



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DAS
RELAÇÕES PARASITO-HOSPEDEIRO**

CÁLITA POLLYANNA MARQUES

**Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP que amplifica
os genes *Ribossomal Internal transcribed spacer* (ITS) e *Glucose-6-
phosphate dehydrogenase* (G6PD) para identificação de *Leishmania*
spp. em gel de poliacrilamida**

**Goiânia
2017**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Cálita Pollyanna Marques

Título do trabalho: Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP que amplifica os genes *Ribossomal Internal transcribed spacer (ITS)* e *Glucose-6- phosphate dehydrogenase (G6PD)* para identificação de *Leishmania* spp. em gel de poliacrilamida.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Cálita Pollyanna Marques.
Cálita Pollyanna Marques (Aluna²)

Ciente e de acordo:

Prof. Dra. Ariam Leandro Dorta
Prof. Dra. Ariam Leandro Dorta (Orientadora²)

Data: 22/09/2017.

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

² A assinatura deve ser escaneada.

CÁLITA POLLYANNA MARQUES

Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP que amplifica os genes *Ribossomal Internal transcribed spacer* (ITS) e *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (G6PD) para identificação de *Leishmania* spp. em gel de poliacrilamida

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia das Relações Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Dra. Míriam Leandro Dorta.

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Marques, Cálita Pollyanna

Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP que amplifica os genes Ribossomal Internal transcribed spacer (ITS) e Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) para identificação de *Leishmania* spp. em gel de poliacrilamida. [manuscrito] / Cálita Pollyanna Marques. - 2017.

xvi, 88 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Miriam Leandro Dorta.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Análise molecular. 2. Padronização. 3. Discriminar espécies. 4. Validação. 5. Poliacrilamida. I. Leandro Dorta, Miriam, orient. II. Título.

CDU 576.8



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE CÁLITA POLLYANNA MARQUES - Aos trinta dias do mês de agosto do ano de 2017 (30/08/2017), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Drs. MIRIAM CRISTINA LEANDRO DORTA, JOANNA D'ARC APARECIDA HERZOG SOARES e RODRIGO SAAR GOMES, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"PADRONIZAÇÃO DA ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR-RFLP QUE AMPLIFICA OS GENES *Ribossomal Internal Transcribed spacer* (ITS) E *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (*G6pd*) PARA IDENTIFICAÇÃO DE *Leishmania* spp. EM GEL DE POLIACRILAMIDA"**, em nível de MESTRADO, de autoria de CÁLITA POLLYANNA MARQUES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. MIRIAM CRISTINA LEANDRO DORTA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada:**

Banca Examinadora

Dra. Miriam Cristina Leandro Dorta
Dra. Joanna D'Arc Aparecida Herzog Soares
Dr. Rodrigo Saar Gomes

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Habilitada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada**, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16 h 10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Dra. Miriam Cristina Leandro Dorta (IPTSP/UFG)
Dra. Joanna D'Arc Aparecida Herzog Soares (IPTSP/UFG)
Dr. Rodrigo Saar Gomes (IPTSP/UFG)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura
M. Dorta
Joanna D'Arc
R. Saar
J. Clementino

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Cálita Pollyanna Marques

Orientador (a): Míriam Leandro Dorta

Co-orientador (a):

Membros:

1. Miriam Leandro Dorta

2. Joanna Darc A. Herzog Soares

3. Rodrigo Saars Gomes

Data: 30/08/2017

*Um dia sonhei que poderia ter...
Outro dia sonhei que poderia buscar!
Hoje sonhei que encontrei...
Levantei-me... Olhei pro céu e agradei a Deus por cada dia!
Os dias difíceis fortaleceram minha fé, exercitaram minha paciência, sucumbiram meu
orgulho, encheram-me de esperança.
Descobri forças que não conhecia e lutei.
Os dias fáceis exaltaram minha alegria, inspiraram-me a ouvir mais, a compreender
mais, a ajudar mais, a amar mais e recomeçar sempre!*

DEDICATÓRIA...

Aos amores da minha vida:

Primeiramente, a Deus!

Aos meus Pais, Selma e Rogério!

A Minha irmã, Táгна e ao meu irmão de coração, Wilson Júnior!

Ao meu esposo, Marcos!

AGRADECIMENTOS

O desafio de desenvolver uma dissertação de Mestrado é um exemplo de plena superação, onde nos permitimos mudar a cada tentativa, seja ela falha ou vitoriosa. Ao terminar “Este trabalho” não poderia deixar de agradecer a todas às pessoas que foram importantes nesta caminhada, sejam àquelas que participaram direta ou indiretamente.

Meu agradecimento é primeiramente a Deus, pelo seu exemplo de amor infinito, pela determinação e sabedoria doada ao meu coração nos momentos em que muito precisei e por fim, a oportunidade de realizar um sonho que parecia impossível.

Agradeço especialmente à minha orientadora Professora Dr^a. Miriam Leandro Dorta, pelas experiências compartilhadas, ensinamentos e lições para vida acadêmica ou experimental que irão ficar comigo por toda a vida. Particularmente, confesso que levarei como ensinamento seu amor a suas meninas!

Em especial à Técnica de laboratório Natália Brandão, pessoa que contribuiu muito ao me acompanhar nas primeiras práticas laboratoriais. Mas o principal, o que mais me ajudou foi sua paciência e o seu “acreditar em minhas capacidades”. Obrigada por não medir esforços ao me ajudar e acima de tudo, por ser amiga e sempre conectar os alunos que passam pelo laboratório de um modo especial.

Não poderia deixar de agradecer a TODOS os colegas do Laboratório de Imunologia das Leishmanioses do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, pela troca de experiências e pelas orientações sobre as metodologias das quais não tinha conhecimento. Foram muitas, principalmente quando estive fazendo disciplinas. O meu muito obrigada também vai pelos incontáveis momentos de risadas, vocês tornaram o Mestrado mais fácil.

Obrigada a Carina Scolari Gosh, minha Parceira de experimentos, de longas e prazerosas conversas, além do fornecimento das amostras do Estado do Tocantins e tantos outros compartilhamentos.

Não poderia esquecer o estagiário que me auxiliou no início dos experimentos, Hiago. Viveu comigo momentos de agonia quando trabalhávamos durante todo o dia e no fim, nosso resultado não era o que esperávamos. Meu muito obrigada pelo otimismo e principalmente pela responsabilidade.

Com muito carinho aos meus Pais, Selma e Rogério, por toda dedicação e apoio durante toda minha formação, bem como, em todos os momentos da vida. Vocês são meus melhores e eternos companheiros.

A minha irmã Tágnia e cunhado Wilson Júnior pelo imensurável auxílio ao sempre me oferecer um Lar aqui em Goiânia, até então uma cidade que não me remetia à família. Sentirei saudades de nossas conversas nas madrugadas... Da Maya... Da saudosa Dolly!

Ao meu esposo, Marcos, pelo incentivo ao viver comigo o meu sonho como se dele fosse. Obrigada pela compreensão nos momentos que abdiquei de estar com você em prol do Mestrado, minha “tarefa de casa” mais difícil do mundo acabou e você foi meu melhor companheiro.

Obrigada aos amigos e familiares, que de certa forma participaram do trabalho oferecendo um ombro amigo nos momentos que precisei de alguém pra dar risadas, conversar ou simplesmente ouvir meus desabafos, em especial às minhas amigas Laysse e Erika que vivenciaram mais um momento de vitória em minha vida.

Agradeço a toda equipe de profissionais do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás pela oportunidade de fazer um Mestrado tão enriquecedor, do qual levarei com muito orgulho meu diploma e se preciso fosse, o escolheria em todas as oportunidades. Não poderia deixar de ressaltar os professores do programa que ministraram suas aulas de forma prazerosa e instrutiva servindo como exemplos a serem seguidos.

Agradeço as Agências de Fomento FAPEG pela bolsa de Mestrado e ao CNPq projeto FAT PPSUS-Tocantins 2014 pelo financiamento do projeto.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	x
FIGURAS, TABELAS E ANEXOS	xii
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	18
1.2. Epidemiologia	22
1.3. Diagnóstico da LTA na rotina laboratorial	25
1.4. PCR/RFLP no diagnóstico da LTA	28
1.5. Tratamento da LTA	32
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVO	36
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4. METODOLOGIA	37
4.1. Local de realização da pesquisa e considerações éticas.....	37
4.2. Delineamento da pesquisa.....	37
4.3. Amostras de pacientes tocantinenes : caracterização e método de coleta	39
4.4. <i>Leishmania</i> spp. de referência e caracterização dos isolados dos isolados de parasitos do <i>Leishbank</i>	40
4.5. Extração de DNA : Amostras de pacientes em lâminas e DNA genômico de espécies de referência.....	40
4.6. Concentração das amostras biológicas armazenadas em lâminas.....	40
4.7. PCR/RFLP	41
4.7.1. Descrição da PCR/RFLP ao alvo kDNA	42
4.7.2. Descrição da PCR/RFLP ao alvo ITS	42
4.7.3. Descrição da PCR ao alvo <i>G6PD</i>	43
4.7.4. Controle das condições para a realização da PCR/RFLP	44
4.8. Análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA em gel de poliacrilamida.....	44
4.9. Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida	45

4.10. Padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> em gel de poliacrilamida	45
4.11. Gel de poliacrilamida: validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo ITS.....	46
4.12. Gel de poliacrilamida : validação da análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> ..	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Padronização da PCR/RFLP para o alvo kDNA	47
5.1.1. PCR/RFLP para o kDNA: seleção das amostras de pacientes tocan- tinentes com suspeita de LTA	48
5.2. Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida	49
5.3. Padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> em gel de poliacrilamida	51
5.4. Validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida.....	52
5.5. Validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> em gel de poliacrilamida	52
5.5.1. Amostras de pacientes tocan- tinentes com LTA	52
5.5.2. Amostras de DNA dos isolados armazenados no <i>Leishbank</i>	53
6. DISCUSSÃO.....	55
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS	61

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

FIGURAS

Figura 1 Distribuição das <i>Leishmania</i> spp. que causam a LTA no Brasil.....	21
Figura 2 Distribuição de casos por ecossistemas da LTA nas Américas, 2013.....	23
Figura 3 Distribuição de casos por ecossistemas da LTA nas Américas, 2013.....	36
Figura 4 Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida.....	37
Figura 5 Validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida.....	38
Figura 6 Produtos da PCR amplificados utilizando os <i>primers</i> L. 150/152 ao alvo kDNA em amostras de DNA de <i>Leishmania</i> spp. de referência.....	46
Figura 7 Produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA utilizando a endonuclease <i>HAEIII</i> em amostras de DNA de <i>Leishmania</i> spp. de referência.....	47
Figura 8 Produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA com os <i>primers</i> L. 150/152.....	48
Figura 9 Produtos da PCR ao alvo ITS com os <i>primers</i> IR1/IR2 em DNA da amostra de <i>Leishmania</i> spp. de referência.....	49
Figura 10 Produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS com a endonuclease de restrição <i>HaeIII</i> em amostras de DNA de <i>Leishmania</i> spp. de referência.....	50

Figura 11 Produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> com os <i>primers</i> ISVB/ISVC a partir de DNA da amostra de <i>Leishmania</i> spp. de referência.....	51
--	----

Figura 12 Análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> com os <i>primers</i> ISVB/ISVC.....	52
---	----

Figura 13 Análise dos produtos da PCR ao alvo <i>G6PD</i> com os <i>primers</i> ISVB/ISVC.....	53
---	----

TABELAS

Tabela 1 Principais <i>Leishmania</i> spp. que causam LTA no Brasil e suas possíveis manifestações clínicas.....	18
---	----

Tabela 2 <i>Primers</i> empregados nas PCR/RFLPs, sequencia de nucleotídeos e tamanho dos <i>amplicons</i> em pares de bases dos pares.....	40
--	----

Tabela 3 Condições da PCR ao alvo kDNA no termociclador.....	41
---	----

Tabela 4 Condições da PCR ao alvo ITS no termociclador.....	42
--	----

Tabela 5 Condições da PCR ao alvo <i>G6PD</i> no termociclador.....	43
--	----

Tabela 6 Amostras dos pacientes tocantinenses, fixadas em lâminas, positivas para LTA pela PCR/RFLP ao alvo kDNA amplificadas pela PCR ao alvo <i>G6PD</i> para validação da padronização da análise dos produtos em gel de poliacrilamida.....	52
--	----

ANEXOS

Anexo 1 Parecer do Comitê de ética.....	84
--	----

Anexo 2 Protocolo para preparo dos reagentes do gel de poliacrilamida e soluções complementares.....	86
---	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

bp	Pares de bases
CEME	Centro Municipal de Especialidades Médicas Dr. Gismar Gomes, Porto Nacional – TO
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>G6PD</i>	<i>Glucose-6-Phosphate dehydrogenase</i>
Hsp70	<i>Heat-Shock Protein 70 gene</i>
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
IFN- γ	Interferon - gama
IL-10	Interleucina - 10
IL-17	Interleucina - 17
IL-2	Interleucina - 2
IL-4	Interleucina - 4
IL-5	Interleucina - 5
IPTSP/UFG	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás
ITS	Internal Transcribed Spacer
kDNA	DNA Mini-círculo do Cinetoplasto
L. 150/152	<i>Primers</i> específicos para leishmânia
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCA	Leishmaniose Cutânea Atípica
LCM	Leishmaniose Cutânea Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
LDf	Leishmaniose Difusa
<i>Leishbank</i>	Banco Imunobiológico de Leishmanioses da Região Centro-Oeste

LM	Leishmaniose Mucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PPSUS	Programa de Pesquisa para o SUS – Gestão Compartilhada em Saúde
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido Ribonucléico mensageiro
SAE	Centro de Leishmaniose do Serviço de Atenção Especializada
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral - alfa

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é causada por protozoários do gênero *Leishmania* e acomete pele e/ou mucosas. É uma zoonose endêmica no Brasil sendo notificada em todas as Regiões. Há uma relação entre a espécie de parasito e as manifestações clínicas, contribuindo à complexidade diagnóstica, que até o presente, não existiu o diagnóstico espécie-específico. No presente trabalho, a proposta foi padronizar a análise dos produtos da PCR/RFLP aos genes ITS e *G6PD* em gel de poliacrilamida. Para padronizar as análises dos produtos da PCR/RFLP aos genes ITS e *G6PD*, foram utilizadas DNA da amostra de *Leishmania* spp., de referência, sendo testada a poliacrilamida na concentração de 5%, 6%, 7%, 8% e 10%. O delineamento do protocolo considerou o tamanho dos *amplicons* gerados pela PCR/RFLP, correlacionando-o a concentração da poliacrilamida. Para padronizar o tempo da eletroforese foi monitorada a migração dos corantes usados no tampão da amostra de DNA. Para validar a técnica, foram selecionadas 521 amostras de pacientes tocantinenses fixadas em lâminas e 43 amostras de isolados de parasitos armazenados no *Leishbank*. As amostras dos pacientes tocantinenses foram analisadas pela PCR/RFLP ao kDNA e foram selecionadas àquelas positivas para a validação. A concentração da matriz para análise dos produtos da PCR e RFLP ao gene ITS ficou padronizada respectivamente em 6% e 8% e distinguiu a espécie *L.(L.) amazonensis*, porém as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* não foram distinguidas entre si, ocorrendo o mesmo entre *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) shawi*. A concentração da matriz para análise dos produtos da PCR ao gene *G6PD* ficou padronizada em 6% e distinguiu *L. (V.) braziliensis* das demais. A validação da análise em gel de poliacrilamida dos produtos da PCR ao alvo ITS a partir de amostras de pacientes fixadas em lâminas não ser realizada, pois das 256 amostras analisadas somente 4 amplificaram. A validação da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida a partir de 48 amostras fixadas em lâminas caracterizou 81% como *L. (V.) braziliensis* e, caracterizou 63% dos isolados de parasitos como *L. (V.) braziliensis*. As análises pela PCR/RFLP realizadas para discriminar *Leishmania* spp. se complementam e, assim, contribuem para o diagnóstico espécie-específico da LTA.

Palavras chave: Análise molecular; Discriminar espécies; Padronização; Validação; Poliacrilamida.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (LTA) is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and it attacks the skin and/or mucous membranes. It is an endemic zoonosis in Brazil being notified in all the Regions. There is a relation between the species of parasite and the clinical manifestations, contributing to the diagnostic complexity, which up to the present, did not exist species-specific diagnosis. In the present work, the proposal was to standardize the analysis of the PCR/RFLP products to the ITS and *G6PD* genes in polyacrylamide gel. In order to standardize PCR/RFLP analysis on the ITS and *G6PD* genes, DNA from the reference *Leishmania* spp. Sample was used and 5%, 6%, 7% 8% and 10% polyacrylamide were tested. The protocol design considered the size of the amplicons generated by the PCR / RFLP, correlating the concentration of the polyacrylamide. To standardize the electrophoresis time the migration of the dyes used in the DNA sample buffer was monitored. To validate the technique, we selected 521 samples from Tocantins patients fixed on slides and 43 samples of parasite isolates stored in *Leishbank*. The samples from the patients from Tocantins were analyzed by PCR/RFLP to the kDNA and were selected to those positive for the validation. The concentration of the matrix for analysis of the PCR and RFLP products to the ITS gene was standardized in 6% and 8%, respectively, and distinguished the species *L. (L.) amazonensis*, but the species *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) lainsoni* were not distinguished among themselves, occurring the same between *L. (V.) naiffi* and *L. (V.) shawi*. The concentration of the matrix for analysis of the PCR products to the *G6PD* gene was standardized in 6% and distinguished *L. (V.) braziliensis* from the others. The validation of the polyacrylamide gel analysis of the PCR products to the ITS target from samples of patients fixed in slides was not performed, since of the 256 samples analyzed only 4 amplified. The validation of the analysis of the products of the PCR to the *G6PD* target in polyacrylamide gel from 48 samples fixed in slides characterized 81% as *L. (V.) braziliensis* and, characterized 63% of the isolates of parasites as *L. (V.) braziliensis*. The PCR/RFLP analyzes performed to discriminate *Leishmania* spp. are complementary and thus contribute to the species-specific diagnosis of LTA.

Keywords: Molecular analysis; Discriminate species; Standardization; Validation; Polyacrylamide.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças infecto-parasitárias não contagiosas, causadas por protozoários que pertencem à ordem *Kinetoplastida*, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos (Alexander & Russel, 1992; Utzinger et al. 2009; Zappa 2011). Durante o ciclo de vida apresenta duas formas, amastigota que é intracelular de hospedeiros vertebrados, esférica e sem flagelo visível e promastigota, que se desenvolve no intestino de hospedeiros invertebrados, longa e com flagelo visível (Besteiro et al. 2007; Neves 2011).

A LTA é uma zoonose primariamente de animais silvestres, transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* durante o repasto sanguíneo. Porém, cada vez mais se observam animais domésticos, como os cães e gatos, atuando como hospedeiros vertebrados acidentais da doença, consequência da adaptação do vetor ao ambiente domiciliar (Rocha et al. 2015). Os seres humanos, embora não façam parte da cadeia de transmissão habitual, apresentam suscetibilidade variada à doença (Herwaldt 1999).

No Brasil, Alexandre Cerqueira em 1985 foi o primeiro a observar a doença relacionando à presença dos flebotomíneos. Seu ciclo de vida se inicia durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea infectada, que ao inocular as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico monocitário, principalmente macrófagos. Após a fagocitose, o parasito adquire uma nova forma, amastigota, que se reproduz por divisão binária e pode infectar novas células ou novos hospedeiros invertebrados no momento de uma nova hematofagia (Dantas-Torres 2012; Montalvo et al. 2012). Quando um novo flebotomíneo se alimenta desse hospedeiro, as formas amastigotas ingeridas se transformam em promastigotas, no intestino do vetor, que ao migrar para a probóscide se diferencia em promastigota metacíclica, formas infectantes ao hospedeiro vertebrado que poderá ser infectado durante um novo repasto sanguíneo (Moradim & Descoteaus 2012).

As espécies que causam a LTA no Brasil pertencem a dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, que por análises de isoenzimas demonstraram ser um grupo monofilético e polifilético, respectivamente (Thomaz-Soccol et al. 1993; Cupolillo et al. 1994). Essa

divisão teve como critério o local de desenvolvimento dos parasitos no tubo digestório do vetor, sendo *Viannia* os que se desenvolvem no tubo digestório médio e posterior, na região peripilária e *Leishmania*, os que desenvolvem no tubo digestório anterior e médio na região suprapilária (Lainson & Shaw 1989). O agente etiológico específico da doença no País, *L. (V.) braziliensis*, foi proposto por Gaspar Vianna (Gontijo & Carvalho 2003).

Atualmente são conhecidas sete espécies responsáveis por causar a LTA no Brasil (Tabela 1). As principais são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*, e mais raramente *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lindenbergi* (Grimaldi & Tesh 1993; Silveira et al. 2002). As espécies são morfológicamente iguais, porém, podem apresentar singularidades como, distribuição geográfica, hospedeiros vertebrados e vetores (Costa et al. 2007).

Tabela 1 – Principais *Leishmania* spp. que causam LTA no Brasil e suas possíveis manifestações clínicas.

Subgênero	Espécie	Manifestação Clínica
<i>Viannia</i> (Lainson & Shaw 1987)	<i>L. (V.) braziliensis</i> (Vianna 1911)	Lesões cutâneas e mucosas
	<i>L. (V.) guyanensis</i> (Floch 1954)	Predominantemente lesões cutâneas e mucosas
	<i>L. (V.) lainsoni</i> (Silveira et al. 1987)	Rara ocorrência, lesões cutâneas
	<i>L. (V.) naiffi</i> (Lainson & Shaw 1989)	Rara ocorrência, lesões cutâneas
	<i>L. (V.) shawi</i> (Lainson et al. 1989)	Rara ocorrência, lesões cutâneas
	<i>L. (V.) lindenbergi</i> (Silveira et al. 2002)	Lesões cutâneas
<i>Leishmania</i> (Ross 1903)	<i>L. (L.) amazonensis</i> (Shaw & Lainson 1972)	Lesões cutâneas e, ocasionalmente, cutâneo-difusas

Os agentes etiológicos da LTA apresentam uma variedade de vetores, hospedeiros vertebrados e a capacidade de se adaptar a ambientes geográficos com diferenças no clima, temperatura e vegetação (Lainson 1983; Grimaldi & Tesh 1993). Somam-se às peculiaridades da LTA, a dependência do curso clínico da doença e a resposta imune do hospedeiro vertebrado resultante da interação com o parasito, da espécie de leishmânia, das condições ambientais e do vetor (Kaye & Scott 2011; Dantas-Torres et al. 2012). De acordo com essa evolução recebem as seguintes denominações: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea

Mucosa (LCM), Leishmaniose Mucosa (LM), Leishmaniose Disseminada (LD), Leishmaniose Difusa (LDf) (Silveira et al. 2009) e a Leishmaniose Cutânea Atípica (LCA) (Guimarães Et al. 2016). De modo geral, no desenvolvimento da doença observa-se que após o período de incubação, que pode variar de duas a três semanas, manifesta uma pápula ou nódulo eritematoso acompanhado ou não de linfadenopatia. A lesão pode ter cura espontânea ou evoluir às diferentes formas clínicas (Costa et al. 2009).

Dentre as modalidades clínicas da leishmaniose, a mais prevalente é LCL, causada por todas as espécies de leishmânias relacionadas ao comprometimento tegumentar, é a forma cutânea clássica, com lesões que se desenvolvem no local do repasto sanguíneo. É caracterizada, inicialmente, por lesão eritêmatopapulosa, única ou múltipla e que assume aspecto característico de úlcera de contornos circulares, bordas elevada em moldura, indolor e de fundo granulomatoso. Acometem, geralmente, membros inferiores ou superiores, áreas descobertas do corpo e pode ser acompanhada de linfangite nodular e linfadenopatia regional (Silveira et al. 2005; Costa et al. 2009).

As formas clínicas LM e LCM têm como agente etiológico da infecção as espécies *L. (V.) guyanensis* (Guerra et al. 2011; Paulo et al. 2013), e na maioria dos casos, *L. (V.) braziliensis* (Amato et al. 2009). Pode afetar o trato respiratório e/ou mucosa oral, das quais na forma LM as lesões acomete somente mucosas, enquanto a LCM extrapola essa área (Cruz et al. 2016). Após a cura da lesão cutânea ou concomitante a esta, aproximadamente 3% dos pacientes com LCL irão desenvolver a forma LCM. A região mais afetada é a mucosa nasal, caracterizada inicialmente por lesões nodulares e ulcerações superficiais ou profundas, que de acordo com a evolução, podem causar a destruição do septo e deformidades na pirâmide nasal. O motivo para justificar o acometimento da mucosa ainda não é de todo conhecido. Atualmente, sabe-se que a infecção por *L. (V.) braziliensis* associada à forma clínica da doença LCM, depende de fatores intrínsecos do parasito, da resistência natural do hospedeiro e do tipo de resposta imunológica (Scott 1989; Lessa et al. 2007; Gollob et al. 2014).

A modalidade clínica LD é causada principalmente pela espécie *L. (V.) braziliensis*. Caracteriza-se por múltiplas lesões que se desenvolvem rapidamente, com aspecto acneiformes, papulares, acomete frequentemente face e tronco, mas podem se disseminar a vários segmentos corporais (Carvalho et al. 1994). Acredita-se que o parasito seja disseminado do local do repasto sanguíneo do flebotomíneo por via hemática ou linfática, posteriormente ao desenvolvimento das lesões primárias (Turetz

et al. 2002). O encontro do parasito nesta forma clínica é baixo e a resposta imune celular se mantém, porém não é o suficiente para controlar a infecção. Nos casos em que o paciente não é tratado ou de evolução tardia da doença, pode ocorrer simultaneamente lesões na pele e mucosas (Carvalho et al. 1994; Costa et al. 2009).

No Brasil a LDf constitui uma forma que ocorre em pacientes anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular à antígenos de leishmânia, rara, contudo grave. O agente etiológico é a espécie *L. (L.) amazonensis*, que geralmente não compromete as mucosas, quando ocorre é de modo discreto, havendo infiltrado da mucosa nasal por adjacência. Caracteriza-se inicialmente por lesões nodulares não ulceradas, com infiltrado de macrófago repleto de parasitos, de difícil terapêutica e que podem disseminar para o tronco e extremidades corporais. Há poucos relatos de destruição do septo nasal ou presença de pólipos nas mucosas labiais e nasais. (Costa et al. 2009; Hashiguchi et al. 2016; Blum-Dominguez et al. 2017).

A LCA compreende uma forma recentemente descrita, causada por estirpes de *L. (V.) braziliensis* isolados a partir de pacientes residentes na região de Corte da Pedra, Bahia. As variações intra-específicas detectadas nos parasitos desta espécie, a partir dos pacientes com LCA, foram correlacionadas ao comprometimento da resposta imune que resulta em casos atípicos de LTA (Marlow et al. 2013). Esta forma foi caracterizada quanto aos aspectos clínicos, imunológicos e genéticos, dos quais discernem das demais descritas. Os pacientes com casos atípicos de LTA apresentaram significativamente mais lesões em relação à LCL, influenciando na escolha do fármaco e no esquema de tratamento. Além disso, o perfil imunológico delineado a partir da expressão de citocinas apresentou altos níveis de IL-10 e IL-17 e baixos de INF- γ e TNF- α , resultado inversamente contrário aos pacientes com LCL. Assim, o estudo complementa a hipótese do autor de que a resposta imune pode ser influenciada pelas variações genéticas intra-específicas, das quais uma das conseqüências pode ser o comprometimento imunológico (Guimarães et al. 2016).

Neste contexto, a LTA é uma doença importante por causar sérios problemas à saúde pública devido à possibilidade de causar lesões com cicatrização desfigurantes. Além disso, as diferenças nas formas clínicas dificultam o diagnóstico, que quanto mais precoce realizado, maior será a chance de sucesso no esquema de tratamento. É importante ressaltar que mesmo a doença sendo diagnosticada no início, a complexa interação entre o parasito-hospedeiro influencia no prognóstico, cujas lesões podem

variar desde a cicatrização espontânea até as formas resistentes aos fármacos (Silveira et al. 2009; Fernandes et al. 2016).

1.2. Epidemiologia

A LTA é uma doença subnotificada e as diferenças no clima, vegetação, reservatórios e vetores no Brasil, não impediram sua disseminação pelo país (Costa et al. 2007; Cardoso et al. 2015). É uma zoonose de mamíferos silvestres, como desdentados, carnívoros, marsupiais e primatas (Gontijo & Carvalho 2003). As sete espécies que causam a doença estão representadas em todas as Unidades Federativas (Figura 1), porém a região Norte apresenta todas as espécies identificadas. No restante do País ocorre a predominância da espécie *L. (L.) amazonensis* e principalmente *L. (V.) braziliensis*. Sua transmissão é intimamente relacionada às mudanças ecológicas no habitat do vetor, desmatamento e urbanização (Costa et al 2009; Alvar et al. 2012). Esses fatores contribuem por facilitar o contato dos flebotomíneos infectados com o homem e, assim, a transmissão (Brasil 2014).

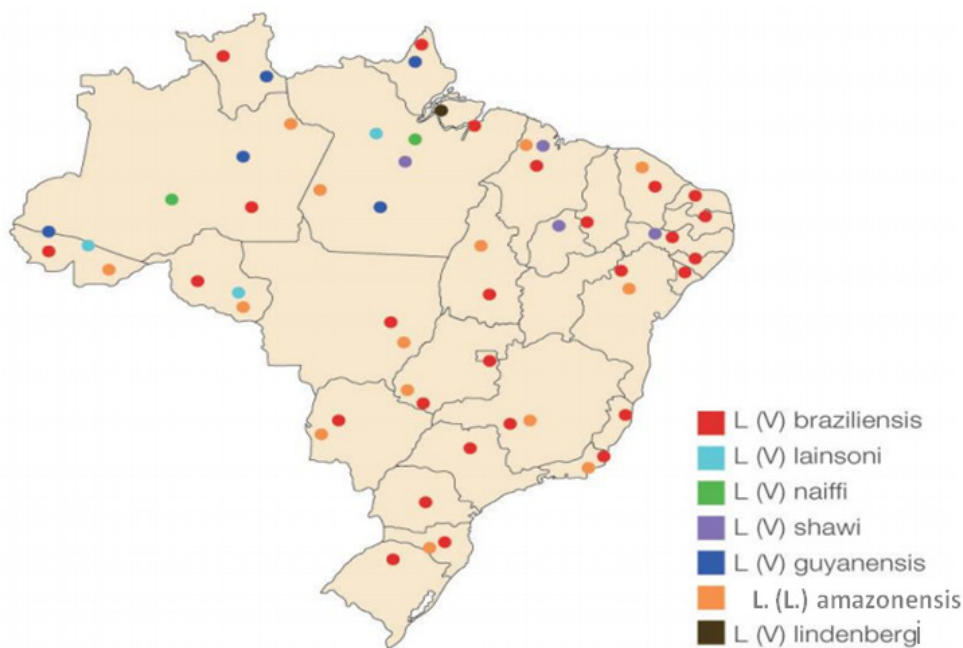


Figura 1 – Distribuição das *Leishmania* spp. que causam a LTA no Brasil. Fonte: Adaptado do Manual de Vigilância da LTA – Brasil 2007.

De modo geral, a LTA apresenta os seguintes perfis epidemiológicos: o silvestre, que ocorre em áreas de vegetação primária e a transmissão se mantém sem a interferência humana; o ocupacional, exclusivamente relacionado ao desmatamento de

áreas florestais, sejam para fins econômicos ou habitacionais, o que pode ocasionar casos esporádicos ou epidêmicos de leishmaniose; o rural ou periurbano, relacionado à colonização de áreas com matas residuais ou áreas urbanas próximas a matas (Basano & Camargo 2004; Negrão 2014).

De acordo com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), o Brasil lidera os casos de LTA na América Latina, fato que impulsionou a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incluí-la entre as 6 doenças consideradas prioritárias em seu programa de controle (INPA 2015). Entre os anos de 2007 a 2013 foram registrados no País 173.357 casos, sendo que o maior número de notificação foi em 2012, com 27.659 casos. A distribuição total por regiões no País foi de 65.235 casos na Região Norte, 53.088 na Nordeste, 23.842 na Centro-Oeste, 13.866 na Sudeste e 3.256 na Sul. A maior prevalência foi na Norte com mais de 395 casos por 100 mil habitantes. Dos estados que compõem esta região o que apresentou maior número de notificação foi o Pará com 25.858, seguido do Amazonas com 13.274, Acre com 7.410, Rondônia com 7.328, Amapá com 4.586, Tocantins com 3.679 e Roraima com 3.100 casos (Matsumura et al. 2015).

O Norte contribui significativamente para o aumento dos casos de LTA confirmados no Brasil, no qual os surtos epidêmicos ocorridos na área amazônica desta região são significantes (Coelho-Neto et al. 2012; Benício et al. 2015), se destacando o estado do Amazonas, com focos endêmicos principalmente da zona rural (Oliart-Guzman et al. 2013; Figueira et al. 2014; INPA 2015) e o estado do Tocantins, que entre os anos de 2000 a 2011 se destaca por altos índices de incidência de leishmaniose (Ferreira et al. 2012). Vários trabalhos ressaltam a prevalência da doença em indivíduos do gênero masculino, em idade produtiva de 20 a 39 anos, sendo a maioria agricultores, caseiros ou que tenham suas atividades laborais relacionadas à área rural (Coelho-Neto et al. 2012; Figueira et al. 2014; Brito et al. 2015; Matsumura et al. 2015).

As mudanças antrópicas ocorridas no Centro-Oeste afetam diretamente o cenário natural das florestas, com consequente mudança de paisagem, e assim contribuem à expansão progressiva das leishmanioses (Negrão 2014). De 2007 a 2014 foi realizada uma pesquisa epidemiológica no município de Barra do Graças, Estado do Mato Grosso, onde foram notificados 546 casos de LTA. Os pacientes em sua maioria se caracterizam por adultos, com uma média de 36 anos, predomínio do gênero masculino. Quanto à escolaridade, observou-se que a maioria alegou ter o Ensino Fundamental incompleto (Moraes 2015).

Em uma pesquisa retrospectiva, Graziani et al. (2013), caracterizaram a epidemiologia da LTA no Estado de Goiás. Dos pacientes analisados, 66% dos casos foram autóctones, 19,5% alóctones e 14,5% indeterminados. Na distribuição de casos por gênero, 70,8% eram do masculino e 29,2% do feminino. Quanto à raça, o grupo dos indivíduos pardos foi o mais afetado, seguido de brancos, negros e amarelos (Graziani et al. 2013). Os municípios com os maiores casos notificados foram Niquelândia, Minaçu, Goiânia, Mineiros, Baliza, Doverlândia, São Miguel do Araguaia, Rio Verde, São Domingos, Caiapônia, Uruaçu, Aparecida de Goiânia, Jataí e Porangatu (SINAN 2011).

Em 2013, foi realizado pela Organização Pan-Americana de Saúde, um levantamento dos casos de LTA distribuídos nas zonas ecológicas com uma variação de 1 a 3.058 casos, onde os maiores números estão em áreas com presença de vegetação, sejam elas florestas tropicais densas, temperada e seca (Figura 2). Porém, a notificação da doença nas diversas áreas do Brasil, nem sempre é dependente da presença de florestas. As duas hipóteses para justificar o fato é a possibilidade de mudança no perfil selvático dos flebotomíneos, com adaptação a ambientes modificados, como no peri e intradomicílio e a alteração nos mecanismos de transmissão entre parasito-hospedeiro (Cotton 2017), que antes era dependente da necessidade do hospedeiro humano adentrar no habitat do vetor, seja por trabalho, turismo ou lazer (OPS 2015).



Figura 2 - Distribuição de casos por ecossistemas da LTA nas Américas, 2013.
Fonte: Organização Pan-Americana da Saúde 2015.

A notificação da LTA ao longo das regiões, estados e municípios do Brasil, aparentemente não demonstra distribuição homogênea, com ausência de periodicidade em regiões de clima semelhante. Porém, apesar de não existir um padrão cíclico regional, há predominância do vetor nas regiões quentes e úmidas (Souza et al. 2010). Os processos antrópicos que visam o desenvolvimento como construção de usinas hidrelétricas, rodovias ou atividades de extrativismo vegetal e mineral causam mudanças ambientais que influenciam no ciclo adaptativo dos vetores, cujo impacto a saúde pública pode ser o favorecimento da ocorrência de zoonoses, como a LTA (Moraes 2015).

1.3. Diagnóstico da LTA na rotina laboratorial

O diagnóstico da LTA é rotineiramente baseado em evidências clínicas, epidemiológicas, histológicas e imunológicas (Marques et al. 2017). Diagnosticar a doença é de extrema importância, porque as lesões causadas podem ser desfigurantes de modo irreversível (Cruz et al. 2016). Os métodos de diagnóstico dessa zoonose visam à confirmação dos achados clínicos e a identificação do agente etiológico que contribuem com informações epidemiológicas que podem orientar medidas de controle (Fernandes et al. 2016). O procedimento diagnóstico considerado “Padrão Ouro” é a demonstração do parasito a partir de amostras de tecido coradas ou seu crescimento em cultura (Weigle et al. 1987).

Para o diagnóstico epidemiológico é necessária uma investigação sobre a procedência do paciente, como por exemplo, se reside ou esteve em áreas endêmicas para a LTA, tipo de atividade laboral e lazer e se há a associação destas a região recém-desmatada, de vegetação primária, margens de rios e ocupação de áreas de matas secundárias (Ferreira et al. 2006; Ministério da saúde 2010). O diagnóstico clínico da LTA realizado através da análise das características clínicas da lesão associado à anamnese do paciente (Martins et al. 2014).

O diagnóstico para LTA é embasado em critérios laboratoriais associados à clínica (OPS 2015). Para a realização do exame parasitológico podem ser utilizados materiais biológicos obtidos por escarificação, biópsias por punção aspirativa de borda da lesão ulcerada ou esfregaços (*imprints*) das biópsias obtidas por *punch* ou bisturi com impressão por aposição em lâminas. A partir desse material corado com *Giemsa* ou *Leishman*, pode ser realizada a pesquisa direta das formas amastigotas através do

microscópio. Pela rapidez, facilidade na execução e menor custo é o único exame realizado em muitos Centros de Saúde, a exemplo os do estado do Tocantins. A qualidade desse tipo de diagnóstico depende, essencialmente, da experiência do investigador, da qualidade dos equipamentos e insumos utilizados, do tempo de evolução das lesões, bem como as formas clínicas e as espécies envolvidas (Ministério da saúde 2014; Singh & Sundar 2015).

A pesquisa parasitológica realizada de forma indireta é através do cultivo *in vitro* e isolamento *in vivo*. Para o cultivo *in vitro* o material biológico obtido do paciente é inoculado em meios de cultivo e após 5 - 10 dias, é possível observar as formas promastigotas. Contudo para liberar um resultado negativo é necessário manter a cultura por até um mês. No isolamento *in vivo*, o material obtido por biópsia ou raspado da lesão é triturado em solução salina e inoculado via intradérmica, no focinho ou patas dos animais de laboratório. As lesões se iniciam a partir de um mês com necessidade de observação destes animais por três a seis meses. É um método de elevada sensibilidade, porém, devido à complexidade e alto custo é pouco utilizado (Weigle et al. 1987; Ramírez et al. 2000; Oliveira et al. 2010).

Nos casos em que os processos ulcerativos não são muito característicos, o exame histopatológico auxilia para o sucesso do exame parasitológico, através da análise de alterações dérmicas ou de córion da mucosa, identifica cinco padrões: reação exsudativa celular, reação exsudativa celular e necrótica, reação exsudativa e necrótica-granulomatosa, reação exsudativa e granulomatosa e reação exsudativa e tuberculóide (De Magalhães et al. 1986; Jara et al. 2013; Saldanha et al. 2017). Nos casos em que há inflamação crônica inespecífica e/ou reação granulomatosa com poucos parasitos, a avaliação por imunohistoquímica é uma ferramenta confiável que pode complementar a análise descritiva do exame histopatológico, pois sua identificação é através da reação antígeno-anticorpo (Amato et al. 1998; Shirian et al. 2014; Marques et al. 2017).

O diagnóstico imunológico indica indiretamente a infecção por leishmânia e é considerado simples e pouco invasivo (Boelaert et al. 2004). Os testes utilizados comercialmente são a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que detecta anticorpos específicos circulantes, e a Intradermorreação de Montenegro (IDRM), que detecta a hipersensibilidade tardia (Vidigal et al. 2008).

A RIFI é o método sorológico mais utilizado, recomendado pelo Ministério da Saúde associada à IDRM (Sampaio et al. 2009) e/ou outros testes parasitológicos, pela possibilidade de haver reações cruzadas com antígenos de outras doenças como

Leishmaniose Visceral e Doença de Chagas. Comparada a outros métodos de diagnóstico, sua sensibilidade varia entre 50 e 70% (Souza et al. 1982; Brito et al. 2000). Balian (2014) investigou as características epidemiológicas e moleculares da LTA de pacientes do estado de Goiás e Mato Grosso entre os anos de 2000 a 2006, a RIFI estava entre os métodos utilizados com sensibilidade de 44, 2%. Na LTA os resultados são variáveis, mas não há correlação entre os níveis de anticorpos circulantes e o estágio da doença (Reis et al. 2008). Apesar da aplicabilidade da RIFI na rotina laboratorial para diagnosticar a LTA, Barroso-Freitas et al. (2009), constataram a dependência dessa reação ao treinamento dos técnicos, havendo redução da confiabilidade, pois esse parâmetro variou de acordo com o observador.

A Intradermorreação de Montenegro (IDRM) ou Teste de Montenegro é um método para diagnosticar a LTA com boa aplicabilidade clínica e baixo custo (Skraba et al. 2015; Fernandes et al. 2016). Ela demonstra uma previa exposição aos antígenos de LTA em que, antígenos de leishmânia são inoculados via injeção intradérmica para detectar células antígeno-específicas mediadoras da imunidade. A reação é uma sensibilidade do tipo tardia, que estimula processos inflamatórios granulomatosos caracterizados pela presença de Linfócitos T no infiltrado celular (Nogueira et al. 2008), com sensibilidade de 68,9% (Balian 2014). Após a inoculação do antígeno na face flexora do antebraço, a leitura da enduração é realizada em torno de 48 ou 72 horas e considera-se positiva se for maior que 5 mm. O indivíduo se torna reator em torno de 4 meses após o início da lesão (Montenegro 1926).

Os resultados da IDRM devem ser interpretados com cautela, pois existem fatores que podem gerar falsos negativos ou positivos (Pedral-Sampaio et al. 2016). Em populações de áreas endêmicas, o resultado positivo para IDRM pode ser interpretado como aplicação prévia do antígeno de IDRM, leishmaniose anterior, exposição ao parasito sem a doença, ou reação cruzada com outras doenças. Ainda, o teste pode persistir positivo após o tratamento, cicatrização da lesão tratada ou curada espontaneamente, ou se tornar negativo em indivíduos fraco-reatores e nos precocemente tratados (Schnorret al. 2012). Outro fator que pode influenciar é a forma clínica, por exemplo, na LCM a IDRM pode ser exacerbada com vários centímetros de enduração e presença de vesiculação na região central da reação, podendo causar ulceração e necrose no local (Gomes et al. 2017), e na LDf o teste frequentemente é negativo (Silveira et al. 2005).

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas que dificultam seu diagnóstico, assim, há a necessidade de aplicar métodos diferenciais. Os métodos clássicos aplicados na rotina laboratorial dos Centros de Saúde do Brasil apresentam limitações, como: o uso de protocolos invasivos para obtenção de amostras biológicas (Adams et al. 2010; Bentes et al. 2015), necessidade de repetição para aumentar a sensibilidade e o resultado está relacionado à experiência do examinador. As características subjetivas geradas pelo exame direto, somadas a falta de experiência do examinador podem resultar em erros de interpretação (Weigle et al. 1987; Alves et al. 2013). Diante das várias questões a serem respondidas sobre a zoonose, a principal delas é a precisão diagnóstica (Lima et al. 2017), especialmente na identificação de espécies do subgênero *Viannia*. Acredita-se que o investimento em técnicas que viabilizem este tipo de diagnóstico, poderá tornar factíveis avaliações terapêuticas, prognósticas e profiláticas. Além disso, possibilitará a compreensão da história natural das espécies que causam a LTA ou, até mesmo, uma reavaliação da distribuição geográfica e taxonômica (Lyra et al. 2015; Teles et al. 2015; Mohammadpour et al. 2017).

1.4. PCR/RFLP no diagnóstico da LTA

Considerando as limitações das técnicas de diagnóstico convencionais para a LTA, os métodos moleculares baseados em análise do DNA (Ácido Desoxirribonucleico) são alternativas promissoras para o diagnóstico laboratorial. Resultam da busca por métodos mais rápidos, sensíveis e específicos, baseados nas características genéticas dos parasitos, que além da possibilidade de detecção da infecção precoce, podem identificar a espécie envolvida (Reithinger & Dujardin 2007; Satow et al. 2013). Dentre os métodos em desenvolvimento e aprimoramento, os sistemas baseados nas técnicas de PCRs (*Polymerase Chain Reaction*) e suas variantes (PCR *multiplex*, *nested*-PCR, PCR em tempo real), associada a RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), constituem uma ferramenta relevante (Simon et al. 2017).

A PCR é um método molecular que amplifica segmentos de DNA *in vitro* a partir de uma única molécula, através de uma reação enzimática catalisada pela *Taq* DNA Polimerase, uma enzima extraída da bactéria aquática *Thermus aquaticus*, que naturalmente vive em altas temperaturas. A análise do polimorfismo de DNA por PCR é

realizada com base em *primers* que sinalizam o segmento de DNA que poderá ser analisado por sequenciamento, hibridização com sondas moleculares e muito comumente utilizado, a RFLP. Os resultados da amplificação produzida podem ser analisados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, onde os fragmentos são separados e caracterizados de acordo com o tamanho e peso molecular (Auwera & Dujardin 2015). A sensibilidade e especificidade têm se mostrado elevada, uma vez que pode se detectar pequenas quantidades de parasitos na biópsia seja devido à espécie envolvida ou advindas de lesões antigas (Tomasiniet al. 2017). Além disso, no genoma das leishmânias existem muitos alvos com sequências repetidas e/ou polimórficas conservadas ideais para serem utilizadas na amplificação (Reithinger & Dujardin 2007).

A RFLP é uma técnica que auxilia na identificação das *Leishmania* spp. e complementa a PCR (Porfírio-Passos et al. 2012). Emprega-se o uso de enzimas bacterianas de restrição (endonucleases) com propriedades de clivar pontos da dupla hélice do DNA, comumente conhecidos como sítios de restrição. Atualmente, há uma diversidade de enzimas que permite uma variedade de aplicações. Assim, nessa técnica os produtos da PCR podem ser digeridos com uma ou várias endonucleases de restrição e, dependendo da presença ou ausência do local de reconhecimento da enzima, são gerados fragmentos de tamanhos variados, que permitem subsequentemente a classificação do parasito (Schönian et al. 2003; Garcia et al. 2005; Auwera & Dujardin 2015).

Para aplicar as técnicas de PCR/RFLP é importante conhecer a organização e a disposição do DNA dos parasitos. O tamanho do genoma das leishmânias é na ordem de 10^7 a 10^8 pb (Pares de Base) de DNA, variando de acordo com a espécie. É composto de 34 a 36 cromossomos dos quais não possuem a alta compactação observada em outros eucariotos. Destes, 31 são conservados e os demais, resultantes de processos celulares como fusão ou fissão binária. Inclusive há estudos que sugerem que as leishmânias são diplóides para muitos *loci* (Wincker et al. 1996; Suarés et al. 2015). O material genético a ser analisado pode ser de origem mitocondrial ou nuclear. O DNA da mitocôndria, denominado kDNA (DNA Mini-círculo do Cinetoplasto), é composto por maxi e mini-círculos, sendo responsável por guardar e regular parte das informações essenciais ao funcionamento mitocondrial. Constitui cerca de 10 a 30% do DNA celular total, cerca de 10 a 20 mil cópias e sequências de 500 a 2.500 bp (Grimaldi & Tesh 1993; Ranasinghe et al. 2015).

No núcleo está o DNA genômico, com cerca de 100 a 500 cópias por parasito, guarda informações que conduzirão a manutenção básica do organismo e apresenta sequências codificadoras altamente conservadas (Wincker et al. 1996), como as regiões do ITS, um alvo ideal para discriminar as espécies (Cupolillo et al. 1995; Schönián et al. 2003; Mateus et al. 2006). Graça et al. (2012), investigaram os alvos ITS, kDNA, *G6PD* e *hsp70* (*Heat-Shock Protein 70 gene*) para a precisão diagnóstica e a identificação das espécies. Silva sugere que a PCR/RFLP para a região do ITS-1 das *Leishmania* spp. auxilia na abordagem clínico-terapêutica e no diagnóstico diferencial da doença (Silva 2015).

Conhecendo as características genéticas dos parasitos, a escolha do alvo deve ser direcionada pelos objetivos da pesquisa (Bracho et al. 2007). No caso da leishmaniose, nem sempre é possível que esse alvo possua sensibilidade e especificidade ao mesmo tempo. Para atingir esse objetivo em conjunto, ele deve conter regiões conservadas com sequências repetidas para conferir sensibilidade à reação, porém variável o suficiente para identificar as espécies. O mais comum é o uso de mais de um alvo para análise ou a associação de técnicas, considerando a PCR/RFLP, que em conjunto detecta o parasito com exatidão e pode identificar a espécie envolvida na infecção (Volpini et al. 2004; Garcia et al. 2005; Andrade et al. 2005; Graça et al. 2012; Simon et al. 2017).

Diversas sequências alvos e protocolos de PCRs estão sendo empregados e outros investigados, para serem utilizados como métodos de diagnóstico e identificação das espécies que causam a LTA (Beldi et al. 2017). Levando em consideração a importância das regiões do DNA altamente conservadas, os alvos rotineiramente utilizados para amplificação são: o ITS (Cupolillo et al. 1995), o *locus* da enzima *G6PD* (Castilho et al. 2003), o kDNA (Volpini et al. 2004), gene mini-exon (Harris et al. 1998), gene *hsp70* (Garcia et al. 2004; Montalvo et al. 2012), sequências repetitivas de DNA nuclear (Piarroux et al. 1993), gene do citocromo b (Kato et al. 2005), gene *gp63* (Joshi et al. 1998) e sequências de RNA (Zelazny et al. 2005; Arora et al. 2008).

As regiões do gene ITS1 e ITS2 que estão no genoma nuclear do parasito são relevantes para a identificação das *Leishmania* spp. O alvo apresenta alto nível de variações intra e interespecíficas que permitem a diferenciação entre as espécies e têm sido importantes para o diagnóstico e estudos da genética populacional. Taxonomistas vêm utilizando marcadores do ITS e as informações geradas podem determinar uma medida mais precisa de distâncias genéticas entre espécies, o que facilita as análises filogenéticas (Cupolillo et al. 1995). A RFLP aos produtos resultantes da PCR com

endonucleases de restrição, como *ApaI*, *RsaI* e *HaeIII*, têm sido amplamente utilizadas nas pesquisas (Rotureau et al. 2006), porque permitem o diagnóstico e a identificação de algumas espécies (Kazemi-Rad et al. 2008; Schönián et al. 2010).

A enzima *G6PD* atua na via das pentoses, dos quais os produtos são essenciais ao organismo, como por exemplo, na produção de proteínas, nucleotídeos e a NADPH (*Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*), cuja função é a de doador de elétrons para reduzir a biossíntese e auxiliar na defesa contra o estresse oxidativo enfrentado pelo parasito dentro da célula hospedeira. As investigações mostram haver isoformas da *G6PD* para leishmânia, o que viabiliza, através de sequências peculiares localizadas no *locus* dessa enzima, discernir espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* e ainda mais especificamente, a espécie *L. (V.) braziliensis* (Barrett 1997; Cupolillo et al. 1994; Castilho et al. 2003). Diante dessas possibilidades, Castilho determinou as sequências de *G6PD* de algumas espécies de referência de *Leishmania* spp. da LTA, e baseado numa diferença de 3 bp, desenharam oligonucleotídeos para identificar a espécie *L. (V.) braziliensis*. A discriminação dessa espécie, em particular, contribui para estudos epidemiológicos em regiões em que as espécies de parasitos vivem em simpatria, principalmente se pertencerem ao mesmo subgênero (Castilho et al. 2003; Castilho et al. 2008). O alvo também tem sido utilizado para quantificar a carga parasitária dos pacientes com LTA (Jara et al. 2013).

Em contraste com as investigações desenvolvidas para o gene *G6PD* e ITS, ensaios de PCR/RFLPs para o alvo kDNA apresentam maior sensibilidade para o diagnóstico da LTA (Mary et al. 2004). O alvo apresenta essa característica pelo seu elevado número de cópias, o que o torna ideal para o diagnóstico, mesmo que haja pouco material genético do parasito (Da Silva et al. 2010; Weirather et al. 2011; Gualda et al. 2015; Hamouchi et al. 2017; Verma et al. 2017). O diagnóstico, realizado com base na investigação por PCR desse alvo, demonstrou uma sensibilidade de 97,9% e especificidade de 87,5 (Jara et al. 2013). Porém, seu uso não é o ideal para distinguir as espécies do subgênero *Viannia* devido suas similaridades genéticas (Cruz et al. 2013).

As técnicas moleculares são rotineiramente empregadas nos laboratórios de pesquisa científica e diante de suas vantagens, é cada vez mais comum o desenvolvimento de protocolos que visem seu aprimoramento (Queiroz et al. 2012; Srivastava et al. 2012). No Campo de Instrução Militar Marechal Newton Cavalcanti, localizado nos remanescentes da Mata Atlântica, no estado do Pernambuco, foi investigado por PCR em tempo real, os vetores da leishmaniose, correlacionando-os às

espécie de parasitos que foram encontrados no material biológico de soldados com diagnóstico da doença. Além da acurácia do método, é importante ressaltar à contribuição epidemiológica, informação que poderá direcionar medidas preventivas à população (Dantas-Torres et al. 2017).

A aplicabilidade da PCR/RFLP a vários tipos de amostras biológicas independentemente do cultivo do parasito *in vivo* e/ou *in vitro* (Guerbouj et al. 2014), é uma vantagem relevante comparada às técnicas convencionais que são baseadas em microscopia e cultura de células. É possível utilizar diversos tipos de material biológico como amostras de sangue, linfonodos, aspirados de medula óssea, biópsia de pele e mucosas, raspado da lesão com bisturi e aposição em lâminas de vidro corada com *Giemsa* (Beldi et al. 2017), ou coleta com *swab* estéril (Gomes et al. 2017), sendo estes dois últimos uma alternativa não invasiva para diagnóstico e identificação das espécies. Além disso, podem ser analisadas amostras conservadas em diversas soluções ou por um longo período de tempo (Piarroux et al. 1993; Volpini et al. 2006). Todavia, comparada às metodologias empregadas no diagnóstico laboratorial, é uma opção mais onerosa em termos de custos financeiros, sua sensibilidade e a especificidade dependem do alvo a ser pesquisado, da qualidade do método de extração do DNA, do treinamento e experiência de quem realiza e das condições laboratoriais a fim de evitar contaminações durante a execução (Silva et al. 2005; Porfírio-Passos et al. 2012).

1.5. Tratamento da LTA

Atualmente, o fármaco de primeira escolha para tratar a LTA no hospedeiro humano é o antimonial pentavalente, N-metilglucamina, com exceção dos pacientes coinfectados com HIV, crianças menores de 1 ano, idosos com mais de 50 anos e gestantes (Ministério da Saúde 2017). Considerado leishmanicida, pois interfere no metabolismo energético das formas amastigotas, com inibição da glicólise e a oxidação dos ácidos graxos. É prescrito para todas as formas de manifestações clínicas, variando nas dosagens e no tempo de tratamento, no qual são observados vários efeitos colaterais. Para o tratamento da forma clínica LCM pode apresentar falhas, com possibilidades de recidivas ou de uma resposta mais lenta (Azeredo-Coutinho et al. 2007; Goto & Lindoso 2010).

O desoxicolato de anfotericina B, tem sido o “Padrão Ouro” contra infecções fúngicas invasivas há mais de 40 anos (Kleinberg 2006; Lacerda & Oliveira 2013). No

Brasil é o fármaco de primeira escolha no caso de gestantes. Durante o tratamento com esse fármaco, é necessário o acompanhamento e cuidados ao paciente, pois são associados diversos efeitos colaterais como a toxicidade renal, cardíaca e gastrointestinal, diminuição do apetite, sensação de náusea, vômitos entre outros sintomas (Thakuret al. 1999; Ministério da Saúde 2017). Com o objetivo de melhorar a sintomatologia, mas sem afetar seu mecanismo de ação contra os parasitos dentro do vacúolo parasitóforo, em lipossomas pode ser administrado em doses menores, o que diminui os efeitos colaterais (Adler-Moore et al. 2016). Porém, apesar das vantagens da formulação lipossomal, o método aumenta os custos financeiros e ainda há necessidade de mais investigação sobre a fórmula (Rocio et al. 2014; Perez et al. 2016).

A miltefosina, medicamento antineoplásico indicado no tratamento para câncer, também mostrou efetividade e segurança no tratamento da LTA, evidenciado pela efetividade contra algumas espécies de leishmânia. Um ensaio clínico randomizado comparou os efeitos da miltefosina administrado via oral com o fármaco de primeira escolha via parenteral. Foram demonstradas taxas similares de cura em 6 meses com os 2 medicamentos e eventos adversos de menor gravidade com a miltefosina (Soto et al, 2014). O fármaco é uma opção para os portadores da doença, indicado para criança, doente renal e cardíaco. Seus efeitos adversos incluem sintomas gastrointestinais como náuseas e vômitos, alterações nos níveis de creatinina e elevação das enzimas hepáticas, além de inchaço testicular doloroso (Reveiz et al 2013). Com administração oral é prescrito em alguns países, como os Estados Unidos e a Índia, enquanto que no Brasil ainda não possui registro na ANVISA para tratar a LTA (Ministério da Saúde 2017).

2. JUSTIFICATIVA

A LTA é uma zoonose endêmica no Brasil, com notificação em todas as regiões, gera impacto e prejuízos a saúde pública. Apesar de ser milenar, ainda há dificuldade no seu diagnóstico espécie-específico mesmo quando se associa os critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais.

Diante disso, são recomendados esquemas terapêuticos idênticos para todas as manifestações clínicas de LTA, o que provavelmente pode ser uma estratégia equivocada, diante da relação entre as espécies de parasitos e as manifestações clínicas. Assim, desenvolver ou melhorar métodos de diagnósticos diferenciais para identificar as espécies de *Leishmania* spp. é uma questão importante para um tratamento mais adequado. O procedimento é relevante por vários fatores, dos quais são importantes: precisão diagnóstica, direcionamento na prescrição do fármaco com doses adequadas (Fernandes et al. 2016), avaliação da eficácia terapêutica com monitoramento da cura parasitológica. Além disso, o conhecimento de que as infecções cutâneas, principalmente as causadas pela espécie *L. (V.) braziliensis*, a espécie prevalente no País, podem evoluir para a forma LCM, também justificaria a importância do diagnóstico espécie-específico, para monitoramento do paciente. A associação das ferramentas moleculares, PCR/RFLP, é eficaz na precisão diagnóstica, porém quanto à identificação do agente etiológico, as similaridades genéticas entre as espécies do subgênero *Viannia* dificultam a identificação, não existindo um único protocolo (Montalvo et al. 2012; Auwera & Dujardin 2015; Tomasine et al. 2017).

Diferentes alvos vêm sido descritos para identificação de espécies de leishmânias e a PCR/RFLP tem sido a principal ferramenta utilizada. Critérios como as variações no tamanho e peso molecular dos fragmentos, devem nortear a escolha do tipo de gel que será usado como matriz para análise do produto amplificado. Assim, o presente trabalho tem como objetivo propor a padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida com intuito de contribuir na melhoria da interpretação dos resultados. Acredita-se que, diante das pequenas variações entre as espécies do subgênero *Viannia* e o fato da impregnação pelo nitrato de prata adicionar melhoria na sensibilidade e resolução na interpretação dos resultados, a poliacrilamida poderá ser uma melhor escolha. Neste sentido, justifica-se a proposta do trabalho em padronizar a análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida, e assim contribuir com informações importantes para a acurácia no diagnóstico, elaboração de

prognósticos, escolha do fármaco e esquema de tratamento, o que consequentemente poderia evitar o aparecimento de novas lesões e a progressão da LTA.

3. OBJETIVO

Padronizar a análise dos produtos amplificados na PCR/RFLP que utilizam como alvos os genes ITS e *G6PD* em gel de poliacrilamida para caracterizar as espécies do subgênero *Viannia* de *Leishmania*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Utilizar a PCR/RFLP que amplifica o alvo kDNA de *Leishmania* spp. para selecionar as amostras positivas de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA;
- Padronizar a análise dos produtos da PCR/RFLP ao gene ITS em gel de poliacrilamida a partir de amostras de DNA das espécies de *Leishmania* de referência;
- Padronizar a análise dos produtos da PCR ao gene *G6PD* em gel de poliacrilamida a partir de amostras de DNA espécies de *Leishmania* de referencia;
- Validar a padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP para o gene ITS em gel de poliacrilamida, a partir das amostras pacientes tocaninenses amplificadas na PCR/RFLP ao alvo kDNA;
- Validar a padronização da análise dos produtos da PCR ao gene *G6PD* em gel de poliacrilamida, a partir das amostras pacientes tocaninenses amplificadas pela PCR/RFLP ao alvo kDNA;
- Validar a padronização da análise dos produtos da PCR ao gene *G6PD* em gel de poliacrilamida, a partir das amostras de DNA dos isolados estocados no *Leishbank* do Laboratório de Imunobiologia do IPTSP/UFG.

4. METODOLOGIA

4.1. Local de realização da pesquisa e considerações éticas

O presente trabalho foi executado no laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do IPTSP/UFG (Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás). Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital da Clínicas da UFG (Anexo 1).

4.2. Delineamento da pesquisa

Para o delineamento da pesquisa foram adaptados 3 protocolos de PCR/RFLP, descritos anteriormente na literatura, e as análises dos produtos da PCR amplificados nessas reações foram padronizadas em gel de poliacrilamida. A PCR/RFLP ao alvo kDNA com os *primers* L. 150/152 foi adaptada segundo Volpini et al. (2004), a PCR/RFLP ao alvo ITS com os *primers* IR1/IR2 adaptada conforme Cupolillo et al. (1995) e a PCR ao alvo *G6PD* com os *primers* ISVB/ISVC adaptada conforme Castilho et al. (2003). O primeiro passo para o delineamento do trabalho consistiu em selecionar amostras positivas para o subgênero *Viannia*, a partir da PCR/RFLP para o alvo kDNA com os *primers* L. 150/152 e a enzima *HaeIII*, usando 521 amostras biológicas de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA armazenadas em lâminas de vidro (Figura 3).

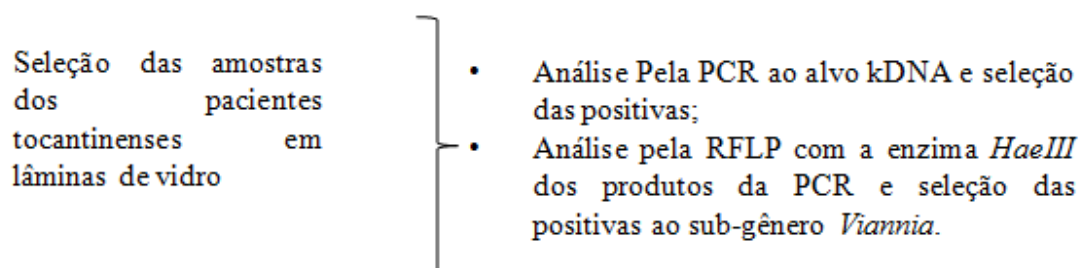


Figura 3 - Seleção de amostras dos pacientes tocaninenses positivas para LTA pela PCR/RFLP.

O segundo passo foi realizar a padronização da análise dos produtos da PCR, com *primers* IR1/IR2 ao alvo ITS em gel de poliacrilamida, seguidos da padronização

da análise dos produtos da RFLP com a enzima *HaeIII* em gel de poliacrilamida. O mesmo procedimento foi realizado aos produtos da PCR ao alvo *G6PD* com os *primers* ISVB/ISVC (Figura 4). Para esses objetivos foram usadas amostras de DNA das espécies de referência de leishmânias, depositadas no *Leishbank* do laboratório de Imunobiologia do IPTSP/UFG12

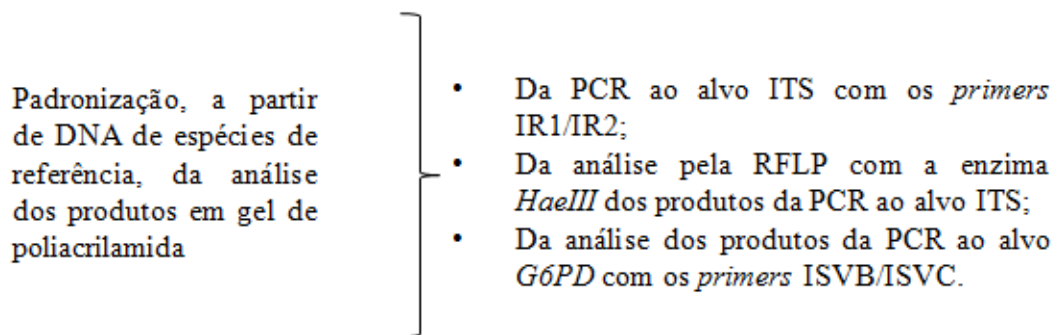


Figura 4 - Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida.

Para finalizar, o último passo no delineamento da pesquisa, foi à validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS e dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida (Figura 5). Para alcançar esses objetivos foram utilizados dois tipos de material biológico: DNA da amostra provenientes de lâminas dos pacientes tocaninenses que foram selecionadas pela PCR/RFLP para o alvo kDNA e 43 amostra de DNA de isolados do subgênero *Viannia* e *Leishmania*, estocados no *Leishbank* do Laboratório de Imunobiologia do IPTSP/UFG.

Validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida a partir de:

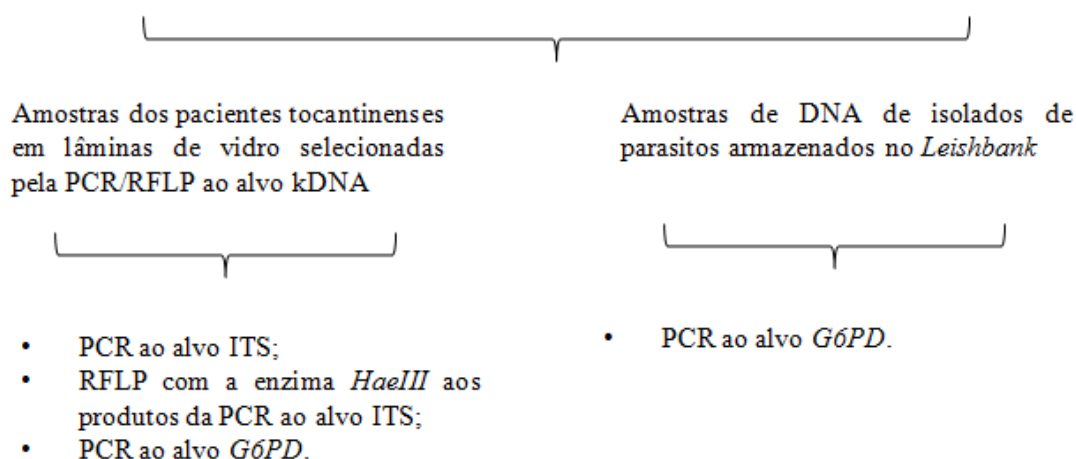


Figura 5 - Validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP em gel de poliacrilamida.

4.3. Amostras de pacientes tocaninenses : caracterização e método de coleta

Foram utilizadas 521 amostras biológicas armazenadas em lâminas, correspondentes aos anos de 2012 e 2013, provenientes de pacientes com suspeita de LTA do Estado de Tocantins, atendidos no Centro de leishmaniose do SAE (Serviço de Atenção Especializada), localizado no CEME (Centro Municipal de Especialidades Médicas Dr. Gismar Gomes, Porto Nacional – TO), e de outras principais redes de saúde distribuídas por todo o Estado.

Para coleta das amostras biológicas os profissionais da saúde higienizaram a borda da lesão com soro fisiológico. Depois, realizaram o raspado da borda da lesão com bisturi estéril e o material obtido foi transposto em movimentos circulares para a superfície de lâminas de vidro. Os esfregaços foram fixados com metanol e corados com solução de *Giemsa* ou foram armazenados -20°C para extração de DNA. Para o diagnóstico, os profissionais examinaram as lâminas coradas em microscópio ótico utilizando objetiva de imersão.

4.4. *Leishmania* spp. de referência e caracterização dos isolados dos isolados de parasitos do *Leishbank*

Para realizar as reações moleculares PCR/RFLP foram usados como controle positivo, amostras de DNA das espécies de leishmânia referência, que estão armazenadas no *Leishbank* IPTSP/UFG, à -80°C em nitrogênio líquido. As espécies de *Leishmania* spp. de referência utilizadas foram: *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L.(V.) braziliensis* (MHOM/BR/M2903), *L. (V.) naiffi*: (MDAS/BR/M5533), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) shawi*: (MCEB/BR/1984/8408) e *L. (V.) lainsoni* (WHOM/BR/1981/M6426).

Para validar a padronização da análise dos produtos amplificados pela PCR/RFLP em gel de poliacrilamida foram utilizadas 43 amostras de DNA dos isolados de parasitos pertencentes aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, armazenadas no *Leishbank* do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do IPTSP/UFG e mantidas à -80°C em nitrogênio líquido, provenientes de casos autóctones dos Estados das Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sob a coordenação da prof. Dra. Miriam Leandro Dorta.

4.5. Extração de DNA : Amostras de pacientes em lâminas e DNA genômico de espécies de referência

Para realizar a extração do DNA dos isolados de *Leishmania* spp., os parasitos foram descongelados e cultivados segundo Oliveira et al. (2010). A extração do DNA dos isolados e/ou das amostras biológicas em lâminas provenientes do raspado da borda da lesão oriundas de pacientes do Tocantins com suspeita de LTA, foi realizada utilizando o Kit de extração *illustra™bloodgenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK.)*, conforme instruções do fabricante. A dosagem do DNA das amostras foi realizada no aparelho *Nano Drop ® Spectrophotometer ND-1000*.

4.6. Concentração das amostras biológicas armazenadas em lâminas

O volume resultante da extração de DNA das amostras dos pacientes tocaninenses com suspeita de LTA armazenadas em lâminas, conforme a instrução do fabricante foi de 200 µL. Visando melhorar a sensibilidade da reação para amplificação

do DNA foi realizada a concentração para 50 µL, do qual, para o procedimento foi utilizado o aparelho liofilizador da marca *LABCONCO CentriVap micro IR*, que comporta 24 amostras por ciclo de concentração. O período de cada ciclo para a concentração foi de 10 horas. Depois desse procedimento, foram feitas as dosagens de DNA no aparelho *Nano Drop® Spectrophotometer ND-1000*.

4.7. PCR/RFLP

Para executar o trabalho foram adaptados 3 protocolos de PCR/RFLP, conforme descrito anteriormente na literatura, por Volpini et al. (2004), Cupolillo et al. (1995) e Castilho et al. (2003), com objetivo de amplificar os alvos kDNA, ITS e *G6PD* respectivamente. Em cada reação da PCR, além das amostras biológicas a serem analisadas, amostras de DNA de formas promastigotas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* foram adicionadas como controles positivos.

Os *primers* L. 150/152 específicos para a região conservada dos minicírculos do kDNA das leishmânias (Degraive et al. 1994), o IR1/IR2 que amplifica a região do ITS do rDNA (Cupolillo et al. 1995) e o ISVB/ISVC que amplifica o alvo *G6PD* do rDNA, específico da espécie *L. (V.) braziliensis* (Castilho et al. 2003), (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização da sequência de nucleotídeos e o tamanho em pares de bases dos pares de *Primers* empregados na PCR/RFLP.

<i>Primers</i>	Alvo	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	<i>*bp</i>	
			PCR	RFLP
L.150/152	kDNA	<i>Forward:</i> GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA <i>Reverse:</i> (G/C) (G/C) (G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C	116/120	40 - 80
IR1/IR2	ITS/rDNA	<i>Forward:</i> GTC GTA GGT GAA CCT GCA GCA GCT GGA TCA TT <i>Reverse:</i> GCG GGT AGT CCT GCC AAA CAC TCA GGT CTG	900/1.000	80 – 300
ISVB/ISVC	<i>G6PD</i> /rDNA	<i>Forward:</i> TAC TCG CCA TGT CGG AGG <i>Reverse:</i> ATC ACA ATG ATG GTC AAC GCA C	234/333	Não se aplica

**bp: Amplicons em pares de bases.*

4.7.1. Descrição da PCR/RFLP ao alvo kDNA

Inicialmente, o DNA de formas promastigotas das espécies de referência *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*, com uma concentração de 5×10^8 parasitos por mL, foram amplificados utilizando os primers L. 150/152 e os produtos dessa reação foram submetidos a RFLP com *HaeIII*. Após a análise das referências, foi realizada a triagem das amostras dos pacientes tocantinenses com suspeita de LTA fixadas em lâminas. O DNA controle foi diluído à 1/100, e o DNA das amostras extraídos das lâminas foi utilizado sem diluir.

Os reagentes da pré-mix da reação da PCR foram: 2 µL de tampão 10x (*Invitrogen* Brasil), 1,2 µL $MgCl_2$ (50 mM, *Invitrogen* Brasil), 0,2 µL dUTP (10 mM), 0,5 µL de cada primer L. 150/152 (10 mM), 5,44 µL de água *MilliQ*, 0,16 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL) e 10 µL de DNA da amostra dos pacientes tocantinenses concentrado, totalizando 20 µL. As reações foram realizadas no termociclador automático (*Eppendorf - Mastercycler personal*) de acordo com as condições descritas na Tabela 3. As amostras dos pacientes amplificadas foram submetidas à RFLP, os reagentes foram: 2 µL de Tampão da enzima, 4 µL de água *MilliQ*, 1 µL da enzima *HaeIII* e 5 µL de produto amplificado. A reação foi incubada a uma temperatura de 37°C por 3 horas no aparelho termobloco (*Bioer Mixing Block MB – 101*).

Tabela 3 - Condições da PCR ao alvo kDNA no termociclador

Temperatura (°C)	Tempo em minutos (′) e segundos (″)	Número de ciclos
94	5′ (Desnaturação inicial)	1
94	45″ (Desnaturação intermediária)	35
60	45″ (Anelamento)	35
72	30″ (Extensão intermediária)	35
72	7′ (Extensão final)	1
4	∞ (Fim da reação)	

4.7.2. Descrição da PCR/RFLP ao alvo ITS

Inicialmente, realizado em 4.7.1, § 1º, para a padronização das análises em gel de poliacrilamida, as amostras de DNA de promastigotas das espécies de referência foram submetidos à amplificação pela PCR/RFLP ao alvo ITS. Em cada reação para validação das análises padronizadas foram utilizados dois controles positivos, o negativo e as amostras dos pacientes tocantinenses fixadas em lâminas positivas pela PCR ao alvo para kDNA sem diluir e/ou DNA da amostra dos isolados armazenados no *Leishbank*.

Os reagentes da pré-mix da PCR para o ITS foram: 14,8 µL de água *MilliQ*, 5 µL tampão 10x (*Invitrogen* Brasil), 2 µL MgCl₂ (50 mM, *Invitrogen* Brasil), 1 µL de dNTP (100 mM), 1 µL de cada *primer* IR1/IR2 (100 µg/µL, *Sigma Life Science*), 0,2 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL) e 25 µL do de DNA da amostra dos pacientes tocaninenses concentrado, totalizando 50 µL. A PCR foi realizada no termociclador automático de acordo com as condições descritas na Tabela 4. As amostras dos pacientes amplificadas foram submetidas à RFLP, onde os reagentes dessa reação foram: 2 µL de tampão da enzima, 7,5 µL de água *MilliQ*, 0,5 µL da enzima de restrição *HaeIII* e 10 µL de produto amplificado. A reação foi incubada a uma temperatura de 37°C por 3 horas no aparelho termobloco.

Tabela 4 - Condições da PCR ao alvo ITS no termociclador

Temperatura (°C)	Tempo em minutos (')	Número de ciclos
94	3' (Desnaturação inicial)	1
94	1' (Desnaturação intermediária)	34
55	1' (Anelamento)	34
72	1' (Extensão intermediária)	34
72	10' (Extensão final)	1
4	∞ (Fim da reação)	

4.7.3. Descrição da PCR ao alvo *G6PD*

Conforme realizado em 4.7.1, § 1º, para a padronização das análises em gel de poliacrilamida, as amostras de DNA de promastigotas das espécies de referência foram submetidos à amplificação pela PCR ao alvo *G6PD*. A validação ocorreu conforme 4.7.2, § 1º.

Os reagentes da pré-mix da reação de PCR foram: 28,6 µL de água *MilliQ*, 5 µL tampão 10x (*Invitrogen* Brasil), 4 µL MgCl₂ (50 mM, *Invitrogen* Brasil), 1 µL de dNTP (100 mM), 0,5 µL de cada *primer* ISVB/ISVC (10 mM, *Sigma Life Science*), 0,4 µL de *Taq* DNA Polimerase (5 U/µL) e 10 µL do DNA da amostra, totalizando 50 µL. As condições das reações foram realizadas no termociclador automático, conforme tabela 5.

Tabela 5 - Condições da PCR ao alvo *G6PD* no termociclador

Temperatura (°C)	Tempo em minutos (') e segundos (")	Número de ciclos
94	4' (Desnaturação inicial)	1
94	1' (Desnaturação intermediária)	40
44	1' (Anelamento)	40
72	30" (Extensão intermediária)	40
72	4' (Extensão final)	1
4	∞ (Fim da reação)	

4.7.4. Controle das condições para a realização da PCR/RFLP

Em todas as etapas de realização da PCR/RFLP foram adotadas medidas de segurança como prevenção a possíveis contaminações com *amplicons*, tanto dos reagentes como dos materiais de uso. Para isso, as etapas, como o preparo da pré-mix e dos reagentes, manipulação do amplificado, eletroforese e revelação, foram processadas em ambientes separados. A pré-mix e o preparo de todos os reagentes foram realizados com pipetas, ponteiras e em capela de fluxo laminar de uso exclusivo. A cada procedimento molecular, o ambiente de preparo era submetido à limpeza com hipoclorito 1%, álcool 70% e exposição com luz UV por 30 minutos, antes e depois de cada procedimento. As ponteiras eram novas, estéreis e com filtro, a água *Milli-Q* utilizada, tanto para as reações, diluições de reagentes, quanto para completar o controle negativo, autoclavada.

4.8. Análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA em gel de poliacrilamida

Após a amplificação dos produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA, à análise foi realizada em gel de poliacrilamida, com pentes de plásticos de 10 ou 15 poços, utilizando-se o kit de aparatos *Mini-PROTEAN® Bio-Rad*. O gel para análise dos produtos amplificados pela PCR foi preparado com 6 mL de sopa primitiva a 8% (Anexo 2), 62,5 mL de Persulfato de amônio a 10% e 6,25 µL de TEMED e, para análise dos produtos da RFLP com *HaeIII*, a sopa à 15% (Anexo 2). Foram pipetados na primeira canaleta de cada gel 2 µL do marcador de peso molecular 100 bp (DNA *ladder*, *Invitrogen* Brasil), e nas demais canaletas 2 µL de tampão da amostra de DNA com 8 µL de produto da PCR e/ou RFLP. O tampão de corrida utilizado foi o TBE 1X (Tris/Borato/EDTA) (Anexo 2), e o tempo de voltagem inicial para análise dos produtos

da PCR foi de 50 V por 20 minutos, seguidos de 100 V por 70 minutos e dos produtos da RFLP foi inicialmente de 50 V por 20 minutos, seguidos de 100 V por 90 minutos.

Para a visualização do produto amplificado o gel de poliacrilamida foi imerso sequencialmente em uma cuba contendo soluções diferentes, das quais, em cada uma delas ficou em constante agitação no aparelho *Biomixer Rotary Shaker* por 10 minutos: solução fixadora (15 mL de etanol P.A., 750 µL de ácido acético P.A. e água *MilliQ* quantidade suficiente para 150 mL), que foi armazenada para o gel ao final do procedimento, em seguida foi imerso em solução de nitrato de prata 0,2%, que após a lavagem em água destilada em constante agitação por 2 minutos, foi acrescentada a solução reveladora (45 mL de solução de hidróxido de sódio, 450 µL de formaldeído e água *MilliQ* quantidade suficiente para 300 mL), até o nítido aparecimento das bandas.

4.9. Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida

Para a padronização das análises dos produtos da PCR ao alvo ITS em gel de poliacrilamida foi realizada a partir do DNA da amostra das espécies de leishmânias de referência do *Leishbank* *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni* e *L. (L.) amazonensis*. O gel de poliacrilamida foi preparado com a matriz testada nas concentrações de 4%, 5%, 6%, 7% e 8%. Após a verificar a amplificação pela PCR e determinar a concentração da poliacrilamida, o mesmo procedimento foi realizado nos produtos da RFLP com *HaeIII*, iniciando o teste com a matriz a 5%, 6%, 7%, 8% e 10%.

4.10. Padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida

Após padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida, o mesmo procedimento foi realizado conforme item 4.9 no qual os produtos amplificados a partir da amostra de DNA das espécies de referência foram analisados na matriz do gel a 5%, 6%, 7% e 8%.

4.11. Gel de poliacrilamida: validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo ITS

Após a padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida, a validação da técnica foi realizada a partir de 256 amostras de pacientes tocaninenses com LTA fixadas em lâminas.

4.12. Gel de poliacrilamida : validação da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD*

Após a padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida, a validação da técnica foi realizada a partir de 48 amostras de pacientes tocaninenses com LTA fixadas em lâminas e 43 amostras de DNA dos isolados estocados no *Leishbank* do IPTSP/UFG. As amostras dos pacientes tocaninenses foram àquelas selecionadas como positivas para o subgênero *Viannia* pela PCR ao alvo kDNA.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização da PCR/RFLP para o alvo kDNA

Os produtos da PCR para o alvo kDNA foi analisado em gel de poliacrilamida 8%. O DNA de formas promastigotas metacíclicas de 6 espécies de referências *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni* foram amplificados conforme o protocolo desenvolvido por Volpini et al. (2004), e adaptado neste trabalho. Os produtos da PCR geraram *amplicons* com 120 bp para espécies do subgênero *Viannia* e 116 bp para a *L. (L.) amazonensis*. No controle negativo não houve amplificação (Figura 6).

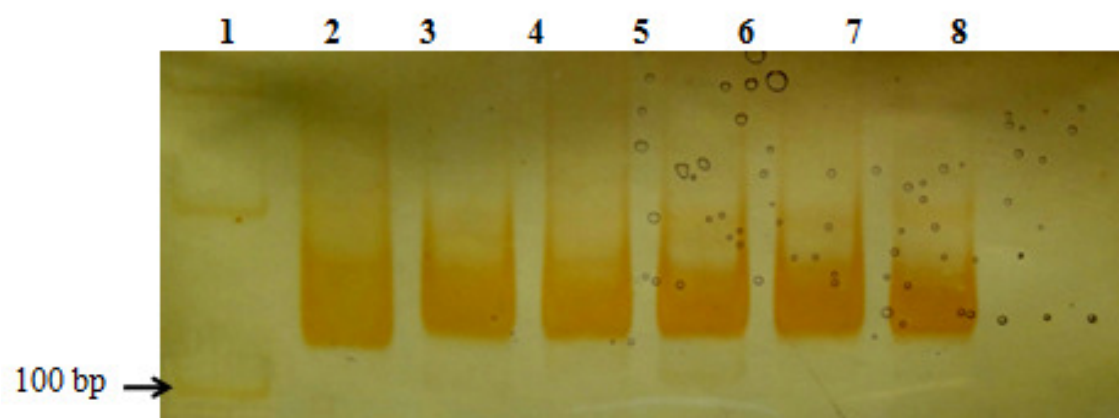


Figura 6 - **Produtos da PCR amplificados utilizando os primers L. 150/152 ao alvo kDNA em amostras de DNA de *Leishmania* spp. de referência.** Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: *L. (L.) amazonensis*; 3: *L. (V.) braziliensis*; 4: *L. (V.) guyanensis*; 5: *L. (V.) naiffi*; 6: *L. (V.) shawi*; 7: *L. (V.) lainsoni*; 8: controle negativo. Gel de poliacrilamida 8% corado pelo nitrato de prata 0,2%.

Após a análise em gel de poliacrilamida dos produtos da amplificação do DNA das amostras das espécies de *Leishmania* de referência, foi feita a RFLP com a endonuclease de restrição *HaeIII* e o produto analisado em gel de poliacrilamida 15%. As espécies do subgênero *Viannia* apresentaram *amplicons* de 40 e 80 bp, enquanto que a espécie *L. (L.) amazonensis* foi de 116 bp (Figura 7)

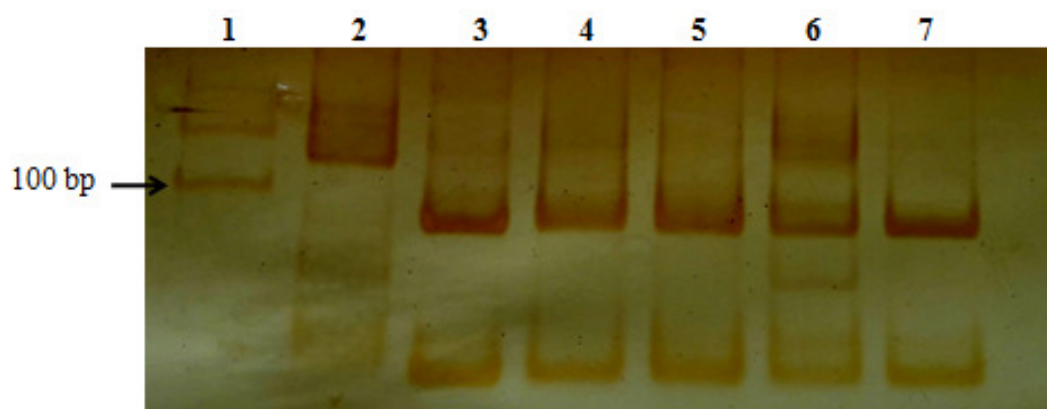


Figura 7 – Produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA utilizando a endonuclease *HAEIII* em amostras de DNA de *Leishmania* spp. de referência. Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: *L. (L.) amazonensis*; 3: *L.(V.) braziliensis*; 4: *L. (V.) guyanensis*; 5: *L. (V.) naiffi*; 6: *L. (V.) shawi*; 7: *L. (V.) lainsoni*. Gel de poliacrilamida 15%, corado pelo nitrato de prata 0,2%.

5.1.1. PCR/RFLP para o kDNA: seleção das amostras de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA

A PCR para o alvo kDNA foi realizada em 521 amostras, provenientes de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA. Do total das amostras, 223 (43%) foram amplificadas, das quais 209 (94%) foram caracterizadas como pertencentes ao subgênero *Viannia* e 14 (6%) como *L. (L.) amazonensis*.

Na figura 8 A observa-se que as amostras dos pacientes tocaninenses que foram amplificadas pela PCR ao alvo kDNA das leishmânias, distinguiu a espécie *L. (L.) amazonensis*, com *amplicons* de 116bp e as amostras do subgênero *Viannia*, com *amplicons* de 120 bp. A RFLP com a endonuclease de restrição *HaeIII*, não clivou os *amplicons* da espécie *L. (L.) amazonensis*, permanecendo com 116 bp, enquanto que as amostras do subgênero *Viannia*, apresentou dois fragmentos, de 40 e 80 bp (Figura 8 B).

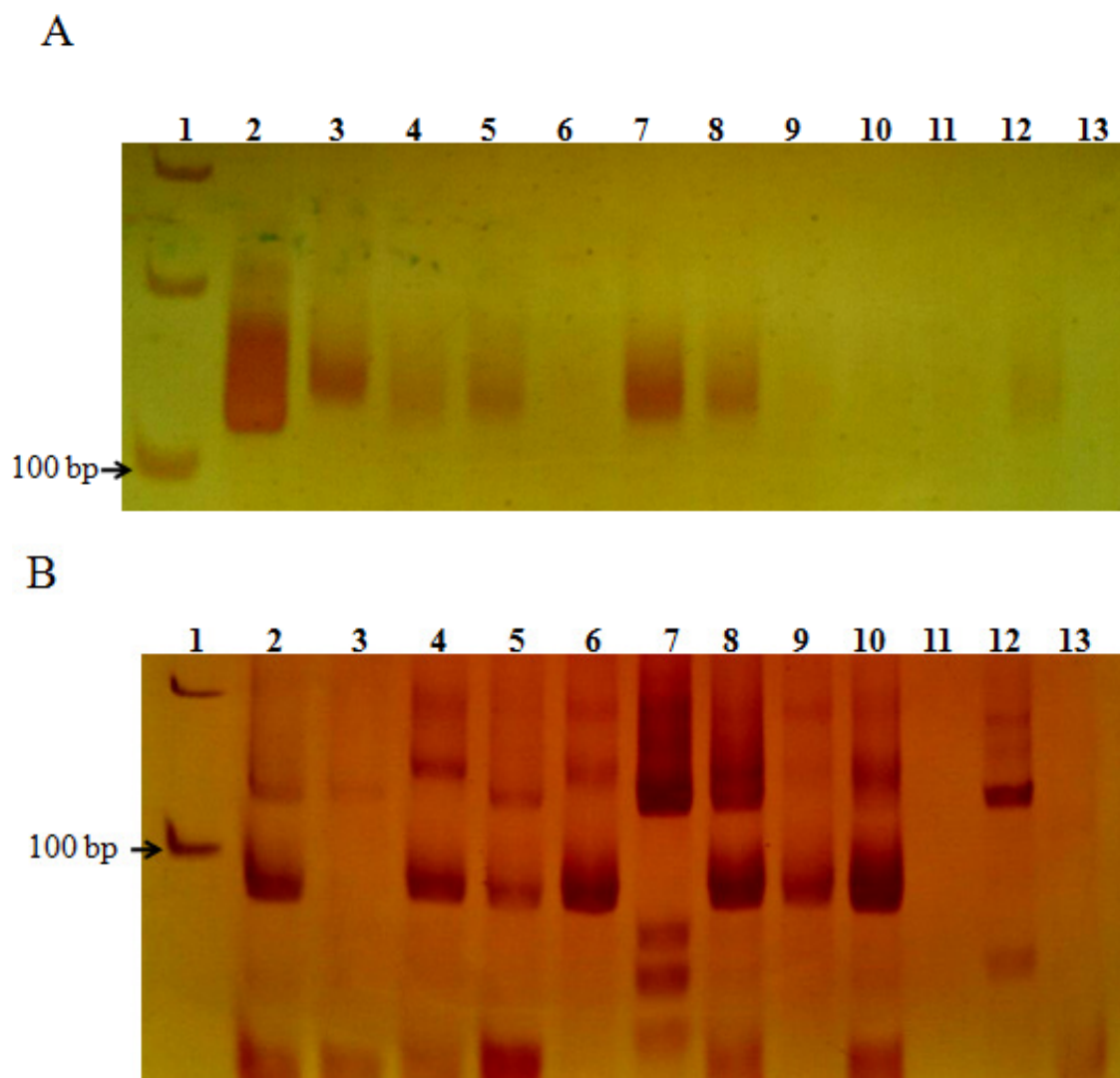


Figura 8 – **Produtos da PCR/RFLP ao alvo kDNA com os primers L. 150/152.** Em A: produtos da PCR analisados em gel de poliacrilamida 8% corado pelo nitrato de prata 0,2%. 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: *L. (L.) amazonensis*; 3: *L. (V.) braziliensis*; 4 - 12: amostra de pacientes tocantinenses com suspeita de LTA fixadas em lâminas, cedidas pelo LACEN-TO; 13: controle negativo. Em B: produtos da RFLP tratados com *HaeIII* analisados em gel de poliacrilamida 15% corado pelo nitrato de prata 0,2%. 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: *L. (V.) braziliensis*; 3: *L. (L.) amazonensis*; 4 - 13: amostra de pacientes tocantinenses com suspeita de LTA fixadas em lâminas, cedidas pelo LACEN-TO.

5.2. Padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida

Utilizando diferentes concentrações de poliacrilamida foi demonstrado que os *amplicons* de todas as espécies são melhor visualizados na concentração de 6%. O tempo da eletroforese foi padronizado em 50 V por 20 minutos seguidos de 100 V por 70 minutos. A partir da amplificação, os *amplicons* das espécies de *Leishmania*

referência analisadas, tiveram seu tamanho molecular variando entre 900 bp a 1.000 bp. Dessa forma, observou-se que as espécies *L. (V.) naiffi* e *L.(V.) shawi*, poderiam ser distinguidas das demais, mas não entre si, pois não foram observadas diferença entre seus *amplicons*. A espécie *L. (L.) amazonensis* apresentou *amplicons* cuja disposição no gel foi diferente em relação às demais. E as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* não puderam ser distinguidas entre si (Figura 9).

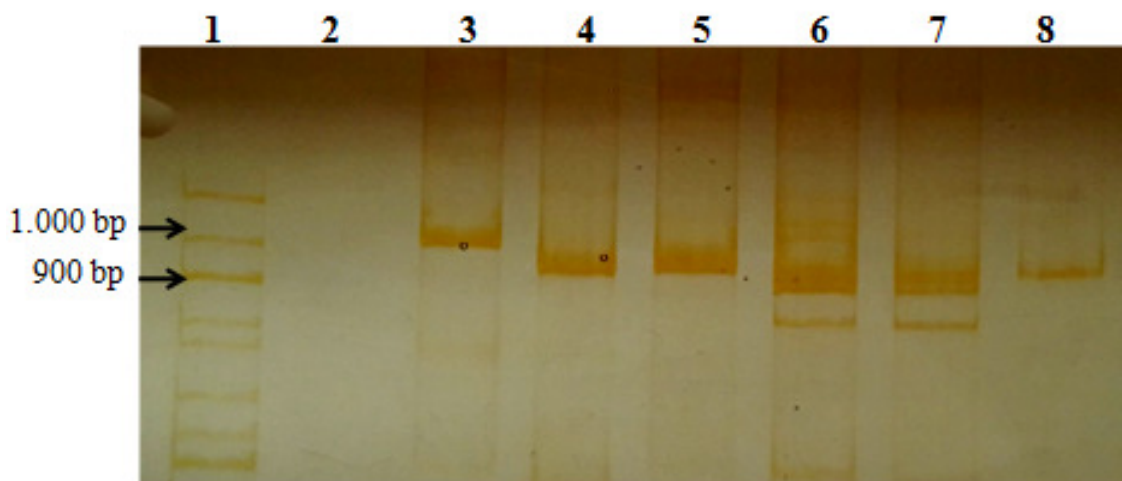


Figura 9 – **Produtos da PCR ao alvo ITS com os primers IR1/IR2 em DNA da amostra de *Leishmania* spp. de referência.** Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: Controle Negativo; 3: *L. (L.) amazonensis*; 4: *L. (V.) braziliensis*; 5: *L. (V.) guyanensis*; 6: *L. (V.) naiffi*; 7: *L. (V.) shawi*; 8: *L. (V.) lainsoni*. Gel de poliacrilamida 6% corado pelo nitrato de prata 0,2%.

A concentração do gel de poliacrilamida utilizada para analisar os produtos da RFLP, com a endonuclease de restrição *HaeIII*, que melhor discriminou os produtos gerados foi de 8%. O tempo da eletroforese ficou padronizado em 50 V por 20 minutos seguidos de 100 V por 50 minutos. Os *amplicons* gerados pela RFLP variaram entre 150 bp e 300 bp. A espécie *L. (L.) amazonensis* pode ser diferenciada das demais, porém, as espécies *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) lainsoni* eram muito similares entre si, ocorrendo o mesmo entre as espécies *L. (V.) naiffi* e *L.(V.) shawi* (Figura 10).

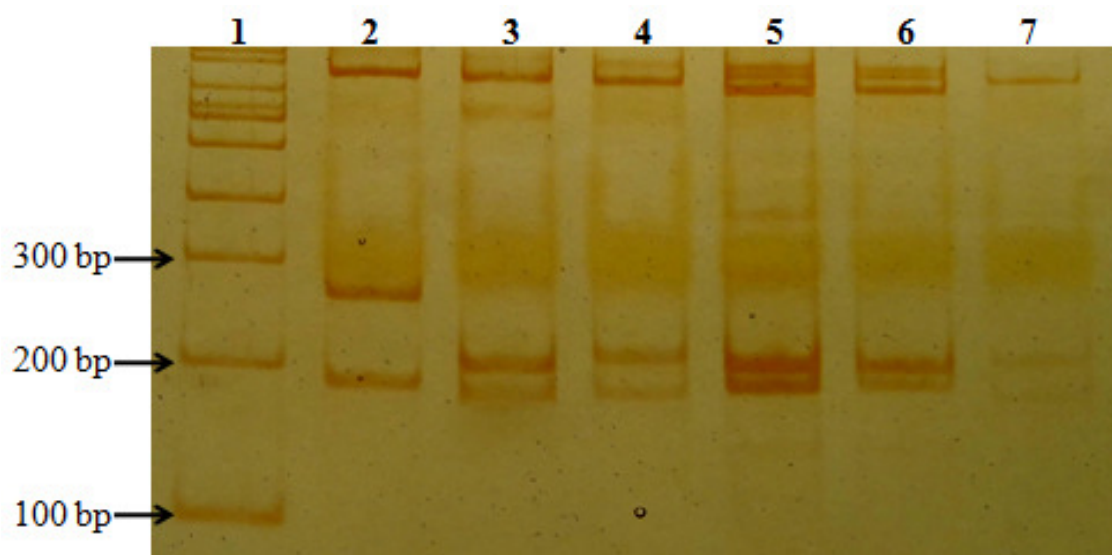


Figura 10 – Produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS com a endonuclease de restrição *HaeIII* em amostras de DNA de *Leishmania* spp. de referência. Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: *L. (L.) amazonensis*; 3: *L. (V.) braziliensis*; 4: *L. (V.) guyanensis*; 5: *L. (V.) naiffi*; 6: *L. (V.) shawi*; 7: *L. (V.) lainsoni*. Gel de poliacrilamida 8% corado pelo nitrato de prata 0,2%.

5.3. Padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida

Após a amplificação pela PCR com os *primers* específicos ao alvo *G6PD*, utilizando o DNA das espécies de referência *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) lainsoni*, a padronização da análise do produto da PCR em diferentes concentrações de poliacrilamida, demonstrou que a concentração da poliacrilamida a 6% discriminou melhor os *amplicons* das espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. A eletroforese ficou padronizada em 50 V por 20 minutos seguidos de 100 V por 50 minutos. Os *amplicons* dessa reação variaram entre 234 bp a 333 bp. As análises realizadas neste estudo demonstraram que a banda de interesse que caracteriza a espécie *L. (V.) braziliensis* possui aproximadamente 234 bp (Figura 11).

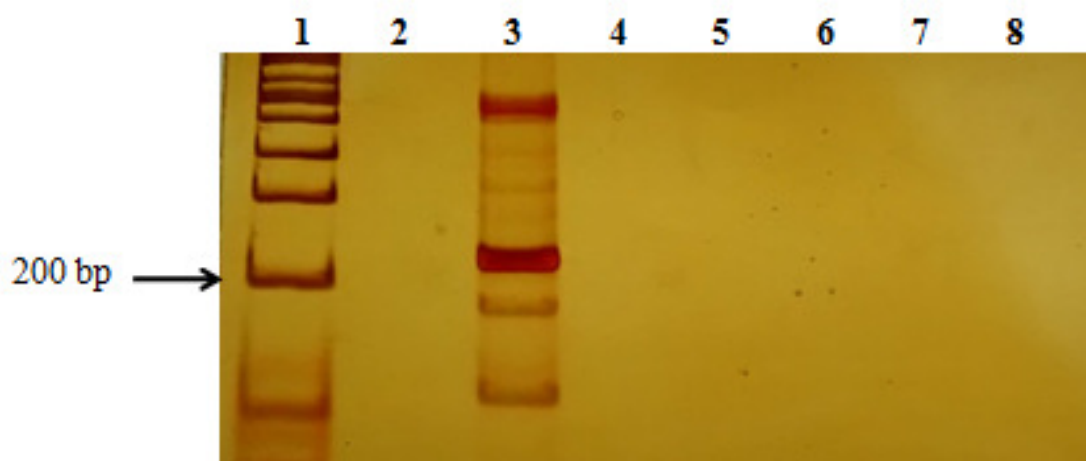


Figura 11 – Produtos da PCR ao alvo *G6PD* com os *primers* ISVB/ISVC a partir de DNA da amostra de *Leshmania* spp. de referência. Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: Controle Negativo; 3: *L. (V.) braziliensis*; 4: *L. (L.) amazonensis* 5: *L. (V.) guyanensis*; 6: *L. (V.) naiffi*; 7: *L. (V.) shawi*; 8: *L. (V.) lainsoni*. Gel de poliacrilamida 6% corado pelo nitrato de prata 0,2%.

5.4. Validação da padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel de poliacrilamida

A validação da análise dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel poliacrilamida realizada a partir do DNA das amostras biológicas dos pacientes tocaninenses fixadas em lâminas não pode ser realizada. Ao todo foram analisadas 256 amostras por esse método e apenas 4 amplificaram.

5.5. Validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida

5.5.1. Amostras de pacientes tocaninenses com LTA

Foram analisadas 66 amostras de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA pela PCR/RFLP ao kDNA sendo observada a amplificação em 73% (48) das amostras, das 90% (43) foram caracterizadas como perncentes ao subgênero *Viannia* e 10% (5) a espécie *L. (L.) amazonensis*. As 48 amostras positivas foram selecioandas para validar a padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel poliacrilamida 6%. Como resultado da análise foi observado que em 81% (39) das amostras, o agente etiológico caracterizado é *L. (V.) braziliensis* e 4 não pertencem a essa espécie e nem *L. (L.) amazonensis* (Tabela 9).

Tabela 9 - Validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD*, a partir de amostras fixadas em lâminas positivas para LTA, selecionadas pela PCR/RFLP ao alvo kDNA.

Alvo	Amostras	Positivas	Subgênero <i>Viannia</i>	Espécie
kDNA	66	48 (73%)	43 (90%)	<i>L. (L.) amazonensis</i> 5 (10%)
<i>G6PD</i>	43	39 (91%)	4 (9%)	<i>L. (V.) braziliensis</i> 39 (91%)

Conforme foi observado na padronização, o fragmento resultante da amplificação pela PCR ao alvo *G6PD* é de aproximadamente 234 bp, das quais todas as amostras que amplificaram com a banda no padrão correspondente pertencem a espécie *L. (V.) braziliensis* (Figura 12).

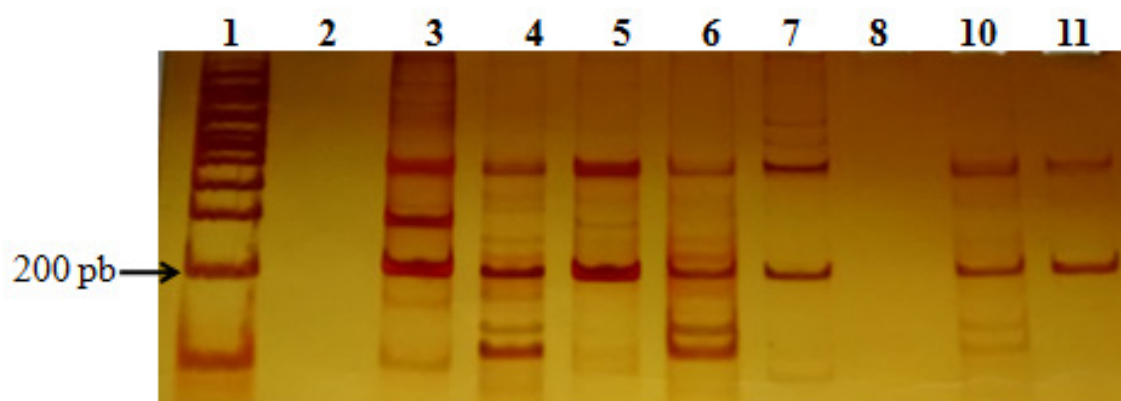


Figura 12 – Validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD*, a partir de DNA das amostras armazenadas em lâminas, por eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: Controle Negativo; 3: *L. (V.) braziliensis*; 4 - 11: DNA da amostra provenientes de lâminas de pacientes tocantinenses com suspeita de LTA, cedidas pelo LACEN-TO.

5.5.2. Amostras de DNA dos isolados armazenados no *Leishbank*

Para complementar a validação das análises dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel poliacrilamida 6%, realizada anteriormente, foi utilizada DNA da amostra de 43 isolados de parasitos pertencentes aos subgêneros *Viannia*, armazenados no *Leishbank* do IPTSP/UFG. Foi demonstrado que 63% (27), desses isolados teve seu agente etiológico identificado como pertencente à espécie *L. (V.) braziliensis* cujo amplicon possui aproximadamente 234 bp (Figura 13).

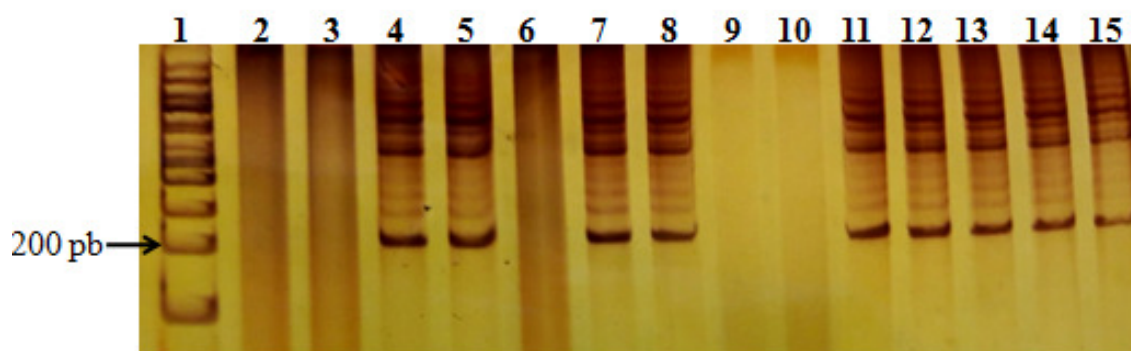


Figura 13 – Análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* com os *primers* ISVB/ISVC. Em 1: padrão de peso molecular de 100 bp; 2: Controle Negativo; 3: *L. (L.) amazonensis*; 4: *L. (V.) braziliensis*; 5 - 15: Amostras dos isolados de parasitos pertencentes aos subgêneros *Viannia* armazenados no *Leishbank* do laboratório de Imunobiologia do IPTSP/UFG. Gel de poliacrilamida 6% corado pelo nitrato de prata 0,2%.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi feita a padronização da análise dos produtos da PCR/RFLP ao gene ITS e *G6PD* em gel de poliacrilamida, com o objetivo de distinguir as espécies de parasitos de causam a LTA pertencentes do subgênero *Viannia*, que por possuírem proximidade filogenética, é de difícil discriminação. Assim, depois de realizada a padronização das análises dos produtos da PCR utilizando diferentes alvos em gel de poliacrilamida, a validação ocorreu a partir de amostras dos pacientes tocaninenses e de amostras dos isolados do Laboratório de Imunobiologia do IPTSP/UFG.

O diagnóstico espécie-específico de *Leishmania* spp., agente etiológico da LTA, baseado na PCR/RFLP, vem sendo descrito ao longo dos anos e tem contribuído para o diagnóstico de certeza da doença, principalmente nos países endêmicos (Avileset al. 1999; Shirian et al. 2014). O Brasil é um exemplo onde a LTA é endêmica e ainda assim, existem regiões em que o diagnóstico é realizado exclusivamente pelo exame direto (Coelho et al. 2011; Bentes et al. 2015), como no estado do Tocantins (Brasil 2011).

Um dos aspectos do diagnóstico da LTA pela PCR/RFLP é a possibilidade de avaliar vários tipos de amostras, ou seja, o fato de não limitar o diagnóstico somente a partir de biópsias, viabiliza o uso de métodos de coleta menos invasivo, como por *Swabs* estéreis ou esfregaços fixados em lâminas (Kazemi-Rad et al. 2008; Beldi et al. 2017; Gomes et al. 2017). O alvo kDNA é caracterizado por conferir sensibilidade ao diagnóstico espécie-específico possuindo aproximadamente 10.000 cópias por célula (Guerbouj et al. 2015). Baseado nesses aspectos, no presente estudo a PCR/RFLP ao kDNA foi utilizada para selecionar amostras de pacientes tocaninenses com suspeita de LTA fixadas em lâminas de vidro utilizados para a pesquisa de parasitos. A técnica detectou DNA dos parasitos com uma positividade de 43% em relação as 521 amostras. Em conformidade com esses achados, Volpini demonstrou que é possível detectar o DNA dos parasitos em lâminas armazenadas (esfregaço e corados com *Giemsa*) por um período de 36 anos, das quais os pesquisadores obtiveram um resultado com positividade de 83,2% (Volpini et al. 2006). Resultados semelhantes foram observados por Kazemi-Rad, ao analisar 48 amostras fixadas em lâminas, pela PCR/RFLP, obtiveram positividade de 89.6% (Kazemi-Rad et al. 2008).

É imprescindível conhecer o alvo molecular das leishmânias a ser investigado de modo a relacionar aos objetivos do trabalho. Em pesquisa recente, Auwera (2016) relatou a tipificação de 21 isolados oriundos de 16 laboratórios de 12 países diferentes pela PCR/RFLP aos alvos kDNA, hsp70 e ITS. Dentre os achados, o autor ressaltou dois importantes em relação ao kDNA e ITS; a caracterização das espécies pela PCR/RFLP direcionadas somente ao alvo kDNA discrimina à nível do subgênero e possui a vantagem de poder ser aplicado em diversos tipos de amostras, inclusive àquelas com pouco material genético do parasito, a exemplo amostras fixadas em lâminas obtidas por esfregaços por aposição e, enquanto que investigações ao alvo ITS do rDNA, se restringe a alguns tipos de amostras, que pela baixa sensibilidade comparada ao kDNA, pode não detectar o DNA do parasito nos casos de haver pouco (Auwera et al. 2016). Assim, análises moleculares ao kDNA das leishmânias compreende um alvo ideal para fins diagnósticos, justificado pela alta sensibilidade. O alvo é composto por cerca de 10 a 20 mil minicírculos, com seqüências de 500 a 2.500 bp (Disch et al. 2005; Cortes. 2008; Godoy et al. 2016; Verma et al. 2017). Enquanto que o ITS do rDNA possui cerca de 100 a 500 cópias, número reduzido comparado ao kDNA, sendo explorado para identificação de *Leishmania* spp., com o uso de enzimas de restrição (Schönian et al. 2010).

A sensibilidade do alvo kDNA pela PCR para detectar DNA é uma característica importante, porém não distingue as espécies do subgênero *Viannia*. Considerando a sensibilidade, Ereshet al. (1994) desenvolveram um protocolo de PCR, que resultou em um marcador com sensibilidade para detectar a espécie *L. (L.) amazonensis* mesmo em amostras com pouco material genético. Volpini et al.(2004), utilizando PCR/RFLP ao kDNA, com o objetivo de desenvolver um protocolo para diagnóstico e identificação dos parasitos, realizou as análises em biópsias e obtiveram concordância de 91,5% para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, cuja identificação foi confirmada pelo sequenciamento dos *amplicons*. É relevante destacar que Volpini et al. (2004), para validar sua técnica não utilizaram outras espécies do subgênero *Viannia*, ficando suas análises restritas as espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Sendo assim, os autores não demonstraram que as demais espécies do subgênero *Viannia* causadoras da LTA, geram perfis de *amplicons* semelhantes, não podendo ser caracterizados pelo método. Os dados representados nas figuras 7 e 8 do presente estudo, demonstram que as espécies do subgênero *Viannia* não podem ser caracterizadas pela PCR/RFLP ao kDNA com a enzima *HaeIII*.

Diante do desafio de distinguir as espécies do subgênero *Viannia*, pesquisadores vêm desenvolvendo novos protocolos para investigar novos alvos. Montalvo et al. (2012) desenvolveram 4 protocolos de PCRs, nos quais foram utilizados quatro pares de *primers* diferentes para explorarem um fragmento do gene *hsp70* de 1422 bp para discriminação das *Leishmânia* spp. e, em seguida a RFLP com 8 enzimas de restrição diferentes. Das espécies caracterizadas no trabalho de Montalvo que representam o Novo Mundo, foram discriminadas as espécies *L. (V.) lainsoni* e *L. (V.) guyanensis*, porém as espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) naiffi* não foram diferenciadas (Montalvo et al. 2012). Os resultados obtidos nesse trabalho quanto a especificidade às *Leishmania* spp., demonstraram a importância de combinar vários protocolos de PCR para discriminar as espécies, o que corrobora com a metodologia escolhida na presente pesquisa em investigar mais de um alvo genético para caracterizar as espécies de leishmânias que causam a LTA.

Contrário aos resultados de Beldi et al. (2017), que detectaram DNA de *Leishmania* spp. pela PCR/RFLP ao alvo ITS em amostras fixadas em lâminas com uma positividade de 77,7%, no presente estudo o protocolo de PCR/RFLP ao ITS em amostras fixadas em lâminas, analisadas em gel de poliacrilamida, não foi capaz de detectar DNA de parasitos, pois das 256 amostras utilizadas e que haviam sido amplificadas pela PCR/RFLP ao kDNA com 209 positivas, somente 4 amplificaram. Assim, a técnica não pode ser validada a partir deste tipo de amostra. Estes dados podem ser explicados por diversas variáveis. No próprio trabalho de Beldi et al. (2017), foi observado diferença de sensibilidade entre amostras recentemente preparadas com àquelas armazenadas por um longo período. Ainda podem ser citados: o tipo de amostra biológica, bem como seu método de coleta e a forma de armazenamento, quantidade de DNA a ser amplificado, método empregado na extração do DNA e o próprio protocolo de amplificação utilizado na detecção do alvo (weigle et al. 1987; Reithinger & Dujardin 2007; Baneth et al. 2008). A distribuição heterogênea do parasito pelos tecidos e órgãos e a resposta imune local do hospedeiro vertebrado frente à invasão do parasito, o que pode causar diminuição destes no local da lesão, pode explicar parte dessa variável, o que ressalta a necessidade de uma melhor comparação e avaliação ao alvo ITS a partir de amostras oriundas de lâminas (Reis et al. 2013; Satow 2016).

Considerando o trabalho de Castilho et al. (2003) ao desenvolver um protocolo de PCR que investigou o lócus da enzima *G6PD* com os *primers* ISVB/ISVC, esse mesmo protocolo foi escolhido devido sua especificidade a espécie de maior

prevalência no Brasil, *L. (V.) braziliensis*, caracterizando a espécie com *amplicons* que podem variar entre 234 a 333 bp. No presente estudo, os achados obtidos na padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* a partir de amostras de DNA de *Leishmania* spp. de referência, em gel de poliacrilamida (realizada com exclusividade), corroboram com os de Castilho et al. (2003), do qual caracteriza a espécie *L. (V.) braziliensis* com aproximadamente 234 bp (Figura 11).

A LTA é uma doença de alta incidência no estado do Tocantins (Costa et al. 2016), cuja parte de seu território está localizada na Região Amazônica, caracterizada por diferentes espécies de leishmânias vivendo em simpatria (Coelho et al. 2011; Benício et al. 2015; Teles et al. 2015), comportamento este, que destaca a importância de estudos que discriminem quais espécies podem ser observadas no estado (Martins et al. 2013). Considerando essa importância Teles realizou um levantamento epidemiológico, no qual identificou pela primeira vez no Acre, Região Norte, as espécies *L. (V.) shawi* e *L. (L.) amazonensis* (Teles et al. 2015). Estes achados corroboram com os obtidos no presente estudo ao detectar espécies vivendo em simpatria na Região Norte. Na validação da padronização da análise dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em 48 amostras de pacientes com LTA do Estado do Tocantins, em poliacrilamida, os *primers* específicos à espécie *L. (V.) braziliensis* detectou esse agente etiológico em 39 amostras. APCR/RFLP ao alvo kDNA, destas mesmas amostras, caracterizou 5 como *L. (L.) amazonensis* e 4, como não amplificaram pela PCR ao alvo *G6PD*, foram caracterizadas como do subgênero *Viannia* não *L. (V.) braziliensis* (Tabela 9).

Outro aspecto relevante é quando comparamos as amostras positivas para o subgênero *Viannia* pela PCR/RFLP ao kDNA com as amostras positivas pela PCR ao alvo *G6PD*. Na tabela 9, pode-se observar que das 43 amostras identificadas inicialmente como pertencentes ao subgênero *Viannia*, 39 foram caracterizadas como *L. (V.) braziliensis* pela PCR ao alvo *G6PD*. Esse dado demonstra que a PCR ao alvo *G6PD*, identificou em nível de espécie 91% das amostras que antes haviam sido confirmadas para LTA no nível de subgênero. A porcentagem de 91% de positividade obtida na PCR ao alvo *G6PD* corrobora com a recente revisão dos métodos de diagnósticos moleculares realizado por Auwera & Dujardin (2015), onde ele compara a sensibilidade deste alvo ao kDNA. Ambas as análises moleculares foram importantes, porque complementam a identificação das espécies. Assim, o protocolo padronizado no presente estudo, abre novas possibilidades para analisar os produtos da PCR ao alvo

G6PD a partir de diferentes amostras biológicas, com sensibilidade comparada as investigações ao alvo kDNA, o que contribui ao diagnóstico espécie-específico, com ênfase em *L. (V.) braziliensis*, que de acordo com Costa et al. (2009) Queiroz et al. (2012), Guimarães et al. (2016) é a espécie prevalente no País.

A combinação das análises moleculares pela PCR/RFLP aos alvos kDNA e *G6PD*, para caracterização das *Leishmania* spp. oriundas de pacientes fixadas em lâminas, mostrou-se relevante, tanto para caracterização quanto para diagnóstico da LTA. Pereira Júnior, no município de Tefé, Estado do Amazonas, corroborou com a metodologia do presente trabalho em combinar métodos de investigações moleculares para caracterizar as espécies de flebotomíneos associado à espécie de leishmânia. Na região foi o primeiro registro da presença de *Trichophoromyia ubiquitalis* associados a *L. (V.) lainsoni* (Pereira-Júnior et al. 2015).

As análises moleculares do presente trabalho, realizadas em amostras provenientes de isolados de parasitos de pacientes (Regiões norte, Nordeste e Centro-Oeste) e de amostras de pacientes tocantinenses fixadas em lâminas demonstraram que a LTA foi causada principalmente por parasitos do subgênero *Viannia*, pertencentes à espécie *L. (V.) braziliensis*. Esses resultados corroboram com os de Graça et al. (2012) que em análises pela PCR/RFLP aos alvos ITS, kDNA e hsp70 a partir de amostras de pacientes com LTA, demonstraram que a maioria dos achados parasitários pertenciam ao subgênero *Viannia*. Os dados do presente trabalho coadunam com os de Graça et al. (2012) reforçando a hipótese de que a maior circulação de leishmânias no Brasil que causam LTA são do subgênero *Viannia*, pertencentes a *L. (V.) braziliensis*.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Das 521 amostras dos pacientes tocaninenses, 223 amplificaram pela PCR/RFLP ao kDNA, das quais o agente etiológico causador em 94% foi caracterizado como pertencente ao subgênero *Viannia* e 6% a espécie *L. (L.) amazonensis*;
- ✓ A padronização das análises dos produtos da PCR e RFLP ao alvo ITS em amostras de *Leishmania* spp. de referência, foram realizadas em gel de poliacrilamida na concentração de 6% e 8%, respectivamente;
- ✓ A padronização das análises dos produtos da PCR ao alvo *G6PD*, em amostras de *Leishmania* spp. de referência, foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 6%;
- ✓ A validação das análises dos produtos da PCR/RFLP ao alvo ITS em gel poliacrilamida realizada a partir do DNA das amostras dos pacientes tocaninenses fixadas em lâminas não pode ser realizada;
- ✓ A validação das análises dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida, realizada em 48 amostras de pacientes tocaninenses positivas para o subgênero *Viannia*, caracterizou 81% como *L. (V.) braziliensis*;
- ✓ A validação da padronização das análises dos produtos da PCR ao alvo *G6PD* em gel de poliacrilamida, realizada em 43 amostras de isolados identificou 63% como *L. (V.) braziliensis*.

8. REFERÊNCIAS

1. Adams ER, Schoone GJ, Ageed ALF, Safi SE, Schallig HDF. Development of a Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Sensitive Detection of *Leishmania* Parasites in Clinical Samples. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 82: 591-596, 2010.
2. Adler-Moore JP, Gangneux JP, Pappas PG. Comparison between liposomal formulations of amphotericin B. *Medical Mycology* 1: 1-9, 2016.
3. Alexander J & Russel DG. The interaction of *Leishmania* species with macrophages. *Jounal Advances in Parasitology* 31, 175-254.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer MD. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One* 7: 1-12, 2012.
4. Alves CF, Alves CF, Figueiredo MM, Souza CC, Machado-Coelho GLL, Melo MN, Tafuri WL, Raso P, Soares RP, Tafuri WL. American Tegumentary Leishmaniasis: Effectiveness of an Immunohistochemical Protocol for the Detection of *Leishmania* in Skin. *Plos One* 8: 1-8, 2013
5. Amato VS, Tuon FF, Imamura R, De Camargo RA, Duarte MI, Neto VA. Mucosal leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 23: 1026-1034, 2009.
6. Amato VS, Oliveira LS, Silva ACM, Machado FR, Amato JGP, Nicodemo AC, Amato-Neto V. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31: 221-224, 1998.
7. Antonio LF, Fagundes A, Oliveira RVC, Pinto PG, Bedoya-Pacheco SJ, Vasconcellos ECF, Valette-Rosalino MC, Lyra MR, Passos SRL, Pimentel MIF,

Schubach AO. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56: 375-380, 2014.

8. Andrade MS, Brito MEF, Silva ST, Lima BS, Almeida EL, Albuquerque EL, Marinho-Júnior JF, Ishikawa E, Cupolillo E, Brandão-Filho SP. Leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, em área de treinamento militar na Zona da Mata de Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 229-233, 2005.

9. Andrade-Narvez FJ, Loría-Cervera EN, Sosa-Bibiano EI, Wynsberghe NRV. Asymptomatic infection with american cutaneous leishmaniasis: epidemiological and immunological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 111: 599-604, 2016.

10. Arora SK, Gupta S, Bhardwaj NS, Sharma NL. Na epitope-specific PCR test for diagnosis of *Leishmania donovani* infections. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102: 41-45, 2008.

11. Auwera GVD, Dujardin J-C. Species typing in dermal leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews* 28: 266 – 294, 2015.

12. Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroyt FP, Harrist E. PCR detection and identification of leishmania parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *Journal of Parasitology* 85: 181-187, 1999.

13. Azeredo-Coutinho RBG, Mendonça SCF, Callahan H, Portal AC, Grol M. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *leishmania* species and correlates with response to therapy in american tegumentary leishmaniasis. *Journal of Parasitology* 93: 688-693, 2007.

14. Bacellar O, Lessa H, Schrieffer A, Machado P, Jesus AR, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 70: 6734-6740, 2002.

15. Balian RPM, Leishmaniose Tegumentar Americana na região Centro-Oeste: avaliação de dados clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e moleculares. Goiânia [Dissertação de Mestrado em Biologia das relações Parasito-Hospedeiro – IPTSP/UFG], 2014.
16. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi JR, Momen H, McMahon-Pratt D, Jesus AR, Almeida R, Badaro R, Barral-Neto M, Carvalho EM, Johnson Jr W. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 536-546, 1991.
17. Barrett MP. The Pentose Phosphate Pathway and Parasitic Protozoa. *Parasitology Today* 13: 11-16, 1997.
18. Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, Nascimento LD, Marzochi MCA, Marzoch KBF. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of american tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 103: 383-389, 2009.
19. Basano AS, Camargo LMA. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 7: 328-337, 2004.
20. Beldi N, Mansouri R, Bettaieb J, Yaacoub A, Omrani HS, Aoun YSB, Saadni F, Guizani I, Guerbouj S. Molecular Characterization of *Leishmania* Parasites in Giemsa-Stained Slides from Cases of Human Cutaneous and Visceral Leishmaniasis, Eastern Algeria. *Vector-borne and zoonotic diseases* 20: 1-9, 2014.
21. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 102-109, 1998.

22. Benício E, Cordeiro M, Monteiro H, Moura MAS, Oliveira C, Gadelha EPN, Chrusciak-Talhari A, Talhari C, Ferreira LCL, Mira MT, Machado PRL, Talhari S, Schriefer A. Sustained presence of cutaneous leishmaniasis in Urban Manaus, the largest human settlement in the Amazon. *American Society of Tropical Medicine Hygiene* 96: 1208-1213, 2015.
23. Bentes AA, Rodrigues DE, Carvalho E, Carvalho AL, Campos FA, Romanelli RMC. Leishmaniose tegumentar americana: um desafio diagnóstico na prática pediátrica. *Revista de Medicina de Minas Gerais* 25: 583-587, 2015.
23. Besteiro S, Williams RAM, Coombs G H, Mottram J C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology* 37: 1063-1075, 2007.
24. Bittencourt AL, Barral A, Costa JML, Saldanha AC, Badaró F, Barral-Neto M, Freitas LAR. Diffuse cutaneous leishmaniasis with atypical aspects. *International Journal of Dermatology* 31: 568-570, 1992.
25. Blum-Domínguez SDC, Martínez-Vásquez A, Núñez-Oreza LA, Martínez-Hernández F, Vilalobos G, Tamay-Segovia P. Leishmaniasis cutánea difusa (LCD) Y visceral (LV) concurrentes com câncer: presentación de un caso. *Gaceta Médica de México* 153: 121-124, 2017.
26. Boelaert M, Rijal S, Regmi S, Singh R, Karki B, Jacquet D, Chappuis F, Campino L, Desjeux P, Ray DL, Stuyft PV. A comparative study of the effectiveness of diagnostic tests for Visceral Leishmaniasis. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 70: 72-77, 2004.
27. Bonfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Neto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in Diffuse Cutaneous Leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.
28. Bracho CO, Quintana LP, Arenas SM, Parra MR. Polymerase chain reaction with two molecular targets in mucosal leishmaniasis diagnosis: a validation study. *Mem*

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 549-554, 2007.

29. Brito FF, Pinto ACVD, Lamenha ML, Cavalcante L, Silva GV, Wachholz PA, Nascimento DC. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para Leishmaniose Tegumentar Americana em centro de referencia em dermatologia. *Hansenologia Internationalis* 40: 17-24, 2015.
30. Brito MEF, Mendonça MG, Gomes YM, Jardim ML, Abath FGC. Identification of Potentially Diagnostic *Leishmania braziliensis* Antigens in Human Cutaneous Leishmaniasis by Immunoblot Analysis. *American Society for Microbiology* 7: 318-321, 2000.
31. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal Experimental Medicine* 182: 1259-1264, 1995.
32. Cantanhêde LM, Silva-Júnior CF, Ito MM, Felipin KP, Nicolette R, Salcedo JMV, Porrozi R, Cupolillo E, Ferreira RGM. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. *Plos Neglected Tropical Diseases* 1: 1-8, 2015.
33. Cardoso RF, Melo BG, Pereira WMM, Cunha VR, Palácios M, Barbosa AV, Gonçalves NV. Estudo socioepidemiológico e espacial da Leishmaniose Tegumentar Americana em Município de Pará. *Revista Paraense de Medicina* 29: 29-36, 2015.
34. Carvalho AM, Amorim CF, Barbosa JLS, Lago AS, Carvalho EM. Age Modifies the Immunologic Response and Clinical Presentation of American Tegumentary Leishmaniasis. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 92: 1173-1177, 2015.
35. Carvalho EM, Barral A, Costa JML, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-324, 1994.

36. Castilho TM, Shaw JJ, Winter LMF. New PCR Assay Using Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase for Identification of *Leishmania* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 540-546, 2003.
37. Castilho TM, Camargo LMA, McMahon-Pratt D, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. A real-time polymerase chain reaction assay for the identification and quantification of american *leishmania* species on the basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 122-132, 2008.
39. Coelho LIC, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito ME, Brandão-Filho SP. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitology Research* 108: 671-677, 2011.
40. Coelho-Neto GT, Rodrigues FMD, Menezes JGPB, Gama MEA, Gonçalves EGR, Silva AR, Laurenti MD, Silveira FT, Corbett CEP, Gomes CMC. Estudo epidemiológico de pacientes com leishmaniose tegumentar americana em Buriticupu, Pré-Amazônia Maranhense. *Revista de Ciências em Saúde* 14: 133-138, 2012.
41. Convit J, Ulrich M, Castilho J, De Lima H, Pérez M, caballero N, Hung J, Arana B, Pérez P. Inorganic particles in the skin of inhabitants of volcanic areas of Central America: their possible immunomodulatory influence in leishmaniasis and leprosy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 734-739, 2006.
42. Costa JML, Saldanha ACR, Nascimento D, Sampaio G, Carneiro F, Lisboa E, Silva LM, Barral A. Modalidades clínicas, diagnóstico e abordagem terapêutica da Leishmaniose Tegumentar no Brasil. *Gazeta médica da Bahia* 79: 70-83, 2009.
43. Costa NF, Claret LOD, Pereira NM, Maia-Júnior R, Guedes VR, Bastos Da. Relato de caso: Investigação diagnóstica de lesão ulcerada na região nasal. *Revista de Patologia do Tocantins* 3: 1-8, 2016.
44. Costa-Silva MF, Gomes LI, Martins-Filho AO, Rodrigues-Silva R, Freire JM,

Quaresma PF, Pascoal-Xavier MA, Mesndes TAaO, Serakides R, Zauli DAG, Campi-Azevedo AC, Melo MN, Gontijo CMF, Peruhype-Magalhães V, Teixeira-Carvalho A. Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. *Molecular Immunology* 57: 74-85, 2014.

45. Costa SM, Cechinel M, Bandeira V, Zannuncio JC, Lainson R, Rangel EF. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: *Psychodidae*: *Phlebotominae*): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous leishmaniasis in Brazil - Mini-review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102: 149-153, 2007.

46. Cotton JA. The expanding world of human leishmaniasis. *Trends in Parasitology* 20: 1-4, 2017.

45. Cruz AF, Resende RG, Albuquerque DR, Lacerda JCT, Leite CF, Aguiar MCF. Mucosal leishmaniasis in Brazilian patients: two case reports with similar clinical presentation and different approaches. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology and Oral Radiology* 1: 1-23, 2016.

46. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, Veland N, Jara M, Adauí V, Castrillón C, Arévalo J, 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.

47. Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 50: 296-311, 2004.

48. Cupolillo E, Grimaldi JG, Momen H, Beverley SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 73: 145-155, 1995.

49. Dantas-Torres F, Sales KGS, Miranda DEO, Silva FJ, Figueredo LA, Melo FL,

Silva FJ, Brito MEF, Andrade MS, Brandão-Filho SP. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases* 17: 1-14, 2017.

50. Dantas-Torres F, Solano-Galeno L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends in Parasitology* 28: 531-538, 2012.

51. Da Silva LAS, Sousa CS, Graça GC, Porrozzi R, Cupolillo E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 10: 77-83, 2010.

52. De Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *L. braziliensis braziliensis*. 1 Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 28: 253-262, 1986.

53. De Souza V, Veras PST, Welby-Borges M, Silva TMC, Leite BR, Ferraro RB, Meyer-Fernandez JR, Barral A, Costa JML, Freitas LAR. Immune and inflammatory responses to *Leishmania amazonensis* isolated from different clinical forms of human leishmaniasis in CBA mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 23-31, 2011.

54. Erwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199, 1999.

55. Fernandes ACBS, Pedroso RB, Venassi, EAS, Zanzarini PD, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV. American cutaneous leishmaniasis with unusual clinical presentation and response to treatment. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 58: 1-4, 2016.

56. Ferreira CC, Marochio GG, Partata AK. Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana com enfoque na farmacoterapia. *Revista Científica do ITPAC* 5: 1-9, 2012.

57. Ferreira MP, Roselino ANF, Nascimento MMP, Aires JM, Figueiredo JFC.

Sensitivity of an immunoenzymatic test for the detection of anti *L. (V.) braziliensis* antibodies compared to other tests used for the diagnosis of american cutaneous leishmaniasis. *Revista Instituto de Medicina tropical de São Paulo* 48: 215-217, 2006.

58. Figueira LP, Soares FV, Naiff MF, Silva SS, Espir TT, Pinheiro FG, Franco AMR. Distribuição de casos de Leishmaniose Tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 43: 173-181, 2014.

59. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and Immunologic Findings for the Subclinical Form of *Leishmania braziliensis* Infection. *Infectious Diseases Society of American* 34: 54-58, 2002.

58. Garcia L, Kind TA, Bermudez H, Cuentas AL, Doncker S, Arevalo J, Tintaya KWQ, Dujardin JC. Culture-Independent Species Typing of Neotropical *Leishmania* for Clinical Validation of a PCR-Based Assay Targeting Heat Shock Protein 70 Genes. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 2294-2297, 2004.

59. Garcia FCB, Santos SSR, Maria Fernanda Chociay MF, Medeiros ACR, Roselino AMF. Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da espécie de leishmânia em amostras cutaneomucosas. *Anais Brasileiro de Dermatologia* 80: 339-344, 2005.

60. Gollob KJ, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. *Parasite Immunology* 36: 367-376, 2014.

61. Gomes AHS, Martines RB, Kanamura CT, Barbo MLP, Iglesias AD, Lindoso JAL, Pereira-Chiocola VL. American cutaneous leishmaniasis: *In situ* immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunology* 39: 123-134, 2017.

62. Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36: 71-80, 2003.

63. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 8: 419-433, 2010.
64. Graça GC, Volpini AC, Romero GAS, Oliveira-Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, 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: 664-674, 2012.
65. Graziani D, Oliveira VAC, Silva RC. Estudo das características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana no estado de Goiás, Brasil, 2007-2009. *Revista de Patologia Tropical* 42: 417-424, 2013.
66. Grimaldi J. G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. *Clinical Microbiology Reviews* 6: 230-250, 1993.
67. Gualda KP, Marcussi LM, Neitzke-Abreu HC, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Cardoso RF, Silveira TGV. New primers for detection of *Leishmania infantum* using polymerase chain reaction. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57: 377-383, 2015.
68. Guerbouj S, Mkada-Driss I, Guizani I. Molecular Tools for Understanding Eco-Epidemiology, Diversity and Pathogenesis of Leishmania Parasites. *Intech* 4: 61-103, 2015. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/molecular-tools-for-understanding-eco-epidemiology-diversity-and-pathogenesis-of-leishmania-parasite>. Acesso em 17/04/2017.
69. Guimarães LH, Queiroz A, Silva JA, Silva SC, Magalhães V, Lago EL, Machado PR, Bacellar O, Wilson ME, Beverley SM, Carvalho EM, Schriefer A. Atypical manifestations of cutaneous leishmaniasis in a region endemic for *Leishmania braziliensis*: clinical, immunological and parasitological aspects. *Plos Neglected tropical Diseases* 1: 1-14, 2016.

70. Guerra JAO, Maciel MG, Guerra MVF, Talhari AC, Prestes SR, Fernandes MA, Da-Cruz AM, Martins A, Coelho LIARC, Romero GAS, Barbosa MGV. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: What have we learned and what do we need? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical* 48: 12-19, 2015.
71. Guerra JAO, Prestes SR, Silveira H, Coelho LIARC, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MGV, Ferreira LCL. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5: 1-5, 2011.
72. Hamouchi AE, Ejghal R, Hida M, Lemrani M. Intraspecific genetic variability in a population of Moroccan *Leishmania infantum* revealed by PCR-RFLP of kDNA minicircles. *Acta Tropica* 169: 142-149, 2017.
73. Harris E, Kropp G, Belli A, Rodrigues B, Agabian N. Single-Step Multiplex PCR Assay for Characterization of New World *Leishmania* Complexes. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1989-1995, 1998.
74. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. *Tropical medicine and health* 44: 1-9, 2016.
75. Heinzl FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *The Journal of experimental medicine* 169: 59-72, 1989.
76. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Disponível em: <http://portal.inpa.gov.br/portal/index.php/ultimas-noticias/2238-brasil-lidera-casos-de-leishmaniose-tegumentar-na-america-latina-e-amazonas-registra-mais-de-9-mil-casos-nos-ultimos-anos>. Acesso em 20/01/2017.
77. Jara M, Adaui V, Valencia BM, Martinez D, Alba M, Castrillon C, Cruz M,

Cruz I, Auwera GVD, Llanos-Cuentas A, Dujardin JD, Arevalo J. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Leishmania* (*Viannia*) Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study of Parasite Load and Clinical Parameters. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 1826-1833, 2013.

78. Joshi PB, Sacks DL, Govind M, McMaster R. Targeted gene deletion of *Leishmania major*, genes encoding developmental stage-specific leishmanolys in (GP63). *Molecular Microbiology* 27: 519-530, 1998.

79. Kato H, Uezato H, Katakura K, Calpovina M, Marco JD, Barroso PA, Gomes EA, Mimori T, Korenaga M, Iwata H, Nonaka S. Hashiguchi, Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the and an areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 87-93, 2005.

80. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology* 9: 604-615, 2011.

81. Kazemi-Rad E, Mohebbali M, Hajjaran H, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and Characterization of *Leishmania* Species in Giemsa-Stained slides by PCR-RFLP. *Iranian Journal Public of Health* 37: 54-60, 2008.

82. Kermanjani A, Akhlaghi, Oormazdi H, Hadighi R. Isolation and identification of cutaneous leishmaniasis species by PCR–RFLP in Ilam province, the west of Iran. *Journal of Parasitic Diseases* 1: 1-5, 2016.

83. Kleinberg M. What is the current and future status of conventional amphotericin B? *International Journal of Antimicrobial Agents* 27: 12-17, 2006.

84. Lacerda JF, Oliveira CM. Diagnosis and Treatment of Invasive Fungal Infections Focus on Liposomal Amphotericin B. *Clinical Drug Investigation* 33: 5-14, 2013.

85. Lainson R, Shaw JJ. *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the

armadillo, *Dasypus novemcinctus* in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitology Humaine et Comparee* 64: 3-9, 1989.

86. Lainson R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 569-596, 1983.

87. Lessa MM, Lessa HA, castro TWN, Oliveira A, Scherifer A, Machado P, Carvalho EM. Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 73: 843-7, 2007.

88. Lima JTR, Gennari Sm, Soares HS, Minervino AHH, Malheiros AF, Marques FS, Laurenti MD, Machado RZ, Marcili A, Labruna MB, Soares RM. Diagnosis of visceral and cutaneous leishmaniasis in human and canine populations living in Indigenous Reserves in the Brazilian Amazon Region. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50: 61-66, 2017.

89. Lima ACVMR. Estudo da Variabilidade genética de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* Vianna, 1911 de diferentes regiões do Brasil. Belo Horizonte [Tese de doutorado em Ciências – Instituto de Ciências Biológicas/UFGM], 2010.

90. Lyra MR, Pimentel MIF, Madeira MF, Antonio LF, Lyra JPM, Fagundes A, Schubach AO. First report of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* in an urban area of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57: 451-454, 2015.

91. Marlow MA, Boitê MC, Ferreira GEM, Steindel M, Cupolillo E. Multilocus sequences analysis for *Leishmania braziliensis* outbreak investigation. *Plos Neglected Tropical Diseases* 8: 1-11, 2014.

92. Marques FA, Soares RP, Alemida GG, Souza CC, Melo MN, Pinto AS, Quixabeira VB, Pereira LI, Dorta ML, Ribeiro-Dias F, Silveira FT, Silva SM, Gontijo CM, Tafuri WL. Effectiveness of an immunohistochemical protocol for *Leishmania* detection in different clinical forms of American tegumentary leishmaniasis. *Parasitology*

Internatinal 66: 884-888, 2016.

93. Marcoval J, Penín RM. Evolution of cutaneous leishmaniasis in the last 30 years in a tertiary hospital of the European Mediterranean coast. *International Journal of Dermatology* 1: 1-4, 2017.
94. Martins ALGP, Barreto JA, Lauris JRP, Martins ACGP. American tegumentary leishmaniasis: correlations among immunological, histopathological and clinical parameters. *Anais Brasileiro em Dermatologia* 89: 52-58, 2014.
95. Martins GAS, Lima MD. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. *Enciclopédia biosfera* 16: 256-269, 2013.
96. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5249-5255, 2004.
97. Matta NE, Nogueira RS, Franco AMR, Souza IS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Leon LL, Da-Cruz AM. *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* Induces Low Immunologic Responsiveness in Leishmaniasis Patients from an Endemic Area of the Brazilian Amazon Highland. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80: 339-344, 2009.
98. Mateus RP, Carlos RC, Luciana PBM, Fábio MS. Caracterização preliminar do espaçador interno transcrito-1 ITS-1 do DNA ribossômico nas espécies do *Cluster Buzzatii de Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *Ambiência - Revista do Centro de Ciências e Ambientais* 2: 89-96, 2006.
99. Matsumura ESS, Costa RJF, Farias JC, Noguchi SKT, Júnior ASS. Distribuição espacial da leishmaniose tegumentar americana no Brasil. In: Congresso de Educação em Saúde da Amazônia, Pará: Universidade Federal, 2015.
100. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília, DF, 2007.

101. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed. Brasília, DF, 2010.
102. Ministério da Saúde. Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 1ª ed. Brasília, DF, 2017.
103. Mohammadpour I, Motazedian MH, Handjani F, Hatam GR. Lip leishmaniasis: a case series with molecular identification and literature review. *BMC Infectious Diseases* 17: 1-7, 2017.
104. Montalvo AM, Fraga J, Dujardin MJC, Auwera GVD. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmanias* species identification. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases* 31: 1453-1461, 2012.
105. Montenegro JMD. Cutaneous Reaction in Leishmaniasis. *Archives of Dermatology and Syphilis* 13: 184-187, 1926.
106. Moraes SC. Ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana no Município de Barra do Garças, Mato Grosso, Brasil. Belo Horizonte [Tese de Doutorado em Parasitologia – ICB/UFMG], 2015.
107. Morandin N, Descoteaux A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Cellular and infection microbiology* 121: 1-7, 2012.
108. Naiff R, Talhari S, Barrett TV. Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 529-530, 1988.
109. Negrão GN. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. *Revista Recurso* 6: 147-168, 2014.
110. Nogueira MF, Sotto MN, Cucé LC. American tegumentary *Leishmaniasis*: langerhans cells in Montenegro skin test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50: 283-286, 2008.

111. Oliart-Guzmán H, Martins AC, Mantovani SAS, Braña AM, Delfino BM, Pereira TM, Santos AP, Filgueira-Júnior JÁ, Branco FLCC, Campos RG, Oliveira CSM, Muniz PT, Silva-Nunes M. Características epidemiológicas da Leishmaniose Tegumentar Americana na fronteira amazônica: estudo retrospectivo em Assis Brasil, Acre. *Revista de Patologia Tropical* 42: 187-200, 2013.
112. Oliveira LCP, Araújo RR, Alves CR, Mouta-Confort E, López JA, Mendonça-Lima FW. Seroprevalence and risk factors for canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Dias D'Ávila, State of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43: 400-404, 2010.
113. Organização Pan-Americana da Saúde (OPS). Informe Epidemiológico das Américas. Organização Mundial da Saúde, *Informe Leishmanioses* 3: 1-5, 2015.
114. Paulo LFB, Rocha GF, Luisi-JR CM, Rosa RR, Durighett-JR AF. Mucocutaneous leishmaniasis: mucosal manifestations in an endemic country. *International Journal of Infectious Diseases* 17: 1088-1089, 2013.
115. Pedral-Sampaio G, Alves JS, Schrieffer A, Magalhães A, Meyer R, Glesby MJ, Carvalho EM, Carvalho LP. Detection of IgG Anti-*Leishmania* Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis. *Plos One* 11: 1-9, 2016.
116. Pereira-Júnior AM, Teles CBG, Santos APA, Rodrigues MS, Marialva EF, Pessoa FAC, Medeiros JF. Ecological aspects and molecular detection of *Leishmania* DNA Ross (*Kinetoplastida: Trypanosomatidae*) in phlebotomine sandflies (Diptera: *Psychodidae*) in terra firme and várzea environments in the Middle Solimões Region, Amazonas State, Brazil. *Parasites & Vectors* 180: 1-11, 2015.
117. Perez AP, Altube MJ, Schilrreff P, Apezteguia G, Celes FS, Zacchino S, Oliveira CI, Romero, Romero EL, Morilla MJ. Topical amphotericin B in ultradeformable liposomes: formulation, skin penetration study, antifungal and antileishmanial activity in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 117: 1-19, 2016.

118. Piarroux R, Azaiez R, Lossi AM, Reynier P, Muscatelli F, Gambarelli F, Fontes M, Dumon H, Quilici M. Isolation and characterization of a repetitive DNA sequences from *Leishmaniasis* polymerase chain reaction. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 364-369, 1993.
119. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *The Journal of clinical investigation* 91: 1390-1395, 1993.
120. Porfírio-Passos G, Silva PMA, de Almeida SLH, Porfírio LC, Zanini MS. Métodos para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana - Revisão. *Enciclopédia Biosfera* 8: 1232-1248, 2012.
121. Queiroz A, Souza R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PRL, Carvalho EM, Riley LW, Wilsson ME, Schriefer A. Association between na emerging disseminated form of leishmaniasis and *Leishmania (Viannia) braziliensis* strain polymorphisms. *Jornal of Clinical Microbiology* 50: 4028-4034, 2012.
122. Ramirez JR, Agudelo S, Muskus C, Alzate JF, Berberich C, Barker D, Velez D. Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: the Sampling Site within Lesions Influences the Sensitivity of Parasitologic Diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3768-3773, 2000.
123. Ranasinghe S, Wickremasinghe R, Hulangamuwa S, Sirimanna G, Opathella N, Maingon RDC, Chandrasekharan V. Polymerase chain reaction detection of *Leishmania* DNA in skin biopsy samples in Sri Lanka where the causative agent of cutaneous leishmaniasis is *Leishmania donovani*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110: 1017-1023, 2015.
124. Reis LC, Brito MEF, Almeida EL, Felix SM, Medeiros ACR, Silva CJ, Pereira VRA. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41: 439-443, 2008.

125. Reithinger R, Dujardin JC. Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 21-25, 2007.
126. Ribeiro-De-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research* 31: 143-8, 1998.
127. Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Romero GAS, Yadon ZE. Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review update. *Plos One*, 8: 1-14, 2013.
128. Rocha TJM, Santana EPC, Barbosa ACA, Calheiros CML. Aspectos epidemiológicos dos casos humanos confirmados de leishmaniose tegumentar americana no Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Pan-Amazônica Saúde* 6: 49-54, 2015.
129. Rocio C, Amato VS, Camargo RA, Tuon FF, Nicodemo AC. Liposomal formulation of amphotericin B for the treatment of mucosal leishmaniasis in HIV-negative patients. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 108: 176-178, 2014.
130. Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JD, Carme B. Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis To Identify the Main New World *Leishmania* Species and Analyze Their Taxonomic Properties and Polymorphism by Application of the Assay to Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 459-467, 2006.
131. SaldanhaMG, Queiroz A, Machado PRL, Carvalho LP, Scott P, Carvalho-Filho EM, Arruda S. Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96: 645-652, 2017.
132. Sampaio RNR, Gonçalves MC, Leite VA, França BV, Santos G, Carvalho MSL, Tauil PL. Estudo da transmissão da leishmaniose tegumentar americana no Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 686-690, 2009.

133. Satow MM. Padronização e validação de marcadores moleculares para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar. São Paulo [Tese de Doutorado em Ciências – IMTSP/USP], 2016.
134. Satow MM, Yamashiro-Kanashiro EH, Rocha MC, Oyafuso LK, Soler RC, Cotrim PC, Lindoso JAL. Applicability of kDNA-PCR for routine diagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis in a tertiary reference hospital. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 55: 393-399, 2013.
135. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimarães LH, Lago EL, Bacellar O, Glesgy MJ, Carvalho EM. IFN- γ Production to Leishmania Antigen Supplements the Leishmania Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. *Plos Neglected Tropical Diseases* 6: 1-8, 2012.
136. Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W, Jaffe CL. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagnosis Microbiology and Infectious Disease* 47: 349-358, 2003.
137. Schonian G, Kuhls k, Mauricio IL. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. *Institute of Microbiology and Hygiene* 138: 405-425, 2010.
138. Schriefer A, Schriefer ALF, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HÁ, Ribeiro de Jesus A, Riley LE, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* in a region of endemicity for american tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunity* 72: 508-514, 2004.
139. Scott P. The role of Th1 and Th2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 68: 369-372, 1989.
140. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Immunology* 16: 581-592, 2016.

141. Scott P, Scharton T. Interaction between the innate and the acquired immune system following infection of different mouse strains with *Leishmania major*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 730: 84-92, 1994.
142. Shiriam S, Oryan A, Hatam GR, Panahi S, Daneshbod Y. Comparison of Conventional, Molecular, and Immunohistochemical Methods in Diagnosis of Typical and Atypical Cutaneous Leishmaniasis. *Archives of Pathology Laboratory Medicine* 138: 235-240, 2014.
143. Simon S, Nacher M, Carne B, Basurko C, Roger A, Adenis A, Ginouves M, Demar M, Couppie P. Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: revising epidemiology with PCR-RFLP. Simon et al. *Tropical Medicine and Health* 45: 1-7, 2017.
144. Silveira FT, Lainson R, Corbett CEP. Further observations on clinical, histopathological, and immunological features of borderline disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100: 525-534, 2005.
145. Silveira FT, Lainson R, Shaw JJ, Braga RR, Ishikawa EEA, Souza AA. Leishmaniose cutânea na Amazônia: isolamento de *Leishmania (Viannia) Lainsoni* do roedor *Agouti paca* (Rodentia: Dasyproctidae), no estado do Pará, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33: 18-22, 1991.
146. Silveira FT, Lainson R, Castro GCM, Laurenti MD, Corbett CEP. Immunopathogenic Competences of *Leishmania (V.) braziliensis* sand *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 31: 423-431, 2009.
147. Silva ED. Identificação e caracterização molecular das espécies de *Leishmanias* pp. em pacientes com HIV/AIDS em Pernambuco. Recife [Dissertação de Mestrado em Biologia Aplicada a Saúde, LIKA/UFPE], 2015.
148. Silva NS, Muniz VD. Epidemiologia da leishmaniose americana no Estado do

Acre, Amazônia Brasileira. *Caderno de Saúde Pública* 25: 1325-1336, 2009.

149. Silva ES, Gontijo CMF, Melo MN. Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmanias* species. *Trends in Parasitology* 21: 550-552, 2005.

150. SINAM/SVS/MS. Relatório de situação de Goiás 5: 1-39, 2011.

151. Singh OP, Sundar S. Developments in Diagnosis of Visceral *Leishmaniasis* in the Elimination Era. *Journal of Parasitology Research* 1-10, 2015.

152. Skraba CM, Mello TFP, Pedroso RB, Ferreira EC, Demarchi IG, Aristides SMA, Lonardon MVC, Silveira TGV. Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48: 437-444, 2015.

153. Soto J, Arana BA, Toledo L, Rizzo N, Vega JC, Dias A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 38: 1266-1272, 2004.

154. Souza AA, Pinheiro MSB, Silveira FT, Silva FMM, Lainson R, Vasconcelos LS, Barata IR, Silva MGS, Lima JAN, Campos MB, Ishikawa EAY. The *Phlebotominae* fauna of Serra dos Carajás, Pará, Brazil, and its possible implication in the transmission of american tegumentary leishmaniasis. *Revista Pan-Amazônica em Saúde* 1: 45-51, 2010.

155. Souza WJS, Coutinho SG, Marzochi MCA, Toledo LM, Gottlieb MV. Utilização da reação de imunofluorescência indireta no acompanhamento da terapêutica da Leishmaniose tegumentar Americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 77: 247-253, 1982.

156. Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene* 105: 1-6, 2012.

157. Suárez M, Valencia BM, Jara M, Alba M, Boggild AK, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Arevalo J, Aducci V. Quantification of *Leishmania (Viannia) Kinetoplast* DNA in Ulcers of Cutaneous Leishmaniasis Reveals Inter-site and Intersampling Variability in Parasite Load. *Plos Neglected Tropical Diseases* 9: 1-14, 2015.
158. Teles CBG, Medeiros JF, Santos APA, Freitas LAR, Katsuragawa TH, Cantanhêde LM, Ferreira RGM, Camargo LMA. Molecular Characterization of cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of Assis, Acre State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 57: 343-347, 2015.
159. Thakur CP, Singh RK, Hassan SM, Kumar S, Kumar NA. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* 93: 319-323, 1999.
160. Thomaz-Soccol V, Lanotte G, Rioux JA, Pratlong F, Martini-Dumas A, Serres E. Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* 68: 104-106, 1993.
161. Tomasini C, Moneghini L, Barbui AM. Chronic amastigote-negative cutaneous leishmaniasis. A clinical, histopathologic and molecular study of 27 cases with emphasis on atypical and pseudolymphomatous presentations. *Journal of cutaneous Pathology* 44: 530-537, 2017.
162. Turetz ML, Machado PR, KO Ai, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-34, 2002.
163. Utzinger J, Raso G, Brooker S, De Savigny D, Tanner M, Singer BH, Goran EKN. Schistosomiasis and neglected tropical diseases: towards integrated and sustainable control and a word of caution. *Parasitology* 136: 1874-1859, 2009.

164. Verma S, Singh R, Sharma V, Bumb RA, Negi NS, Ramesh V. Development of a rapid loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis and assessment of cure of Leishmania Infection. *Infectious Diseases* 17: 2-9, 2017.
165. Vidigal CP, Marcussi VM, Marcussi LM, Mikcha JMG, Arraes SMAA, Lonardoní MVC, Silveira TGV. Enzyme immunoassay using *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigens for laboratorial diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *ActaTropica* 107: 208-212, 2008.
166. Volpini AC, Marques MJ, Santos L, Machado-Coelho GL, Mayrink W, Romanha AJ. Leishmania identification by PCR of Giemsa-stained lesion imprint slides stored for up to 36 years. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 12: 793-821, 2006.
167. Volpini AC, Passos VMA, Oliveira GC, Romanha AJ. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 90: 31-37, 2004.
168. Weigle K, Dedavalos M, Heredia P, Molineros R, Saravia N, D'Alessandro A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 489-496, 1987.
169. Weirather JL, Jeronimo SMB, Gautam S, Sundar S, Kang M, Kurtz MA, Haque R, Schrieffer A, Talhari S, Carvalho EM, Donelson JE, Wilson ME. Serial Quantitative PCR Assay for Detection, Species Discrimination, and Quantification of *Leishmania* spp. in Human Samples. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 3892-3904, 2011.
170. Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Jauffret Y, Dedet J, Bastien P. The Leishmania Genome Comprises 36 Chromosomes Conserved Across Widely Divergent Human Pathogenic Species. *Nucleic Acids Research* 24: 1688-1694, 1996.
171. Zappa V, Foganholi JN. Importância da Leishmaniose na Saúde Pública. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 17: 1-45, 2011.

172. Zelazny AM, Fedorko DP, Neva FA, Fischer SH. Evaluation of 7SL RNA gene sequences for the identification of *Leishmanias* pp. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72: 415-420, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE LEISHMANIAS INCIDENTES NAS POPULAÇÕES TOCATINENSES

Pesquisador: Miriam Cristina Leandro Dorta

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 35963214.8.0000.5078

Instituição Proponente: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/UFG

Patrocinador Principal: Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 889.111

Data da Relatoria: 19/11/2014

Apresentação do Projeto:

Resposta de pendência

Objetivo da Pesquisa:

Não se aplica

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não se aplica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não se aplica

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências foram devidamente atendidas. Pesquisa aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephufg@yahoo.com.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - GO



Continuação do Parecer: 869.111

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, a Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas/UFG - CEP/HC/UFG, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Após início, o pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEP/HC/UFG, via Plataforma Brasil, relatórios trimestrais/semestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusões e publicações. O CEP/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 466/12 e suas complementares.

Situação: Protocolo aprovado.

GOIANIA, 12 de Novembro de 2014

Assinado por:
JOSE MARIO COELHO MORAES
(Coordenador)

Endereço: 1ª Avenida s/nº - Unidade de Pesquisa Clínica
Bairro: St. Leste Universitário CEP: 74.605-020
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3269-8338 Fax: (62)3269-8426 E-mail: cephufg@yahoo.com.br

Página 02 de 02

ANEXO 2 - Protocolo para preparo dos reagentes do gel de poliacrilamida e soluções complementares

- Solução de EDTA 0,5 M pH 8,0: 9,3 g de EDTA (PM: 372,24), 35 mL de água MilliQ e diluir concomitantemente acertando o pH para 8,0 com NaOH 5 N a uma temperatura em torno de 23°C. Completar o volume com água MilliQ para 50 mL em um tubo falcon.
- TBE 5X: 54 g de tris-base (PM: 121,12), 27,5 g de ácido bórico (PM: 61,83), 300 mL de água MilliQ e homogeneizar até a completa diluição. Acrescentar 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e completar o volume da solução em um balão volumétrico de 1 L com água MilliQ.
- TBE 1X: Diluir 200 mL de TBE 5 X em 800 mL de água MilliQ.
- Acrilamida mix 30%: 29 g de acrilamida 99,9% (PM: 71,08) e 1 g de bis acrilamida (PM: 154,17). Diluir em 100 mL de água deionizada e deixar *overnight* protegido da luz. Armazenar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 4%: 13,35 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 56,65 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 5%: 16,687 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 53,31 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 6%: 20,025 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 49,975 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 7%: 23,36 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 46,63 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 8%: 26,7 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 43,4 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 10%: 33,375 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 36,625 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Sopa primitiva 15%: 50 mL de acrilamida mix 30%, 20 mL de TBE 5X e 30 mL de água MilliQ. Homogeneizar e guardar a 4°C protegido da luz.
- Persulfato de amônio 10%: proporção de 1 g de persulfato de amônia (PM: 228,28) para 10 mL de água destilada. Diluir no momento de uso.
- Tampão da amostra 6X caseiro: 0,25% de xileno cianol (PM: 538,61), 0,25% de azul de bromofenol (PM: 669,96), 30% de glicerol e água MilliQ q.s.p (quantidade suficiente para). Armazenar no *freezer* a -20°C.

- Padrão de peso molecular 50 ou 100bp DNA *Ladder* (50 ug – 1 ug/uL, Invitrogen): proporção de 1 µL de padrão de peso molecular concentrado para 50µL de tampão da amostra caseiro. Armazenar no *freezer* a -20°C.
- TEMED (N,N,N',N-Tetramethylethylenediamine, PM: 116,21): Pronto pra uso.
- Solução fixadora: 15 mL de etanol P.A. (PM: 46,7), 750 µL de ácido acético P.A. (PM: 60,05) e 150 mL de água MilliQ (q.s.p).
- Nitrato de prata (AgNO₃) 0,2%: 0,3 g de nitrato de prata (PM: 169,83) e 150 mL de água MilliQ.
- Solução reveladora: 9 g de hidróxido de sódio (NaOH, PM: 40,0) e 300 mL de água MilliQ. No momento de uso acrescentar 45 mL de solução reveladora a 450 µL de formaldeído (PM: 30,03) e homogeneizar.

