

Universidade de Brasília

Faculdade de Medicina

Pós-Graduação em Ciências Médicas

Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



Detecção de DNA de *Leishmania* spp. no sangue e em espermatozoides de indivíduos residentes na região Amazônica

Aluna: Tamires Emanuele Vital

Orientadora: Prof. Dr^a. Nadjar Nitz

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Mariana Hecht

Brasília – DF

2014

Tamires Emanuele Vital

Detecção de DNA de *Leishmania* spp. no sangue e em esperma de indivíduos residentes na região Amazônica

Dissertação apresentada ao Programa de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Brasília – DF

2014

O presente trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília.

Financiamento: FAPDF / CNPq / CAPES

DEDICATÓRIA

“É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada, mas graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara.

À minha amada mãe Marlei.

Minha avó Maria Antônia (*in memoriam*).

Aos meus padrinhos Benedito e Girlei.

À minha querida Tia Sirléia.

A Danillo Silva, grande incentivador.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro e maior agradecimento é sempre a Deus e a nossa mãe Maria Santíssima. Nada teria sido realizado se não pela graça e bondade de Deus.

À minha orientadora Nadjar Nitz, sempre acolhedora, agradeço pelo aprendizado imensurável, a confiança e o apoio que nunca faltou. Seu amor à profissão, à pesquisa e seu profissionalismo muito me inspira.

À minha co-orientadora Mariana Hecht, sempre prestativa e paciente, disposta em ajudar com meus experimentos, avaliando meus resultados e me ensinando a perseverar. A vocês, Nad e Mari, minha gratidão, admiração e respeito!

Ao professor Antônio Teixeira, pela oportunidade de participar de um laboratório de pesquisa como o LMPDC, me possibilitando crescer profissionalmente.

Aos amigos adquiridos no LMPDC. Aos meus estagiários Guilherme Diniz, Bruna Carvalho, Emanuel Bezerra e Luísa Rodrigues, vocês foram verdadeiramente companheiros nos experimentos, dificuldades e risadas. Meu agradecimento por todo o auxílio! Às queridas Maria Carolina Diniz e Perla Araújo, pelo acolhimento e grande incentivo para realização do mestrado. Às queridas Marcelle Ribeiro, Camilla Sant'ana e Aline Moraes, como é bom sermos amigas! Companheirismo resume a nossa convivência. Ester Rose, Manuela Britto, Thaís Minuzzi, Luciana Hagström, Ana Luísa Marques, Adriano Rios, Herick Müller, Eliete Ferreira, Adriana Benevides, Cássia Rosa, Rafael Andrade, Alessandro Oliveira, Carlos Fernando Pimentel e Gabriela Lustosa, obrigada por todos os ensinamentos e palavras de carinho dedicadas diariamente em nossa convivência. Manatealoucas, meus dias com vocês são muito mais felizes!

Agradeço aos professores e amigos Edejan Heise e Daniella Alves, vocês são grandes exemplos e incentivadores desde a graduação para o despertar científico da Biomedicina.

À minha amada família, muito obrigada pelo amor incondicional, apoio diário, zelo e grande incentivo pela busca de meus sonhos. As minhas conquistas são nossas vitórias! A você Danilo, namorado e futuro esposo, sua presença, palavras de motivação, de fé, sempre me tranquilizam e me impulsionam.

A todas as famílias que voluntariamente participaram da pesquisa.

RESUMO

A leishmaniose é uma zoonose transmitida por flebotomíneos e causada por várias espécies do gênero *Leishmania*. Na região Amazônica, em particular no estado do Pará, a doença de Chagas e as leishmanioses compartilham área de transmissão, o que leva frequentemente à presença de infecções mistas. A ocorrência dessas foi verificada em estudo prévio em população de chagásicos da Amazônia, identificando a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 50% das amostras. No sêmen dos mesmos indivíduos, também foi detectado DNA do *Trypanosoma cruzi*, sugerindo a possibilidade de transmissão sexual. Com poucos relatos sobre a transmissão sexual das infecções causadas por tripanossomatídeos, a real importância epidemiológica dessa via de transmissão permanece desconhecida. Assim, o este estudo avaliou a presença de infecções mistas causadas por *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, mediante a análise dos resultados obtidos no diagnóstico sorológico por ELISA e molecular por PCR ITS1, em uma população residente no estado do Pará. Além disso, foi realizada a pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de esperma dessa população. Os resultados sorológicos revelaram que 50/108 (46,29%) dos indivíduos apresentavam anticorpos específicos contra antígenos de *Leishmania* spp., enquanto que a reação de PCR foi positiva em somente 20/108 (18,51%) dos indivíduos testados, evidenciando uma clara discrepância de 27,78% entre os métodos de diagnóstico. O teste de PCR demonstrou-se mais eficiente para identificação dos indivíduos com infecção mista, já que o teste sorológico apresentou um elevado número de reações cruzadas. O método molecular também foi capaz de detectar DNA nuclear do parasito no esperma de 53,1% dos indivíduos. O sequenciamento dos produtos amplificados permitiu identificar as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* nas amostras, demonstrando que a possibilidade de transmissão sexual das leishmanioses necessita de estudos mais aprofundados. Nossos resultados reafirmam a necessidade de aprimorar as técnicas de diagnóstico utilizadas na rotina laboratorial e aponta a técnica de PCR como ferramenta promissora na identificação das infecções causadas por *Leishmania* spp. A pesquisa realizada apresenta informações relevantes sobre diagnóstico e vias de transmissão das leishmanioses na região Amazônica, que poderá favorecer o aprimoramento de medidas de controle, prevenção e assistência à população.

Palavras chaves: leishmaniose, *Leishmania* spp., diagnóstico molecular, ITS1, infecções mistas e transmissão sexual.

SUMMARY

Leishmaniasis is a zoonosis transmitted by sandflies and caused by various species of the genus *Leishmania*. In Amazon, particularly at Pará State, Chagas disease and leishmaniasis share a common transmission area, which often leads to mixed infections. This scenario was observed in a previous study in a chagasic population of Amazon, which demonstrated the presence of anti-*Leishmania* spp. antibodies in almost 50% of the samples. Furthermore, it was detected *Trypanosoma cruzi* DNA in semen from infected people, suggesting the possibility of sexual transmission of the parasite. There are few reports regarding the sexual transmission of infections caused by trypanosomatids and the actual epidemiological importance of this transmission route remains unknown. Thus, the present study aimed to evaluate the presence of mixed infections caused by *Leishmania* spp. and *T. cruzi* by serological ELISA and molecular diagnosis PCR LITSR, in an endemic population at Pará State. Moreover, *Leishmania* spp. DNA search was carried out in sperm samples of this population. The results of serological tests revealed that 50/108 (46,29%) individuals had specific antibodies against *Leishmania* spp. antigens, whereas PCR was positive in only 20/108 (18,51%) of tested samples, showing a clear discrepancy 27,78% between these methods. The study showed PCR was more efficient to identify individuals with mixed infection, since serological assay showed a large number of cross-reactions. Molecular method was able to detect parasite nuclear DNA in semen from 53.1% individuals. Amplicons sequencing allowed us to identify the species *L. amazonensis* and *L. infantum* in samples, demonstrating the possibility of leishmaniasis sexual transmission needs to be further investigated. Our results reaffirm the requirement of improve diagnostic techniques currently used in routine, and PCR arises as a promising tool for identification of infections caused by *Leishmania* spp. The study presented relevant information about diagnosis and leishmaniasis transmission routes at the Amazon region, which may favor the improvement of control measures, prevention and population care.

Key words: leishmaniasis, *Leishmania* spp., molecular diagnosis, ITS1, mixed infections and sexual transmission.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Distribuição mundial da Leishmaniose Cutânea.	03
Figura 2:	Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral.	05
Figura 3:	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.	12
Figura 4:	Localização dos municípios estudados e distribuição das famílias.	30
Figura 5:	Distribuição das amostras de sangue e espermatozoides pertencentes a cada família e aos casos avulsos.	31
Figura 6:	Detecção de DNA nuclear de <i>Leishmania</i> em amostras de sangue de indivíduos das famílias A, B, C e D.	42
Figura 7:	Detecção de DNA nuclear de <i>Leishmania</i> nas amostras de espermatozoides de indivíduos das famílias estudadas.	43
Figura 8:	Detecção de DNA nuclear de <i>Leishmania</i> em amostras de espermatozoides dos casos avulsos estudados.	44
Figura 9:	Número de indivíduos identificados com infecção mista por <i>Leishmania</i> spp. e <i>T. cruzi</i> pelos testes ELISA e PCR.	45
Figura 10:	Identificação de nDNA <i>Leishmania</i> em amostras de sangue e espermatozoides de indivíduos infectados.	47
Figura 11:	Alinhamento das sequências da região espaçadora do gene RNA ribossomal de <i>Leishmania</i> amplificadas nas amostras pertencentes à família A.	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Diagnóstico sorológico e molecular das infecções por <i>Leishmania</i> spp. nas amostras de sangue dos indivíduos agrupados em famílias.	42
Tabela 2:	Identificação das espécies <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> nas amostras sequenciadas e analisadas pelo BLASTn.	46
Tabela complementar:	Anexo D. Resultados dos testes PCR e ELISA, utilizados para diagnóstico de <i>Leishmania</i> spp. e de <i>T. cruzi</i> na população estudada.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide)</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)</i>
dNTPs	Desoxiribonucleotídio trifosfato
DST	Doença Sexualmente Transmissível
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas)</i>
IFI	Imunofluorescência Indireta
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer (Região espaçadora do gene de RNA Ribossomal)</i>
kDNA	<i>Kinetoplast DNA (DNA do Cinetoplasto)</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutaneomucosa
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia)
nDNA	DNA nuclear
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em Cadeia)
PKLD	Leishmaniose dérmica pós-Kalazar
IDRM	Reação Intradérmica de Montenegro
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
SESPA	Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará
SLA	Antígenos Solúveis de <i>Leishmania</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1. Leishmanioses	1
1.1 Descoberta da doença.....	1
2. Aspectos epidemiológicos	2
2.1 Leishmaniose Tegumentar (LT).....	2
2.2 Leishmaniose Visceral (LV)	4
2.3 Leishmaniose no estado do Pará	6
2.4 Infecções mistas causadas por <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
3. Agente etiológico.....	8
3.1 Classificação taxonômica.....	9
4. Vetor	9
5. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> spp.....	11
5.1 Interação Parasito-Hospedeiro	13
6. Vias de transmissão	14
6.1 Transmissão sexual	15
7. Manifestações clínicas.....	17
7.1 Leishmaniose Cutânea (LC).....	17
7.2 Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM).....	18
7.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	19
7.4 Leishmaniose cutânea disseminada <i>borderline</i>	20
7.6 Leishmaniose dérmica pós-Kalazar (PKLD)	21
8. Diagnóstico.....	21
9. Tratamento e vacinas	25
II. JUSTIFICATIVA	27
III. OBJETIVOS.....	28
1. Objetivo geral.....	28
2. Objetivos específicos.....	28
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
1. Desenvolvimento do estudo	29
2. Descrição dos municípios.....	29
2.1 Barcarena.....	29
2.2 Breves.....	30
3. Descrição dos participantes do estudo.....	30

4. Coleta das amostras	32
5. Extração de DNA.....	32
5.1 De células do sangue periférico de humanos	32
5.2 De esperma.....	33
5.3 De formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i>	33
5.4 Reextração de células do sangue e de esperma	34
6. Quantificação e análise do DNA extraído	34
7. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	35
7.1 Amplificação do DNA nuclear (nDNA) de <i>Leishmania</i> spp.....	35
7.2 Reamplificação do produto de PCR	35
8. Transferência dos produtos de PCR para membrana de <i>nylon</i>	36
9. Sonda de quimioluminescência	36
9.1 Marcação da sonda.....	36
9.2 Hibridização com sondas de quimioluminescência.....	37
9.3 Detecção e geração de sinal de quimioluminescência.....	37
10. Purificação de DNA em gel de agarose.....	38
11. Sequenciamento dos produtos de PCR e análise das sequências	38
12. Teste sorológico.....	39
12.1 Preparo de antígenos para o teste ELISA.....	39
12.2 Sensibilização das placas para o teste ELISA	39
12.3 Incubação do primeiro anticorpo em ELISA	40
12.4 Incubação do segundo anticorpo em ELISA.....	40
12.5 Revelação em ELISA.....	40
V. RESULTADOS	41
1. Resultados do teste sorológico para identificação de anticorpos anti- <i>Leishmania</i> spp.....	41
2. Diagnóstico molecular das infecções causadas por <i>Leishmania</i> spp.....	41
3. Comparação dos resultados obtidos nos testes sorológicos e moleculares para identificação de infecções mistas causadas por <i>Leishmania</i> spp. e <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
4. Sequenciamento dos produtos de PCR para identificação das espécies de <i>Leishmania</i> spp.	45
VI. DISCUSSÃO.....	49
1. Avaliação dos testes de diagnóstico utilizados para a detecção de <i>Leishmania</i> spp.	49
2. Identificação de infecção mista por leishmaniose e por doença de Chagas na região Amazônica.....	51
3. Espécies de <i>Leishmania</i> spp. que afetam a população de Barcarena e de Breves.....	52

4. Possibilidade de transmissão sexual da <i>Leishmania</i> spp.....	54
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
VIII. PERSPECTIVAS.....	59
IX. REFERÊNCIAS	60
Anexo A.....	74
Anexo B.....	75
Anexo C.....	76
Anexo D.....	77

I. INTRODUÇÃO

1. Leishmanioses

1.1 Descoberta da doença

As leishmanioses são patologias infecciosas causadas por protozoários intracelulares que infectam numerosos mamíferos, incluindo os humanos, apresentando alta prevalência em regiões tropicais e neotropicais, sendo transmitidas pela picada do flebotomíneo fêmea infectado. Afetando a população mais empobrecida, a doença está associada à desnutrição, à resposta imunológica individual dos infectados, à migração da população e a condições precárias de habitação (WHO, 2014).

Estes protozoários têm sido observados desde o final do século XIX por pesquisadores como Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg, Vianna e Ronald Ross (WHO, 2010). Cunningham, em 1885, publicou o encontro de morfologias que hoje seriam formas amastigotas de *Leishmania* identificadas em biópsia de baço (Wright, 1904). Em 1903, Leishman observou o protozoário em autópsias e o considerou uma forma evolutiva de tripanossomatídeo (Leishman, 1903). No mesmo ano, Donovan também observou uma forma distinta de tripanossomatídeo em amostras de fígado e de baço autopsiados. Em estudos na Índia, Laveran e Mesnil, em 1903, consideraram que o parasito associado ao Calazar indiano poderia ser uma nova espécie, *Piroplasma donovani*. Até que o médico Ronald Ross nomeou o gênero como *Leishmania* no mesmo período (Ross, 1903).

L. Rogers, em 1904, observou em culturas que as amastigotas tornavam-se alongadas e mudavam sua morfologia, assemelhando-se a tripanossomatídeos presentes em diferentes espécies de insetos. A partir desse trabalho, se iniciou uma verdadeira maratona, pois se conhecia o agente etiológico da leishmaniose, mas as vias de transmissão ainda não eram esclarecidas (Killick–Kendrick, 2013).

J. A. Sinton, em 1925, sugeriu que o *Phlebotomus argentipes* seria o vetor. Baseando-se nessa informação, duas equipes independentes e lideradas por Henry Shortt, em Assam, e R. Knowles e L. Napier, em Calcutá, concentraram-se na busca pelo vetor. Em paralelo, estava em andamento na China a pesquisa dirigida por E. Hindle e W. S. Patton a outra espécie de vetor. Até que em 1942, pela picada de *P. argentipes*, trabalhadores foram

infectados, diagnosticados e a descrição da principal forma de transmissão através de um vetor flebotomíneo foi concluída (Killick–Kendrick, 2013). Hoje, sabe-se que o agente etiológico das leishmanioses mantém o seu ciclo de vida através da transmissão entre insetos (flebotomíneos) e hospedeiros mamíferos (Kaye e Scott, 2011).

2. Aspectos epidemiológicos

As diferentes formas clínicas da patologia podem ser agrupadas em: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral também conhecida como Calazar (Beattie e Kaye, 2011). São registrados 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose e 20.000 a 30.000 mortes anuais (WHO, 2014). Aproximadamente 350 milhões de pessoas encontram-se em área de risco e 88 países e três territórios nos cinco continentes apresentam a endemia (Boer, Argaw e Alvar, 2011; Alvar *et al*, 2012).

2.1 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença de caráter zoonótico que acomete os humanos e diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Novo Mundo (Goto e Lindoso, 2012). Nos humanos, acomete pele e/ou mucosas, sendo dividida em três principais tipos de manifestações clínicas: cutânea e cutaneomucosa, permanecendo os sintomas localizados na pele e em mucosas; e difusa, forma rara, com nódulos por todo corpo e um denso infiltrado dérmico de macrófagos intensamente parasitados (Costa *et al*, 2009a).

A incidência de novos casos de LT está estimada em 0,7 a 1,2 milhões por ano. Brasil, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, juntos, apresentam uma incidência alta, 70 a 75% dos casos mundiais (Alvar *et al*, 2012). Um milhão de casos de LT cutânea foi reportado nos últimos cinco anos. Dados da distribuição mundial de leishmaniose cutânea, segundo a WHO, 2012 são apresentados na Figura 1 (WHO, 2014). Um fator que contribui grandemente para o surgimento de novas epidemias de LT no Novo Mundo é a urbanização. A doença tem se espalhado por cidades como Belo Horizonte (Brasil) e países como México, Venezuela, Colômbia, Bolívia e Argentina (Maroli *et al*, 2013).

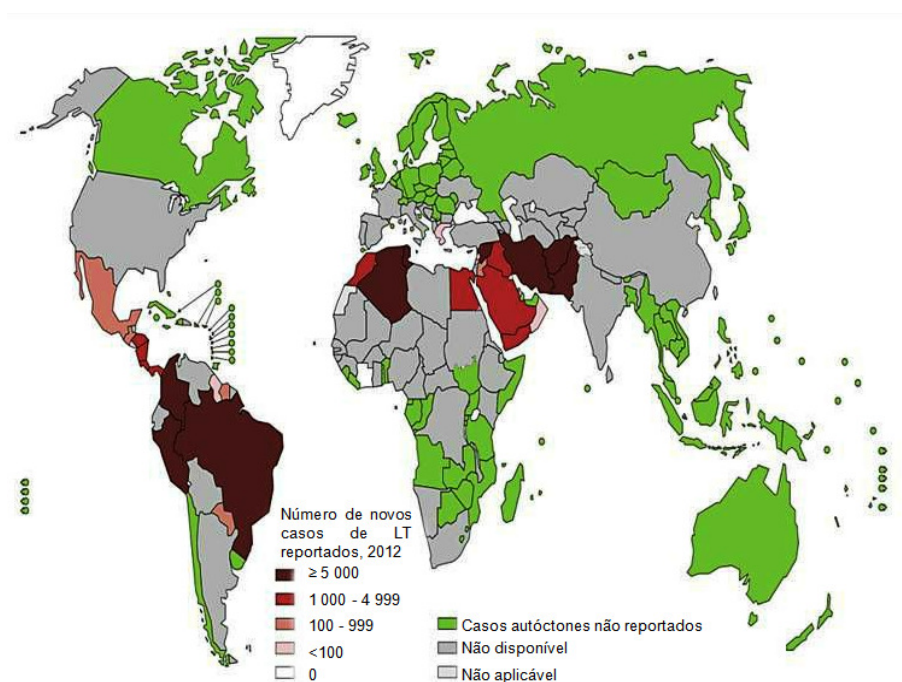


Figura 1: Distribuição mundial de leishmaniose cutânea. Adaptado de WHO, 2012. Dados da Organização Mundial da Saúde em 2012 apontam países como Brasil, Peru, Colômbia, Argélia, Paquistão, Afeganistão, Irã e Síria com os maiores números de ocorrência de casos de LT, número superior ou igual a 5.000 casos notificados (WHO, 2014).

No Brasil, a origem da LT apresenta confronto entre achados e datas, mas uma indicação segura é de Eduardo Rabello, em 1925, publicou um trabalho intitulado como "Contribuições ao estudo da leishmaniose tegumentar no Brasil" e distinguiu três períodos na história da doença. O primeiro, em 1895, por meio da observação clínica do “botão da Bahia” e sua semelhança ao “botão do Oriente”. O segundo, em 1909, quando se identificou e se descreveu o agente etiológico da “úlcer de Bauru”. E o terceiro em 1910, com o encontro do parasito em lesões mucosas, associando assim ao quadro clínico da doença (Vale e Furtado, 2005; Furusawa e Borges, 2014). A espécie *Leishmania braziliensis* foi nomeada por Gaspar de Oliveira Vianna, em 1911, ao descrever o parasito, causando lesões na pele (Furusawa e Borges, 2014). No ano seguinte, Splendore também descreve o parasito *Leishmania* em manifestação clínica cutaneomucosa (Lainson, Killick-Kendrick e Flisser, 1988). No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, descreveu o papel do flebotomíneo na transmissão da LT e a primeira observação do parasito em roedores silvestres foi realizada por Forattini, em 1958 em áreas florestais do estado de São Paulo (Brasil, 2013a).

Encontrada em todos os estados brasileiros, a LT constitui uma afecção dermatológica que merece atenção, pelo risco de deformações e agravos psicológicos, com reflexos no campo social e econômico dos portadores (Reis e Franco, 2010). Pelo seu caráter zoonótico, inicialmente, a transmissão das leishmanioses era apenas silvestre, limitada a áreas rurais. Contudo, mudanças no padrão de transmissão ocorrem devido a modificações socioambientais, como desmatamento e processo migratório (OPAS, 2006; Brasil, 2011b). No Brasil, em 2010, foram registrados 22.397 casos de LT (OPAS, 2012).

2.2 Leishmaniose Visceral (LV)

Doença tropical negligenciada, a LV, é caracterizada pela visceralização do parasito para órgãos internos (McCall, Zhang e Matlashewski, 2013). Uma doença crônica grave, caracterizada por febre, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, citopenias e algumas vezes, é fatal aos humanos quando não é tratada corretamente (Romero e Boelaert, 2010). A letalidade da LV mesmo sob tratamento específico é variável, podendo atingir valores entre 4,2% e 10,2% em indivíduos tratados (Belo *et al*, 2013). Aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de novos casos por ano são registrados e mais de 90% dos casos ocorrem em países como: Índia, Bangladesh, Sudão, Sul do Sudão, Etiópia e Brasil (Alvar *et al*, 2012). Casos de LV humanos são relatados em Honduras, na Venezuela, no Paraguai e na Argentina. Casos esporádicos em humanos e em cães são descritos no Chile, no Equador, na Bolívia, no México, em Costa Rica e na Guiana Francesa (Romero e Boelaert, 2010). A endemia é presente em doze países do Novo Mundo (Maroli *et al*, 2013). E são estimadas 20.000 mortes anualmente em todo mundo. Dados da distribuição mundial de leishmaniose visceral, segundo a WHO, 2012 são apresentados na Figura 2 (WHO, 2014).

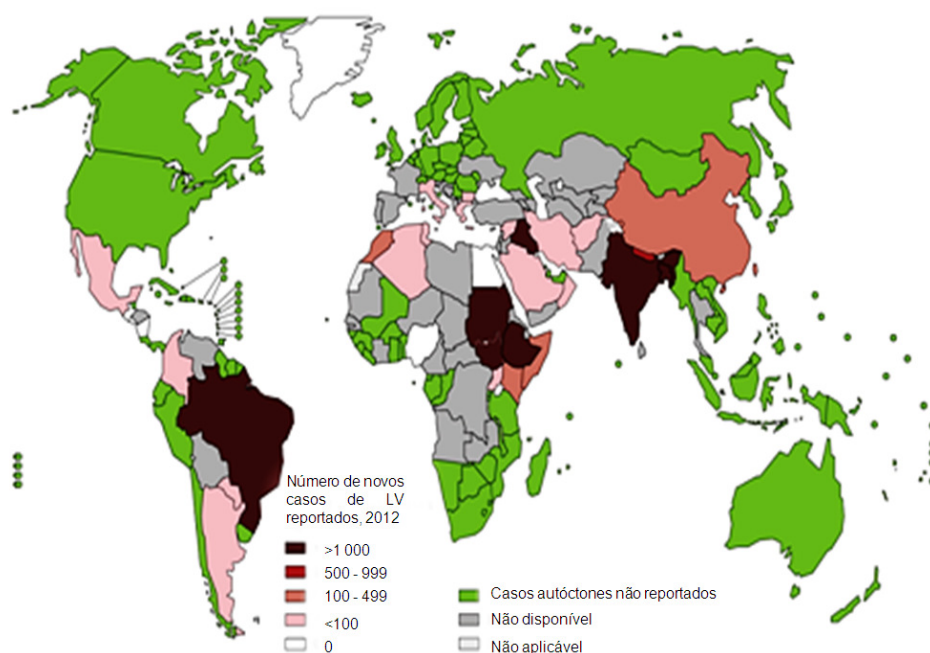


Figura 2: Distribuição mundial de leishmaniose visceral. Adaptado de WHO, 2012. Dados da Organização Mundial da Saúde em 2012 apontam países como Brasil, Etiópia, Sudão, Iraque, Índia e Bangladesh com os maiores número de casos, superior a 1.000 casos de LV notificados (WHO, 2014).

Pela falta de sistemas eficientes de vigilância epidemiológica e controle da LV nas Américas, a incidência da doença não é exatamente conhecida e, embora o sistema de vigilância brasileiro seja considerado melhor que em outros países Latino-americanos, a incidência de LV no Brasil também é subestimada (Belo *et al*, 2013).

Migone, em 1913, foi o primeiro a observar e a descrever um caso positivo para LV em necropsia de indivíduo oriundo do município de Boa Esperança, Mato Grosso. Anos depois, em 1934, Pena relatou outros achados. Durante estudo sobre febre amarela, foram observados 41 casos positivos para *Leishmania* a partir de viscerotomia de indivíduos das regiões Norte e Nordeste, a maioria crianças. Após a descrição do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* como importante espécie vetora, também foram descritos os primeiros casos de infecção em cães no Brasil (Brasil, 2013b).

Os relatórios das primeiras investigações sobre LV na região Amazônica, em 1937, permitiram: classificar a doença como autóctone, identificar a espécie *L. infantum*, estabelecer o caráter silvestre da infecção e determinar a sua incidência, pelos aspectos clínicos, pelos processos patogênicos e terapêuticos. Essas foram as primeiras investigações realizadas no

Brasil sob a nova moléstia e contribuíram para conhecimento da terapêutica (Chagas *et al*, 1938).

Inicialmente no Brasil, a LV era concentrada em áreas rurais da região Nordeste, mas, desde os anos 80, epidemias vêm ocorrendo em cidades como Belo Horizonte, Campo Grande e Natal (Romero e Boelaert, 2010). A intensa urbanização resultou em crescimento desordenado com formação de favelas com más condições sanitárias e a presença de *Lutzomyia longipalpis* em tais áreas levou ao estabelecimento de ciclos domésticos e peri-domésticos da doença (Maroli *et al*, 2013). No ano de 2009, foram registrados no Brasil 3.693 casos autóctones de LV em diferentes estados, evidenciando a expansão geográfica da doença para as regiões Norte, Sudeste, Centro-Oeste e Sul. Contudo, as maiores endemias são registradas nos estados do Nordeste (Brasil, 2011a). Atualmente, a LV é registrada em 21 estados brasileiros, com aproximadamente 1.600 municípios, apresentando transmissão autóctone (OPAS, 2012; Brasil, 2013b).

2.3 Leishmaniose no estado do Pará

No estado do Pará, a LT e LV encontram-se em constante expansão geográfica, com tendência à urbanização (Garcez *et al*, 2010; Silva e Gaioso, 2013). Nos anos 70, na Serra dos Carajás, dezenas de casos de LT foram observados em trabalhadores que se dedicavam à exploração de ferro, motivando assim as primeiras pesquisas sobre ecoepidemiologia da doença (Souza *et al*, 2010). Os três primeiros casos de LV foram diagnosticados casualmente em indivíduos procedentes dos municípios de Abaetetuba e Mojú (Rosas Filho e Silveira, 2007). Em 1938, Evandro Chagas registrou no município de Abaetetuba oito casos de infecção por LV e também a presença de cães infectados (Chagas *et al*, 1938). Durante surto de LV ocorrido em Santarém e na Ilha do Marajó, em 1985, Lainson apresentou evidências que o *L. longipalpis* seria o vetor na região, uma vez que os parasitos encontrados nos flebotomíneos eram biologicamente e bioquimicamente indistinguíveis dos encontrados nos humanos, nas raposas e nos cães (Lainson *et al*, 1985).

Trabalhos realizados no Pará por: Júnior *et al*, 2009; Souza *et al*, 2010 e Bacha *et al*, 2011, demonstram a incidência, a prevalência e a influência das muitas espécies de flebotomos, existentes neste território contribuindo para disseminação de LT em municípios e em áreas do estado. Outros trabalhos apresentam evidências que a expansão da LV é multifatorial, podendo-se destacar: desmatamento desordenado, levando a proximidade do flebotomíneo ao ambiente peri-domiciliar, presença de cães domésticos nas áreas endêmicas e

migração da população não imunizada para outras regiões. Assim, a multiplicidade dos fatores contribui para a incidência das leishmanioses no meio urbano (Rosas Filho e Silveira, 2007; Silva e Gaioso, 2013).

No ano de 2009, o estado do Pará registrou 3.347 casos de LT distribuídos em 93% dos municípios, representando 68,8 casos/100.000 habitantes. Para a LV, 275 casos foram confirmados, representando 3,7 casos/100.000 habitantes. A letalidade registrada foi de 2,9% e 56% evoluíram para cura clínica. Os maiores percentuais de casos de LV foram registrados nos municípios de Conceição do Araguaia (14,6%), de Cametá (7,6%) e de Barcarena (7,3%) (Brasil, 2011c).

Buscando descrever o perfil epidemiológico dos casos notificados de LV, no estado do Pará, entre 2007 e 2011, a Secretaria de Estado de Saúde Pública do Pará (SESPA) analisou a ocorrência dos casos notificados de leishmaniose nas regionais de saúde, sendo treze no total. O município de Barcarena pertence à 6ª Regional de Saúde e com mais quatro municípios, apresenta os maiores índices de porcentagem em anos analisado (Silva e Gaioso, 2013). O município de Breves pertence à 8ª Regional de Saúde, juntamente com outros municípios, são os que menos apresentam casos de notificação para LV. Os municípios com intensa transmissão de LV no estado do Pará estão localizados a oeste e ao norte do estado (Pereira, 2005). As informações fornecidas pela SESPA e pelo Sistema Nacional de Agravos de Notificações determinam a incidência e a análise georeferenciada, fundamentais para orientar ações de vigilância em todo o estado (Teles, 2011).

2.4 Infecções mistas causadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*

Doença tropical negligenciada, a doença de Chagas representa um grave problema de saúde pública na América Latina. No Brasil, é estimado que dois a três milhões de pessoas estejam infectadas, com 6.000 mortes anuais (Martins-Melo *et al*, 2014). A Amazônia brasileira é endêmica para a doença de Chagas com um ciclo enzoótico muito bem estabelecido entre os animais silvestres desta região (Pinto *et al*, 2008).

Em 1969, Shaw, Lainson e Fraiha relataram os primeiros casos autóctones de doença de Chagas em Belém, Pará. O trabalho relatou quatro casos registrados em uma mesma família. Porém, não foram descritos triatomíneos na residência destes, nem nas proximidades, sugerindo assim outra forma de infecção, possivelmente, a via oral. Hoje na região Amazônica, os estudos demonstram casos de doença de Chagas por transmissão oral, pelo consumo de produtos naturais como o suco do açaí. Uma via de transmissão impactante para

saúde pública, resultando em preocupação quanto à pasteurização destes produtos e ao controle para uso e exportação (Martins-Melo *et al*, 2014).

Os protozoários *Leishmania* spp. e *T. cruzi* pertencem à mesma família, Trypanosomatidae, possuindo muitas características antigênicas comuns. São digenéticos, responsáveis por infecções zoonóticas e compartilham área de transmissão e hospedeiros mamíferos como: roedores, humanos e animais domésticos (Mendes *et al*, 2007; Quinnell e Courtenay, 2009). A sobreposição das áreas endêmicas na América do Sul tem caracterizado a ocorrência de infecção mista, demonstrada por testes sorológicos, parasitológicos, PCR, sequenciamento e caracterização de isoenzimas (Bastrenta *et al*, 2003). Porém, esses parasitos apresentam características antigênicas comuns, dificultando o diagnóstico diferencial e apresentando reações cruzadas pelos testes sorológicos comumente utilizados. Limitação que exige o uso de técnicas mais específicas e sensíveis para identificação de infecções mistas, muitas vezes assintomáticas (Gil *et al*, 2011). A ocorrência de infecções mistas por esses tripanossomatídeos tem sido documentada, contudo há poucos relatos sobre a situação epidemiológica atual dessas infecções na Amazônia brasileira.

3. Agente etiológico

Parasitos pertencentes ao reino Protozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* e subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Lainson, 2010). O protozoário apresenta duas morfologias principais: a) amastigota é ovoide, com ausência de flagelo livre, núcleo esférico, o cinetoplasto tem forma de bastão e é encontrada no interior dos macrófagos nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Singh, 2006); b) promastigota é alongada, flagelada e é encontrada no sistema digestório do flebotomíneo em estágios de diferenciação, até chegar à forma de promastigota metacíclica infectante (Kaye e Scott, 2011). O flagelo na região anterior origina-se a partir do cinetoplasto, uma região especializada da mitocôndria encontrada nos parasitos pertencentes à ordem Kinetoplastida (Ferreira, 2012).

O cinetoplasto apresenta grande quantidade de DNA extra nuclear, organizado em moléculas circulares: algumas dezenas ou centenas de maxicírculos, que codificam os genes mitocondriais e os minicírculos, presentes em milhares de cópias, que transcrevem os *Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucléico - RNA guias, transcritos responsáveis pela edição do RNA mensageiro (mRNA) mitocondriais (Weirather *et al*, 2011). Outras organelas

citoplasmáticas também são observadas como: retículo endoplasmático, complexo de Golgi, lisossomos e núcleo. Os protozoários do gênero *Leishmania* contêm, ainda, glicossomos, organelas essenciais para a regulação metabólica necessária para adaptação a ambientes diversos encontrados nos mais diferentes hospedeiros (Ferreira, 2012).

3.1 Classificação taxonômica

Buscando o entendimento dos ciclos e a padronização da nomenclatura das várias espécies neotropicais de *Leishmania* presente na Amazônia brasileira, foi proposto caracterizá-las pelo perfil enzimático e revisar sua taxonomia, resultando na divisão de subgêneros que se conhece hoje. Em 1977, os primeiros a proporem esta divisão foram Lainson, Ward e Shaw, que observaram a ocorrência ou a ausência de desenvolvimento parasitário nos intestinos do flebotomíneo. Assim, as espécies de *Leishmania* presentes na região neotropical receberam uma subdivisão: todas as espécies com ciclo no intestino anterior do flebotomíneo pertencem ao subgênero *Leishmania* e as espécies com ciclo no intestino posterior do flebotomíneo pertencem ao subgênero *Viannia* (Lainson, 2010). As infecções causadas por espécies do subgênero *Viannia* são mais invasivas, com recidivas após tratamento e disseminação do parasito para regiões mucosas (Silveira *et al*, 2009)

São conhecidas cerca de vinte espécies de leishmânias patogênicas aos humanos e uma diversidade de manifestações clínicas. Essa diversidade é decorrente da interação de múltiplas espécies e da resposta imune de cada indivíduo infectado (Silveira *et al*, 2008; Maroli *et al*, 2013). Na região Amazônica, sete espécies de *Leishmania* que podem causar a LT, seis do subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, *L. lindenberg* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. amazonensis* (Silveira *et al*, 2008; Bacha *et al*, 2010). Quanto a LV, os agentes etiológicos são parasitos do complexo *Leishmania donovani*. Na África e na Ásia, é causada pela espécie *L. donovani*. No Mediterrâneo, na China, na Europa, no norte da África, na América, principalmente, no Brasil a espécie mais prevalente é *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) (Chappuis *et al*, 2007; Pereira *et al*, 2013).

4. Vetor

Os flebotomíneos são insetos hematófagos responsáveis pela transmissão do protozoário *Leishmania* através da picada do inseto fêmea, previamente alimentado com o sangue de um mamífero infectado. Estes pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e

subfamília Phlebotominae. As espécies do gênero *Phlebotomus* são encontradas na África, na Ásia e na Europa e espécies do gênero *Lutzomyia* nas Américas Central e do Sul (Bates, 2008).

No Brasil, são encontradas 260 espécies de flebotomíneos onde o *L. longipalpis* é a principal espécie, participando da transmissão de LV (Shimabukuro e Galati, 2011; Belo *et al*, 2013). A expansão geográfica do *L. longipalpis* é ampla, sendo encontrada em quatro regiões do país: Nordeste, Norte, Sudeste e Centro-Oeste (Maroli *et al*, 2013). Os vetores das leishmanioses são popularmente conhecidos como: mosquito palha, birigui, cangalha ou tatuíra, dependendo da região que são encontrados (Ferreira, 2012).

Os insetos adultos são pequenos, raramente maiores que 3,5 mm de comprimento, o corpo é coberto por pêlos densos, as patas são longas e delicadas e as asas ficam em formato de “V” quando está em repouso, característico da espécie. Os insetos machos e fêmeas alimentam-se de secreções adocicadas de plantas ou melão produzidos por pulgões, mas as fêmeas necessitam de sangue para completar o desenvolvimento de seus ovos, buscando então os hospedeiros mamíferos como parte de fundamental para completar o ciclo de evolução (Maroli *et al*, 2013).

A ação desses insetos é silenciosa, as picadas são realizadas principalmente ao anoitecer e ao amanhecer, embora também possam picar durante o dia sem serem perturbados. Não são capazes de voar longas distâncias e encontram-se perto das residências, multiplicam-se em restos orgânicos e os ovos são encontrados em tocas de animais, tronco de árvores, orifícios nas paredes, em abrigos de animais peridomésticos como galinheiros e estábulos, ou próximo a depósitos de lixo (Ferreira, 2012).

Atualmente, entre os flebotomíneos encontrados no Novo Mundo, cinquenta e seis espécies pertencem ao gênero *Lutzomyia* e estão envolvidos na transmissão de quinze espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. colombiensis*, *L. garnham*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. mexicana*, *L. naiffi*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. pifanoi*, *L. shawi* e *L. venezuelensis* (Maroli *et al*, 2013).

Um fator importante na infectividade do hospedeiro é a reação que a saliva do flebotomíneo desencadeia no hospedeiro; essa é composta por uma variedade de agentes farmacológicos como vasodiladores, anticoagulantes, agentes antiplaquetários, imunomodulatórios e moléculas anti-inflamatórias (Mendes-Sousa *et al*, 2013). Os anticoagulantes salivares têm como alvo proteínas ou complexos enzimáticos da cascata de coagulação, buscando interromper ou atrasar a formação do coágulo, permitindo que o

flebotomíneo complete sua alimentação. Algumas das proteínas anticoagulantes pertencem à família de lectinas tipo C, que recentemente foram identificadas como inibidor do fator de coagulação Xa e comercializadas como Lufaxin (Maroli *et al*, 2013).

Vários fatores contribuem para disseminação dos flebotomíneos: fonte de sangue, interrupção das atividades de controle dos vetores, alterações climáticas, desmatamento, migração humana e urbanização (Maroli *et al*, 2013). Outros importantes fatores são: expansão de assentamentos e grande suscetibilidade de espécies de flebotomos permissivas a transmissão de leishmanioses, levando ao estabelecimento de novos focos e consequente propagação da doença (Volf e Myskova, 2007).

5. Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp.

O flebotomíneo fêmea infecta-se ao se alimentar com sangue infectado por macrófagos parasitados com formas amastigotas. Os parasitos diferenciam-se rapidamente em promastigotas procíclicos no intestino do flebotomíneo, onde se nutrem de glicose e de prolina. No intestino do flebotomíneo, os promastigotas se instalam na região do intestino anterior (subgênero *Leishmania*) ou no intestino posterior (subgênero *Viannia*). Por interações entre moléculas presentes no lado externo de sua membrana plasmática, *Lipophosphoglycan* – Lipofosfoglicano (LPG) e lectinas presentes no epitélio digestivo do inseto vetor, consegue escapar das enzimas digestivas do estômago. Aderidos ao epitélio, multiplicam-se intensamente, e em alguns dias, diferenciam-se em promastigotas metacíclicos. As moléculas da superfície do parasito são alteradas, desaparecendo a capacidade de adesão a lectinas do epitélio. Observa-se aumento da extensão do flagelo e encurtamento do corpo, tornando-se incapaz de se multiplicar e devendo ser inoculado no mamífero para o ciclo ter continuidade. Livres no interior do sistema digestório, os promastigotas metacíclicos migram para as porções anteriores do esôfago do flebotomíneo, sendo liberados no momento da picada juntamente com a saliva (Ferreira, 2012). Fatores como pH ácido e aumento de temperatura ao passar do inseto para o mamífero, ativam sinais para a transformação do parasito para amastigota, forma intracelular, adaptada ao vacúolo fagolisossômico e ao meio ácido (Barros *et al*, 2012). Os amastigotas se multiplicam por divisão binária e, quando em grande quantidade, rompem a célula hospedeira, liberando os parasitos no meio extracelular. A partir disso, eles podem ser fagocitados por outros macrófagos, migram por via hematogênica a outros órgãos do hospedeiro ou novamente serem ingeridos junto ao sangue durante o repasto

de outros flebotomíneos (Ferreira, 2012). Fases do ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp. são observadas na Figura 3.

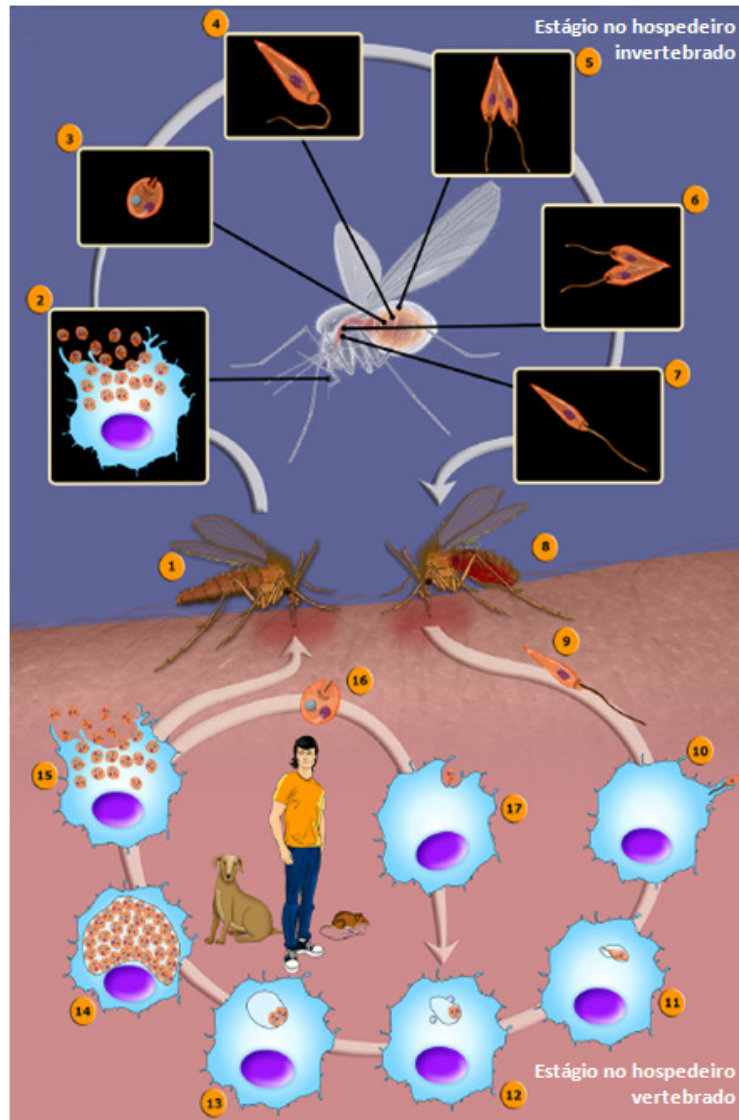


Figura 3: Ciclo de vida do parasito *Leishmania* spp. Adaptado de Teixeira *et al*, 2013. (1) O flebotomíneo fêmea ingere junto ao sangue macrófagos (2) com formas amastigotas (3). No intestino do vetor, se diferenciam em promastigotas procíclicas (4), se multiplicam (5). Migram para porção anterior do esôfago, onde se dividem (6). Diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, forma infectante e permanece na probóscide do flebotomíneo (7). O flebotomíneo regurgita formas promastigota metacíclico junto a componentes salivares na corrente sanguínea dos mamíferos (8). Promastigota metacíclico (9). São fagocitados por macrófagos, neutrófilos e células dendríticas (10). Diferenciam-se em amastigotas (11). Permanecem no vacúolo parasitóforo (12). Multiplicam-se (13). Ocorre divisão binária (14). Rompem a célula quando em grande quantidade (15). Forma amastigota livre (16). Reinfecta outras células ou são ingeridas junto ao sangue em uma nova picada do flebotomíneo (17) (Teixeira *et al*, 2013).

5.1 Interação Parasito-Hospedeiro

Determinadas moléculas na superfície das formas amastigotas e promastigotas e algumas vias metabólicas são essenciais para o estabelecimento da virulência e patogenicidade de *Leishmania* spp. (Barros *et al*, 2012). A molécula LPG é a mais abundante na superfície, com função importante nas interações entre o parasito e o hospedeiro. Na fase inicial da infecção, promove a sobrevivência intracelular dos promastigotas, atrasando a fusão do fagosossomo e lisossomo no interior do macrófago. Quando o fagolisossomo é formado, a Metaloproteinase dependente de zinco, conhecida como *Glycoprotein* - Glicoproteína 63 (GP63) atua inibindo as enzimas fagolisossomais. No lúmen do fagolisossomo, estão presentes nutrientes necessários para as espécies de *Leishmania*, fontes de carbono, aminoácidos, purinas, heme, vitaminas e cátions de ferro e magnésio. A absorção de cátions de ferro (Fe^{2+}) acontece através de transportadores de alta afinidade expressos pelas amastigotas que captam Fe^{2+} do fagolisossomo (Barros *et al*, 2012).

A GP63 tem papel significativo na virulência da *Leishmania* (Kaye e Scott, 2011). Presente na superfície de amastigotas e promastigotas é uma protease capaz de hidrolisar substratos e apresentar uma ampla faixa de pH considerado ótimo. Esta enzima é capaz de se ligar a frações do sistema complemento, tornando-as inativas, conferindo assim proteção as promastigotas contra o sistema imune inato do hospedeiro. É provável também que a GP63 atue como opsonina, ligando-se a frações inativas do complemento, que possuem receptor específico na superfície do macrófago, auxiliando assim na fagocitose de promastigotas. A GP63 auxilia na sobrevivência de amastigotas, sendo capaz de evitar degradação de peptídeos necessários para o crescimento dos amastigotas e interagindo com células do sistema imune como linfócito T auxiliar (T CD4⁺) (Barros *et al*, 2012).

Outro fator importante para o estabelecimento da infecção ocorre durante o repasto sanguíneo. Junto aos promastigotas metacíclicos também é depositada no local da picada uma substância gelatinosa, secretada pelos próprios promastigotas (*Promastigote Secretory Gel-PSG*) (Rogers, 2012). O componente ativo do PSG é a parte glicana dos filamentos de Proteofosfoglicanos (fPPG), o principal constituinte desse gel. O bloqueio causado na probóscita do flebotomíneo pelo PSG altera sua forma de alimentação, aumentando o número de picadas e o tempo de repasto (Rogers, Chance e Bates, 2002). Essas mudanças no comportamento do inseto favorecem a deposição de mais parasitos, PSG e saliva antes que o flebotomíneo possa realizar o repasto (Rogers *et al*, 2004).

6. Vias de transmissão

A transmissão da leishmaniose ocorre principalmente pela picada de flebotomíneos infectados, nas Américas principalmente pelo gênero *Lutzomyia* (Belo *et al*, 2013). A transmissão pode ser de caráter zoonótico ou antroponótico. No entanto, outras formas de transmissão como: congênita, em transfusão de sangue, em transplante de órgãos, em hemodiálise, entre usuários de drogas e em acidentes de trabalho também são conhecidas (Singh, 2006).

Pela transmissão congênita ou vertical, já foi verificada a presença de *L. donovai* e *L. infantum*. Um caso foi descrito em 1926, em gestante que apresentou sintomas sugestivos de leishmaniose no primeiro trimestre de gravidez. Após o nascimento, no primeiro ano de vida, a criança revelou pela biópsia do baço a presença do parasito *L. donovai*, comprovando a transmissão congênita (Avila-García *et al*, 2014).

Durante os procedimentos de transplantes de órgãos, os parasitos de *Leishmania* podem ser transmitidos diretamente do doador através de transfusão sanguínea. No sangue do doador assintomático, o parasito sobrevive ao processamento e estocagem no banco de sangue (Singh, 2006; Avila-García *et al*, 2014). A transfusão sanguínea regularmente é realizada durante processos cirúrgicos, ocasionando possibilidade de infecção. São ainda observados casos de reagudização do parasito devido o tratamento com imunossupressores. No procedimento de hemodiálise, pode ser verificado um alto risco de aquisição de doenças infecciosas, incluindo as parasitárias. A presença de *Leishmania* em indivíduos submetidos à hemodiálise não é diretamente vinculada, mas a presença de anticorpos específicos para *Leishmania* já foi observada em 9 a 25% de indivíduos submetidos à hemodiálise em áreas endêmicas (Avila-García *et al*, 2014).

Casos de infecção por fômites contaminados tais como agulhas são descritos entre usuários de drogas. Um estudo espanhol pesquisou *Leishmania* em seringas utilizadas após o uso de drogas e confirmou por PCR que 32 a 52% dessas estavam contaminadas pelo parasito. As infecções causadas por acidentes de trabalho ocorrem pelo contato com fluídos como o sangue e pelo contato com animais ou objetos contaminados. Em equipes de pesquisa, diagnóstico ou médica, é comum o relato de casos de infecção. Contudo, essa via de transmissão pode ser afetada por uma variedade de fatores como, as características da

exposição e quantidade de inóculo, de patogenicidade e de resposta imune do hospedeiro (Avila-García *et al*, 2014).

Entre os diversos hospedeiros mamíferos que contribuem para a manutenção do ciclo de transmissão da *Leishmania* em ambientes silvestres e domésticos, o homem é um hospedeiro acidental. Os animais mais comumente infectados são roedores e canídeos e a maioria das infecções em animais silvestres é assintomática (Ferreira, 2012). As raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*) são a principal fonte de infecção no meio silvestre (Romero e Boelaert, 2010). Em áreas urbanas, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção para LV, contribuindo para que a enzootia canina preceda os casos humanos, tornando a infecção em cães mais prevalente que no homem (Belo *et al*, 2013). Alguns autores sugerem a transmissão entre os cães pela ingestão de carrapatos infectados, pela mordedura e pela ingestão de vísceras contaminadas, mas faltam evidências sobre a importância epidemiológica deste mecanismo de transmissão aos humanos ou sobre a manutenção da enzootia (Brasil, 2013b).

6.1 Transmissão sexual

A possibilidade de transmissão sexual de leishmaniose é descrita na literatura por algumas evidências. Um primeiro caso foi descrito na Grã-Bretanha em 1960. Com ausência de vetor, nenhum relatório de caso autóctone e residente em região livre da infecção, a esposa desenvolveu lesão nodular e ulcerativa na vulva com presença de macrófagos parasitados por *Leishmania* spp. O seu esposo era diagnosticado há anos e tratado para LV e, possivelmente, a infecção de sua esposa foi pela via sexual (Symmers e Belf, 1960). A transmissão sexual também tem sido sugerida pela presença de promastigotas em cultura de urina e fluido prostático de indivíduos com LV. São conhecidos relatos de transmissão entre relações heterossexuais e homossexuais, concomitantes à infecção por *Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Singh, 2006). Em, 1988, Rosenthal *et al*, descreveu a infecção por *Leishmania* spp. em indivíduo HIV positivo, com lesão retal grave e sem sinais de lesão cutânea ou visceral. Há relato de lesão ulcerativa nodular com presença de *L. infantum* no prepúcio de órgão genital masculino (Turchetti *et al*, 2014).

Em cães, a possibilidade de transmissão sexual é descrita por Riera e Valladares desde 1996. Três cães machos da raça Beagle foram infectados com formas de *L. infantum*, com confirmação da infecção por sorologia, por meio de exame direto e de cultura do aspirado de

linfonodos. O sêmen e a urina foram coletados, cultivados e conseguiu-se isolar o parasito. Diversos são os relatos na literatura de casos de infecção em cães, em que lesões genitais, encontro do parasito no sêmen e presença de ninhos de amastigotas nos órgãos sexuais são associados a LV (Diniz *et al*, 2005; Silva *et al*, 2008; Manna *et al*, 2012). Em experimentos com células germinativas de hamsters infectados com *L. donovani*, também, foi demonstrada degeneração testicular e presença de macrófagos e linfócitos, com formas amastigotas de *Leishmania* spp. (Gonzales *et al*, 1983).

Igualmente, a transmissão sexual de *T. cruzi* tem sido reportada desde sua descoberta. Carlos Chagas já havia anunciado a possibilidade de transmissão pela via sexual, e análises histopatológicas de cobaias infectadas pelo *T. cruzi* revelaram ninhos de amastigotas no túbulo seminífero e epidídimo (Vianna *et al*, 1911). Outras referências também relatam achados importantes que sugerem a via sexual como forma de infecção para o *T. cruzi*: Teixeira, Roters e Mott, 1970; Carvalho *et al*, 2009; Dias *et al*, 2011. Outro achado importante é o apresentado pela equipe do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC). Uma das linhas de pesquisa é a avaliação da possibilidade de transmissão sexual de tripanossomatídeos, detectando a presença do DNA nuclear do parasito em amostras de sêmen. Assim, o nDNA de *T. cruzi* foi pesquisado no sêmen dos mesmos indivíduos aqui estudados, que na sua maioria também eram assintomáticos para doença de Chagas. A porcentagem de infecção ativa apresentada foi de 83% (Pimentel, 2012).

A discussão sobre a transmissão sexual das leishmanioses e outros tripanossomatídeos vem sendo estudado há alguns anos, entretanto com poucos trabalhos na literatura. Algumas hipóteses são utilizadas para justificar essa via, como a anatomia dos testículos e a fisiologia do sêmen. Os testículos são considerados um local propício para reservas das formas de *Leishmania*, uma vez que esses realizam a proteção das células germinativas e são imunologicamente privilegiados. Esse tropismo é verificado nos cães, mas ainda pouco relacionado aos casos de LV humana. Apesar de na literatura haver um caso que descreve formas amastigotas de *Leishmania* spp. em macrófagos aspirados dos testículos de um garoto com leucemia linfoblástica (Benites *et al*, 2011; Manna *et al*, 2012).

A composição do sêmen humano se dá por uma mistura de espermatozóides dos testículos e fluidos das vesículas seminais, da próstata e das glândulas bulbouretrais. Apresenta pH de 7,2 a 8,0, que protege os espermatozóides do pH ácido da vagina. Na sua composição contém prostaglandina, frutose, colina, ácido cítrico, lipídios, creatinina, enzima hialuronidase e outras. O papel dessas substâncias tem se mostrado como fatores protetores e

auxiliares aos espermatozoides como fonte de energia e no processo de fertilização. Assim, o envolvimento genital durante a LV, pode resultar em derramamento de formas de *Leishmania* no sêmen, favorecendo a transmissão venérea da doença, tais como relatada em seres humanos e animais experimentais (Symmers e Belf, 1960; Spence, 1991; Silva *et al*, 2009). Situações que demonstram a necessidade de novas pesquisas para se verificar a importância epidemiológica da transmissão sexual na leishmaniose.

7. Manifestações clínicas

Os indivíduos infectados podem ser assintomáticos ou sintomáticos e as diversas manifestações clínicas associadas à LT ou à LV são observadas há anos em várias partes do mundo. A LT recebia diferentes denominações populares pela gravidade da lesão e permaneceu sem o conhecimento da etiologia por muito tempo. Assim, as lesões menos destrutivas eram conhecidas como uta, buba, úlcera de Baurú, ferida brava, botão do oriente, *forest yaws* entre outros, e as lesões mais destrutivas recebiam as denominações de espundia, nariz de tapir, tiacarana, gangosa e ferida esponjosa. Já a LV, no Brasil, era conhecida como barriga d'água, pela dilatação anormal do abdômen (Lainson, 2010).

A divisão para as diferentes manifestações clínicas da patologia agrupadas como LT são: cutânea, cutaneomucosa, difusa e cutânea disseminada *borderline*. Nestas os sintomas permanecem localizados na pele ou superfícies mucosas (Kaye e Scott, 2011). Para LV, as manifestações clínicas podem variar de assintomática a formas viscerais graves e dérmica pós-Kalazar, achado raro após o tratamento que apresenta sintomas na pele, mas não é considerado um tipo de LT (Belo *et al*, 2013).

7.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

No amplo espectro clínico e imunopatológico, a leishmaniose cutânea (LC) é a manifestação clínica mais frequente. A característica da lesão é exclusivamente cutânea, benigna e tende à cicatrização. São arredondadas, únicas ou em pequeno número, apresentando aspectos variados. Quando presente infecção secundária, tornam-se inflamadas, doloridas e com presença de pus (Brasil, 2013a). Encontram-se próximo ao local da picada, normalmente face, antebraço, pernas e regiões descobertas do corpo, evoluindo ao longo de semanas a meses. Alguns indivíduos podem chegar à cura espontânea ou, se causada por

espécies como *L. braziliensis*, *L. guyanensis* ou *L. panamensis*, pode ocasionar leishmaniose cutaneomucosa (McGwire e Satoskar, 2014).

As lesões cutâneas podem apresentar algumas diferenças dependendo da espécie que as causam. Lesões causadas por *L. braziliensis* e por outros subgêneros *Viannia* são ulceradas, com ligeira infiltração nas bordas e com poucos parasitos e macrófagos. Em contraste, os linfócitos são frequentes no infiltrado, apresentando características de granuloma epitelióide (Silveira, Lainson e Corbett, 2004). Já a lesão *L. amazonensis*, também, tem característica ulcerosa, mas com grande infiltração nas bordas (Silveira *et al*, 2009). A histopatologia da lesão por esta espécie apresenta denso infiltrado de macrófagos vacuolizados na derme, cheios de amastigotas, que dão ao infiltrado a aparência de granuloma macrofágico. Na LC, os amastigotas se reproduzem na derme e não são disseminados para além do local da picada do vetor. Em um pequeno número de indivíduos, além das lesões ulceradas, podem surgir lesões verrucosas, pápulas, nódulos e infiltrações na pele que levam a considerar a LC como uma doença polimórfica (Silveira, Lainson e Corbett, 2004).

A resposta imunológica se dá principalmente pela presença e pela ação dos linfócitos Timo-dependentes, T CD4⁺ e T CD8⁺, e pela produção de citocinas como Interferon- γ (IFN- γ), *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) e Interleucinas-12 (IL-12) e IL-2. Os linfócitos T CD4⁺ com perfil T auxiliar subtipo 1 - T *helper* (Th1), desempenham um papel importante na resistência do hospedeiro, já os T CD4⁺ subtipo 2 - T *helper* (Th2), estão associados à suscetibilidade da infecção. As respostas imunes para LC são representadas por Th1, com baixa quantidade de anticorpos e elevada produção de IL-10 (Ameen, 2010; Mendes *et al*, 2013). Os indivíduos apresentam boa resposta ao tratamento e positividade ao teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Dependendo da frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no infiltrado celular e do balanço da resposta Th1/Th2, a lesão pode espontaneamente ser curada ou progredir (Ameen, 2010).

7.2 Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM)

A leishmaniose cutaneomucosa (LCM) tem característica hiperérgico-pauciparasitário, com excessiva resposta celular anti-*Leishmania* e pela escassez de parasitos. As lesões apresentam úlceras infiltradas nas mucosas do nariz, face, septo nasal, pálpebras, afetando o sistema respiratório e a alimentação dos indivíduos (Silveira *et al*, 2009; McGwire e Satoskar, 2014). Alguns indivíduos apresentam lesões simultâneas na pele e em mucosas causadas mais

comumente pela espécie *L. braziliensis*, manifestando depois de meses ou anos após a primeira lesão cutânea (McGwire e Satoskar, 2014).

A resposta imune específica estimula uma atividade inflamatória intensa e crônica, mediante a ativação de linfócitos, a proliferação e a secreção de citocinas (Ameen, 2010). Na LCM, a resposta inflamatória é exacerbada em comparação com LC, resultando em aumento da severidade e destruição tecidual, com resposta Th1 e Th2, presença de anticorpos, difícil resposta terapêutica e positividade ao teste de IDR. São encontrados poucos parasitos nas lesões, o que dificulta o diagnóstico parasitológico. Também há uma elevada expressão de IL-17 e baixa produção de IL-10. E ainda que a resposta imune desenvolvida na LCM não seja capaz de controlar a infecção, pode ser muito provavelmente responsável pelas manifestações clínicas (Oliveira *et al*, 2014).

7.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

De forma rara e grave, alguns indivíduos, por causa idiopática ou má resposta ao tratamento, apresentam imunodeficiência à LC. Esses podem evoluir com ausência de resposta celular para antígenos de *Leishmania*, caracterizando assim uma nova manifestação clínica, LCD. Apresentam espectro anérgico-multiparasitário, onde a proliferação celular é associada à acentuada proliferação dos parasitos e à disseminação da infecção (Mendes *et al*, 2013).

A clínica inicia-se com uma pápula no local da inoculação que não apresenta ulceração, mas ocorrendo aparecimento de outras lesões semelhantes na vizinhança pela disseminação hematogênica do parasito após meses ou anos, surgindo lesões em várias partes do corpo: face (nariz, regiões malares, lábio superior, orelhas) e membros (braços, antebraço, pernas, pés), não afetando o couro cabeludo, regiões inguinocrurais, axiliares e palmares. A apresentação das lesões se dá como eritemas, pápulas, tubérculos, nódulos, infiltrações difusas e aspecto tumoral. A disseminação pode envolver extensas áreas do corpo e, quando presente na face, dá ao paciente aspecto leonino, lembrando a forma virchowiana da hanseníase. A espécie mais comum que causa esse tipo de manifestação é *L. amazonensis* e o vetor mais importante no continente americano é o *L. flascustellata*, inseto pouco antropofílico (Costa *et al*, 2009b; McGwire e Satoskar, 2014).

De curso crônico, a resposta imune resulta em imunossupressão específica, ocasionando hipossensibilidade celular, caracterizada pela expressão de Th2, altos níveis de anticorpos, elevada produção de IL-10, baixa produção de INF- γ , fraca ativação de

macrófagos parasitados, impossibilitando o controle da infecção. O que resulta no processo inflamatório desorganizado. Apresenta baixa resposta terapêutica, pela imunodeficiência específica e negatividade ao teste de IDR (Silveira, 2009).

7.4 Leishmaniose cutânea disseminada *borderline*

Observada desde 1986 e descrita clinicamente por Silveira em 2004, a manifestação clínica denominada “leishmaniose cutânea disseminada *borderline*”, constitui-se em uma forma indeterminada entre LC e LCD. Infecção com processo de disseminação rápida, que em dois a três meses, uma centena de pápulas (lesões acneiformes) e/ou lesões cutâneas ulceradas podem surgir com fundo granuloso e bordas elevadas. Pela histologia observa-se infiltração nodular de linfócitos e de células plasmáticas na derme, com raros macrófagos e poucos parasitos (Silveira, Lainson e Corbett, 2004; Silveira, Lainson e Corbett, 2005). As diferenças de lesões acontecem, dependendo da espécie que as causam: *L. amazonensis*, causa lesão infiltrada no dorso da mão (lesão primária), nas orelhas e na região frontal da cabeça (lesões secundárias); *L. braziliensis*, causa lesões de pele ulcerada, com pápulas disseminadas na face, nas orelhas, no tronco e nos braços. A resposta imune resulta em altos níveis de anticorpos e tratamento satisfatório apresentando resultado positivo ou negativo no teste de IDR (Silveira *et al*, 2009).

7.5 Leishmaniose Visceral (LV)

A LV é a forma mais grave da leishmaniose. As manifestações clínicas da doença variam de formas assintomáticas a graves com envolvimento visceral, sendo associadas com diferentes graus de metástase (Belo *et al*, 2013). Indivíduos que apresentam febre podem aumentar a resposta imune, pela migração de neutrófilos, células dendríticas, produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação de células Th1, mas com o aumento da febre aumenta também a produção de oxidantes pelas células fagocitárias. Contudo, as espécies viscerotrópicas apresentam resistência, como a *L. donovani*, a óxido nítrico e *L. major* a peróxidos de hidrogênio (McCall, Zhang e Matlashewski, 2013).

Neste tipo de manifestação clínica, a população de macrófagos difere da leishmaniose cutânea, as espécies viscerais infectam células de Kupffer, macrófagos do baço e medula óssea, com elevada produção de anticorpos. Difere também na estimulação da produção de IFN- γ , de citocinas e na ativação de linfócitos. Várias citocinas, quimiocinas e seus receptores estão presentes nessa infecção tanto em indivíduos sintomáticos e assintomáticos como: TNF-

α , IL-4, *Transforming Growth Factor* - Fator de Transformação de Crescimento (TGF- β), receptor de IL-2 e de quimiocina CXCR2. A resposta imune celular Th1 é necessária para controlar a infecção, e envolve a liberação de IL-12 pelas células apresentadoras de antígenos. A produção de IFN- γ resulta na ativação de macrófagos e na produção de óxido nítrico, um potente leishmanicida. Porém só a resposta Th1/IFN- γ não é suficiente para proteger contra a infecção, pois é observada uma elevada produção de IL-10 e IL-4, citocina imunossupressora que inibe funções imunitárias leishmanicidas (McCall, Zhang e Matlashewski, 2013).

Os indivíduos em tratamento desenvolvem pancitopenia, imunossupressão, tornam-se propensos a infecções microbianas e apresentam positividade ao teste de IDRM. Mesmo com terapia, alguns indivíduos chegam ao óbito e os indivíduos com coinfeção por HIV são susceptíveis a manifestações atípicas e maior severidade da doença (McGwire e Satoskar, 2014).

7.6 Leishmaniose dérmica pós-Kalazar (PKLD)

Determinados indivíduos tratados para LV permanecem assintomáticos por meses ou anos, porém posteriormente desenvolvem uma progressiva proliferação de parasitos na pele, ocasionando difusão macular, maculopapular ou lesão nodular (McGwire e Satoskar, 2014). Em vários casos de PKLD, parasitos ou antígenos de parasitos são observados em lesões e induzem a formação de infiltrado inflamatório, apresentando macrófagos, linfócitos e células plasmáticas. As células inflamatórias são principalmente CD3⁺ e IL-10, mas IFN- γ e IL-4 têm sido observadas nesse tipo de lesão (Mansueto *et al*, 2011). A patogênese desta manifestação não é totalmente compreendida, mas é relatada uma alta resposta imune do hospedeiro a partir da produção de IFN- γ contra os parasitos na derme (McGwire e Satoskar, 2014).

8. Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses é baseado em critérios epidemiológicos, manifestações clínicas e em testes laboratoriais (Tsukayama *et al*, 2013). A avaliação clínica e epidemiológica é importante, especialmente para indivíduos oriundos de áreas endêmicas ou que estiveram nessas áreas. Entretanto, deve-se ser complementada com o diagnóstico laboratorial, que envolve técnicas de detecção do parasito (método direto, histopatologia, cultura e inoculação em animais experimentais), testes de imunodiagnóstico (detecção de resposta imune celular, anticorpos e imunocomplexos) e técnicas moleculares (Neitzke-Abreu

et al, 2013; Pereira *et al*, 2013). Porém os métodos atualmente utilizados em laboratórios de rotina apresentam limitações, podendo assim interferir na melhor conduta de tratamento aos indivíduos (Souza *et al*, 2013).

A pesquisa direta parasito é o procedimento de primeira escolha por ser rápido, com menor custo e de fácil execução. Porém o encontro do parasito é inversamente proporcional ao tempo de evolução da lesão cutânea e quando presente infecções secundárias contribuem para diminuir a sensibilidade desse método. Para a realização da pesquisa direta podem ser utilizadas: escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa das lesões (Brasil, 2013a). A técnica de histopatologia é difícil de ser executada e contra indicada quando há infecções bacterianas secundárias, pelos riscos de bacteremia (Boggild *et al*, 2011). Requer conhecimento técnico, tem característica invasiva que provoca desconforto, pode gerar risco de hemorragias e infecções e, dependendo do número de parasitos, tem uma aplicação limitada pela não visualização do mesmo, apresentando assim baixa sensibilidade (Neitzke-Abreu *et al*, 2013; Tsukayama *et al*, 2013). Métodos de isolamento dos parasitos em cultura ou inoculação em animais podem ser utilizados, mas o desempenho destas técnicas depende da espécie de *Leishmania*. A utilização de animais pode ser mais dificultosa pelo tempo de observação clínica e pelos aspectos éticos envolvidos. Aos meios de cultura, podem ocorrer contaminações com bactérias, portanto, cultura e inoculação de animais não são métodos práticos para rotina laboratorial (Neitzke-Abreu *et al*, 2013).

Avanço importante nos últimos anos foi o desenvolvimento de métodos rápidos de diagnóstico, obtendo resultados em poucas horas ou até mesmo minutos. A maior parte desses métodos são baseados na detecção do complexo antígeno-anticorpo e outras técnicas amplamente utilizadas são as técnicas de biologia molecular. Diferentemente dos métodos imunológicos, os métodos moleculares, a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) e suas variações, identificam a molécula de DNA na amostra dos indivíduos. Entretanto, em muitos casos a detecção da molécula de DNA do microrganismo na amostra clínica não indica a confirmação de infecção (Cavalcanti, Lorena e Gomes, 2008).

O teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM) objetiva a visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. Tem grande importância diagnóstica, mas deve-se ressaltar que sua positividade pode não significar doença em atividade e sim que o indivíduo se expôs a antígenos do parasito. A IDRM geralmente persiste como positiva após o tratamento ou durante a cicatrização da lesão cutânea tratada ou curada espontaneamente. O teste pode apresentar-se como negativo nos indivíduos fraco-reativos e também nos precocemente tratados. Sua positividade também pode ser interpretada como alergia ao

diluinte do teste ou reação cruzada por outras infecções como, doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose e cromomicose (Brasil, 2013a).

Os testes sorológicos são rotineiramente realizados, por serem de fácil execução, com baixo custo, principalmente utilizados para inquéritos epidemiológicos. A Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) é utilizada desde a década de 1960 e indicada pelo Ministério da Saúde (MS) para diagnóstico e para levantamento epidemiológico de leishmaniose. Teste baseado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* usando formas promastigotas que detecta anticorpos nos primeiros estágios de infecção. Apresenta elevada sensibilidade, mas podem ocorrer reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi* devido a proximidade filogenética entre os parasitos (Luciano *et al*, 2009).

A busca de um método simples, mas sensível para a detecção de antígenos ou anticorpos específicos, resultaram na década de 70 no desenvolvimento de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* - Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzimas (ELISA). Também é baseado na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* ou antígenos, adicionado com um substrato da enzima cromógeno, os resultados são expressos por absorbâncias obtidas em espectrofotômetro (Cavalcanti, Lorena e Gomes, 2008). Técnica de diagnóstico mais amplamente utilizada para o diagnóstico de leishmaniose, realizada em laboratórios de rotina, requer equipamentos simples e apresenta-se como uma técnica com alta sensibilidade, porém com baixa especificidade na detecção de anticorpos (Neitzke-Abreu *et al*, 2013; Souza *et al*, 2013). A metodologia da técnica pode ser adaptável para uso com diferentes antígenos como, antígeno solúvel, purificados, recombinantes ou sintéticos (Singh, 2006). Os testes sorológicos distinguem a infecção passada da recente, entretanto, o resultado pode apresentar reação cruzada com antígenos de *Trypanosoma sp.*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Toxoplasma sp.* Outra limitação do teste se dá pela variabilidade de resposta imune do hospedeiro, pois os títulos de anticorpos podem variar de acordo com as espécies infectantes (Shirian *et al*, 2014).

Na manifestação clínica da leishmaniose, grande parcela dos indivíduos apresenta-se como assintomáticos e o diagnóstico diferencial é crucial, principalmente em áreas endêmicas. A técnica de PCR é um poderoso método de validação dos testes sorológicos. Esta foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 1980, apresenta alta especificidade que permite amplificar sequências de DNA e RNA por repetitivos ciclos *in vitro*, com metodologia que se assemelha ao que ocorre *in vivo* durante a replicação de DNA, possibilitando seu uso para a detecção e para identificação de espécies de *Leishmania* (Hernández-Rodríguez e Ramirez, 2012). Técnica muito utilizada por apresentar, além de alta especificidade, sensibilidade,

versatilidade e rapidez, sendo realizada a partir de amostras de cultura, de lesão, de sangue e de DNA flebotômicos (Neitzke-Abreu *et al*, 2013). O isolamento e a amplificação de DNA do parasito em sangue periférico e em biópsias de lesão são alternativas para o diagnóstico, permitindo detectar pequenas quantidades de parasitos nos tecidos sem passar pelo cultivo (Pereira *et al*, 2013). O método de PCR é amplamente utilizado, mas para fins de pesquisa. No entanto, na rotina laboratorial ainda é pouco difundido, mesmo acrescentando mais especificidade ao diagnóstico convencional (Brasil, 2013a).

A escolha dos *primers* utilizados na reação de PCR influencia na sensibilidade da técnica e permite diferenciar espécies dos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (Neitzke-Abreu *et al*, 2013). A identificação da espécie de *Leishmania* é importante para determinar a terapêutica apropriada, medidas de controle em estudos epidemiológicos e prever riscos de disseminação a pacientes imunocomprometidos (Khosravi, 2012). Modificações e novas amplificações a partir da PCR objetivam tornar o diagnóstico ainda mais específico, como: Nested PCR, PCR quantitativa, amplificação de rRNA, Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6pd), β -tubulina, GP63, proteína de choque térmico 70 (HSP70) e minicírculos de DNA do cinetoplasto (kDNA) (Silva *et al*, 2012).

A PCR dirigida para amplificação da região espaçadora do gene de RNA Ribossomal (rRNA ITS1) é um dos métodos mais utilizados para o diagnóstico e para a identificação de espécies de *Leishmania*. Amplamente utilizada, a PCR para amplificação de minicírculos de kDNA e digestão de *amplicons* de ITS1, utilizando enzimas de restrição *HaeIII*, possibilita distinguir as espécies de *Leishmania*. A técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP) baseia-se na restrição de um fragmento de DNA por endonucleases que clivam a molécula em sítios específicos, resultando em perfis de restrição. A análise da expressão e da distribuição de HSP70 apresenta resultados promissores para a identificação de espécies de *Leishmania* spp. (Graça *et al*, 2012). Outras PCRs que codificam genes específicos também são descritos, como para o antígeno K26 e para o gene GP63 (Guerbouj *et al*, 2001; Haralambous *et al*, 2008).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que apresentam o diagnóstico molecular por PCR como o mais específico para infecções causadas por leishmaniose. Contudo, se a PCR irá substituir totalmente os outros testes diagnósticos, considerados padrão ouro como a demonstração do parasita e detecção sorológica é um questão controversa. Uma primeira discussão seria que o método de PCR detecta o DNA do parasito e não

necessariamente a doença. Portanto, mesmo apresentando vantagens, mas também limitações, o diagnóstico molecular por PCR apresenta-se como um método de diagnóstico confirmatório para as outras metodologias (Assis *et al*, 2010; Srivastava *et al*, 2011).

9. Tratamento e vacinas

As medidas de controle adotadas pelo MS prezam o diagnóstico, tratamento precoce dos casos humanos, a vigilância entomológica e de reservatórios, contudo as leishmanioses continuam em expansão pelas dificuldades e limitações de execução destas medidas (Coimbra *et al*, 2013). As leishmanioses são doenças negligenciadas, que dispõem de tratamento quimioterápico com severa toxicidade e crescente número de parasitos resistentes (Kumar e Engwerda, 2014). No Brasil, os componentes antimoniais, na forma de sais trivalentes, foram utilizados pela primeira vez utilizados por Gaspar Vianna, em 1912 (Furusawa e Borges, 2014).

O medicamento de primeira escolha são os Antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), porém a resistência parasitária tem limitado o seu uso (Kumar e Engwerda, 2014; McGwire e Satoskar, 2014;). A atividade leishmanicida é demonstrada pela indução de resposta pró-inflamatória com maior produção de fagócitos e com produção de TNF- α , controlando assim a patologia (Melo e Fortaleza, 2013). Os compostos podem ser administrados pelas vias intravenosa e intramuscular e na própria lesão para LT cutânea (McGwire e Satoskar, 2014). O efeito cardiotoxico, nefrotóxico, hepatotóxico e pancreatotóxico do medicamento exige seu uso com cautela (Sampaio, Lucas e Filho, 2009).

A Anfoterecina B é considerada uma segunda linha de tratamento, com excelente atividade leishmanicida esse ligando-se ao ergosterol da membrana plasmática do parasito, causa instabilidade (Lima *et al*, 2007; McGwire e Satoskar, 2014). Apresenta taxas de 90 a 95% de cura e similar aos Antimoniais, estimula reposta imune modulatória, com regulação e proliferação de células T e produção de citocinas pró-inflamatórias, mas também é associada à resistência parasitária (Melo e Fortaleza, 2013; Kumar e Engwerda, 2014). As fórmulas lipídicas de Anfotericina B atuam de forma eficiente, aumentando a segurança no tratamento de LCM e LV. São envolvidos por lipossoma unilamellar ou incorporados em um complexo lipídico. As formulações têm baixa nefrotoxicidade, podendo assim ser administradas em doses altas por curto tempo (Lima *et al*, 2007).

As Pentamidinas são diamidinas aromáticas e sua atuação anti-microbiana não é totalmente conhecida, sabe-se que interfere na biossíntese de macromoléculas de DNA, RNA, fosfolípidios e proteínas, porém, são relatadas reações adversas, como: hipoglicemia ou piora de diabetes, ou ambas, alteração de enzimas do fígado, leucopenia, anemia, efeito nefrotóxico, cardiotoxíco e hipotensão (McGwire e Satoskar, 2014). Bons resultados com o uso de Isotionato de Pentamidina são observados em indivíduos acometidos de LT cutânea causada por *L. guyanensis* e *L. amazonensis* na região Amazônica, uma vez que estas espécies têm apresentado insucesso com Sb⁺⁵ (Costa *et al*, 2009a).

A vacinação seria a melhor profilaxia para as leishmanioses. Apesar das diferentes espécies envolvidas, a análise genômica indica um elevado grau de sequências homólogas entre essas, comprovando que a produção de vacinas para as diferentes manifestações clínicas podem ser desenvolvidas (Kumar e Engwerda, 2014). Várias estratégias de vacinação têm sido empregadas com utilização de: parasitos vivos, atenuados, antígenos recombinantes, expressão de antígeno, DNA, baseada em células dendríticas, vírus, saliva do flebotomíneo entre outras (Tavares *et al*, 2009; Maroof *et al*, 2012).

Aos cães com LV o tratamento medicamentoso não é recomendado no Brasil, este tem baixa eficácia, induzindo a remissão temporária dos sinais clínicos, mas não prevenindo a ocorrência de recidivas e podem desenvolver parasitos resistentes. O MS recomenda a prática da eutanásia a todos os animais soropositivos e/ou com parasitológico positivo (Fernades *et al*, 2013). A vacinação aos cães é a mais apropriada profilaxia, no Brasil existem duas vacinas: Leishmune[®] e Leish-Tec[®]. Estes imunizantes apresentaram ensaios em animais, estudos comprovados e em andamento que permitiram em 2003 e 2006 respectivamente, o registro dos produtos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2009).

A eficiência de qualquer vacina depende de muitos fatores, interações específicas antígeno-anticorpo, disparo e manutenção de resposta imune mediada por células T específicas, a compreensão da imunobiologia de interação entre parasito e hospedeiro, a seleção de vacina apropriada com ou sem adjuvantes e a promoção da imunidade por longo prazo. Assim, todo conhecimento desenvolvido nos últimos anos sobre as leishmanioses têm solidificado as pesquisas em busca do melhor tratamento e da profilaxia da patologia (Kumar e Engwerda, 2014).

II. JUSTIFICATIVA

As doenças causadas por tripanossomatídeos constituem importante problema de saúde pública em vários países, principalmente no continente americano. Na região Amazônica do Brasil, em particular no estado do Pará, as leishmanioses e a doença de Chagas compartilham uma área de transmissão comum, o que leva frequentemente à presença de infecções mistas e assintomáticas. A ocorrência de infecções mistas causadas por tripanossomatídeos foi identificada na população do estudo, mediante resultados obtidos por teste sorológico ELISA destes indivíduos. Resultados da tese de doutorado da aluna Perla Fabíola de Araújo (2012), conduzido pelo Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC/UnB), com objetivo de realizar o estudo genético, imunológico e parasitológico de infecções causadas por *T. cruzi*, de interesse o estudo também possibilitou identificar a presença de anticorpos anti-*Leishmania* spp. em 50% das amostras da população estudada. Essas famílias foram selecionadas pela Secretaria de Saúde do Estado do Pará, como portadores da doença de Chagas. Com o conhecimento de que os testes sorológicos podem apresentar resultados falso-positivos, em decorrência das reações cruzadas, especialmente no caso das infecções por *T. cruzi* e *Leishmania* spp., há necessidade de validação por outros testes de diagnóstico. Adicionalmente, o aluno de mestrado Carlos Fernando Pimentel (2012), com o objetivo de avaliar a herança e integração de sequências de minicírculos de kDNA identificou a presença de DNA de *T. cruzi* no sêmen de indivíduos infectados. A presença do DNA nuclear do parasito no sêmen é um indicativo da possibilidade de transmissão sexual do parasita e, há poucos relatos na literatura em relação à transmissão sexual de leishmaniose; assim como não há muitos estudos a respeito das infecções mistas por tripanossomatídeos na região Amazônica. Diante do exposto, surgiu o interesse de ampliar a pesquisa científica conduzida na população de indivíduos residentes na Amazônia brasileira com o interesse de identificar a presença dessas infecções mistas e realizar a pesquisa de DNA de *Leishmania* spp. em amostras de sangue e em esperma desses indivíduos.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo geral

O objetivo principal desta dissertação foi realizar o diagnóstico molecular para leishmanioses, identificando a presença de DNA nuclear de *Leishmania* spp. em amostras de sangue e esperma de indivíduos residentes em municípios do estado do Pará, Amazônia brasileira.

2. Objetivos específicos

- Identificar as espécies de *Leishmania* presentes nos indivíduos estudados a partir do sequenciamento dos produtos amplificados;
- Analisar a presença de infecção mista por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na população estudada mediante comparação dos resultados obtidos no diagnóstico molecular e sorológico;
- Investigar a possibilidade de transmissão sexual da leishmaniose através da detecção de DNA nuclear de *Leishmania* spp. no esperma.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Desenvolvimento do estudo

O estudo foi desenvolvido com 157 amostras, 108 amostras de sangue e 31 amostras de esperma pertencentes a quatro famílias, e 18 amostras de esperma de indivíduos apresentados como casos avulsos, procedentes aos municípios de Barcarena e de Breves, no estado do Pará. Os indivíduos na maioria eram assintomáticos para doença de Chagas e leishmaniose, exceto 21 indivíduos portadores de doença de Chagas aguda. Todos aderiram à pesquisa voluntariamente de acordo com as normas do Comitê de Ética de Pesquisa com Seres Humanos, com aprovação firmada por assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Hospital de Clínicas Gaspar Vianna - CONEP/FHCGV, sob o registro nº 054/2009 em 21 de maio de 2009 (Anexo B), Comissão Nacional de Ética em Pesquisa nº 262390 (Anexo C) e Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina/UnB, nº 25000.167567/2004-28.

2. Descrição dos municípios

As coletas das amostras de sangue e de esperma foram realizadas entre os anos de 2009 e 2010 nos municípios de Barcarena e de Breves pertencentes ao estado do Pará, região norte do Brasil.

2.1 Barcarena

O município de Barcarena, pertence à mesorregião metropolitana e à microrregião de Belém, situado a 30 Km em linha reta e 115 Km por condução da capital paraense com acesso fluvial e rodoviário. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 2014, a população estimada em 2013 era de 109.975 habitantes, ocupando uma área de 336 Km². A sede municipal apresenta as coordenadas geográficas: 01° 30' 24 "de latitude Sul e 48° 37' 12" de longitude a oeste de Greenwich, os limites territoriais são: ao norte, Baía de Guajará e município de Belém, ao sul, municípios de Moju e de Abaetetuba, ao leste, Baía de

Guajará e município de Acará e ao oeste Baía do Marajó. As principais atividades econômicas do município são: comércio, extração de madeira, minério, pesca, pecuária e turismo (Pará, 2013a).

2.2 Breves

O município de Breves pertence à mesorregião de Marajó e à microrregião de Furos de Breves, situado a 222 Km da capital Belém e parte integrante do Arquipélago do Marajó. Com população estimada de 96.444 habitantes em 2013 e ocupando uma área de 513 Km² (IBGE, 2014). A sede municipal apresenta as coordenadas geográficas: 01° 40' 57" de latitude Sul e 50° 28' 48" de longitude a Oeste de Greenwich, os limites territoriais são: ao norte, municípios de Afuá e de Anajás, ao sul, municípios de Melgaço e de Bagre, ao leste, municípios de Anajás, de Currálinho e de São Sebastião da Boa Vista e, ao oeste, municípios de Melgaço e de Gurupá. As principais atividades econômicas do município são: agricultura, extrativismo, pecuária e turismo (Pará, 2013b). A localização geográfica dos municípios e a distribuição das famílias são apresentadas na Figura 4.



Figura 4: Localização dos municípios estudados e distribuição das famílias. Foto por satélite da região do estuário do rio Amazonas, destacando os municípios de Breves no Arquipélago do Marajó e de Barcarena, estado do Pará, com a distribuição das famílias pertencentes a cada município. Fonte: Laboratório de Geociências do Instituto Evandro Chagas/PA.

3. Descrição dos participantes do estudo

Foram estudados 108 indivíduos, pertencentes a quatro famílias, indivíduos autóctones do estado do Pará. Três famílias (A, B e C) oriundas do município de Barcarena e uma família (D) oriunda do município de Breves. As amostras de sangue das famílias A, B e C foram

coletas entre os anos de 2009 a 2010, dois anos após a suspeita de contaminação oral por *T. cruzi* e os casos diagnosticados por doença de Chagas aguda foram tratados com Benzonidazol. As amostras da família D foram coletadas na fase aguda da doença de Chagas em 2010, enquanto os indivíduos ainda recebiam tratamento com Benzonidazol. As amostras consideradas como casos avulsos foram coletadas de indivíduos que não pertenciam às famílias, mas residentes na mesma região e que apresentavam sintomatologia consistente com doença de Chagas. O número de amostra de sangue e esperma pertencentes a cada família e aos casos avulsos é discriminado na Figura 5.

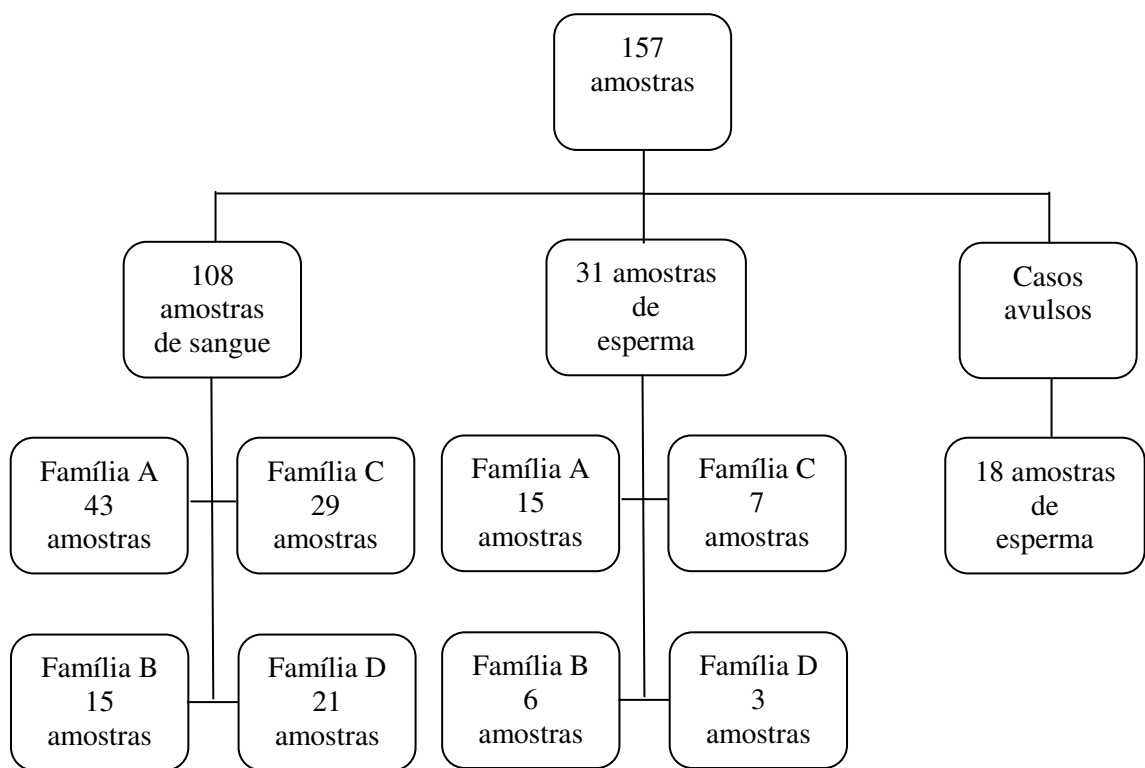


Figura 5: Distribuição das amostras de sangue e esperma pertencentes a cada família e aos casos avulsos estudados. O fluxograma apresenta a quantidade de amostras de sangue e esperma pertencente a cada uma das quatro famílias e a quantidade de amostra de esperma pertencente aos casos avulsos.

Como controle negativo, foram coletadas amostras de sangue e esperma de indivíduos sem infecção chagásica e leishmaniótica, provenientes de região não endêmica. Os controles apresentam hemaglutinação, IFI e ELISA, negativos para antígenos de *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

4. Coleta das amostras

Cada participante voluntário foi devidamente cadastrado e identificado com um código de registro específico e individual do laboratório. A coleta de material biológico foi realizada nas residências das famílias pelas Dr^{as}. Adriana Benevides e Perla Araújo pesquisadoras do LMPDC. De cada indivíduo coletou-se 15 a 16 mL de sangue por punção venosa em quatro tubos BD VACUETTE[®], contendo 7,2 mg de *Ethylenediaminetetraacetic Acid* (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) K2 jateado na parede interna e 4 mL de sangue em tubos BD Vacutainer[®] SST[®] II Advance[®] com ativador de coágulo jateado na parede do tubo e gel separador para obtenção de soro. As amostras de esperma foram coletadas em preservativo anticoncepcional de látex, resultando de 2 a 3 mL. Todo o material biológico foi transportado para o LMPDC/UnB para realização dos testes laboratoriais.

5. Extração de DNA

5.1 De células do sangue periférico de humanos

Todas as extrações para obtenção de DNA foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russel, 2001, proporcionando a obtenção de amostras com qualidade e integridade. Os procedimentos foram realizados pelas Dr^{as}. Nadjar Nitz, Perla Araújo e pelo MsC. Carlos Fernando Pimentel, todos os pesquisadores do LMPDC.

Inicialmente, os leucócitos foram separados por gradiente de Ficoll-Paque[™] Plus (GE Healthcare), com centrifugação a 5.000 rotações por minuto (rpm) por 30 minutos à temperatura ambiente. A fração obtida foi lavada uma vez com *Phosphate Buffered Saline* – Tampão de Fosfatase Salina (PBS) 1X pH 7,4 (3,2 mM de Fosfato Dissódico (Na₂HPO₄), 0,5 mM Fosfato Monopotássico (KH₂PO₄), 1,3 mM de Cloreto de Potássio (KCl) e 135 mM NaCl) a 5.000 rpm por 15 minutos à temperatura ambiente, sendo obtido um sedimento de células ressuspenso em tampão de extração (1mM *Hydroxymethyl Aminomethane* – Hidroximetilaminometano (Tris) Ácido Clorídrico (HCl) pH 8,0, 0,1M EDTA pH 8,0 e *Sodium Dodecyl Sulfate* - Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 0,5%) com proteinase K (100 µg/mL). O material foi incubado a 37 °C por 12 horas. O material obtido foi submetido à extração por duas vezes com igual volume de Clorofane (fenol : clorofórmio : álcool

isoamílico, na proporção de 25 : 24 : 1) e uma vez com igual volume de Clorofil (clorofórmio : álcool isoamílico, na proporção de 24 : 1). A separação das fases orgânicas foram obtidas por centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Para precipitação do DNA, transferiu-se o sobrenadante para um novo falcon contendo 10 mL de Etanol 100% gelado e acondicionado por 12 horas a -80 °C. Após, o DNA foi sedimentado por centrifugação a 14.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o *pellet* submetido a duas lavagens com Etanol 70% gelado. O Etanol foi aspirado e o *pellet* acondicionado em capela de fluxo. Após 24 horas, com o *pellet* seco, foi ressuspensão em 500µL de tampão Tris-EDTA (TE) (10M Tris-HCl pH 8,0 e 1M EDTA pH 8,0) e 1µL de Ribonuclease (RNase) 200µg/mL, ficando incubados a 37 °C por 24 horas. O DNA resultante foi quantificado, etiquetado e estocado a - 20 °C.

5.2 De esperma

As extrações a partir do esperma foram realizadas, seguindo a metodologia descrita por Carter, Robertson e Kempnaers, 2000. Os espermatozoides ressuspensos em PBS foram centrifugados a 13.000 x giros por 15 minutos. Ao sedimento foi adicionado 3 mL de tampão de extração (10 mM Tris, 10 mM de Cloreto de sódio (NaCl), 20 mM EDTA, 1% SDS, 0,04 % proteinase K e 1% Dithiothreitol-DTT), homogeneizado por inversão e incubado por duas horas a 55 °C. A extração de DNA seguiu a metodologia de Clorofil : Clorofane descrito no item acima. Ao final do procedimento, o DNA foi quantificado, etiquetado e estocado a - 20 °C.

5.3 De formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*

Alíquotas de DNA genômico de *L. amazonensis* e *L. infantum*, para controle positivo nas reações de PCR, foram obtidas de formas promastigotas dos estoques de cada um desses protozoários cultivados no LMPDC. Essas foram crescidas em meio de cultura Difco™ Liver Infusion Broth e coletadas por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, lavados duas vezes com *Tris Buffered Saline* – Solução Salina Tamponada com Tris (TBS) (20 mM Tris-HCl pH 7,2 e 0,5 NaCl), nas mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspensão em tampão de extração (1mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1M EDTA pH 8,0; SDS 0,5%) com proteinase K (100 µg/mL), ficando incubado a 37 °C por 12 horas. Após a incubação, a extração de DNA seguiu a metodologia descrita por Sambrook e Russel, 2001, Clorofil : Clorofane como já descrito. Para precipitação do DNA, foi utilizado 2,5 V de Etanol 100% gelado e 1/10 V de Acetato de Sódio 3,0 M, pH 4,7. Após, o DNA foi sedimentado por

centrifugação a 14.000 rpm por um minuto à temperatura ambiente, o sobrenadante descartado e o *pellet* submetido a duas lavagens com Etanol 70% gelado. O Etanol foi aspirado e o *pellet* acondicionado em capela de fluxo. Após 24 horas o *pellet* seco foi ressuspenso em 500µL de tampão TE (10M Tris-HCl pH 8,0 e 1M EDTA pH 8,0) ficando incubado a 37 °C por 24 horas. O DNA resultante foi estocado a - 20 °C (Hecth *et al*, 2010).

5.4 Reextração de células do sangue e de esperma

Para realização deste trabalho todas as amostras de DNA foram novamente avaliadas quanto à concentração e qualidade exigidas para a reação de PCR, assim algumas amostras necessitaram ser reextraídas. O procedimento de reextração foi realizado com o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega e ao final do procedimento as amostras foram incluídas no estudo.

A reextração foi iniciada com a precipitação de possíveis proteínas existentes na amostra. Ao volume de ~ 300µL foi adicionado 100µL de *Protein Precipitation Solution* e homogeneizado no vórtex por 20 segundos. Após, foi centrifugado a 2.000 × giros por 10 minutos. O passo seguinte foi a precipitação do DNA e reidratação do DNA. O sobrenadante foi transferido para um novo *ependorf* de 1,5 mL contendo 300µL de Isopropanol e homogeneizado por inversão, verificando a precipitação de novelos de DNA. Seguiu-se com uma centrifugação a 2.000 × giros por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de Etanol 70% para lavagem do *pellet*, invertendo o tubo algumas vezes e centrifugado a 2.000 × giros por 1 minuto. O Etanol foi aspirado e o *pellet* acondicionado em capela de fluxo. Após 24 horas, com o *pellet* seco, foi ressuspenso em 250µL de tampão TE (10M Tris-HCl pH 8,0 e 1M EDTA pH 8,0) e 1µL de RNase (200µg/mL), ficando incubados a 37 °C por 24 horas. O DNA resultante foi quantificado, etiquetado e estocado a - 20 °C.

6. Quantificação e análise do DNA extraído

As amostras de DNA foram quantificadas em NanoVue Espectrofotômetro (GE) com 3µL de DNA. A integridade do DNA foi realizada pelo teste de PCR específico para o gene constitutivo β-actina e visualizada em gel de agarose a 0,8% corado com Brometo de Etídeo a 0,5mg/mL, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris acetato 90mM pH 8,0 e EDTA 25 mM).

7. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Com objetivo de detectar a presença do DNA nuclear de *Leishmania* spp. no material genético extraído de cada voluntário, foram realizadas PCRs em triplicata, utilizando como marcador molecular *primers* gênero-específicos que amplificam uma sequência nuclear do parasito.

7.1 Amplificação do DNA nuclear (nDNA) de *Leishmania* spp.

A aplicação da reação de PCR com marcador molecular específico para a detecção do nDNA do parasito visa verificar a presença da infecção pelo protozoário. Para amplificação de nDNA de *Leishmania* spp. utilizou-se *primers* *Ribossomal RNA Internal Transcribed Spacer 1* que amplificam a região espaçadora do gene de RNA ribossomal (rRNA) ITS1 (El Tai *et al*, 2000). LITSR - 5' CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3' e L5.8S - 5' TGA TAC CAC TTA TCG CAC TT 3'. Os produtos amplificados pelos *primers* são de aproximadamente 330 pares de base (pb). A amplificação dessa região do nDNA do parasito requer 200ng do DNA molde humano e reagentes nas seguintes condições: tampão de reação 1 X (20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl) e 1 mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂); 0,25µM de cada *primer*, 0,2 mM de dNTPs e 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Invitrogen/Life Technologies/Brazil). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador modelo My Cycler™ da BioRad com a seguinte padronização: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos, extensão a 72 °C por 30 segundos; uma extensão final a 72 °C de 5 minutos e 4 °C por tempo ∞.

7.2 Reamplificação do produto de PCR

Com objetivo de aumentar a quantidade de produto amplificado das amostras para envio ao sequenciamento, foi realizada a reamplificação dos produtos de PCR. A dupla amplificação foi realizada, com todas as amostras. O produto da primeira PCR foi diluído 1:10 e com 2µL da diluição realizou-se a segunda PCR, utilizando os mesmos *primers*: LITSR e L5.8S, reagentes e padronização de amplificação nas mesmas condições. Em todas as triplicatas e reamplificação das PCRs de nDNA foram utilizadas amostras controles para dar validade e confiabilidade aos testes. Quatro controles foram utilizados: branco, onde o DNA molde foi substituído por H₂O, controle negativo DNA de indivíduo sem infecção e

dois controles positivos 100pg de DNA purificados de cultura de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0%, corado com Brometo de Etídeo a 0,5mg/mL, utilizando tampão TAE 1X (Tris acetato 90mM pH 8,0 e EDTA 25mM). Os produtos de PCR foram confirmados pela técnica de *Southern blot*, mediante transferência para membrana de *nylon* e posterior hibridização com sonda específica marcada por quimioluminescência.

8. Transferência dos produtos de PCR para membrana de nylon

Após a realização das etapas de amplificação e de separação eletroforética, os produtos de PCR foram transferidos do gel de agarose para uma membrana de *nylon* carregada positivamente (Amersham HybondTM - N+, GE Healthcare) pelo método de transferência por capilaridade (Sambrook & Russel, 2001). O gel de agarose, contendo DNA, foi desnaturado em solução de Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,4 M por 20 minutos. O processo de transferência ocorreu durante 12 horas, após as membranas foram retiradas e secas em estufa a 37 °C, para fixação do DNA. A hibridização das membranas foi realizada com sonda específica marcada por quimioluminescência.

9. Sonda de quimioluminescência

Todos os produtos de PCR transferidos para membrana de *nylon* foram submetidos à hibridização com sonda de quimioluminescência, de acordo com as recomendações do fabricante (Kit Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System, GE Healthcare), para avaliar a especificidade dos *amplicons*. A sonda utilizada foi obtida mediante a purificação do produto de 330pb resultante das amplificações do DNA extraído de cultura de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

9.1 Marcação da sonda

O procedimento de marcação da sonda obedeceu ao protocolo do fabricante: são utilizados 10µL do DNA molde na concentração de 10ng/µL, que deve ser desnaturado por

cinco minutos a 100 °C em *ependorf*. Ao término da desnaturação, este foi imediatamente colocado no gelo por cinco minutos e depois centrifugado. Ainda no gelo, foram acrescentados 10µL de tampão de reação e homogeneizado vagarosamente, 2µL do reagente de marcação seguido de homogeneização, 10µL de Cross-Linker Solution diluído (20µL da Cross-Linker Solution em 80µL de água Milli-Q) e homogeneizado vagarosamente, seguido de *spin*. A reação foi incubada por 30 minutos a 37 °C. O volume final foi de 32µL e ao término do tempo de incubação pôde ser usada imediatamente ou estocada em 50% de glicerol a - 20°C.

9.2 Hibridização com sondas de quimioluminescência

Antes da hibridização, as membranas de *nylon* contendo DNA foram bloqueadas com solução de pré-hibridização (tampão de hibridização, 0,5M NaCl e solução de bloqueio a 4%) em cilindro giratório a 65 °C por 2 horas. Após esse período, as sondas de quimioluminescência foram aquecidas a 60 °C por 15 minutos e acrescentada à solução de pré-hibridização na concentração de 5 ng/mL. Foram utilizadas duas sondas, 64µL a cada 100 mL de solução de pré-hibridização. A hibridização ocorreu a 65 °C por 12 horas sobre giro constante. O passo seguinte à hibridização foi a sequência de lavagens que a membrana foi submetida. Após retirar a solução com a sonda, foram realizadas lavagens para remoção da sonda ligada de forma inespecífica, duas lavagens com solução I (2 M Uréia, 0,1% SDS, 50 mM de Fosfato de Sódio pH 7,0, 150 mM de NaCl, 1mM de MgCl₂ e 0,2% Reagente Bloqueador) a 65 °C por 10 minutos cada. Em seguida mais duas lavagens sequenciais à temperatura ambiente com solução II (1 M Tris e 2mM de MgCl₂) por cinco minutos cada.

9.3 Detecção e geração de sinal de quimioluminescência

Após as lavagens as membranas foram incubadas com o reagente de detecção CPD-StarTM Detection Reagent por cinco minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Transcorrido o tempo foi retirado o excesso de solução e as membranas foram revestidas com filme plástico, fixadas em cassete metálico e expostas a filme sensível de Raios X (Kodak T-MAT) à temperatura ambiente por quatro horas. Passado esse período, a revelação dos filmes foi realizada em sala escura com soluções comerciais de revelação e fixação da Kodak.

10. Purificação de DNA em gel de agarose

A purificação de DNA em gel foi realizada de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare).

Após visualização e correta identificação dos produtos de PCR em gel de agarose através do transluminador, a agarose contendo os *amplicons* foi cortada com o auxílio de uma lâmina de bisturi nova e acondicionada em *ependorfs* de 1,5 mL. As bandas foram pesadas e foi adicionado o tampão de captura tipo 3 (*Capture buffer type 3*) na proporção de 10 μ L para cada 10 mg de gel; misturado por inversão e incubado a 60 °C por 10 minutos ou até que a agarose estivesse completamente dissolvida. Em seguida, foi adicionado 600 μ L do mix tampão de captura 3 e amostras à coluna GFX Microspin já encaixada no tubo coletor. Após 60 segundos de incubação à temperatura ambiente, foi centrifugado a 16.000 x giros durante 30 segundos e as amostras com um volume maior que 600 μ L foram passadas duas vezes na coluna. O líquido obtido no tubo de coleta foi descartado e a coluna colocada novamente dentro do tubo. Foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem tipo 1 (*Wash buffer type 1*) e centrifugado por 16.000 x giros durante 30 segundos. Após a centrifugação, o tubo de coleta foi descartado e a coluna, seca à temperatura ambiente por cinco minutos, foi transferida para um novo *ependorf* de 1,5 mL. Foram adicionados 30 μ L de tampão de eluição tipo 6 à coluna e incubado por 60 segundos à temperatura ambiente, seguida por nova centrifugação a 16.000 x giros durante 60 segundos. O DNA purificado, o que passou na coluna, foi quantificado em NanoVue Espectrofotômetro (GE) com 2 μ L de DNA e guardadas a - 20°C.

11. Sequenciamento dos produtos de PCR e análise das sequências

Os produtos de PCR purificados foram sequenciados comercialmente pelo Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo para a identificação das espécies de *Leishmania*. As reações foram processadas em tubos de *ependorf* de 0,2 mL contendo 5 μ L de DNA e 2,5 μ L de cada *primer* (LITSR e L5.8S). A concentração do produto estava conforme exigido pelo sequenciador de 15 a 20ng/ μ L, valor estipulado pelo tamanho do produto final da PCR ~330pb. A análise das sequências obtidas foi realizada pelo algoritmo BLASTn disponível no site do National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

12. Teste sorológico

Para confirmação da presença de anticorpos contra antígenos de *Leishmania*, foi utilizado o teste de ELISA com Antígenos Solúveis de *Leishmania* (SLA) para anti-Imunoglobulina G (IgG), de acordo com técnicas padronizadas por Vexenat, 1993 e Lauria-Pires, 2000. Procedimentos realizados pela pesquisadora Dr^a. Perla Araújo.

12.1 Preparo de antígenos para o teste ELISA

A coleta das formas promastigotas de *L. braziliensis* foi realizada por centrifugação a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C, lavadas três vezes com PBS pH 7,4 por igual período e ressuspensas em 2 mL de água Milli-Q. Em seguida, os parasitos foram submetidos a três ciclos de congelamento a -20 °C/descongelamento a 37 °C. Para rompimento da membrana dos parasitos, as formas promastigotas de *L. braziliensis* foram lisadas de forma mecânica com auxílio de um triturador a 4° C. O lisado foi centrifugado novamente a 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi colhido, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e ressuspensão em 2 mL de água destilada. A concentração de proteínas foi determinada e alíquotas dos extratos foram guardados a - 80 °C.

12.2 Sensibilização das placas para o teste ELISA

Microplacas de fundo chato com 96 poços foram sensibilizadas separadamente com 50 µL/poço de cada um dos antígenos brutos (antígenos não purificados) dos parasitos diluídos em PBS pH 7,4 de forma a conter 0,1µg/poço do antígeno de *L. braziliensis*. Após a incubação por 18 horas a 4 °C em câmara úmida, o excesso de antígenos foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween*-20 (PBS-T). Para bloqueio dos sítios de adesão livres das proteínas que ainda existiam na superfície dos poços, foram adicionados 100µL/poço de PBS/leite desnatado a 5%. Deixou-se por mais de 2 horas incubadas a 37 °C em câmara úmida, o excesso foi retirado e novamente as placas foram lavadas três vezes com *Tween*-20. As placas sensibilizadas foram imediatamente envolvidas em papel laminado e guardadas a - 20° C.

12.3 Incubação do primeiro anticorpo em ELISA

Para detecção de anticorpos específicos, os soros foram diluídos 1:100 em PBS/leite desnatado 2% e adicionados a placa 50µL/poço, em triplicata. Após 2 horas de incubação a 37 °C em câmara úmida o excesso foi retirado e as placas foram lavadas três vezes com *Tween*-20. Em cada placa, os soros controles positivos e negativos, foram adicionados nas mesmas condições. Para controle dos reagentes foram adicionados apenas PBS/leite desnatado 2%.

12.4 Incubação do segundo anticorpo em ELISA

O conjugado previamente testado e titulado composto por anticorpos anti-IgG humano marcado com peroxidase foi diluído 1:500 em PBS/leite desnatado a 2% e adicionado à placa 50µL/poço. Após 2 horas de incubação a 37 °C em câmara úmida o excesso foi retirado e as placas novamente lavadas três vezes com *Tween*-20.

12.5 Revelação em ELISA

Para a revelação dos imunocomplexos utilizou-se como substrato Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), a diluição foi de 2µL em 5 mL de tampão de citrato de sódio/ácido cítrico pH 5,0, contendo o cromógeno *o*-Phenylenediamine dihydrochloride (OPD) a 2 mg. Este foi adicionado à placa 50µL/poço e incubado por 2 horas a 37 °C. Após o tempo de incubação, foi adicionado 50 µL/poço de Ácido Sulfúrico (H₂SO₄) para interromper a reação de H₂O₂, as placas foram deixadas a temperatura ambiente por cinco minutos na ausência de luz. Passado o tempo realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. O ponto de corte foi determinado a partir da média do branco, controles negativos e de cada amostra. As amostras foram consideradas negativas e positivas com 10% abaixo ou acima do ponto de corte respectivamente.

V. RESULTADOS

1. Resultados do teste sorológico para identificação de anticorpos anti-*Leishmania* spp.

O diagnóstico sorológico de cada indivíduo foi realizado pela técnica de ELISA (anti-IgG), a qual apresenta alta sensibilidade de diagnóstico, confirmando, assim, a presença de anticorpos contra antígenos de *Leishmania*. Os testes foram validados quando todos os controles utilizados (branco, controles negativo e positivo) apresentaram resultados consistentes com o esperado. Assim, 50/108 (46,29%) indivíduos pertencentes às famílias revelaram-se positivos e dos casos avulsos, 11/18 (61,11%) indivíduos revelaram-se positivos. Destaca-se o fato que todos os indivíduos eram assintomáticos para leishmaniose. Os resultados do teste ELISA foram obtidos pelas Dr^{as}. Luciana Hagström e Perla Araújo, pesquisadoras do LMPDC que trabalharam com essas amostras em suas pesquisas de pós-doutorado e doutorado.

2. Diagnóstico molecular das infecções causadas por *Leishmania* spp.

O diagnóstico molecular de cada indivíduo foi realizado pela técnica de PCR, utilizando-se *primers* e procedimentos descritos em detalhes no tópico 7. A utilização dos oligonucleotídeos LITSR/L5.8S permitiu verificar a presença de DNA nuclear (nDNA) de *Leishmania* spp., indicando a infecção ativa no hospedeiro. As ampliações das sequências de nDNA representam as regiões que se repetem no genoma do parasito (Filho e Pena, 1992). Os *primers* utilizados geraram bandas de aproximadamente 330pb que foram confirmadas pela hibridização com sonda de quimioluminescência específica.

Em relação às amostras de sangue dos 108 indivíduos das famílias, o nDNA de *Leishmania* foi amplificado em 20/108 (18,51%) amostras, todas pertencentes à família A. Os resultados dos testes moleculares realizados nas amostras dos indivíduos agrupados em famílias estão apresentados na Figura 6.

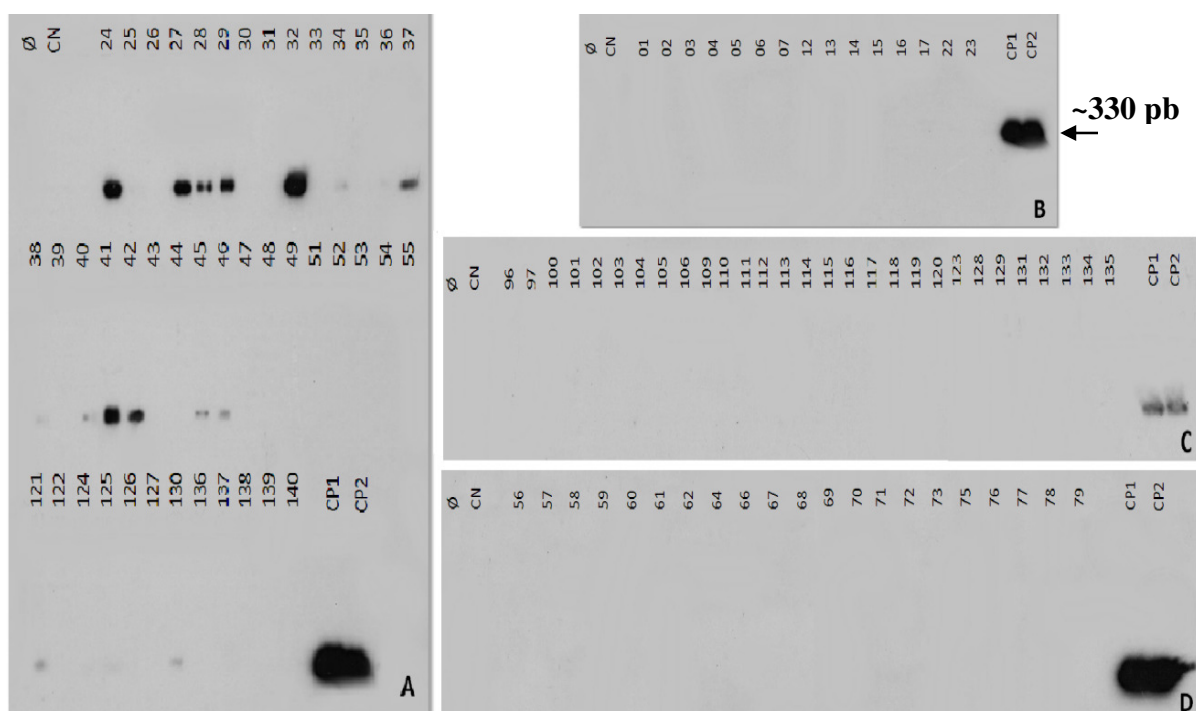


Figura 6: Detecção de DNA nuclear de *Leishmania* em amostras de sangue de indivíduos das famílias A, B, C e D. *Southern blot* de produtos de PCR amplificados com os *primers* para nDNA (ITS1). As membranas foram hibridizadas com sonda específica marcada por quimioluminescência. A amplificação gerou bandas de ~330pb. Controles utilizados nas reações: Ø, ausência de DNA molde; CN, controle negativo; CP 1 e 2, controles positivos com DNA de *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente.

Os demais indivíduos pertencentes às outras três famílias não apresentaram bandas específicas na hibridização, ou seja, não apresentam infecção pelo parasito, ainda que muitos dos indivíduos (27,78%) tivessem sorologia positiva para leishmaniose. Na família A, 20 indivíduos são positivos no teste de ELISA e na PCR, resultado não coincidente entre as mesmas amostras, pois somente 10/43 (23,25%) indivíduos foram positivos para os dois testes. A Tabela 1 sumariza os resultados obtidos nos testes sorológicos e moleculares.

Tabela 1: Diagnóstico sorológico e molecular das infecções por *Leishmania* spp. nas amostras de sangue dos indivíduos agrupados em famílias.

	ELISA	PCR
Família A	20/43 (46,51%)	20/43 (46,51%)
Família B	6/15 (40%)	0/15 (0%)
Família C	11/29 (37,93%)	0/29 (0%)

Família D	13/21 (61,9%)	0/21 (0%)
Total	50/108 (46,29%)	20/108 (18,51%)

Em 31 amostras de esperma doadas por indivíduos pertencentes as famílias, 17/31 (54,83%) casos foram identificados com a presença de bandas específicas de nDNA de *Leishmania*. Os resultados das ampliações de nDNA de *Leishmania* spp. nas amostras de esperma dos indivíduos das famílias estão apresentados na Figura 7. Dessas 17 amostras positivas, dez amostras pertencem à família A e sete à família C. De interesse, a concordância nos resultados de PCR obtidos nas amostras de sangue e de esperma dos indivíduos da família A foi verificada em apenas três amostras: 29, 34 e 37. Nas amostras de sangue dos indivíduos da família C, não foram obtidos resultados positivos, porém, a análise molecular dos espermatozoides demonstrou bandas positivas em todas as amostras. Nas outras duas famílias, B e D, que apresentavam um total de seis e três amostras de esperma, respectivamente, não se obtiveram resultados positivos no teste molecular.

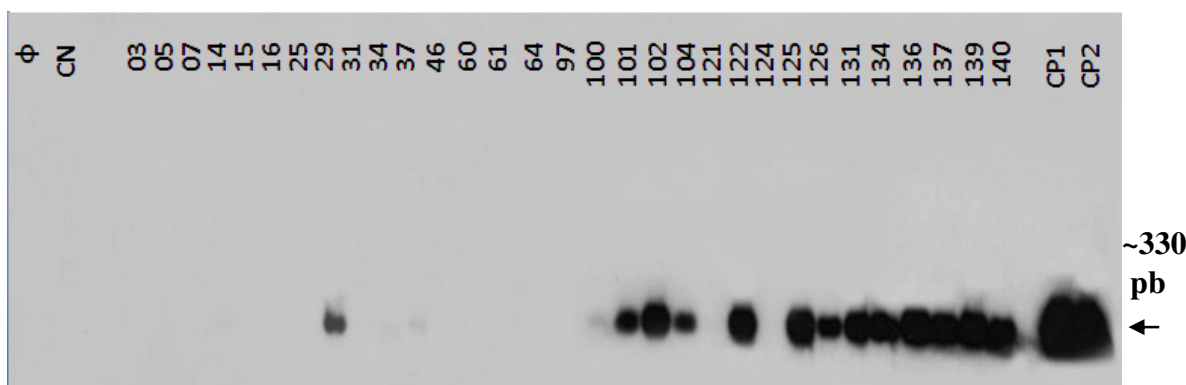


Figura 7: Detecção de DNA nuclear de *Leishmania* nas amostras de esperma de indivíduos das famílias estudadas. Southern blot de produtos de PCR obtidos com primers de nDNA (ITS). As membranas foram hibridizadas com sonda específica marcada por quimioluminescência. A amplificação gerou bandas de ~330pb. Controles utilizados nas reações: Ø, ausência de DNA molde; CN, controle negativo; CP, controles positivos com DNA de *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente.

Em relação aos casos de indivíduos classificados como avulsos, foram obtidos um total de 18 amostras de esperma, onde 50% (9/18) apresentaram bandas de ~330pb reconhecidas pela sonda. Os resultados das ampliações de nDNA de *Leishmania* spp. nas amostras de esperma dos casos avulsos estão apresentados na Figura 8. Resumindo, somando as amostras de esperma das famílias (31) com as amostras dos casos avulsos (18), foram identificadas 26/49 (53,1%) amostras de espermatozoides positivas para *Leishmania* spp. A presença

de nDNA do parasito no esperma sugere a presença de infecção ativa por *Leishmania* spp. nos indivíduos estudados. Todos os resultados de PCR e de ELISA obtidos na população estudada estão descritos no Anexo D.

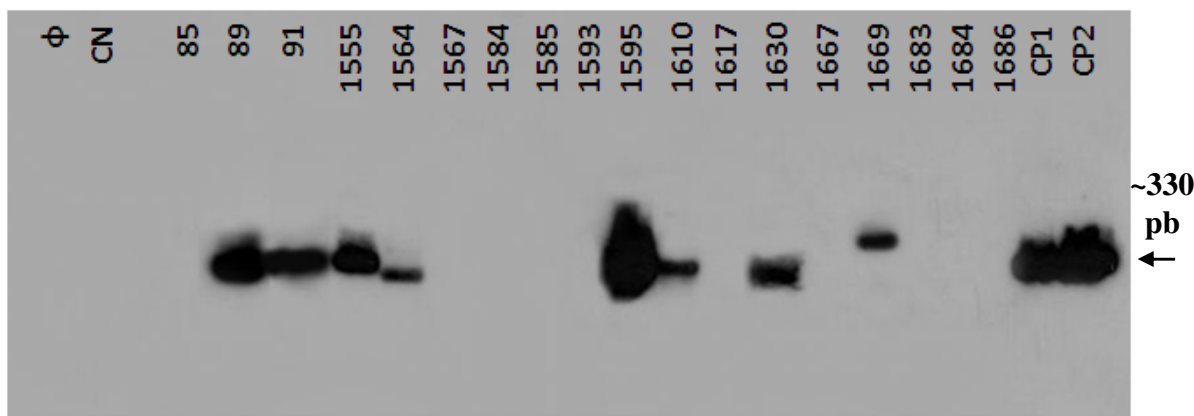


Figura 8: Detecção de DNA nuclear de *Leishmania* em amostras de esperma dos casos avulsos estudados. Southern blot de produtos de PCR obtidos com primers de nDNA (ITS). As membranas foram hibridizadas com sonda específica marcada por quimioluminescência. A amplificação gerou bandas de ~330pb. Controles utilizados nas reações: Ø, ausência de DNA molde; CN, controle negativo; CP, controles positivos com DNA de *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente.

3. Comparação dos resultados obtidos nos testes sorológicos e moleculares para identificação de infecções mistas causadas por *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*

Sabendo que a população estudada reside em área endêmica para as leishmanioses e doença de Chagas, foi avaliada a presença de infecção mista nesses indivíduos mediante a comparação dos dados obtidos nos testes moleculares e sorológicos utilizando amostras de sangue periférico.

A comparação dos resultados moleculares com os dados obtidos nos testes sorológicos para leishmaniose e doença de Chagas, revelou discrepâncias. Uma maior positividade foi identificada na sorologia, onde 48/108 (44,44%) indivíduos apresentaram reação positiva para *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. A infecção mista para *Leishmania* spp. e *T. cruzi* foi determinada em 19/108 (17,59%) casos que apresentaram resultados de PCR positivos para ambos tripanossomatídeos. Analisando os resultados de PCR, foi possível verificar quantos indivíduos são positivos exclusivamente para cada uma das infecções, resultados esses que não levam em consideração os dados de sorologia, devido a possibilidade de reação cruzada.

Assim, apenas um indivíduo apresentou infecção somente para *Leishmania* spp. Outros sessenta e três indivíduos apresentaram unicamente a infecção por *T. cruzi* e vinte e cinco indivíduos não estavam infectados por nenhum desses parasitos. Verificou-se uma baixa concordância de resultados entre os testes de PCR e de ELISA, observada em apenas 10/108 (9,25%) indivíduos. O alto índice de resultados positivos no teste ELISA, não coincidente com o diagnóstico por PCR, indica um elevado número de reações cruzadas, resultando em 27,78% no que se refere às infecções causadas por *Leishmania* spp. A Figura 9 resume os resultados concordantes e discrepantes entre testes sorológicos e moleculares encontrados neste estudo.

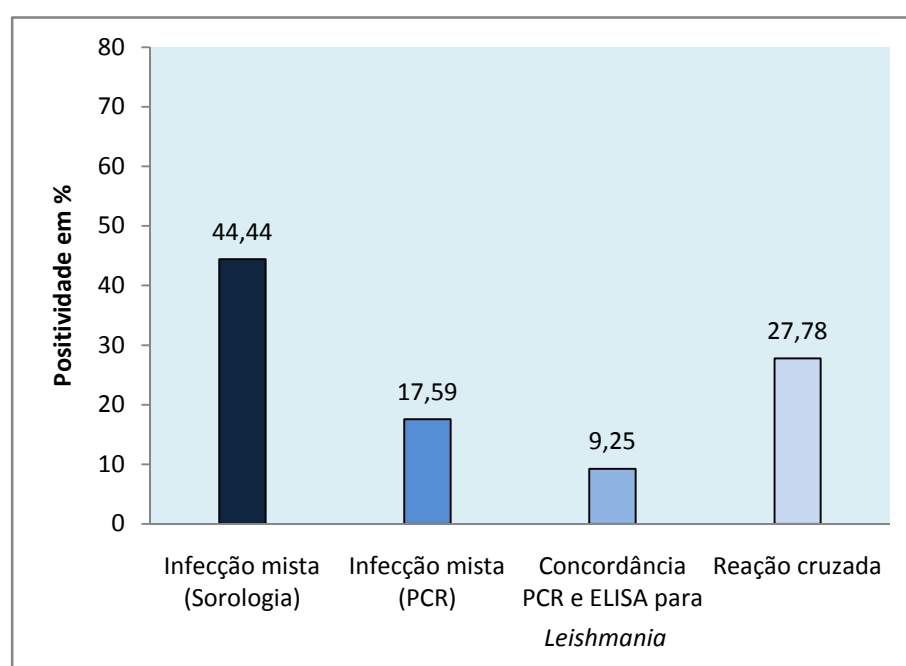


Figura 9: Número de indivíduos identificados com infecção mista por *Leishmania* spp. e *T. cruzi* pelos testes ELISA e PCR. As análises dos resultados dos testes diagnósticos de PCR e de ELISA demonstraram baixa concordância em 9,25% dos indivíduos. E possibilidade de reação cruzada pelos testes sorológicos em 27,78% dos casos.

4. Sequenciamento dos produtos de PCR para identificação das espécies de *Leishmania* spp.

Os produtos de PCR amplificados pelos *primers* LITSR/L5.8S utilizando-se amostras de sangue e esperma foram purificados e enviados para o sequenciamento automático. O sequenciamento dos fragmentos amplificados permitiu identificar as espécies de *Leishmania*

presentes em dezessete indivíduos da população estudada e duas amostras dos controles positivos *L. amazonensis* e *L. infantum*, perfazendo um total de dezenove amostras. As demais amostras positivas foram purificadas, entretanto apresentarem concentração abaixo do exigido pela empresa que executou o sequenciamento.

A análise das sequências identificou a presença de *L. amazonensis* e *L. infantum* nas amostras estudadas. De dezessete amostras sequenciadas, oito delas foram reconhecidas como *L. amazonensis*, nove como *L. infantum*. A Tabela 2 apresenta informações de *E-value* e identidade entre 91 e 100% identificadas nas sequências analisadas.

Tabela 2: Identificação das espécies *L. amazonensis* e *L. infantum* nas amostras sequenciadas e analisadas pelo BLASTn.

Caso	Amostra	Família	Locus	Espécie	E-value	Identidade
27	sangue	A	JX448540.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹²³	95%
28	sangue	A	FJ753371.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁵	96%
31	sangue	A	FJ753373.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁵⁰	97%
32	sangue	A	GQ367486.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹²⁴	91%
38	sangue	A	FJ753371.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁶²	99%
40	sangue	A	FJ753373.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁶⁷	100%
41	sangue	A	FJ753373.1	<i>L. amazonensis</i>	2e ⁻¹⁶⁷	100%
104	esperma	C	FJ753373.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁶⁷	100%
122	esperma	A	EU604810.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹³⁷	99%
125	esperma	A	JX448540.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹³¹	96%
126	esperma	A	KC347300.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹⁵⁰	97%
131	esperma	C	HG512947.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹³⁷	100%
134	esperma	C	KC347301.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹⁵⁵	99%
139	esperma	A	AJ634370.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹⁴³	97%
1595	esperma	avulso	DQ300193.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁴³	100%
1610	esperma	avulso	FJ753371.1	<i>L. amazonensis</i>	1e ⁻¹⁵⁰	97%
1669	esperma	avulso	JX448540.1	<i>L. infantum</i>	1e ⁻¹⁴³	99%

A figura 10 apresenta duas sequências obtidas a partir de uma amostra de sangue (Figura 10 A) e uma amostra de esperma (Figura 10 B), destacando seus respectivos valores de *E-value*, identidade e espécie infectante, reconhecidos na análise do BLASTn.

A *Leishmania amazonensis* isolate 43 clone 5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

Sequence ID: FJ753373.1 Expect: 2e⁻¹⁶⁷ Identities: 331/331 (100%)

ITS

CTGGATCATT TTCCGATGAT TACACCAAAA AAACATATAC AAAACTCTCG GGGAGACCTA
 TTCTTTCGAT AGGCGCCTTT CCCACACATA CACAGCAAAG TTTTGTACT CAAAAACAAC
 ATTTGCAGTA AACAAAAAAT GGCCGATCGA CGTTATAGCG CACAACCGCG TATATACAAA
 AGCAGAGAAA AATGCCCGTT TCAATACGGC GTTTTCCGTT TTTGGGGCGG GGGGTGCGT
 GTGTGGATAA CGGCTCACAT AACGTGTCGC GATGGATGAC TTGGCTTCCT ATTTTCGTTGA
 AGAACGCAGT AAAGTGCGAT AAGTGGTATC A

L5.8S

B *Leishmania infantum* genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1 and 5.8S rRNA gene strain MCAN/IL/97/LRC-L720 (LEM3386).

Sequence ID: HG512947.1 Expect: 1e⁻¹³⁷ Identities: 276/276 (100%)

ITS

CTGGATCATT TTCCGATGAT TACACCAAAA AAACATATAC AACTCGGGGA GACCTATGTA
 TATATATGTA GGCCTTTCCC ACATACACAG CAAAGTTTGT TACTCAAAAT TTGCAGTAAA
 AAAAAGGCCG ATCGACGTTA TAACGCACCG CCTATACAAA AGCAAAAATG TCCGTTTATA
 CAAAAAATAT ACGGCGTTTC GGTTTTTGGC GGGGTGGGTG CGTGTGTGGA TAACGGCTCA
 CATAACGIGT CGCGATGGAT GACTTGGCTT CCTATTTCGT TGAAGAACGC AGTAAAGTGC
GATAAGTGGT ATCA

L5.8S

Figura 10: Identificação de nDNA *Leishmania* em amostras de sangue e esperma de indivíduos infectados. Sequências de uma amostra de sangue (A) caso 41, família A e uma amostra de esperma (B) caso 131, família C. O alinhamento das amostras permitiu identificar as espécies *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente, com *E-value* próximo a zero e similaridade de 100%. As regiões sublinhadas (azul) correspondem a sequência dos *primers* que foram utilizados na reação de PCR.

Após a análise no BLASTn, foi realizado o alinhamento das sequências obtidas da família A que apresentavam o mesmo *locus* de identificação. A Figura 11 permite estabelecer uma relação de semelhança e avaliar a proximidade entre as sequências dos indivíduos da mesma família.

Leishmania amazonensis isolate 43 clone 5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: FJ753373.1 Expect: $2e^{-167}$ Identities: 331/331(100%)

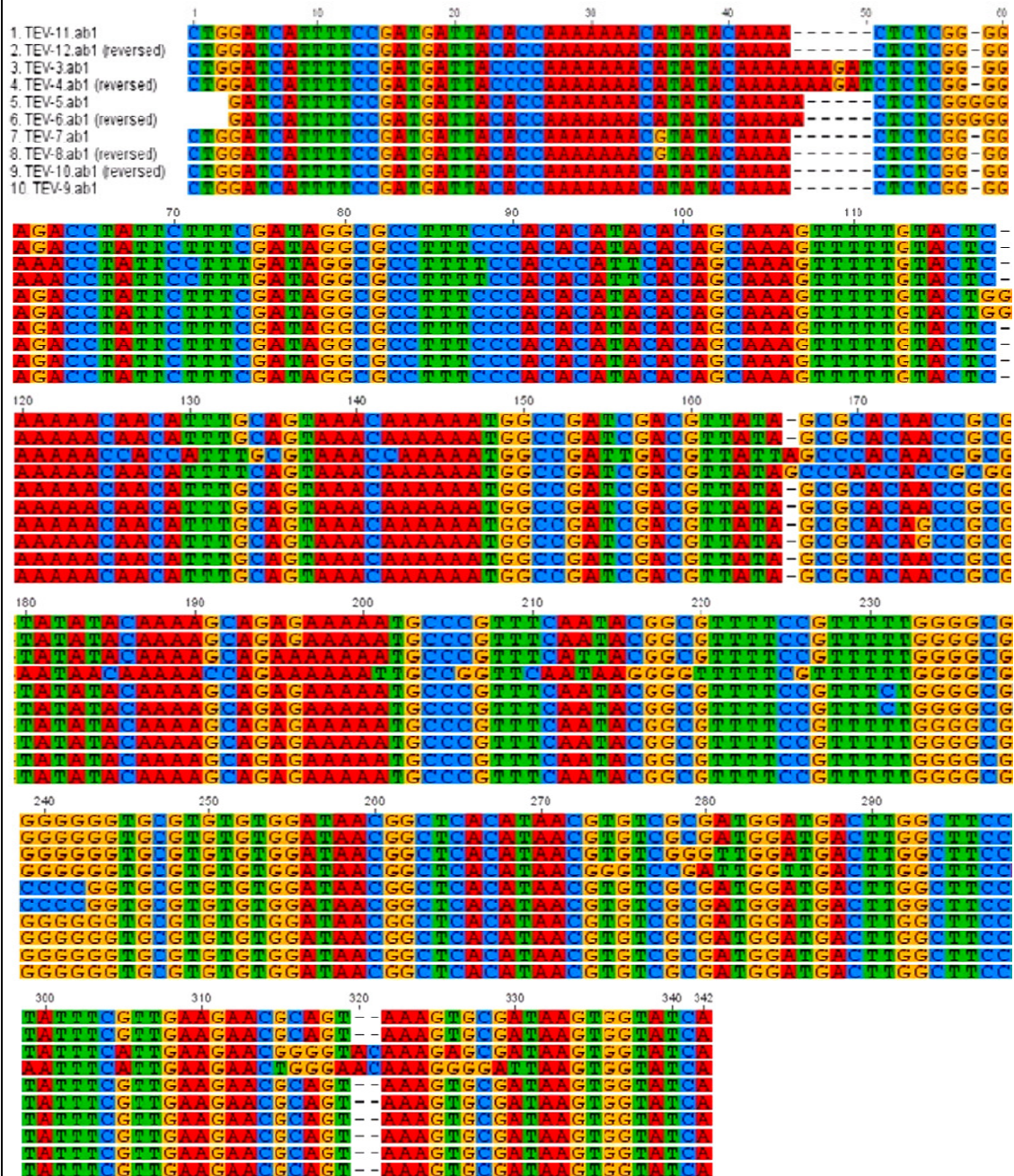


Figura 11: Alinhamento das sequências da região espaçadora do gene RNA ribossomal de *Leishmania* amplificadas nas amostras pertencentes à família A. O alinhamento de dez sequências da família A permitiu identificar o comprimento das sequências em 342pb, com localização no locus FJ753373.1 e identidade de 93,8%. Pela alta identidade, é possível que estes indivíduos tenham sido infectados pelo mesmo isolado de *L. amazonensis*.

VI. DISCUSSÃO

1. Avaliação dos testes de diagnóstico utilizados para a detecção de *Leishmania* spp.

Segundo o MS, a leishmaniose é uma doença de notificação compulsória e com características clínicas de evolução grave. Seu diagnóstico deve ser baseado em critérios epidemiológicos, manifestações clínicas, quando aparentes, e testes laboratoriais (Brasil, 2013b). O diagnóstico laboratorial é realizado por técnicas de detecção do parasito, imunológicas e moleculares (Pereira *et al*, 2013). Para o desenvolvimento deste estudo, não foi diferente: o diagnóstico dos indivíduos foi realizado a partir da técnica sorológica ELISA e do teste molecular PCR. O teste ELISA é amplamente utilizado para o diagnóstico de leishmaniose em laboratórios de rotina e determina o nível de imunoglobulinas séricas circulantes, sendo um teste com elevada sensibilidade, mas pouca especificidade na detecção desses anticorpos (Singh, 2006; Neitzke-Abreu *et al*, 2013; Souza *et al*, 2013).

A alta sensibilidade comumente associada ao ELISA está representada neste estudo pela maior positividade obtida quando comparada ao teste molecular PCR. O teste ELISA identificou 46,29% de casos positivos, enquanto que, a PCR identificou somente 18,51% de amostras positivas. Entretanto, alguns indivíduos apresentaram testes sorológicos negativos, mas a presença ativa do parasito foi confirmada pela positividade no teste de PCR com *primers* de nDNA, seguido de hibridização com sonda específica e sequenciamento. A discrepância entre os resultados obtidos no teste sorológico e molecular podem ser justificados em alguns casos, por limitações apresentadas nos testes imunológicos, que podem resultar em reações cruzadas com outros antígenos pela similaridade filogenética entre os protozoários levando a resultados falso-positivos (Teixeira e Vexenat, 1996; Luciano *et al*, 2009; Shirian *et al*, 2014). Além do *T. cruzi*, também podem ocorrer reação antigênica cruzada de *Leishmania* spp. em humanos com *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma gondii* e em cães com *Ehrlichia canis*, *Neospora caninum* e *Babesia canis* (Zanette *et al*, 2013; Shirian *et al*, 2014). Ainda a presença de micoses profundas, esporotricose, paracoccidiodomicose e cromoblastomicose também podem resultar em reação falso-positiva (Brasil, 2013a).

Outra limitação quanto ao diagnóstico de indivíduos na fase crônica é a baixa parasitemia, tornando os métodos parasitológicos tradicionais pouco eficientes. Assim, o aprimoramento dos testes sorológicos, como desenvolvimento de testes com antígenos recombinantes têm motivado muitas pesquisas onde se substituí as preparações de SLA por proteínas recombinantes: rHSP70, rH2A, rH2B, RH3, rh4 e rKMP11 derivadas de *L. infantum*. De interesse, quando comparadas aos testes com SLA, apresentam melhor reatividade, principalmente, com as proteínas rHSP70 e rH2A (Souza *et al*, 2013).

O MS também indica para diagnóstico das leishmanioses a aplicação da técnica de PCR, método amplamente utilizado para fins de pesquisa, acrescentando especificidade quando associado a outros métodos parasitológicos, mas ainda pouco utilizado na rotina de diagnóstico em laboratórios (Brasil, 2013b). Essa técnica apresenta muitas vantagens, como alta sensibilidade e especificidade. Contudo, a técnica de PCR também apresenta suas limitações. Em nosso estudo, foi possível identificar em uma das triplicatas, um produto de peso molecular acima do esperado que hibridizou fracamente com a sonda. A análise dessa sequência mostrou uma identidade parcial com a região ITS1 do *T. cruzi*. O indivíduo em questão foi diagnosticado pela sorologia como portador da doença de Chagas. Assim, para que a reação de PCR seja utilizada como método de diagnóstico seguro devem ser obedecidas rigorosamente as condições de padronização e controle de qualidade dos reagentes. A confirmação dos produtos amplificados com a metodologia de *Southern blot* proporcionou resultados com maior especificidade e sensibilidade. Os *primers* utilizados neste estudo são desenhados para amplificar especificamente a região espaçadora do gene de rRNA, sendo capazes de detectar de 0,1 a 0,2 parasitos por reação de PCR (Chargui *et al*, 2011; Toz *et al*, 2013). Assim, a identificação do DNA de *Leishmania* em vinte indivíduos, quando comparado aos cinquenta indivíduos identificados no ELISA, sugere que a discrepância observada advém de reações sorológicas cruzadas com outros organismos, principalmente o *T. cruzi*. Portanto, o diagnóstico por PCR pode ser muito útil na identificação de casos duvidosos e apresenta-se como um dos métodos mais específicos e sensíveis para diagnóstico de leishmaniose (Deborggraeve *et al*, 2008; Cruz *et al*, 2013).

Com o objetivo de estimar a precisão da PCR em amostras biológicas obtidas por escarificação de lesões e a partir de leucócitos do sangue periférico, Neitzke-Abreu *et al*, 2013, comparou as técnicas de PCR, histopatologia, IDRM e IFI para diagnóstico de 106 indivíduos com LC. A positividade revelada pela PCR foi de 83,87%, mais significativo que o histopatológico. A alta positividade apresentada pelo IDRM e IFI também foi justificada pela

alta sensibilidade e possibilidade de reação cruzada. A combinação de diferentes metodologias para melhorar o diagnóstico de LC tem sido sugerida e a PCR aparece como método de escolha, especialmente em indivíduos crônicos, tratados, com reinfeção ou reagudização da infecção por *L. braziliensis*, que pode evoluir para lesões grave na mucosa.

Erros nos métodos diagnósticos e resultados duvidosos podem adiar e dificultar o tratamento dos indivíduos infectados (Bastrenta *et al*, 2003). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos mais rápidos, confiáveis e específicos de diagnóstico, com correta identificação das espécies e diferenciação das leishmanioses com outras doenças que apresentem sinais clínicos semelhantes (Neitzke-Abreu *et al*, 2013). As discussões de testes diagnósticos precisos e confiáveis para a leishmaniose devem alcançar a realidade que se vivencia hoje em bancos de sangue e em hospitais, entre doadores de sangue, medula e órgãos, locais onde o diagnóstico realizado baseia-se apenas em testes sorológicos.

2. Identificação de infecção mista por leishmaniose e por doença de Chagas na região Amazônica

As patologias causadas por tripanossomatídeos constituem um importante problema de saúde pública em vários países, principalmente, no continente americano, sendo a região Amazônica considerada área endêmica para leishmaniose e doença de Chagas. Infecções mistas por *Leishmania* spp. e por *T. cruzi* são reconhecidas, contudo, há poucos relatos sobre a situação epidemiológica dessas infecções na região Amazônica brasileira (Bastrenta *et al*, 2003).

Analisando os resultados obtidos nos testes de diagnóstico empregados nesse estudo, foi possível identificar infecção mista entre *Leishmania* spp. e *T. cruzi* na população estudada, uma vez que os resultados sorológicos e moleculares para *T. cruzi* foram produzidos em estudos anteriores do LMPDC (Araújo, 2012; Pimentel, 2012). Considerando os resultados do teste molecular, foi detectada a presença de infecção mista em 19/108 (17,59%) indivíduos estudados. Na literatura há resultados sobre infecção dupla e tripla entre os cinetoplastídeos *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. infantum*, realizado no município de Paço do Lumiar, Maranhão. Pelo inquérito soroepidemiológico de 1.100 habitantes, trinta e cinco (3%) indivíduos apresentaram positividade para *T. cruzi*, quarenta e um (4%) para *L. braziliensis* e cinquenta (4,5%) para *L. infantum*. Pelo teste de PCR, onze (1%) indivíduos apresentavam infecção

mista para *T. cruzi* e *L. braziliensis*, sete indivíduos (0,6%) com infecção mista para *T. cruzi* e *L. infantum* e dois casos (0,18%) apresentaram infecção tripla (Mendes *et al*, 2007).

As infecções mistas são descritas em outras regiões endêmicas do Brasil, como no Centro-Oeste. Onde trinta chagásicos crônicos residentes em Minas Gerais e em Goiás, tratados com Benzonidazol apresentaram positividade para leishmaniose. O resultado da hemocultura evidenciou a presença concomitante de promastigotas e epimastigotas em 10% (3/30) casos. O estudo descreve que os testes biológicos foram comprovados por análise da parasitemia, hemocultura, sorologia por IFI e histopatologia e ainda posterior confirmação do gênero *Leishmania* spp. através de PCR de kDNA. Os resultados confirmaram que isolados de pacientes chagásicos crônicos continham espécies de *Leishmania* spp. caracterizando infecção mista (Dias, 2006). Estudo realizado por Maranhão em 2004 verificou a soropositividade em 451 indígenas para as três infecções, *T. cruzi*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Esses eram oriundos de quatro tribos indígenas dos estados de Minas Gerais e de Espírito Santo. Os testes realizados foram ELISA, IFI e hemaglutinação indireta, e aos casos conflitantes empregou-se *Western blot*. O estudo identificou indivíduos com infecção única para *L. braziliensis* e *L. infantum* em trinta e nove (8,6%) casos. E ainda, indivíduos com infecções mistas por dois (1,1%) e até três (3,7%) protozoários.

Portanto, com poucos relatos na literatura, o diagnóstico de infecções mistas para *Leishmania* spp. e para *T. cruzi* requer o uso de técnicas mais específicas. Os exames convencionais apresentam limitações quando há baixa carga parasitária, poucos anticorpos ou semelhança desses em casos de infecção mista, que podem ser frequentes devido a áreas comuns de transmissão dessas infecções. Assim, a técnica de PCR, utilizando marcadores moleculares específicos para o DNA destes parasitos, é uma ferramenta valiosa para esclarecer os casos onde há limitações no diagnóstico sorológico rotineiramente aplicado. A região Amazônica brasileira é comprovadamente uma área endêmica para leishmanioses e para doença de Chagas, situação que necessita de atenção quanto ao diagnóstico, ao tratamento, à profilaxia e ao controle destas doenças.

3. Espécies de *Leishmania* spp. que afetam a população de Barcarena e de Breves

Em áreas endêmicas para leishmaniose, é possível encontrar diferentes espécies de *Leishmania* que compartilham características clínicas semelhantes. Tal situação requer a utilização de metodologias laboratoriais mais precisas e sensíveis para identificação dessas espécies, a fim de avaliar o prognóstico e aperfeiçoar o tratamento. A identificação das

espécies também contribui para uma melhor compreensão da epidemiologia das leishmanioses nessas áreas (Chargui *et al*, 2011; Toz *et al*, 2013).

Das dezessete amostras sequenciadas e identificadas como *Leishmania*, oito delas eram *L. amazonensis* e nove eram *L. infantum*. O sequenciamento das amostras resultou no conhecimento de duas espécies que se encontram entre as principais da América Latina e do Brasil. O ciclo de transmissão da *L. amazonensis* é comum em áreas florestais da Amazônia, como no estado do Pará (Brasil, 2013a). No Brasil, a LC é causada principalmente pela espécie *L. braziliensis*, mas há infecções pela espécie *L. amazonensis*, apresentando lesões com característica ulcerosa e infiltração acentuada nas bordas (Silveira *et al*, 2009). Não é a principal, mas também pode desenvolver a manifestação clínica mucocutânea e é descrita como a espécie mais comum na LCD (Goto e Lindoso, 2012).

Em 2010, trabalho similar desenvolvido no município de Santarém, Pará, realizou o diagnóstico molecular de LT, seguido de sequenciamento, mostrando alta positividade para as espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Bacha *et al*, 2010). Em estudo retrospectivo dos casos descritos de LCD no Brasil desde 1945, Costa *et al*, 2009c descreve a espécie *L. amazonensis* como responsável pela doença no país. A LCD é uma forma rara da LT no continente americano, causada pelo complexo *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. pifanoi* e *L. amazonensis*). Nesse estudo, foram apresentados quarenta casos provenientes de onze estados brasileiros, inclusive o Pará com oito casos, e a espécie *L. amazonensis* foi identificada nos vários testes realizados. Embora a LCD seja relatada em outras regiões do nordeste, sua ocorrência é fortemente ligada à ecologia da região Amazônica e ao estado do Pará, com a maior casuística de LCD (Silveira, 2009).

A LV representa a forma mais severa das leishmanioses, com indivíduos com grave envolvimento visceral. Neste estudo, nove indivíduos foram diagnosticados com infecção causada pela espécie *L. infantum*, agente etiológico da LV na América Latina e no Brasil (Brasil, 2013b). Rosas Filho e Silveira, 2007, realizaram estudo avaliando a epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *L. infantum* em área endêmica do município de Barcarena, Pará, a mesma de investigação deste estudo. Nessa pesquisa, 946 indivíduos foram submetidos a testes de IDRM e IFI. Destes, 120 foram diagnosticados positivos para *L. infantum*, sendo portadores assintomáticos e sintomáticos. Tal resultado viabilizou uma nova abordagem sobre a dinâmica e o espectro clínico-imunológico da infecção humana por *L. infantum* na região Amazônica brasileira.

Pesquisa desenvolvida por Silva e Gaioso, 2013 em parceria com a SESPA, descreveu o perfil epidemiológico dos casos notificados para LV de janeiro de 2007 a dezembro de

2011. A LV não é endêmica em todo o estado, portanto a pesquisa abordou os casos das regionais municipais com maior prevalência da doença nas quais estão localizados os municípios de transmissão intensa. As oito regionais definidas para o estudo registraram 1.738 casos de LV. As regionais com maiores ocorrências são a 6ª regional (24,3%), composta pelos municípios: Abaetetuba, Barcarena, Igarapé-Miri, Mojú e Tailândia. A 2ª regional (22,1%), composta por: Acará, Bujarú, Colares, Concórdia do Pará, Santa Isabel do Pará, Santo Antônio do Tauá, São Caetano de Odivelas, Tomé-Açú e Vigia.

O município de Barcarena pertence à 6ª regional de saúde de onde são originárias três famílias (A, B e C) pesquisadas neste trabalho. A infecção por *Leishmania* spp. foi identificada em amostras de sangue e espermatozoides de indivíduos das famílias A e C. Das dez amostras sequenciadas da família A, cinco foram reconhecidas como *L. amazonensis* e cinco como *L. infantum*. Para a família C, das quatro amostras sequenciadas, uma foi reconhecida como *L. amazonensis* e três como *L. infantum*. Esses resultados permitiram confirmar o município como endêmico e conhecer as espécies possivelmente mais prevalentes na região. Pertencente ao município de Breves (8ª regional), a família D não apresentou infecção por *Leishmania*. O teste de PCR não identificou positividade em nenhuma das amostras de sangue e espermatozoides, concordando novamente com os resultados da literatura, que descreve esse município como área de baixa transmissão.

4. Possibilidade de transmissão sexual da *Leishmania* spp.

No século XX, com a descoberta da transmissão sexual do vírus HIV, as doenças sexualmente transmissíveis ganharam atenção especial dos órgãos responsáveis pela saúde pública (Piot e Quinn, 2013). Uma das espécies de protozoário reconhecida pela Organização Mundial da Saúde que pode ser transmitida por via sexual entre os humanos é o *Trichomonas vaginalis*. A tricomoníase é a DST não viral mais frequente no mundo, com 173 milhões de novos casos por ano (Martínez, 2009). Entretanto, pesquisas consideram viável a transmissão sexual de outros protozoários, infecções raras que podem ser causadas por *Trypanosoma* sp., *L. donovani*, *Entamoeba histolytica*, espécies de *Acanthamoeba*, *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium falciparum*, principalmente no trato genital masculino, causando dano testicular ou hipogonadismo secundário via alterações no eixo hipotálamo-hipofisário (Martinez-Garcia et al, 1996).

A esse respeito, estudos têm sugerido a transmissão sexual da *Leishmania* spp. em modelo experimental. Dados de 2009 demonstram a transmissão da espécie *L. infantum* por via sexual em cães. Alojados e na ausência de vetor, cães com eliminação intermitente e aleatória de formas de *Leishmania* spp. no sêmem, copularam com doze cadelas saudáveis. Ao final do período experimental, 165 dias, três (25%) cadelas apresentavam positividade em testes sorológicos de IFI e ELISA e seis (50%) foram identificadas como positivas por PCR de kDNA (Silva *et al*, 2009).

Pesquisas também já identificaram elevada frequência de lesões no epidídimo, no prepúcio e nos testículos, com presença de amastigotas de *L. infantum* na glândula do pênis em cães com LV (Diniz *et al*, 2005; Silva *et al*, 2008). A infecção por *L. infantum* afeta o trato genital dos cães, ocasionando orquite e prostatite crônica (Manna *et al*, 2012; Mir *et al*, 2012). Na literatura ainda há relatos de amastigotas de *Leishmania* spp. nos órgãos genitais de cães com tumor venéreo (Cotone *et al*, 2003; Marino, Gaglio e Zanghì, 2012).

Pesquisa desenvolvida por Benites *et al*, 2011, aponta o aparelho reprodutor de cães sorologicamente positivos para LV canina como um reservatório para formas infectantes de *Leishmania* spp. A capacidade dos testículos em proteger as células germinativas auto-antigênicas do sistema imune confere aos testículos a habilidade de ser um local imunologicamente privilegiado. E a composição do tecido intersticial dos testículos é abundante em macrófagos que expressam molécula de classe II do Complexo principal de Histocompatibilidade (MHC II), linfócitos B e T presentes nos ductos deferentes, além de grande área ocupada por vasos linfáticos e capilares sanguíneos. Assim, a atividade imunocelular dos testículos poderia contribuir para a infecção, justificando o alto percentual de cães sorologicamente positivos que apresentam formas amastigotas nesse órgão. Isso reforça o potencial epidemiológico da transmissão sexual da leishmaniose, principalmente em áreas endêmicas.

Lesões genitais humanas são verificadas em indivíduos com LV, principalmente em homens, apresentando lesões crônicas destrutivas e ulcerativas no pênis. A histologia é caracterizada por infiltrado inflamatório com presença de macrófagos, células gigantes, plasmócitos e linfócitos, associados a formas amastigotas de *Leishmania* spp. No prepúcio e no escroto, também, são descritas lesões ulcerativas crônicas, microscopicamente caracterizadas por infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos, poucos neutrófilos, macrófagos com numerosas formas amastigotas de *Leishmania* e alguns casos apresentam processo inflamatório granulomatoso (Silva *et al*, 2008). Há relatos de autópsias

testiculares de indivíduos com LV que apresentaram macrófagos com *Leishmania* spp. e também lesões escrotais pós-Kalazar (Martinez-Garcia *et al*, 1996).

Estudos também descrevem a presença do protozoário *Leishmania* spp. em amostras de urina (Singh, 2006). Riera e Valadares em 1996, a partir do cultivo de amostras de sêmen e de urina de cães infectados conseguiram isolar o parasito. Formas amastigotas de *L. infantum* também foram observadas em cão gravemente doente, pela análise do sedimento urinária e confirmado pelo método de PCR. Relatos de 1923 e 1993 descrevem a presença de formas de amastigotas de *Leishmania* spp. em amostras de urina humana e crescidas em cultura. A origem desse achado em amostra de urina é incerta, bem como a taxa de sobrevivência do protozoário, uma hipótese seria pela lesão renal ocasionada na manifestação visceral da leishmaniose. As formas se originariam dos macrófagos envolvidos no processo inflamatório renal. Outra hipótese sugere que alguns componentes da urina humana são benéficos para o crescimento do parasito (Franceschi *et al*, 2007). Isso foi demonstrado em um estudo comparativo de técnicas para detecção de amastigotas e de promastigotas no diagnóstico da LT. Desenvolvido em 2002, o trabalho apresenta a urina como um meio de cultivo que pode substituir o soro fetal bovino. Outros autores também já haviam comprovado a eficácia da urina humana no crescimento de formas amastigotas em cultivo de células e promastigotas mantidas em laboratório (Sampaio *et al*, 2002).

Neste estudo, a positividade nas amostras de esperma foi mais significativa que no sangue. No total de 49 amostras de esperma, 26 (53,1%) tiveram seus DNAs amplificados, resultados que podem ser justificados pelo descrito na literatura, que aponta o aparelho reprodutor, como um reservatório para formas de *Leishmania* spp. Resultados que contribuem para a hipótese da possível transmissão sexual de leishmaniose em humanos. De interesse, pesquisa desenvolvida com as mesmas amostras deste estudo também demonstrou a presença de infecção pelo de *T. cruzi* em 83% (44/53) das amostras (Pimentel, 2012). Tais achados reforçam a necessidade de aprofundar o estudo a respeito dessa via como forma de transmissão.

Ainda, em relação ao *T. cruzi*, experimento desenvolvido com camundongos na fase aguda da doença identificou ninhos de amastigotas nos testículos dos machos infectados, fator determinante para que 100% das fêmeas sadias cruzadas com estes machos fossem infectadas (Silva, 2013). A transmissão de *T. cruzi* por fêmeas infectadas para machos sadios também aconteceu, possivelmente, devido à presença do parasito nos fluidos vaginais contaminados e por microfissuras no órgão genital. Assim, embora existam alguns relatos que sugeriram a

transmissão sexual da leishmaniose, este trabalho é o primeiro relato da identificação de DNA de *Leishmania* spp. no esperma de indivíduos infectados.

VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo permitiu diagnosticar nDNA de *L. amazonensis* e *L. infantum* em células de sangue e esperma de indivíduos residentes nos municípios de Barcarena e de Breves. Municípios localizados no Pará, região Amazônica brasileira, área endêmica para leishmaniose e para doença de Chagas.

O diagnóstico foi realizado com dois testes, ELISA e PCR, com alta sensibilidade e especificidade. A partir dos resultados, foi possível avaliar a concordância e a discrepância entre os testes. O teste de ELISA apresentou positividade superior, próximo a duas vezes o valor do resultado de PCR, uma alta sensibilidade que sugere reações cruzadas. Assim, os resultados reafirmam a necessidade de técnicas mais específicas como a PCR, principalmente em laboratórios de rotina para diagnóstico de leishmaniose, de Chagas e de possíveis casos de infecções mistas.

A presença do nDNA de *Leishmania* spp. no sangue dos indivíduos sugeriu infecção ativa em uma das quatro famílias estudadas, essa residente em Barcarena. O município é descrito como endêmico para leishmaniose visceral e o sequenciamento confirmou a presença de *L. infantum*, bem como a identificação de *L. amazonensis*, espécie presente em manifestações cutâneas e difusa. Os resultados da análise do esperma, com 53,1% de positividade, potencializam a via sexual como forma de transmissão.

Como a área é endêmica para leishmaniose e para Chagas, buscou-se avaliar a ocorrência de infecções mistas, pouco descrita na literatura. Pela pesquisa de nDNA, 19/108 (17,59%) indivíduos foram diagnosticados com infecção mista. Conhecimento de extrema importância para o diagnóstico, para tratamento e aprimoramento de políticas públicas visando o desenvolvimento de medidas de prevenção e de controle eficiente dessas infecções.

Ao longo do desenvolvimento do estudo, destacam-se algumas limitações como a negação para a doação de esperma e a alta concentração de DNA exigido pelo sequenciamento que impossibilitou a investigação de algumas amostras.

Conclui-se esta pesquisa com informações relevantes que contribuem para melhor compreensão das leishmanioses na região Amazônica, agregando dados epidemiológicos, de transmissão, de múltiplas infecções e necessidade de diagnóstico cada vez mais preciso.

VIII. PERSPECTIVAS

A pesquisa contribuiu para melhorar a compreensão das leishmanioses na região Amazônica. No entanto, estudos devem ser realizados com o objetivo de se traçar estratégias para o combate e a prevenção dessa endemia e também para confirmação da via sexual como forma de transmissão. Possíveis estratégias seriam isolamento do parasito em amostras de esperma de animais experimentais e humanos, além de estudos epidemiológicos que visem determinar a prevalência das leishmanioses na região Amazônica.

IX. REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. den. **Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence**. PLOS ONE, 7 (5). 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>>
- AMEEN, M. **Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics**. Clinical and Experimental Dermatology, 35 (7), 699-705.2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2230.2010.03851.x>>
- ARAÚJO, P. F. **Estudo genético, imunológico e parasitológico das infecções pelo *Trypanosoma cruzi* em Famílias do estado do Pará, Brasil**. 2012. 135 páginas. Tese de Doutorado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.
- AVILA-GARCÍA, M.; MANCILLA, J.; SEGURA-CERVANTES, E.; GALINDO-SEVILLA, N. **Transmission to Humans**. Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment, Chapter 2, 534 pages. Publisher: InTech. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5772/57271>>
- ASSIS, J.; QUEIROZ, N. M. G. P.; SILVEIRA, R. C. V.; NUNES, C. M.; OLIVEIRA, T. M. F. S.; JUNIOR, A. C. F. N.; NEVES, M. F.; MACHADO, R. Z.; BUZETTI, W. A. S. **Estudo comparativo dos métodos diagnósticos para Leishmaniose Visceral em cães oriundos de Ilha Solteira, SP**. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 19 (1), 17-25. 2010. Disponível em: <<http://ISSN 1984-2961>>
- BACHA, H. A.; TUONA, F. F.; ZAMPIERIC, R. A.; FLOETER-WINTERC, L.M.; OLIVEIRAD, J.; NICODEMO, A. C.; QUIROGAD, M. M.; MASCHERETTID, M.; BOULOSA, M.; AMATOE, V. S. **Leishmania (Viannia) braziliensis identification by PCR in the state of Para, Brazil**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 105 (3) 173–178. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.trstmh.2010.11.010>>
- BARROS, M. P.; INNOCENTE, A. M.; SILVA, G. N. S.; DUARTE, M.; VUNDA, S. L. L.; TASCA, T. **Mecanismo específico de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp.** Revista Liberato, 13 (20), 01-134. 2012.
- BASTRENTA, B.; MITA, N.; BUITRAGO, R.; VARGAS, F.; FLORES, M.; MACHANE, M.; YACSIK, N; TORREZ, M; LE PONT, F; BRENIÈRE, F. **Human Mixed Infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a Sub Andean Bolivian Area: Identification by Polymerase Chain Reaction/hybridization and Isoenzyme**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98 (2), 255-264. 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762003000200015>>
- BATES, P. A. **Leishmania sand fly interaction: progress and challenges**. Current Opinion in Microbiology, 11, 340–344. 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003>>

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. **Microreview: *Leishmania*–host interactions: what has imaging taught us?** Cellular Microbiology, 13 (11), 1659–1667. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01658.x>>

BELO, V. S.; WERNECK, G. L.; BARBOSA, D. S.; SIMÕES, T. C.; NASCIMENTO B. W. L.; SILVA, E. S.; STRUCHINER, C. J. **Factors associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 7 (4). 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002182>>

BENITES, A. P.; FERNANDES, C. E.; BRUM, K. B.; ABDO, M. A. G. S. **Presença de formas amastigotas de *Leishmania chagasi* e perfil leucocitário no aparelho reprodutivo de cães.** Pesquisa Veterinária Brasileira, 3 (1), 72-77. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2011000100011>>

BOER, M. DEN; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. **Review: Leishmaniasis impact and treatment access.** Clinical Microbiology and Infection, 17 (10), October 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x>>

BOGGILD, A. K.; RAMOS, A. P.; VALENCIA, B. M.; VELAND, N.; CALDERON, F.; AREVALO, J.; LOW, D. E.; LLANOS-CUENTAS, A. **Diagnostic Performance of Filter Paper Lesion Impression PCR for Secondarily Infected Ulcers and Nonulcerative Lesions Caused by Cutaneous Leishmaniasis.** Journal of Clinical Microbiology, 49 (3), 1097-1100. 2011. Disponível em: <<http://doi.org/10.1128/JCM.02457-10>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Leishmaniose Visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011a. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/editora>>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011b. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/editora>>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. 3ª Reimpressão. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013a. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/editora>>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. 5ª Reimpressão. Brasília: Ministério da Saúde, 2013b. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/editora>>

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Pará** / Ministério da Saúde, Secretaria de

Vigilância em Saúde. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011c. Disponível em:
<<http://www.saude.gov.br/editora>>

CARTER, K.L.; ROBERTSON, B.C; KEMPENAERS, B. **A differential DNA extraction method for sperm on the perivitelline membrane of avian eggs. Technical notes, Blackwell Science, Ltd.** Molecular Ecology, 9, 2149-2154. 2000.

CARVALHO, L. O. P.; SILVA, A. L. A.; HARDOIM, D. J.; TEDESCO, R. C.; MENDES, V. G.; COSTA, S. C. G.; SILVA, K. **Trypanosoma cruzi and mioid cells from seminiferous tubules: components of extracellular matrix in experimental Chagas disease.** International Journal of Experimental Pathology, 90, 52-57. 2009. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00592.x>>

CAVALCANTI, M. P.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. **Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias.** Revista de Patologia tropical, 37 (1), 1-14. 2008.

CHAGAS, E. CUNHA, A. M.; FERREIRA, L. C.; DEANE, L.; DEANE, G. GUIMARÃES, F. N.; PAUMGARTTEN, M. J.; SÁ, B. **Leishmaniose Visceral Americana.** Relatórios dos trabalhos realizados pela comunidade encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1937. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 31 (1). 1938.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. **Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?** Nature reviews microbiology, 5, 873-882. 2007. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1748>>

CHARGUI, N.; HAOUAS, N.; JAOUADI, K.; GORCII, M.; PRATLONG, F.; DEDET, J.P.; MEZHOUD, H.; BABBA, H. **Usefulness of a PCR-based method in the detection and species identification of Leishmania from clinical samples.** Pathologie Biologie, 60, 75-79. 2012. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2011.11.011>>

COIMBRA, E. S.; CASTRO-JÚNIOR, J. G.; SCOPEL, K. K. G.; FREIRE, M. L.; CAMPOS, S. P.S.; NOCELLI, S.; SILVA, E.; PORROZZI, R.; MARQUES, M. J.; COLOMBO, F.; SILVEIRA, R. C. V.; SILVA, M. R.; MITTEROFHE, A.; LIMA, A. C.; CAMPOS, G. M. M.; PINHEIRO, I. O.; CASTRO, M. F.; GONÇALVES, M.; GUIMARÃES, R. J. P. S.; FILHO, J. D. A.; SILVA, A. D.; CARVALHO, G. S. G.; ALMEIDA, A. C.; PAULA, D. S. T.; MACHADO, P. A. **Investigação epidemiológica do calazar canino e de flebotomíneos no município de Juiz de Fora (MG) e prospecção de moléculas com potencial atividade leishmanicida.** Revista de Saúde Pública do SUS/MG, 1 (1), 70-80. 2013. Disponível em:
<<http://ISSN2318-2598>>

COSTA, J. F.; WANDERLEY, J. L. M.; COSTA, J. M. L.; BARCINSKI, M. A.; BARRAL, A.; BORGES, V. M.; **Mimetismo apoptótico como possível mecanismo imunopatogênico da Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD).** Gazeta Médica da Bahia, 79 (3), 40-44. 2009a. Disponível em:
<<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1029/1005>>

COSTA, J. M. L.; COSTA, Af Ali U. M. L.; ELKHOURY, A. N.; BEZERRIL, A. C. R.; BARRAL, A.; SALDANHA, A. C. R. **Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil após**

60 anos de sua primeira descrição. *Gazeta Médica da Bahia*, 79 (3), 16-24. 2009c.

Disponível em:

<<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1025/1001>>.

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*, 79 (3), 70-83. 2009b. Disponível em:

<<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1033/1009>>

COTONE, G.; MARINO, G.; POGLAYEN, G.; GRAMICCIA, M. L. A.; ZANGHÌ, A. **Canine transmissible venereal tumour parasitized by *Leishmania infantum*.** *Veterinary Research Communications*, 27, 549-553. 2003. Disponível em:

<<http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1026047725012?LI=true>>

CRUZ, I.; MILLET, A.; CARRILLO, E.; CHENIK, M.; SALOTRA, P.; VERMA, S.; VELAND, N.; JARA, M.; ADAUI, V.; CASTRILLÓN, C.; ARÉVALO, J.; MORENO, J.; CAÑAVATE, C. **An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis.** *Experimental Parasitology*, 134, 281-289. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2013.03.026> >

DEBORGGRAEVE, S.; LAURENT, T.; ESPINOSA, D.; AUWERA, G. V. D.; MBUCHI, M.; WASUNNA, M.; EL-SAFI, S.; AL-BASHEER, A. A.; ARÉVALO, J.; VERÁSTEGUI, C. M.; LECLIPTEUX, T.; MERTENS, P.; DUJARDIN, J. C.; HERDEWIJN, P.; BÜSCHER, P. **A Simplified and Standardized Polymerase Chain Reaction Format for the Diagnosis of Leishmaniasis.** *The Journal of Infectious Diseases*, 198, 1565-72. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1086/592509>>

DIAS, J. C. P; NETO, V. A; LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44 (3), 375-379. 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822011005000032>>

DIAS, S. M. S. **Estudo bio-molecular de três estoques mistos de *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. isolados de pacientes chagásicos crônicos após terapêutica específica para a doença de Chagas.** 2006. 61 páginas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiânia, Goiás.

DINIZ S. A.; MELO, M. S.; BORGES, A. M.; BUENO, R.; REIS, B. P.; TAFURI, W. L.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Genital lesions associated with visceral leishmaniasis and shedding of *Leishmania* sp. in the semen of naturally infected dogs.**

Veterinary Pathology Online, 42 (5), 650-8. 2005. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1354/vp.42-5-650>>

EL TAI, N.O.; OSMAN, O.F.; EL FARI, M.; PRESBER, W.; SCHO'NIAN, G. **Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94 (5), 575-9. 2000. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(00\)90093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(00)90093-2)>

FERREIRA, M. U. **Parasitologia contemporânea**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2012. 439 páginas.

FILHO, G. B.; PENA, S. D. J. **Molecular biological techniques for the diagnosis of infectious diseases**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 25 (1), 59-71. 1992. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v25n1/09.pdf>>

FRANCESCHI, A.; MERILDI, V.; GUIDI, G.; MANCIANTI, F. **Occurrence of Leishmania DNA in urines of dogs naturally infected with leishmaniasis**. Veterinary Research Communications, 31, 335-341. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11259-006-3477-z>>

FURUSAWA, G. P.; BORGES, M. F. **Colaboração para o conhecimento do histórico da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil: possíveis casos entre escravos na Vila de Vassouras-RJ, nos anos 1820 a 1880**. Revista de Patologia Tropical, 43 (1), 7-25. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5216/rpt.v43i1.29366>>

GARCEZ, L. M.; CARDOSO, J. F.; CHAGAS, A. P.; MIRANDA, J. F. C.; SOUZA, G. C. R.; SOARES, D. C.; BEZERRA, L. M.; FRAIHA, H.; SHAW, J. J.; GOTO, H. **Vigilância da leishmaniose visceral em localidades epidemiologicamente distintas em Juruti, um município minerário do Estado do Pará, Brasil**. Revista Pan-Amazônica de Saúde, 1 (1), 107-116. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232010000100016>>

GIL, J.; CIMINO, R.; LÓPEZ, Q. I.; CAJAL, S.; ACOSTA, N.; JUAREZ, M.; ZACCA, R.; ORELLANA, V.; KROLEWIECKI, A.; DIOSQUE, P.; NASSER, J. **Reactivity of GST-SAPA antigen of Trypanosoma cruzi against sera from patients with Chagas disease and leishmaniasis**. Medicina (Buenos Aires), 71 (2), 113-9. 2011.

GONZALEZ, J. L.; GALLEGO, E.; CASTANÕ, M.; RUEDA, A. **Testicular amyloidosis in hamsters experimentally infected with Leishmania donovani**. Br. J. Exp. Pathol, 64, 518-523. 1983. Disponível em: <PMCID: PMC2040823>

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis**. Infectious Disease Clinics of North America, 26, 293-307. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>>

GRAÇA, G. C.; VOLPINI, A. C.; ROMERO, G. A. S.; NETO, M. P. O.; HUEB, M.; PORROZZI, R.; BOITÉ, M. C.; CUPOLILLO, E. **Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 107 (5), 664-674. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000500014>>

GUERBOUJ, S.; VICTOIR, K.; GUIZANI, I.; SERIDI, N.; NUWAYRI-SALTI, N.; BELKAID, M.; ISMAIL, R. B.; RAY, D. L.; DUJARDIN, J. C. **Gp63 gene polymorphism and population structure of Leishmania donovani complex: influence of the host selection pressure?** Parasitology, 122, 25-35. 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000007125>>

HECHT, M. M.; NITZ, N.; ARAUJO, P. F.; SOUSA, A. O.; ROSA, A. C.; GOMES, D. A.; LEONARDECZ, E.; TEIXEIRA, A. R. L. **Inheritance of DNA transferred from American**

trypanosomes to human hosts. PLOS One, 5 (2). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009181>>

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, P.; RAMIREZ, A. G. **Polymerase Chain Reaction: Types, Utilities and Limitations.** Chapter 8. Edited by Dr Patricia Hernandez-Rodriguez. Published online 30, May, 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.5772/37450>>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2014.

Disponível em:

<<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=150130&search=paralbarcarenalinfograficos:-informacoes-completas>>. Acesso em: 05 de maio de 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2014.

Disponível em:

<<http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=150180&search=paralbreveslinfograficos:-informacoes-completas>>. Acesso em: 05 de maio de 2014.

JÚNIOR, R. D. N.; F. PINHEIRO, G.; NAIFF, M. F.; SOUZA, I. S.; CASTRO, L. M.; MENEZES, M. P.; FRANCO, A. M. R. **Estudo de uma série de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil.** Revista de Patologia Tropical, 38 (2), 103-114. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/iptsp/article/viewFile/6610/4868>>

KAYE, P.; SCOT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface.** Nature Reviews Microbiology, 9. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>

KHOSRAVI, S.; HEJAZI, S. H.; HASHEMZADEH, M.; ESLAMI, G.; DARANI, H. Y. **Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: Real-time PCR based on tryparedoxin peroxidase gene for the detection and identification of *Leishmania* spp.** Vector Borne and Zoonotic Diseases, 49, 15-18. 2012. Disponível em: <<http://www.mrcindia.org/journal/issues/491015.pdf>>

KILLICK–KENDRICK, R. **The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903–1942.** Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 106, 131-137. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1007/s13149-013-0285-x>>

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. **Review: Vaccines to prevent leishmaniasis.** Clinical & Translational Immunology, (3). 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/cti.2014.4>>

LAINSON, R. **The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy.** Revista Pan-Amazônica de Saúde, 1 (2). 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>>

LAINSON, R.; KILLICK-KENDRICK, R.; FLISSER, A. **Ecological Interactions in the Transmission of the Leishmaniasis [and Discussion].** Philosophical Transactions of Royal Society of London B, 321, 1207. 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.1988.0099>>

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; RYAN, L.; RIBEIRO, R. S. M.; SILVEIRA, F. T. **Leishmaniasis in Brazil. XXI. Visceral leishmaniasis in the Amazon Region and further**

observations on the role of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) as the vector. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79, 223-226. 1985. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(85\)90340-2](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(85)90340-2)>

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. ***Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes.** Proc. R. Soc. Lond. B. 199, 309-320. 1977. Disponível em: <<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/pc/artigos/1977/procrsoclondb1977n199p309-320.pdf>>

LAURIA-PIRES, L; BRAGA, M.S; VEXENAT, A.C; NITZ, N; SIMÕES-BARBOSA, A; TINOCO, D.L; TEIXEIRA, A.R.L. **Progressive chronic Chagas Heart disease ten years after treatment with anti-trypanosoma nitroderivatives.** The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 63, (3-4): 111-118. 2000. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/63/3/111.full.pdf>>

LEISHMAN, W. B.; M. B.; R. AM. C. **On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India.** The British Medical Journal, 1 (2213), 1252-1254. 1903. Disponível em: <<http://PMC2513550>>

LIMA; E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C; SAMPAIO, R. N. R. **Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.** Anais Brasileiros de Dermatologia, 82 (2), 111-24. 2007.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; M. Z.; TRONCARELLI, LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. **Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI).** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 46 (3), 181-187. 2009. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26765>>

MANNA, L; PACIELLO, O.; MORTE, R. D.; GRAVINO, A. E. **Detection of *Leishmania* parasites in the testis of a dog affected by orchitis: case report.** Parasites & Vectors, 5, 216. 2012. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/216>>

MANSUETO, P.; VITALE, G.; SEIDITA, A.; GUARNERI, F. P.; PEPE, I.; RINOLLO, C.; ROSA, S.; RINI, G.; CILLARI, E.; FEDE G. **Advances in leishmaniasis immunopathogenesis.** Acta Medica Mediterranea, 27 (7). 2011. Disponível em: <http://actamedicamediterranea.com/medica/2011/med2011_pag-7.pdf>

MAPA. MINISTÉRIO DA SAÚDE E MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Nota de esclarecimento sobre as Vacinas Antileishmaniose Visceral Canina registradas no MAPA, 2009.** Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Registros_AtORIZACOES/Produtos_veterinarios/Comunicacoes_e_instrucoes_tecnicas/Nota_de_esclarecimento%20_sobre_a_vacina_.pdf>

MARANHÃO, A. C. B. **Prevalência de Doenças de Chagas e Leishmanioses em Tribos Indígenas Brasileiras.** 2004. 111 páginas. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília.

MARINO, G.; GAGLIO, G.; ZANGHÌ, A. **Clinico pathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs.** Journal of Small Animal Practice, 53, 323-327. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01201.x>>

MAROLI, M.; FELICIANGLI, M. D.; BICHAUD, L.; CHARREL, R. N.; GRADONI, L. REVIEW ARTICLE. **Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern.** Medical and Veterinary Entomology, 27, 123-147. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>>

MAROOF, A.; BROWN, N.; SMITH, B.; HODGKINSON, M. R.; MAXWELL, A.; LOSCH, F. O.; FRITZ, U.; WALDEN, P.; LACEY, C. N. J.; SMITH, D. F.; AEBISCHER, T.; KAYE, P. M. **Therapeutic Vaccination With Recombinant Adenovirus Reduces Splenic Parasite Burden in Experimental Visceral Leishmaniasis.** The Journal of Infectious Diseases, 205, 853-6. 2012. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/infdis/jir842>>

MARTINEZ, M. A. **Microbiological diagnosis of sexually transmitted infections (STI): Part 1. Non-viral STI.** Revista Chilena de Infectologia, 26 (6), 529-539. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/S0716-10182009000700008>>

MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J.; MAYER, R.; SANCHEZ, S.; NISTAL, M. **Protozoan infections in the male genital tract.** Review Article. The Journal of Urology, 156, 340-349. 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)65846-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5347(01)65846-4)>

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACHA, J. **Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis.** Acta Tropica, 130, 167-174. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.10.002>>

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. **Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease.** PLOS Pathogens, 9 (1). 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003053>>

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. **Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment.** QJ M: An International Journal of Medicine, 107 (1), 7-14. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.1093/qjmed/hct116>>

MELO, E. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. **Review Article: Challenges in the Therapy of Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Public Health Perspective.** Journal of Tropical Medicine, 319234. 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1155/2013/319234>>

MENDES, D. G.; LAURIA-PIRES, L.; NITZ, N.; LOZZI, S. P.; NASCIMENTO, R. J.; MONTEIRO, P. S.; REBELO, M. M.; ROSA, A. C.; SANTANA, J. M.; TEIXEIRA, A. R. L. **Exposure to mixed asymptomatic infections with *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* in the human population of the greater Amazon.** Tropical Medicine and International Health, 12 (5), 629-636. 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01831.x>>

MENDES, D.S.; DANTAS, M. L.; GOMES, J. M.; SANTOS, W. L. C.; SILVA, A. Q.; GUIMARÃES, L. H.; MACHADO, P. R.; CARVALHO, E. M.; ARRUDA, S. **Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in**

non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 108 (1), 18-22. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-2762013000100003>>

MENDES-SOUSA, A. F.; NASCIMENTO, A. A. S.; QUEIROZ, D. C.; VALE, V. F.; FUJIWARA, R. T.; ARAÚJO, R. N.; PEREIRA, M. H.; GONTIJO, N. F. **Different Host Complement Systems and Their Interactions with Saliva from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae) and *Leishmania infantum* Promastigotes.** PLOS ONE, 8. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079787>>

MIR, F.; FONTAINE, E.; REYES-GOMEZ, E.; CARLUS, M.; FONTBONNE, A. **Subclinical leishmaniasis associated with infertility and chronic prostatitis in a dog.** Journal of Small Animal Practice, 53, 419-422. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01224.x>>

NEITZKE-ABREU, H. C.; VENZAZZI, M. S.; BERNAL, M. V. Z.; REINHOLD-CASTRO, K. R.; VAGETTI, F.; MOTA, C. A.; SILVA, N. R.; ARISTIDES, S. M. A.; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. **Detection of DNA from *Leishmania* (*Viannia*): Accuracy of Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.** PLOS One, 8 (7). 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0062473>>

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE NAS AMÉRICAS (OPAS). **Panorama regional e perfis de países.** Publicação Científica e Técnica N°. 636. Washington, DC. 2012, 232p. Disponível em: <ISBN 978-92-75-71691-5>

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). **Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniasis Visceral en las Américas.** Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 2006, 152p. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=16960&Itemid=>>

PARÁ. Governo do estado do Pará. Secretaria de estado de planejamento, orçamento e finanças. Instituto de desenvolvimento econômico, social e ambiental do Pará. **Estatística municipal, Barcarena, 2013a.** Disponível em: <<http://iah.iec.pa.gov.br/iah/fulltext/georeferenciamento/barcarena.pdf>>

_____. Governo do estado do Pará. Secretaria de estado de planejamento, orçamento e finanças. Instituto de desenvolvimento econômico, social e ambiental do Pará. **Estatística municipal, Breves, 2013b.** Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002001439>>

PEREIRA, E. A. **Leishmaniose Visceral no município de Barcarena, Pará: importância do comportamento da enzootia canina por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* e de outros fatores para a infecção humana.** 2005. 143 páginas. Dissertação de Mestrado pelo Núcleo de Medicina Tropical. Universidade Federal do Pará.

PEREIRA, M. R.; ROCHA, F. S.; MELO, C. G.; MAGALHÃES, C. L. T.; CALIGIORNE, R. B.; **Aplicação das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase convencional (cPCR) e em tempo real (qPCR) para detecção do genoma *Leishmania* sp em amostras biológicas.** Revista de Saúde Pública do SUS/MG, 1 (1), 57-58. 2013. Disponível em: <<http://ISSN 2318-2598>>

PIMENTEL, C. F. R. **Herança de sequências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de células germinativas com persistência de nDNA de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 102 páginas. Dissertação de Mestrado em Patologia Molecular, Universidade de Brasília.

PINTO, A. Y. N.; VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; JUNIOR, A. G. F.; COURA, J. R. **Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 41 (6), 602-614. 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822008000600011>>

PIOT, P.; QUINN, T. C. **Response to the AIDS Pandemic - A Global Health Model**. New England Journal of Medicine, 368 (23), 2210-2218. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1201533>>

QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis**. Parasitology, 136, 1915-1934. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009991156>>

REIS, S. R.; FRANCO, A. M. R.; **A Leishmaniose Tegumentar Americana no estado do Amazonas, Brasil. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Canina**. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária, Ano XVI, nº 50, 2010. Brasília/DF. Disponível em: <<http://issuu.com/cfmvrevista/docs/cfmv50>>

RIERA, C.; VALLADARES, J. E. **Viable *Leishmania infantum* in urine and semen in experimentally infected dogs**. Parasitology Today, 12 (10), 412. 1996. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)90062-9](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(96)90062-9)>

ROGERS, M. E. **The role of *Leishmania proteophosphoglycans* in sand fly transmission and infection of the mammalian host. Review article**. Frontiers in Microbiology, 3, 223. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00223>>

ROGERS, M. E.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. **The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis***. Parasitology, 124, 495-507. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1017/S0031182002001439>>

ROGERS, M. E.; ILG, T.; NIKOLAEV, A. V.; FERGUSON, M. A. J.; BATES, P. A. **Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of Fppg**. Nature, 430, 463-467. 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature02675>>

ROMERO, G. A. S.; BOELAERT, M. **Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review**. PLOS Neglected Tropical Diseases, 4 (1). 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>>

ROSAS FILHO, M. S.; SILVEIRA, F. T. **Epidemiologia, clínica e imunologia da infecção humana por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em área endêmica de Leishmaniose Visceral no Pará**. Revista Paraense de Medicina, 21 (3). 2007. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpm/v21n3/v21n3a02.pdf>>

ROSENTHAL, P. J.; CHAISSON, R. E.; HADLEY, W. K.; SANGUESSUGA, J. H. **Rectal Leishmaniasis in a patient with Acquired Immunodeficiency Syndrome**. The American Journal of Medicine, 84. 1988. Disponível em: <[http:// PMID: 3407656](http://PMID:3407656) [PubMed - indexado para MEDLINE]>

ROSS, M. R.; F. R. S.; F. R. C. S.; C. B. **Further notes on Leishman's bodies**. The British Medical Journal, 2 (2239), 1401. 1903. Disponível em: <<http://PMC2514909>>

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. 3 ed.

SAMPAIO, R. N. R.; ANDRADE, G. B.; PEREIRA, A. C.; SILVA, E. A.; CUBA, C. A. C.; **Estudo comparativo de técnicas de demonstração de amastigotas e isolamento de promastigotas no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana**. Anais Brasileiros de Dermatologia, 77 (5), 557-561. 2002. Disponível em: <<http://dx.doi.org/>

SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; FILHO, A. V. C. **O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6**. Anais Brasileiros de Dermatologia, 84 (2), 125-8. 2009.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. **Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil**. Revista de Saúde Pública, 3, 153-157. 1969. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v3n2/05.pdf>>

SHIMABUKURO, P. H. F.; GALATI, E. A. B. **Lista de espécies de Phlebotominae (Diptera, Psychodidae) do Estado de São Paulo, Brasil, com comentários sobre sua distribuição geográfica**. Biota Neotropical, 11 (1). 2011. Disponível em: <<http://www.biotaneotropica.org.br/v11n1a/pt/fullpaper?bn0361101a2011+pt>>

SHIRIAN, S.; ORYAN, A.; HATAM, G. R.; PANAH, S.; DANESHBOOD, Y. **Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis**. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 138 (2), 235-240. 2014. Disponível em: <<http://doi.org/10.5858/arpa.2013-0098-OA>>

SILVA, A. R. **Transmissão Sexual do *Trypanosoma cruzi* em *Mus musculus***. 2013. 94 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas, Universidade de Brasília.

SILVA, E. S.; GAIOSO, A. C. I. **Leishmaniose visceral no estado do Pará**. Revista Paraense de Medicina, 27 (2). 2013. Disponível em: <<http://files.bvs.br/upload/S/0101-5907/2013/v27n2/a3671.pdf>>

SILVA, F. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T.M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Venereal transmission of canine visceral leishmaniasis**. Veterinary Parasitology, 160 (1-2), 55-9. 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.079>>

SILVA, F. L.; RODRIGUES, A. A.; REGO, I. O.; SANTOS, R. L.; OLIVEIRA, R. G.; SILVA, T. M.; XAVIER, M. N.; NASCIMENTO, E. F.; Santos, R. L. **Genital lesions and distribution of amastigotes in bitches naturally infected with *Leishmania chagasi*.**

Veterinary Parasitology, 151 (1), 86-90. 2008. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.09.032>>

SILVA, J. G. L.; SILVA, T. M.; PELOSO, E. F.; COELHO, G. L. L. M.; MAYRINK, W.; ARIOS, M. C. F.; SILVA, P. M. F.; MARQUES, M. J. **Comparison among three polymerase chain reaction assays on detection of DNA from *Leishmania* in biological samples from patients with american cutaneous leishmaniasis.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 45 (2), 257-259. 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822012000200023>>

SILVEIRA, F. T. **Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: aspectos clínicos e epidemiológicos.** Gazeta Médica da Bahia, 79 (3), 25-29. 2009. Disponível em:

<<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1026/1002>>

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. **Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99 (3), 239-251. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v99n3/v99n3a01.pdf>>

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E. **Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 100 (5), 525-534, 2005. Disponível em: <<http://PMID: 16184231>>

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. **Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Review Article.** Parasite Immunology, 31 (8), 423-31. 2009. Disponível em: <<http://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01116.x>>

SILVEIRA, F. T.; MULLER, S. R.; SOUZA, A. A. A.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. **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, 22 (1). 2008. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpm/v22n1/v22n1a02.pdf>>

SINGH, S. **New developments in diagnosis of leishmaniasis. Review Article.** Indian Journal of Medical Research, 123, 311-330. 2006. Disponível em:

<<http://icmr.nic.in/ijmr/2006/march/0312.pdf>>

SOUZA, A. A. A.; SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; BARATA, I. R.; SILVA, M. G. S.; LIMA, J. A. N.; PINHEIRO, M. S. B.; SILVA, F. M. M.; VASCONCELOS, L. S.; CAMPOS, M. B.; ISHIKAWA, E. A. Y. **Fauna flebotômica da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Brasil, e sua possível implicação na transmissão da leishmaniose tegumentar americana.** Revista Pan-Amaz Saude, 1 (1), 45-51. 2010. Disponível em: <<http://doi.org/10.5123/S2176-62232010000100007>>

SOUZA, A. P.; SOTO, M.; COSTA, J. M. L.; BOAVENTURA, V. S.; OLIVEIRA, C. I.; CRISTAL, J. R.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. **Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using *Leishmania* Recombinant Proteins.** PLOS One, 8 (6), 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0066110>>

SPENCE, A.; **Anatomia humana básica.** Tradução Edson Aparecido Liberti. São Paulo, Editora Manole, 1991. 713 páginas.

SRIVASTAVA, P.; MEHROTRA, S.; TIWARY, P.; CHAKRAVARTY, J. SUNDAR, S. **Diagnosis of Indian Visceral Leishmaniasis by Nucleic Acid Detection Using PCR.** PLOS ONE, 6 (4). 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019304>>

SYMMERS, WSC. **Leishmaniasis acquired by contagion: a case of marital infection in Britain.** Lancet, 1 (7116), 127-32. 1960. Disponível em: <PMID: 13836213 [PubMed - indexed for MEDLINE]>

TAVARES, N. M.; SANTOS, D. M.; OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. **Estratégias de vacinação contra leishmaniose visceral e cutânea: lições dos modelos experimentais.** Gazeta Médica da Bahia, 79 (3), 110-121. 2009. Disponível em: <<http://www.gmbahia.ufba.br/index.php/gmbahia/article/viewFile/1038/1014>>

TEIXEIRA, A. R. L.; ROTERS, F.; MOTT, K. E. **Acute Chagas disease.** Gazeta Médica da Bahia, 70, 176-186. 1970.

TEIXEIRA, A. R. L.; VEXENAT, A. C. **Comunicação: o real significado de exames sorológicos no diagnóstico de doenças endêmicas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29 (4), 379-382. 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821996000400013>>

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P. SOUZA, W. **The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations.** PLOS Pathog, 9. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003594>>

TELES, E. J. C. **Perfil epidemiológico da leishmaniose visceral em Barcarena, um município minerário no estado do Pará, Brasil.** 2011. 45 páginas. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Belém. Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca.

TOZ, S. O.; CULHA, G.; ZEYREK, F. Y.; ERTABAKLAR, H.; M. ALKAN, Z.; VARDARLI, A. T.; GUNDUZ, C.; OZBEL, Y. **A Real-Time ITS1-PCR Based Method in the Diagnosis and Species Identification of *Leishmania* Parasite from Human and Dog Clinical Samples in Turkey.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 7 (5), 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/10.1371/journal.pntd.0002205>>

TSUKAYAMA, P.; NÚÑEZ, J. H.; SANTOS, M. L.; SOBERÓN, V.; LUCAS, C. M.; MATLASHEWSKI, G.; LLANOS-CUENTAS, A.; ORE, M.; BALDEVIANO, G. C.; EDGEL, K. A.; LESCANO, A. G.; GRAF, P. C. F.; BACON, D. J. **A FRET-Based Real-Time PCR Assay to Identify the Main Causal Agents of New World Tegumentary Leishmaniasis.** PLOS Neglected Tropical Diseases, 7 (1), 2013. Disponível em: <<http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001956>>

TURCHETTI, A. P.; SOUZA, T. D.; PAIXÃO, T. A.; SANTOS, R. L. **Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis**. Review Article. The Journal of Infection in Developing Countries, 8 (4), 403-407. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3855/jidc.4108>>

VALE, E. C. S.; FURTADO, T. **Leishmaniose Tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia**. Anais Brasileiro de Dermatologia, 80 (4): 421-8. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962005000400015>>

VEXENAT, A. C.; C. SANTANA, J. M. E TEIXEIRA, A. R. L. **Cross-reactivity of antibodies in human infections by the kinetoplastid protozoa *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* e *Leishmania (Vianna) braziliensis***. Revista do Instituto de Medicina Tropical, 38 (3), 177-185. 1996. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000300003>>

VIANNA G. **Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas”**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 3, 276-292. 1911. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761911000200004>>

VOLF, P.; MYSKOVA, J. **Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors**. Trends in Parasitology, 23 (3), 91-92. 2007. Disponível em: <<http://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.010>>

WEIRATHER, J. L.; JERONIMO, S. M. B.; GAUTAM, S.; SUNDAR, S.; KANG, M.; KURTZ, M. A.; HAQUE, R.; SCHRIEFER, A.; TALHARI, S.; CARVALHO, E. M.; DONELSON, J. E.; WILSON, M. E. **Serial quantitative PCR assay for detection, Species Discrimination, and quantification of *Leishmania* ssp. in Human Samples**. Journal of Clinical Microbiology, 49 (11), 3892. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/JCM.r00764-11>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**. Fact sheet N° 375. Acesso em: 22 de fevereiro de 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

_____. WHO. Technical Report Series. **Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases**. Geneva, 22–26, March 2010.

WRIGHT, J. H. **Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore")**. Journal of Medical Research, 10 (3), 472-482. 1904. Disponível em: <<http://PMC2105980>>

ZANETTE, M. F.; LIMA, V. M. F.; LAURENTI, M. D.; ROSSI, C. N.; VIDES, J. P.; VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; MARCONDES, M. **Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 47 (1). 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-1723-2013>>

Anexo A

Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título: Associação de *loci* das mutações de kDNA de *T. cruzi* no genoma com prognóstico do chagásico.

Informação ao paciente

Nós estamos pedindo seu consentimento para participar voluntariamente em um estudo sobre a Doença de Chagas. Nós queremos saber como a pessoa que tem a infecção pode ter sua saúde alterada. Para isso nós precisamos estudar suas células, onde pode ocorrer a alteração. Talvez essas alterações estejam associadas com as queixas em algumas pessoas. Nós lhe pedimos para participar desse estudo porque sabemos que alguém de sua família tem a doença de Chagas.

Se você decidir participar neste estudo, nós lhe perguntaremos sobre seus filhos e netos; onde você nasceu e sua exposição ao “barbeiro”, sobre seu trabalho e o número de pessoas que vivem em sua casa. Nós tomaremos sua pressão e pulso, e nós faremos eletrocardiograma para analisar a função do seu coração. Quando necessário, será feita monitoração do coração por 24 horas. Nós tiraremos duas amostras de sangue de uma veia de seu braço. Isto pode causar um pequeno desconforto passageiro. Aos homens com alguma alteração comprovada nós pediremos a doação de uma amostra de seu esperma que será obtido por masturbação. Nós lhe daremos os resultados dos exames para você mostrar ao seu médico, se você quiser. Você poderá desistir e se retirar do estudo a qualquer momento, sem prejuízo dos cuidados médicos da equipe do estudo. Esta consulta não será paga por você e não está sujeita a cobrança de qualquer natureza. Nós não garantimos que haverá um benefício direto do estudo para você. Mas nós podemos garantir que o estudo é sigiloso e que nem mesmo a inicial do seu nome aparecerá em qualquer comunicação sobre esse assunto.

Decisão do paciente

Depois de ter lido e/ou ouvido a informação que me foi passada, eu sei o que significa o estudo proposto pelo Professor Antônio Teixeira, da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília e Dra. Adriana Almeida, médica cardiologista, deixo registrado aqui que a minha decisão de participar neste estudo é voluntária e tem a importância de colaborar com a pesquisa para conhecer a doença de Chagas. Eu sei também que a minha participação pode ser interrompida por mim a qualquer momento após o início do estudo, sem prejuízo para meu atendimento pela equipe médica da instituição.

A minha assinatura ou impressão digital testemunhada indica que fui eu quem decidiu participar nessa pesquisa e que eu li e/ou me foi dado conhecimento sobre o estudo, sendo que eu entendi tudo da forma explicada acima. Uma cópia deste documento ficará em meu poder.

Belém, _____ de _____ de 200__.

Dra. Adriana de J. B. de Almeida / CRM 5754 PA / (HCGV) - Fones para contato: (91) 96111152/4005 2553.

VOLUNTÁRIO

PESQUISADOR

Anexo B

Parecer de ética de projeto de pesquisa envolvendo seres humanos.



FUNDAÇÃO PÚBLICA ESTADUAL
HOSPITAL DE CLÍNICAS GASPAR VIANNA
GERÊNCIA DE ENSINO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA




Belém, 21 de maio de 2009.

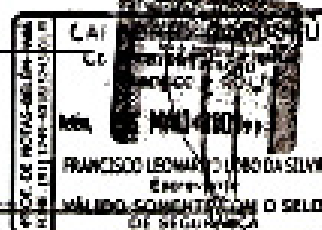
PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Protocolo: Nº 054/2009 - CEP/FHCGV
2. Projeto de Pesquisa: "ASSOCIAÇÃO DE LOCI DAS MUTAÇÕES DE KDNA DE TRYPANOSSOMA CRUZI NO GENOMA COM PROGNÓSTICO DO CHAGÁSICO DA AMAZÔNIA"
3. Pesquisador Responsável: Adriana de Jesus Benevides de Almeida
4. Instituição/Unidade: Fundação Pública Estadual Hospital de Clínicas Gaspar Vianna
5. Data de Entrada: 08/05/2009
6. Data do Parecer: 21/05/2009

PARECER: O Comitê de Ética em Pesquisa da FHCGV analisou o Projeto supracitado e, conforme Parecer datado de 21/05/2009 emitido por este CEP, verificou que foram atendidas todas as adequações recomendadas de acordo com as normas da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: APROVADO


Heider José Lima Reis
Coordenador do CEP/FHCGV



CEP/FHCGV

Ty. Afereis Costas s/n - Pedreira - Belém (PA) - CEP: 66067-660
Fone/Fax: (081)3276-1770
E-mail: gepfhcgv@yahoo.com.br

Anexo C

Folha de rosto da comissão nacional de ética em pesquisa.

Ministério da Saúde
Comissão Nacional de Ética
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS FR - 262358

Plano de Pesquisa:
 Associação de 100-105 Alunos de CONEP de Tugueiros em uma Clínica com Proprietário de Crianças de Amador

Ass de Contabilidade: _____ UFPA: _____ País: _____
 4-20 - C. de Contabilidade: _____ UFPA: _____ País: _____
 Ass de: Interação e Apoio: _____ UFPA: _____ País: _____
 (Caridade Humana, Inovação, Novas Tecnologias, Novos Procedimentos, Biosegurança, Pesquisa com Cooperação)

Objetivos:
 Crianças de Crianças de Amador, Crianças de Crianças de Amador, Crianças de Crianças de Amador, CONEP de Tugueiros em uma Clínica

Registros da Pesquisa

MP de Registro no Cadastro TIC	Total (Brasil) TIC	MP de Registro Total TIC	Grupos Científicos Clique em número de 10 anos.
Plano de	Interação e Apoio	Interação e Apoio	Interação e Apoio

Responsável Pesquisador

Nome do Pesquisador ACRÓNICAS DE BOLA, MEMÓRIAS DE ALABRA	CNPJ 452.126.802-08	Identidade 201088
Ass de Interação e Apoio LACERDADE	Ass de Interação e Apoio LACERDADE	Ass de Interação e Apoio LACERDADE
Endereço Av. J. J. de Almeida, 1000	Bairro CURUPA	Cidade SOLIMÕES - PA
Código Postal 66000-000	Telefone 91.321.1111	Fax 91.321.1111
E-mail acp@univpa.com		

Termos de Compromisso
 Declara que cumpre e cumprirá as exigências da Res. CNS 196/96 e suas complementares. Comprometido a fornecer materiais e dados necessários para a realização da pesquisa, em particular no que se refere ao resultado.
 Assinatura: *[Assinatura]*
 Data: 12.05.2009

Responsável Instituição

Nome FUNDAÇÃO PÚBLICA ESPÍRITUAL HOSPITAL DAS CLÍNICAS GASPAR GASPAR	CNPJ 00.960.870/0001-17	Identificação Nacional BRASIL
Endereço/Cidade Av. dos Desportos	Participação Interação 000	Participação Interação 000
Endereço TRAI, ALFENES COSTA	Bairro CURUPA	Cidade SOLIMÕES - PA
Código Postal 66000-000	Telefone	Fax
E-mail		

Termos de Compromisso
 Declara que cumpre e cumprirá as exigências da Res. CNS 196/96 e suas complementares e comprometer-se a fornecer materiais e dados necessários para a realização da pesquisa, em particular no que se refere ao resultado.
 Assinatura: *[Assinatura]*
 Data: 13.05.09

Responsável Instituição

Nome Universidade de Brasília	CNPJ 00.334.085/0001-17	Identificação Nacional BRASIL
Endereço/Cidade LABORATÓRIO MULTIDISCIPLINAR DE PESQUISA EM DOENÇAS CRONICAS	Participação Interação 000	Participação Interação 000
Endereço Univ. - Campus, Via Norte	Bairro ASA NORTE	Cidade BRASILIA - DF
Código Postal 70910-000	Telefone 61.321.1111	Fax
E-mail pneu@univ.br		

Termos de Compromisso
 Declara que cumpre e cumprirá as exigências da Res. CNS 196/96 e suas complementares.
 Assinatura: _____
 Data: _____

PROTÓCOLO Nº 054-2009
 SECRETARIA CEP/FHCGV
 DATA: 02/05/2009
 SECRETÁRIA *[Assinatura]*

Anexo D

Resultados dos testes PCR e ELISA, utilizados para diagnóstico de *Leishmania* spp. e de *T. cruzi* na população estudada.

Amostras	nDNA <i>T. cruzi</i>		Sorologia <i>T. cruzi</i> (SLA)	nDNA <i>Leishmania</i>		Sorologia <i>Leishmania</i> (SLA)	Sorologia e PCR concordantes <i>Leishmania</i>	Infecção mista (sangue) por PCR
	Sangue	Esperma		Sangue	Esperma			
1	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
2	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
3	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
4	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
5	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
6	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
7	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
12	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
13	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
14	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
15	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
16	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
17	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
22	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
23	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
24	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
25	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
26	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
27	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
28	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
29	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
30	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
31	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
32	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
33	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
34	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
35	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
36	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo

37	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo		Positivo
38	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
39	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
40	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
41	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
42	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
43	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
44	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
45	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
46	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
47	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
48	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
49	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
51	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
52	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
53	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
54	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
55	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
56	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
57	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
58	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
59	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
60	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
61	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
62	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
64	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
66	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
67	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
68	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
69	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
70	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
71	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
72	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
73	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		

75	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
76	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
77	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
78	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
79	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
96	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
97	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
100	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
101	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
102	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
103	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
104	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
105	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
106	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
109	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
110	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
111	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
112	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
113	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
114	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
115	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
116	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
117	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
118	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
119	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
120	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
121	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo		Positivo
122	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
123	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
124	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
125	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo		
126	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo		
127	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo		
128	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		

129	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
130	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	
131	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
132	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
133	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
134	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
135	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
136	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
137	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo		
138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo		
139	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
140	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
85	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo	NR		
87	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Positivo	NR		
91	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Positivo	NR		
1555	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Positivo	Negativo		
1564	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
1567	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
1584	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
1585	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
1593	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
1595	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo		
1610	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
1617	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
1630	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
1667	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo		
1669	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo		
1683	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo	Negativo		
1684	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo	Positivo		
1686	Positivo	Positivo	NR	Negativo	Negativo	Negativo		

NR: Não reagentes.