada representa as espécies de *Leishmania*. Lb, *L. braziliensis* e Lg, *L. guyanensis*. A abscissa representa os valores médios de ΔCq apresentados nos genes. LT, representa a fase logarítmica tardia e ET, a fase estacionária* Valor significativo de $p < 0,05$.

4.3.2 Variação na expressão gênica entre as cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* e as fases de crescimento.

No gene γ GCS foi observada variação na expressão entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis* na fase logarítmica tardia com significância estatística ($p = 0,0025$). Os genes GSH2 e TRYR não apresentaram diferença estatística significativa entre as espécies de *Leishmania* em nenhuma das duas fases. O gene ODC apresentou diferença significativa entre as espécies de *Leishmania* tanto na fase logarítmica tardia quanto na fase estacionária, respectivamente para ambas ($p \leq 0,0001$).

Entre as fases de crescimento, logarítmica tardia *versus* estacionária intra espécie, não foi observada diferença estatística significativa na expressão gênica (Figura 24).

Figura 24. Variação da expressão gênica entre as espécies de *Leishmania* estudadas e as fases de crescimento.



Os gráficos representam a variação de expressão dos genes nas fases de crescimento em 22 cepas de *L. braziliensis* e 15 cepas de *L. guyanensis*. Figura A representa o gene γ GCS, figura B, o gene GSH2, figura C, o gene TRYR e figura D, o gene ODC. A ordenada representa os valores de ΔCq e a abscissa as fases de crescimento. LT representa a fase logarítmica tardia e E, a fase estacionária. Lb representa *Leishmania braziliensis* e Lg, *Leishmania guyanensis*. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

4.3.3. Variação na expressão gênica entre as fases de crescimento e em RNA extraído de lesão nas cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

Foi analisada a variação na expressão dos genes γ GCS, TRYR, GSH2 e ODC em 22 cepas de *L. braziliensis* e 4 cepas de *L. guyanensis* de modo a comparar entre as fases de crescimento logarítmica tardia e estacionária (forma promastigota) com a expressão gênica em RNA extraído da lesão (forma amastigota). Para esta análise foram utilizados os valores de Δ Cq apresentados pelos genes.

Os genes γ GCS e ODC apresentaram variação na expressão com diferença significativa quando comparado o perfil de expressão em cultura com o RNA extraído da lesão, tanto entre a fase logarítmica tardia quanto entre a estacionária de *L. braziliensis* (respectivamente: $p < 0,0001$ - Figura 25A; e $p = 0.1280$ (Figura 25D). Os genes TRYR e GSH2 não apresentaram variação significativa na expressão entre as variáveis analisadas (Figuras 25B e C). Em *L. guyanensis* não foi observada diferença significativa na expressão de nenhum dos genes avaliados entre cultura e lesão.

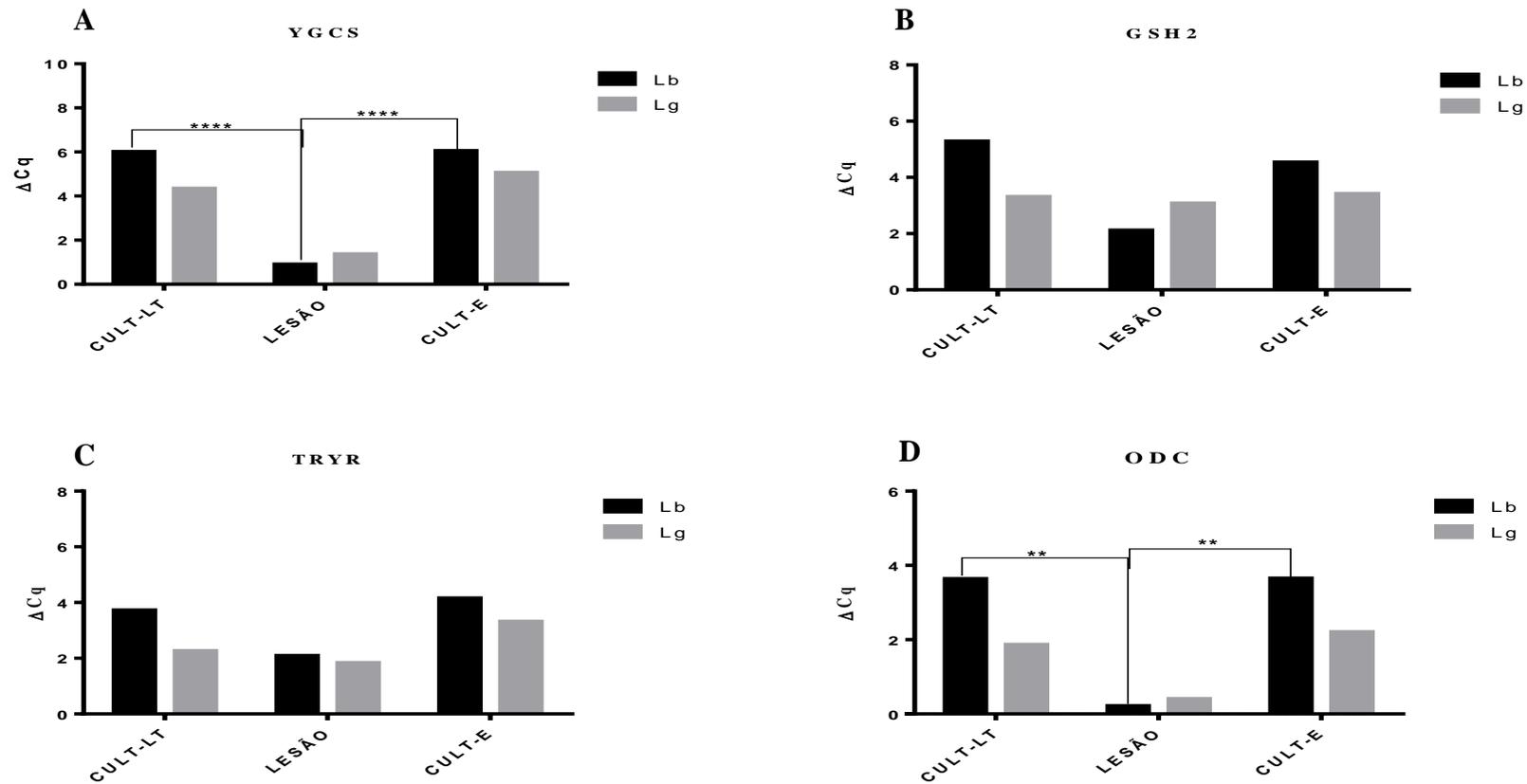
4.3.4. Análise de agrupamentos do perfil de expressão gênica em cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*

A análise de agrupamento do perfil de expressão gênica foi realizada com as seguintes comparações: (i) fases de crescimento, logarítmica tardia *versus* estacionária (Figura 26A), (ii) RNA extraído da lesão *versus* cultura, fase logarítmica tardia (Figura 26B), (iii) RNA extraído da lesão *versus* cultura, fase estacionária (Figura 26C) e (iv) RNA extraído da lesão *versus* cultura, fases logarítmica tardia e estacionária (Figura 26D). Para essa análise foram utilizados os valores de *fold change*.

Os resultados dessa análise demonstram que houve formação de agrupamentos, mas os grupos gerados estão relacionados com a variação da expressão entre as cepas de *Leishmania* e não com as espécies do parasita. Essa variação formou dois grupos: um com tons verdes para a maioria dos genes/cepa e que representam superexpressão, outro em tons vermelhos que apresentam subexpressão. Na análise de agrupamento entre os genes em todas as variáveis foi observado que há uma relação aparente entre os níveis de expressão apresentados nos mesmos. Na comparação simultaneamente entre as fases de crescimento e o RNA extraído da lesão foi observado que a variação entre as fases de crescimento é baixa, sendo

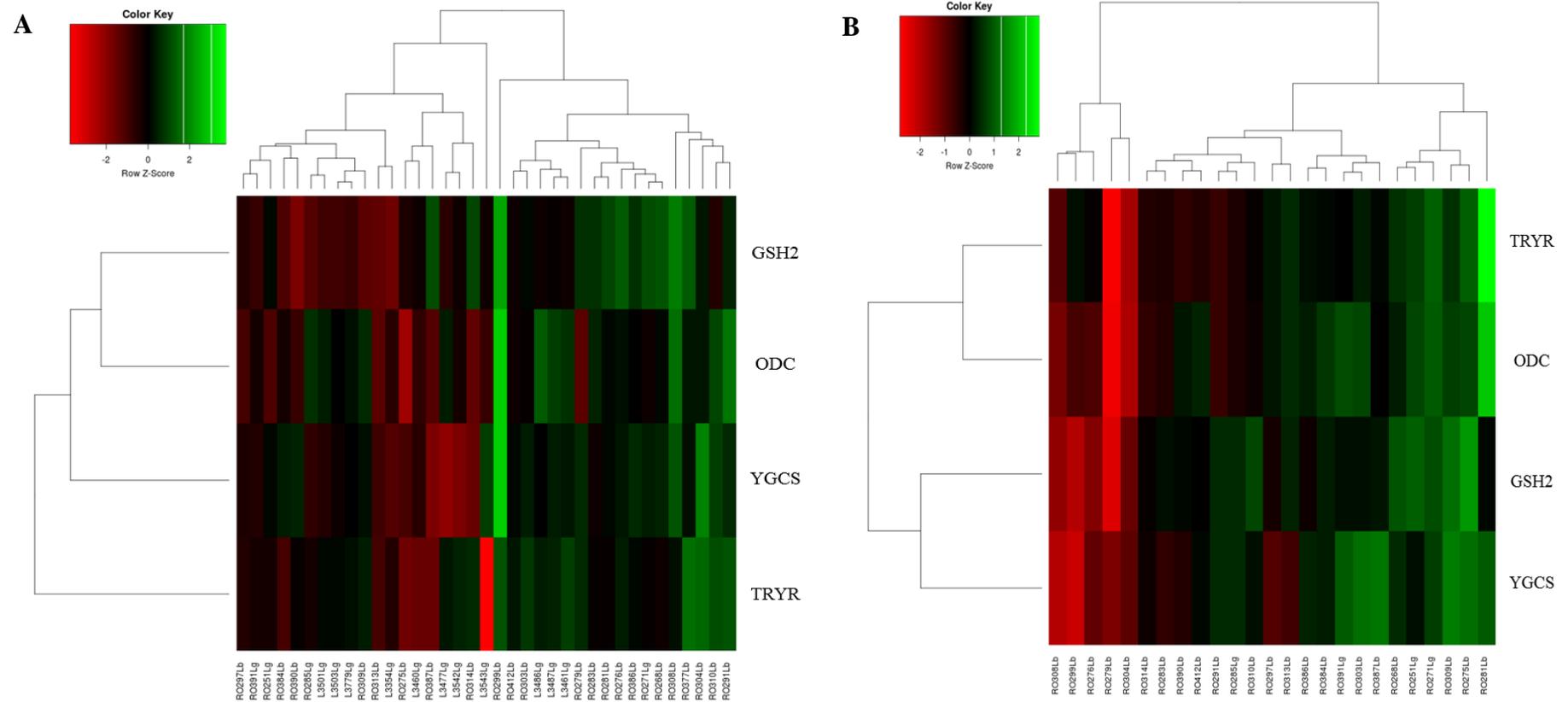
que essas apresentaram variações similares em todos os genes analisados (Figura 26D). Essa comparação corrobora a ANOVA com os resultados de expressão avaliados, dado que não foram observadas variações significativas entre as fases de crescimento.

Figura 25. Variação na expressão gênica entre as fases de crescimento e em RNA extraído de lesão nas cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.

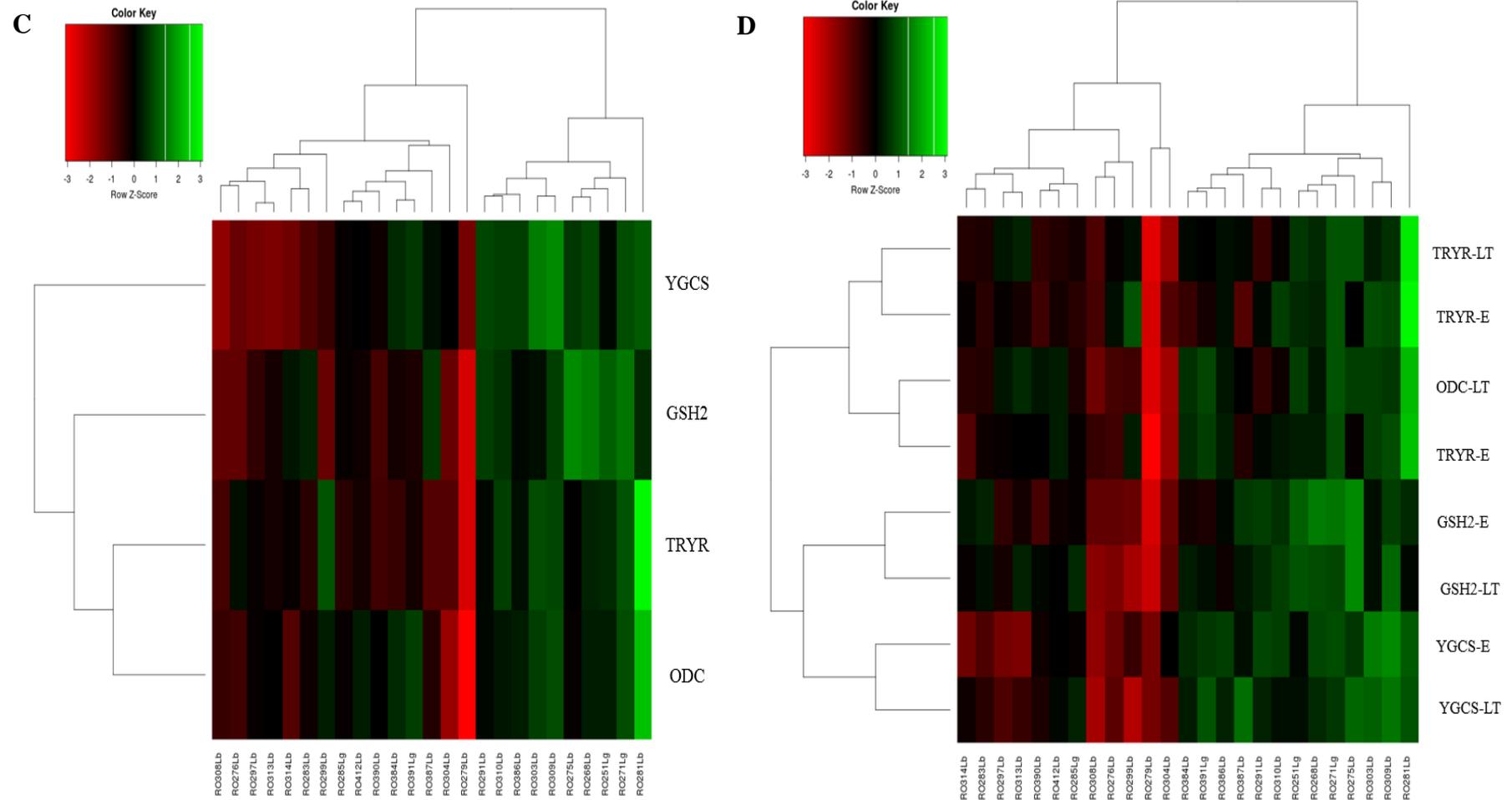


As figuras representam a variação de expressão gênica em cultura, nas duas fases de crescimento, comparadas com RNA extraído da lesão em 22 cepas de *L. braziliensis* e 4 de *L. guyanensis*. A representa o gene γ GCS, B, o gene GSH2, C, o gene TRYR e D, o gene ODC. A ordenada representa os valores de ΔCq e a abscissa representa as fases de crescimento em cultura e o RNA extraído da lesão. CULT-LT representa o perfil de expressão em cultura na fase logarítmica tardia, lesão representa o perfil de expressão em RNA extraído da lesão e CULT-E, o perfil de expressão em cultura na fase estacionária. Lb representa *Leishmania braziliensis* e Lg, *Leishmania guyanensis*. * Diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 26. Análise de agrupamentos do perfil de expressão gênica em cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*.



Agrupamentos em formato heatmap utilizando os valores de fold change baseado em perfil de expressão similares em 22 cepas de *L. braziliensis* e 4 de *L. guyanensis*. O eixo horizontal representa os agrupamentos entre os genes e a vertical entre as cepas de *Leishmania*. Quanto mais verde, maior é o perfil de expressão, quanto mais, vermelho menor é a expressão. Figura A representa as comparações entre as fases de crescimento logarítmica tardia versus estacionária e figura B representa as comparações entre cultura na fase logarítmica tardia versus RNA extraído da lesão.



Agrupamentos em formato *heatmap* utilizando os valores de *fold change* baseado em perfil de expressão similares em 22 cepas de *L. braziliensis* e 4 de *L. guyanensis*. O eixo horizontal representa os agrupamentos entre os genes e a vertical entre as cepas de *Leishmania*. Quanto mais verde, maior é o perfil de expressão, quanto mais, vermelho menor é a expressão. Figura C representa as comparações entre cultura na fase estacionária versus RNA extraído da lesão e figura D comparações entre as fases de crescimento, logarítmica tardia e estacionária versus RNA extraído da lesão. LT representa a fase logarítmica tardia e E, fase estacionária.

5 DISCUSSÃO

As leishmanioses são doenças caracterizadas por uma variedade de espectros clínicos, atingem principalmente países subdesenvolvidos, consideradas negligenciadas, com elevado número de infectados anualmente no mundo (WHO, 2015). A ausência de uma vacina como prevenção da patologia aumenta a necessidade da utilização de drogas efetivas no tratamento, principalmente devido os problemas que podem surgir oriundos de resistência ao tratamento (BACON et al., 2013). A eficiência do tratamento depende de vários fatores, entre eles, a resposta imunológica do hospedeiro, a farmacocinética da droga e fatores inerentes ao parasita (KAUR; RAJPUT, 2014). Os antimoniais pentavalentes, droga de primeira escolha, utilizada no tratamento das leishmanioses, possuem um elevado número de casos relatados com resistência (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Uma melhor compreensão dos eventos moleculares e biológicos de *Leishmania* spp. pode fornecer informações importantes no mecanismo de resistência, assim como, evidenciar possíveis alvos moleculares para novas terapias (MONTE-NETO et al., 2011).

A utilização de genes controle nas análises de expressão relativa é essencial para a normalização dos dados e os critérios de escolha desse gene podem determinar a confiabilidade dos resultados (BUSTIN et al., 2009). O gene ACTIN vem sendo proposto com gene controle em diferentes organismos (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), entretanto, algumas análises vem demonstrando variações nos seus níveis de expressão (ADAUI et al., 2011). As análises de expressão desse gene no presente estudo mostraram padrões semelhantes aos dos genes alvos o que corrobora a existência de variação já descrita anteriormente (ADAUI et al., 2011) e reforçam a importância da escolha do gene controle na interpretação dos resultados.

O gene γ GCS apresentou a menor expressão entre as cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no conjunto de genes analisados. O perfil expresso desse gene pode refletir nos níveis de tripanotona, um tiol responsável pela detoxificação celular (GRONDIN et al., 1997). Em alguns estudos foi observado que esse gene pode sofrer variação na expressão de acordo com o perfil de sensibilidade das cepas. Torres e colaboradores em 2010, em contraste com o presente estudo, observou uma superexpressão do γ GCS em cepas de *L. guyanensis* com falha terapêutica e em *L. braziliensis* observou que o mesmo apresentou expressão estável em cepas isoladas de pacientes com cura clínica e falha terapêutica. A contradição

observada entre esses estudos pode estar relacionada a diversos fatores não esclarecidos, dentre eles ao perfil clínico dos pacientes quanto a cura ou falha clínica. Dessa forma, os resultados apresentados reforçam a importância da avaliação do perfil clínico dos pacientes para comparações mais conclusivas.

O gene ODC apresentou a maior expressão entre os genes nos isolados de *L. braziliensis* e *L. guyanensis*. Em estudos com cepas de *L. donovani*, a superexpressão em ODC foi correlacionada com elevados níveis de tiol apresentados no parasita e por conseguinte com cepas resistentes. Embora esse gene tenha apresentado expressão elevada em cepas sensíveis ao SbV, as cepas resistentes apresentaram níveis significativamente ainda mais elevados de expressão (RAI et al., 2013). Aduí e colaboradores (2010) observaram a superexpressão de ODC em cepas de *L. braziliensis* resistentes ao SbV, mas, apesar de ter sido o gene mais expresso nas análises deste estudo, não foi possível avaliar características do tratamento e desfecho clínico dos pacientes de origem das cepas. Além disso, são necessários testes de sensibilidade aos antimoniais *in vitro* ou quantificação dos níveis de tiol produzidos pelas cepas analisadas para correlações mais conclusivas.

Assim como observado por Torres e colaboradores (2010) que comparou o perfil de expressão no gene TRYR em cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* oriundas de pacientes com falha e cura clínica, esse gene não apresentou variação significativa no perfil de expressão entre as cepas analisadas neste estudo. Aduí e colaboradores em 2011, observaram também que esse gene apresentou expressão estável em 4 cepas das 5 analisadas no ciclo de vida de *L. braziliensis*. No entanto, em um estudo anterior com cepas de *L. braziliensis*, Aduí e colaboradores (2010) observaram que o TRYR apresentou variação na expressão com superexpressão em percentuais mais elevados quando oriundas de pacientes com falha terapêutica. Os dados de Torres e colaboradores (2010) e Aduí e colaboradores (2011) condizem com os resultados encontrados nesse estudo e divergem dos dados de Aduí e colaboradores (2010). Essa divergência na expressão do TRYR em *L. braziliensis*, pode estar relacionada a alta variabilidade genética observada entre cepas e subpopulações dessa espécie (CUPOLILLO et al., 2003; BOITÉ et al., 2012).

O gene GSH2 apresentou um perfil de expressão mais modulada, com a menor variação de expressão nas cepas entre os genes analisados. Aduí e colaboradores em 2010 e 2011 demonstraram em estudo com cepas de *Leishmania braziliensis* que GSH2 não

apresentou variação na expressão, expressando perfil de gene constitutivo, resultados esses que corrobora nossos achados.

O perfil de expressão gênica analisado em promastigotas (fase estacionária e logarítmica) *versus* amastigotas (RNA extraído da lesão) apresentou variações significativas nos genes γ GCS e ODC em *L. braziliensis*. Nos isolados de *L. guyanensis* não houve variações significativas nas comparações cultura/lesão ou promastigota/amastigota em nenhum dos genes analisados. Alcolea e colaboradores (2010) observaram em *L. infantum* que a forma amastigota expressa diferencialmente vários genes quando comparada com a fase logarítmica e estacionária de promastigotas. Aduai e colaboradores (2010; 2011) observaram que alguns genes de *L. braziliensis* envolvidos no metabolismo de tiol, transporte e redução da droga expressam diferencialmente entre promastigota e amastigota, sendo baixo expressos em amastigota. Os dados de Alcolea e colaboradores (2010) e Aduai e colaboradores (2010; 2011) são corroborado pelos resultados encontrados neste estudo, embora deva ser considerado que a expressão gênica em promastigotas foi realizada com parasitas em meio de cultura (como nos estudos anteriores) e a expressão gênica de amastigotas foi realizada a partir do RNA extraído da lesão. Esse tratamento diferenciado entre as amostras pode influenciar nessas variações apresentadas entre as formas de *L. braziliensis*.

As comparações entre promastigotas e amastigotas de *L. guyanensis* não apresentaram variações significativas em nenhuma das variáveis, o que pode ser explicado pelo reduzido número de amostras de lesão com essa espécie disponíveis para as análises.

O perfil de expressão gênica analisado entre *L. braziliensis* e *L. guyanensis* mostrou diferença significativa nos genes γ GCS e ODC. Essas espécies pertencem ao mesmo subgênero, no entanto possuem características distintas quanto a manifestação clínica (MATTA et al., 2009) como por exemplo o fato de infecções por *L. guyanensis* apresentarem menores taxas de cura clínica em relação às causadas por *L. braziliensis* (ROMERO et al., 2001). Torres e colaboradores (2010) comparou o perfil de expressão de genes envolvidos no metabolismo de tiol entre essas espécies e observou que apenas o gene γ GCS apresentou variação na expressão entre essas espécies. Os diferentes resultados para o gene ODC entre as espécies obtidos neste estudo e em Torres e colaboradores (2010) pode estar relacionada ao fato de que dentro de cada espécie foi observada variação entre cepas.

O estudo entre as fases de crescimento logarítmica tardia e estacionária não mostrou diferenças significativas nos perfis de expressão assim como observado por Torres e colaboradores (2010). Por outro lado, estudos realizados com expressão gênica em todo ciclo de vida do parasita mostraram diferenças significativas na expressão de genes envolvidos no metabolismo de tiol, redução e transporte da droga (DECUYPERE et al., 2008; ADAUI et al., 2011). O contraste observado nesses dados pode estar relacionado a elevada variação na expressão e ao baixo número de cepas utilizadas por Decuypere e colaboradores (2008) e Aduai e colaboradores (2011).

As análises apresentadas nos *heatmaps* demonstraram que não houve formação de agrupamentos por espécies, mas sim, de forma geral, relacionados a expressão gênica individual das cepas. Esses dados sugerem que exista uma variação significativa na expressão intra espécie, principalmente em *L. braziliensis*, descrita anteriormente como sendo uma espécie com alta variabilidade genética (CUPOLILLO et al., 2003; BOITÉ et al., 2012).

Os resultados apresentados aqui demonstraram que há uma variabilidade na expressão dos diferentes genes, mas que essa variação pode estar associada à variabilidade das cepas e de cada gene. Quando analisada a variação no conjunto de genes, foi observado que a mesma foi significativa nos mesmos genes para ambas formas do parasita (promastigota e amastigota) e para as espécies de *Leishmania*.

Assim, a avaliação da variação na expressão dos genes deste estudo mostrou diferenças significativas, quando comparadas inter e intra espécies de *Leishmania* para 2 genes e variações significativas no perfil de expressão entre as formas promastigotas e amastigotas.

6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Este estudo apresentou perfil de expressão dos genes γ -GCS, TRYR, ODC e GSH2, em dois pontos da curva de crescimento de cepas de *L. braziliensis* e *L. guyanensis* isoladas de pacientes com leishmaniose tegumentar da região norte do Brasil. O gene ODC foi mais expresso e o gene γ -GCS foi o menos expresso dentre os genes analisados nas cepas deste estudo. A variação observada entre as cepas de *Leishmania* sugere que poucos isolados não determinam um perfil de expressão gênica característico de uma espécie, portanto para estudos comparativos de expressão gênica entre espécies de *Leishmania* é necessário avaliar um número significativo de isolados.

Os resultados apresentados foram bem padronizados, de forma que podem ser úteis na comparação com novos isolados obtidos por outros pesquisadores, por exemplo, de isolados supostamente resistentes aos antimoniais utilizados no tratamento.

Concluimos a partir dos nossos resultados que o gene ACTIN não apresentou perfil de gene constitutivo, sugerimos para estudos posteriores com expressão gênica em *Leishmania* que o mesmo não seja avaliado como possível gene controle.

Considerando os resultados obtidos, avaliamos que pode ser promissora a continuidade dos estudos de expressão gênica, comparando as informações clínicas dos pacientes em relação a cura ou falha clínica, com o perfil de expressão gênica apresentado nas cepas.

REFERÊNCIAS

ADAUI, V.; CASTILLO, D.; ZIMIC, M.; GUTIERREZ, A.; DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; DE DONCKER, S.; SCHNORBUSCH, K.; MAES, I.; VAN DER AUWERA, G.; MAES, L.; LLANOS-CUENTAS, A.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. C. Comparative gene expression analysis throughout the life cycle of *Leishmania braziliensis*: Diversity of expression profiles among clinical isolates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 5, 2011.

ADAUI, V.; SCHNORBUSCH, K.; ZIMIC, M.; GUTIÉRREZ, A.; DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; LLANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; ARÉVALO, J.; DUJARDIN, J.-C. Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony. **Parasitology**, v. 138, n. 02, p. 183–193, 3 fev. 2010.

ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; GÓMEZ, M. J.; MORENO, I.; DOMÍNGUEZ, M.; PARRO, V.; LARRAGA, V. Transcriptomics throughout the life cycle of *Leishmania infantum*: High down-regulation rate in the amastigote stage. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 13, p. 1497–1516, dez. 2010.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, L. J.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization , Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets Normalization of Real-Time Quantitative Reverse. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.

BACON, K. M.; HOTEZ, P. J.; KRUCHTEN, S. D.; KAMHAWI, S.; BOTTAZZI, M. E.; VALENZUELA, J. G.; LEE, B. Y. The potential economic value of a cutaneous leishmaniasis vaccine in seven endemic countries in the Americas. **Vaccine**, v. 31, n. 3, p. 480–486, 2013.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR., G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R. B.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON JR., W. D.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO, J. A.; ALMEIDA, R. B.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536, 1991.

BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of

American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 1, p. 51–6, 1991.

BOITÉ, M. C.; MAURICIO, I. L.; MILES, M. A.; CUPOLILLO, E. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania* (Viannia) Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1888, 1 nov. 2012.

BRASIL. MANUAL DE VIGILÂNCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA. **MINISTÉRIO DA SAÚDE**, v. 2º ED., 2013.

BRASIL. SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. **Disponível em <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>**. Acesso em 20/11/2015, 2015.

BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CANTACESSI, C.; DANTAS-TORRES, F.; NOLAN, M. J.; OTRANTO, D. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 3, p. 100–108, 2015.

CANTANHÊDE, L. M.; SILVA JÚNIOR, C. F.; ITO, M. M.; FELIPIN, K. P.; NICOLETE, R.; SALCEDO, J. M. V.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, R. G. M. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004079, 2015.

COLER, R. N.; GOTO, Y.; BOGATZKI, L.; RAMAN, V.; REED, S. G. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral Leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. **Infection and immunity**, v. 75, n. 9, p. 4648–54, set. 2007.

COSTA, J. M. L.; SALDANHA, A. C. R.; NASCIENTO, D.; SAMPAIO, G.; CARNEIRO, F.; LISBOA, E.; SILVA, L. M.; BARRAL, A. MODALIDADES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO E ABORDAGEM TERAPÊUTICA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR NO BRASIL. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 70–83, 2009.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L. R.; TOALDO, C. B.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; BRITO, M.

E. F.; FALQUETO, A.; FARIAS NAIFF, M.; GRIMALDI, G. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3126–32, 2003.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, G.; MOMEN, H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 50, n. 3, p. 296–311, mar. 1994.

DANTAS, M. L.; MENEZES, J.; CABRAL, G.; CARVALHO, L.; PASSOS, S. T.; QUEIROZ, A.; GUIMARÃES, L. H.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.; ARRUDA, S. Comparative analysis of the tissue inflammatory response in human cutaneous and disseminated leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. April, p. 202–209, 2014.

DECUYPERE, S. Antimonial treatment failure in anthroponotic visceral leishmaniasis: towards improved tools and strategies for epidemiological surveillance and disease control. **PhD. thesis. University of Antwerp, Antwerp, Belgium.**, v. The, 2007.

DECUYPERE, S.; RIJAL, S.; YARDLEY, V.; DONCKER, S.; LAURENT, T.; KHANAL, B.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J. C. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4616, 2005.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; RIJAL, S.; YARDLEY, V.; MAES, L.; DONCKER, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.-C. Gene expression profiling of *Leishmania (Leishmania) donovani*: overcoming technical variation and exploiting biological variation. **Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 183–194, 2008.

DEPLEDGE, D. P.; EVANS, K. J.; IVENS, A. C.; AZIZ, N.; MAROOF, A.; KAYE, P. M.; SMITH, D. F. Comparative expression profiling of *Leishmania*: modulation in gene expression between species and in different host genetic backgrounds. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 7, p. e476, 2009.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 276, 2012.

DOWNING, T.; IMAMURA, H.; DECUYPERE, S.; CLARK, T. G.; COOMBS, G. H.; COTTON, J. A.; HILLEY, J. D.; DE DONCKER, S.; MAES, I.; MOTTRAM, J. C.; QUAIL, M. A.; RIJAL, S.; SANDERS, M.; SCHONIAN, G.; STARK, O.; SUNDAR, S.; VANAERSCHOT, M.; HERTZ-FOWLER, C.; DUJARDIN, J.-C.; BERRIMAN, M. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2143–2156, 1 dez. 2011.

EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual review of microbiology**, v. 46, p. 695–729, 1992.

GAUDENZI, J. G.; NOÉ, G.; CAMPO, V. A.; FRASCH, A. C.; CASSOLA, A. Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays in biochemistry**, v. 51, p. 31–46, 2011.

GILROY, C.; OLENYIK, T.; ROBERTS, S. C.; ULLMAN, B. Spermidine synthase is required for virulence of *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2764–2769, 2011.

GOMES, C. .; PAULA, N. A.; MORAIS, O. O.; SOARES, K. A.; ROSELINO, A. M.; SAMPAIO, R. N. R. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–9, 2014.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B.; MCMAHON-PRATT, D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, n. 6, p. 687–725, 1989.

GRIMALDI, J. G.; DAVID, J.; MCMAHON-PRATT, D. A. Identificação e distribuição das espécies de *Leishmania* Novo Mundo caracterizados por análise serodema utilizando anticorpos monoclonais. **J Trop Med Hyg**, v. 36, p. 270–287, 1987.

GRONDIN, K.; HAIMEUR, A.; MUKHOPADHYAY, R.; ROSEN, B. P.; OUELLETTE, M. Co-amplification of the γ -glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. **EMBO Journal**, v. 16, n. 11, p. 3057–3065, 1997.

GUERRA, J. .; PRESTES, S. R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L. I. A. R. C.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M. G. V.; LIMA FERREIRA, L. C. Mucosal leishmaniasis caused by *leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. 1–5, 2011.

HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental Stages of Trypanosomatid Flagellates: a New Terminology. **Nature**, v. 212, n. 5068, p. 1385–1386, 1966.

IMBEAUD, S.; GRAUDENS, E.; BOULANGER, V.; BARLET, X.; ZABORSKI, P.; EVENO, E.; MUELLER, O.; SCHROEDER, A.; AUFRAY, C. Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 6, p. e56, 2005.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M. R.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 2005.

KAUR, G.; RAJPUT, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in *Leishmania*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. 3, p. e13, 2014.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. **Academic Press**, p. 12–120, 1987.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MARTINS, A. L. G. P.; BARRETO, J. A.; LAURIS, J. R. P.; MARTINS, A. C. G. P. American tegumentary leishmaniasis: Correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 52–58, 2014.

MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detecção de DNA de *Leishmania braziliensis* em pacientes de leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 3, p. 571–574, 2010.

MATTA, N. E.; NOGUEIRA, R. S.; FRANCO, A. M. R.; SOUZA E SOUZA, I.; MATTOS, M. S.; OLIVEIRA-NETO, M. P.; COUTINHO, S. G.; LEON, L. L.; DA-CRUZ, A. M. *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* induces low immunologic responsiveness in leishmaniasis patients from an endemic area of the Brazilian Amazon Highland. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 80, n. 3, p. 339–44, 2009.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. S. Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. **Frontiers in Immunology**, v. 6, 2015.

MENEZES, J. P. B.; GUEDES, C. E. S.; PETERSEN, A. L. O. A.; FRAGA, D. B. M.; VERAS, P. S. T. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: past, present and future. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p. S58–S61, nov. 2010. D

MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 5, p. e1167, 2011.

MÜLLER, N.; HENTRICH, B.; FREY, C. F.; WELLE, M. Quantitative PCR for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from formalin-fixed and paraffin-embedded skin sections. **Molecular and Cellular Probes**, 2015.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, out. 2005.

PAHO. Epidemiological Report of the Americas - Leishmaniasis. **PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO/WHO** <http://new.paho.org/leishmaniasis>, 2015.

PAIVA-CAVALCANTI, M.; MORAIS, R. C. S.; PESSOA-E-SILVA, R.; TRAJANO-SILVA, L. A. M.; GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. C.; TAVARES, D. H. C.; BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A.; SILVA, R. F.; PEREIRA, V. R. A. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 31, 2015.

QUEIROZ, A.; SOUSA, R.; HEINE, C.; CARDOSO, M.; GUIMARÃES, L.; MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, E. M.; RILEY, L. W.; WILSON, M. E.; SCHRIEFER, A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 4028–4034, 2012.

RAI, S.; BHASKAR; GOEL, S. K.; NATH DWIVEDI, U.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74862, 2013.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S.; WASHINGTON, G.; LEOPOLD, P.; BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.

RIOUX, J. A.; LANOTTE, G.; SERRES, E.; PRATLONG, F.; BASTIEN, P.; PERIERES, J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Annales de parasitologie humaine et comparée**, v. 65, n. 3, p. 111–25, 1990.

ROGERS, M. B.; HILLEY, J. D.; DICKENS, N. J.; WILKES, J.; BATES, P. A.; DEPLEDGE, D. P.; HARRIS, D.; HER, Y.; HERZYK, P.; IMAMURA, H.; OTTO, T. D.; SANDERS, M.; SEEGER, K.; DUJARDIN, J.-C.; BERRIMAN, M.; SMITH, D. F.; HERTZFOWLER, C.; MOTTRAM, J. C. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Research**, v. 21, n. 12, p. 2129–2142, 1 dez. 2011.

ROJAS, R.; VALDERRAMA, L.; VALDERRAMA, M.; VARONA, M. X.; OUELLETTE, M.; SARAVIA, N. G. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 10, p. 1375–83, 15 maio 2006.

ROMERO, G. A.; GUERRA, M. V.; PAES, M. G.; MACÊDO, V. O. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–65, nov. 2001.

SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JUNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2012, p. 898419, 2012.

SHOWLER, A. J.; BOGGILD, A. K. Cutaneous Leishmaniasis in Travellers: a Focus on Epidemiology and Treatment in 2015. **Current Infectious Disease Reports**, v. 17, n. 7, p. 489, 2015.

SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. A.; DORTA, M. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. In Vitro Metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed research international**, v. 2015, p. 393049, 2015.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. *braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 239, 2004.

SILVEIRA, F. T.; MÜLLER, S. R.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, 2008.

SINGH, N.; CHATTERJEE, M.; SUNDAR, S. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 596, 2014.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C. S.; CRUZ, A. . Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 11, p. 1173–86, 2007.

SUNDAR, S.; MORE, D. K.; SINGH, M. K.; SINGH, V. . P.; SHARMA, S.; MAKHARIA, A.; KUMAR, P. C.; MURRAY, H. . W. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 1104–7, out. 2000.

TELES, C. B. G.; MEDEIROS, J. F.; SANTOS, A. P. A.; FREITAS, L. A. R.; KATSURAGAWA, T. H.; CANTANHÊDE, L. M.; FERREIRA, R. G. M.; CAMARGO, L. M. A. Molecular characterization of american cutaneous leishmaniasis in the border area of Assis Brasil, Acre state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 343–347, 2015.

TORRES, D. C.; ADAUI, V.; RIBEIRO-ALVES, M.; ROMERO, G. A. S.; ARÉVALO, J.; CUPOLILLO, E.; DUJARDIN, J.-C. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 6, p. 727–733, ago. 2010.

VAN NIEUWENHOVE, S.; SCHECHTER, P. J.; DECLERCQ, J.; BONÉ, G.; BURKE, J.; SJOERDSMA, A. Treatment of gambiense sleeping sickness in the Sudan with oral DFMO

(DL-alpha-difluoromethylornithine), an inhibitor of ornithine decarboxylase; first field trial. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 692–8, 1985.

VANAERSCHOT, M.; F, D.; ROY, S.; PONTE-SUCRE, A.; AREVALO, J.; DUJARDIN, J. c. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, p. 937–946, 2014.

VERGEL, C.; PALACIOS, R.; CADENA, H.; POSSO, C. J.; VALDERRAMA, L.; PEREZ, M.; WALKER, J.; TRAVI, B. L.; SARAVIA, N. G. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 4, p. 503–511, 2006.

WHO. -World Health Organization. Programmes and projects/ Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acessado em: 20/11/2015, 2015.

ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA PARA APROVAÇÃO DO PROJETO

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical
Comitê de Ética em Pesquisa

REF.: Parecer 33/11 CEP/CEPEM
CAAE: 0020.0.046.000-11

Porto Velho, 15 de Dezembro de 2011.

Ilmo. Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira
FIOCRUZ Noroeste

Sr. Pesquisador, em sua Décima reunião realizada no dia **15 de Dezembro de 2011**, a Comissão de Ética do Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM, atendendo sua solicitação, analisou as alterações no projeto sob sua responsabilidade intitulado: "**Verificação da presença de leishmaníavirus em amostras de pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa atendidos no Centro de Medicina Tropical - CEMETRON**". Informo que, após análise e discussão a Comissão de Ética considerou **APROVADO**, o citado projeto.

De acordo com o item VII.13.d, da resolução CNS nº 196/96, V.S.ª, deve encaminhar a nossa secretaria relatório parcial ou final do referido projeto até o dia 15 de Dezembro de 2012 e enquanto durar a pesquisa.

Atenciosamente,


Flávia Saurano Batista
Vice - Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa

Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEP
Aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP
Av. Guaporé, 215 - Lagos Telefone: 3219-6012 / 32165442
Porto Velho - RO

