

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS**

Maríel Asbury Marlow

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA NO ESTADO DE SANTA
CATARINA, BRASIL**

Tese de Doutorado submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Doutor em Biotecnologia e Biociências
Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Marlow, Mariel Asbury
Epidemiologia molecular da Leishmaniose Tegumentar
Americana no Estado de Santa Catarina, Brasil / Mariel
Asbury Marlow ; orientador, Mário Steindel -
Florianópolis, SC, 2013.
133 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Leishmaniose . 3.
Doença tropical negligenciada. 4. Doenças infecciosas
emergentes. 5. Santa Catarina. I. Steindel, Mário . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“Epidemiologia molecular da Leishmaniose tegumentar americana no
Estado de Santa Catarina, Brasil,”
POR

Mariel Asbury Marlow

Tese julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e
membros da Comissão Examinadora.

Orientador:

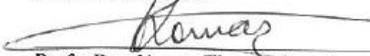


Prof. Dr. Mário Steindel
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:



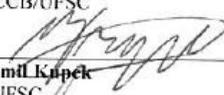
Profa. Dra. Elisa Cupolillo
CLIOC/FIOCRH/RJ



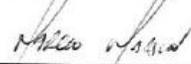
Profa. Dra. Vanete Thomaz Socol
PPG em Processos Biotecnológicos/UFPR



Prof. Dr. Alvaro José Romanha
PPGBTC/CCB/UFSC



Prof. Dr. Emil Kupczak
DSP/CCS/UFSC



Prof. Dr. Marcelo Maraschin – FIT/CCA/UFSC
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biotecnologia/CCB/ UFSC
Florianópolis, Junho de 2013.

Este trabalho é dedicado a todos os professores, colegas e amigos que me inspiraram ao longo do caminho.

AGRADECIMENTOS

Às agências de financiamento CAPES, FAPESC, PPSUS e CNPq, pelo apoio financeiro desse e outros projetos que tive a oportunidade de participar, pela concessão da bolsa REUNI e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e PRPG da UFSC pelos auxílios fornecidos para participações em congressos.

Ao meu orientador Prof. Mário Steindel, por se arriscar com a americana que bateu em sua porta há três anos sem saber uma palavra em português, por ouvir e pensar à frente, pelo suporte profissional e pessoal nos tempos de calma e caos, e, acima de tudo, por sua paciência.

Ao Prof. Emil Kupek, por sempre encontrar tempo para me auxiliar e ajudar a manter meus pés no chão.

Ao Prof. André Báfica, por me encorajar a conduzir minha tese em outro país, pelas piadas e debates, e acima de tudo por sempre estar aberto a novas ideias e possibilidades.

Ao Prof. Alvaro José Romanha, pelo seu carinho e palavras gentis nos dias mais tediosos e por compartilhar sua sábia experiência.

Aos meus colegas estrangeiros Ibeth Cristina Romero Calderón e Jair Alexander Téllez Meneses, por serem meus parceiros nos obstáculos que encontramos e por sempre conseguirem dar aquele conselho para que todos meus pensamentos se alinhassem.

Aos meus amigos e colegas do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, pelo companheirismo, especialmente Ninna e Álvaro, que sempre estavam lá para dar apoio, e Pati, por sua orientação no laboratório.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose de Fiocruz, especialmente Mariana e Profa. Elisa Cupolillo, que tiveram papel fundamental neste trabalho.

To my family, who always supported me and trusted that I would find my way, and to my wonderful friends who, though not here in person, were with me through it all, this document proves those long days, months, and years of missing you all were not in vain.

To Bruno, for being my everything and giving your limitless support, stability and understanding, together we will always have a story to tell, and, of course, to Mia.

*“Prevention is so much better than healing
because it saves the labor of being sick”*

Thomas Adams, 1630.

RESUMO

Embora conhecida como uma doença de alta endemicidade na região Amazônica do Brasil, a presença de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na parte subtropical do Sul do país tem recebido pouca atenção dos órgãos oficiais de saúde pública brasileira. Este estudo foi realizado para demonstrar que a LTA é uma zoonose emergente e endêmica no estado de Santa Catarina. Além de caracterizar o perfil epidemiológico, o presente estudo incorporou métodos moleculares para a identificação das espécies de *Leishmania* e a tipagem das cepas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* do Estado. Para este estudo transversal retrospectivo, foram avaliados os dados de todos os casos de LTA em Santa Catarina notificados ao Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no período entre 2001 e 2009, e o perfil epidemiológico foi comparado entre as duas regiões do Estado. Os resultados mostram que a LTA é recentemente endêmica na região Nordeste do estado de Santa Catarina, com o perfil epidemiológico variado entre as distintas regiões do Estado. A LTA do Estado é predominantemente uma doença de transmissão urbana. A PCR-RFLP de kDNA identificou 98,8% das amostras como sendo *L. (V.) braziliensis* (248/251), e 1,2% somente como sendo *L. (Leishmania) amazonensis*. A análise de sequências multilocus (MLSA) de seis loci gênicos de 33 isolados de Santa Catarina e 53 isolados de onze outros estados brasileiros de *L. (V.) braziliensis*, agrupou as cepas em três principais complexos clonais (CC). A maioria (84,8%, 28/33) das cepas de Santa Catarina pertencem ao CC1, mostrando elevada homogeneidade genética. O mesmo foi observado na análise da estrutura populacional, que identificou três populações com a maioria das cepas de Santa Catarina pertencentes a uma população principal. A MLSA foi capaz de distinguir padrões epidemiológicos entre as cepas, demonstrando o potencial da técnica como ferramenta epidemiológica. Esses dados sugerem que a emergência da LTA causada pela *L. (V.) braziliensis* na população humana em Santa Catarina é um fenômeno recente que requer o desenvolvimento urgente de medidas de controle.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. *Leishmania amazonensis*. Leishmaniose cutânea. Leishmaniose mucocutânea. Doença tropical negligenciada. Doenças infecciosas emergentes.

ABSTRACT

Although known to be highly endemic in the Amazon regions of Brazil, the presence of American tegumentary leishmaniasis (ATL) in the subtropical southern part of the country has received little attention by public health officials. This study was conducted to demonstrate ATL is an emerging zoonosis in the state of Santa Catarina. In addition to characterizing the epidemiological profile, the present study incorporated molecular methods for the identification of *Leishmania* species and evaluation of the genetic variability of isolates from the state. For this retrospective cross-sectional study, data from all cases of ATL in Santa Catarina notified to the Information System for Notifiable Diseases (SINAN) during the period from 2001 to 2009 were evaluated, and the epidemiological profile was compared between the two main geographical regions of the state. Results demonstrated ATL has become endemic recently in northeastern region of the state of Santa Catarina, with the epidemiological profile varying significantly by region of the state. The LTA of the state is predominantly a disease of urban transmission. Species characterization by kDNA PCR-RFLP identified 98.8% of the samples as *L. (V.) braziliensis* (248/251) and only 1.2% as *L. (Leishmania) amazonensis* (3/251). Among the 33 Santa Catarina *L. (V.) braziliensis* isolates and 53 *L. (V.) braziliensis* isolates from eleven other states which were subjected to multilocus sequence analysis (MLSA) of six loci, the strains were found to cluster into three clonal complexes (CC). The majority (84.8%, 28/33) of the Santa Catarina strains belonged to CC1, representing high genetic homogeneity. The same was observed in the analysis of population structure, in which three populations were identified with most of the Santa Catarina strains belonging to one main population. MLSA was able to distinguish epidemiological patterns among the strains, demonstrating the potential of the technique as an epidemiological tool. Data presented here suggests the emergence of LTA caused by *L. (V.) braziliensis* in the human population of Santa Catarina is a recent phenomena that urgently requires the development of control methods.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. *Leishmania amazonensis*. Cutaneous leishmaniasis. Mucocutaneous leishmaniasis. Neglected tropical diseases. Emerging infectious diseases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de transmissão da Leishmaniose	24
Figura 2. Apresentação clínica e histopatologia das diferentes formas clínicas da LTA.	25
Figura 3. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil por ano (1989-2010).	27
Figura 4. Distribuição nacional de LTA no Brasil (2007).	29
Figura 5. As mesorregiões de Santa Catarina agrupadas em duas sub-regiões do nordeste e sudoeste.	44
Figura 6. Fluxo de integração de todos os bancos de dados do Laboratório de Protozoologia e SINAN.	46
Figura 7. Comparação de mapeamentos que demonstram origem dos casos de LTA por município entre os períodos de 2001-2004 e 2005-2009, Santa Catarina.	60
Figura 8. Mapeamento de casos de LTA por zona de residência, Santa Catarina, Brasil (n= 452, 2001-2009).	64
Figura 9. Distribuição sazonal do diagnóstico de LTA dos casos em Santa Catarina, Brasil, por região (n=542, 2001-2009).	65
Figura 10. Comparações bivariadas de probabilidades previstas de um caso ser recidivo, como previsto pelo modelo de regressão logística multivariada.	68
Figura 11. Diagnóstico e identificação molecular por kDNA PCR-RFLP da espécie de <i>Leishmania</i> presente na biópsia dos pacientes representivos de LTA em Santa Catarina.	70
Figura 12. Mapeamento de casos de LTA por espécies de <i>Leishmania</i> identificada a partir de amostra de biópsia do paciente utilizando PCR-RFLP de kDNA, Santa Catarina, Brasil.	71
Figura 13. Caracterização molecular de espécies de <i>Leishmania</i> por PCR-RFLP dos produtos de amplificação da região conservada de hsp70 dos casos da LTA de Santa Catarina, Brasil.	73
Figura 14. Distribuição geográfica dos complexos clonais por estado entre as cepas brasileiros de <i>L. (V.) braziliensis</i>	75
Figura 15. Os resultados (<i>output</i>) do programa STRUCTURE estimando a estrutura populacional das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> dos doze estados brasileiros.	77

Figura 16. Representação geográfica da soma da variação genética total atribuída pelo STRUCTURE das amostras por estado entre as cepas brasileiros de <i>L. (V.) braziliensis</i>	78
Figura 17. Representação geográfica da estrutura populacional demonstrada como número total de amostras por população designada pelo STRUCTURE por estado entre as cepas brasileiros de <i>L. (V.) braziliensis</i>	79
Figura 18. Rede <i>Median-joining</i> com base nas sequências concatenadas dos fragmentos de seis genes para 88 haplótipos de <i>L. (V.) braziliensis</i> , com origem do caso designado para as cepas de Santa Catarina.	84
Figura 19. Rede <i>Median-joining</i> com base nas sequências concatenadas dos fragmentos de seis genes para 88 haplótipos de <i>L. (V.) braziliensis</i> , com forma clínica do caso designado.	85
Figura 20. Rede <i>Median-joining</i> com base nas sequências concatenadas dos fragmentos de seis genes para 34 haplótipos de <i>L. (V.) braziliensis</i> de Santa Catarina, com ano do isolado, cidade da residência e origem do caso designados.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Questões epidemiológicas a serem abordadas por ferramentas de diferenciação das espécies e das cepas de <i>Leishmania</i>	33
Tabela 2. Comparação de ferramentas moleculares epidemiológicas utilizadas para leishmaniose no Mediterrâneo.	36
Tabela 3. Sequências de iniciadores e tamanhos de amplicons de regiões alvos para cada locus estudado para MLSA.....	53
Tabela 4. Comparação de dados demográficos dos casos de LTA entre as regiões Nordeste e Sudoeste de Santa Catarina, 2001-2009.	62
Tabela 5. Comparação das características clínicas dos casos de LTA entre as regiões nordeste e sudoeste de Santa Catarina, 2001-2009.....	63
Tabela 6. A regressão logística multivariada para recidiva de LTA em Santa Catarina, Brasil.	66
Tabela 7. A forma clínica de LTA de pacientes por sua população, atribuído no STRUCTURE das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> do Brasil.	80
Tabela 8. A comparação dos resultados das análises de STRUCTURE e BURST das cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i> do Brasil.	80
Tabela 9. Matriz dos valores de F_{ST} e correspondentes valores de p para as três populações identificadas no STRUCTURE.	81
Tabela 10. Caracterização das três populações encontradas pela análise do STRUCTURE das 86 cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	81
Tabela 11. Número de alelos encontrados a cada locus genético utilizado na MLSA entre as 86 cepas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LTA – Leishmaniose tegumentar americana
LC – Leishmaniose cutânea
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LV – Leishmaniose visceral
SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
NE – Nordeste
SO – Sudoeste
SC – Estado de Santa Catarina
DIVE – Diretoria de Vigilância Epidemiológica
PCR – Reação em cadeia da polimerase (polymerase chain reaction)
RFLP – Polimorfismo de tamanho de fragmentos obtidos por restrição (Restriction fragment length polymorphism)
MLST – Tipagem multi loci por sequenciamento (Multilocus sequence typing)
MLSA – Análise de sequências multilocus (Multilocus sequence analysis)
MJ – *Median-joining*
km² – quilômetro quadrado
µl – microlitro
ml – mililitro
pb – pares de base
mg – miligrama
mM – milimolar
µM – micromolar
U – unidade
SBF – soro bovino fetal
pmol – picomol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	EPIDEMIOLOGIA E CICLO DA TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE NO BRASIL	27
1.2	O APARECIMENTO DA LEISHMANIOSE NO ESTADO DE SANTA CATARINA	31
1.3	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA LEISHMANIOSE	32
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	39
3	OBJETIVO GERAL	41
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	MÉTODOS EPIDEMIOLÓGICOS	43
4.1.1	Área de estudo e coleta de dados	43
4.1.2	Coleta dos dados laboratoriais e integração com dados do SINAN.....	45
4.1.3	Análise estatística.....	48
4.1.4	Mapeamento.....	49
4.2	MÉTODOS MOLECULARES.....	49
4.2.1	Extração de DNA	49
4.2.2	Diagnóstico por kDNA PCR e caracterização molecular de espécies de <i>Leishmania</i> por kDNA PCR-RFLP	50
4.2.3	Cultura de parasitos e o depósito na Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz	51
4.2.4	Caracterização molecular de espécies de <i>Leishmania</i> por hsp70 PCR-RFLP	51
4.2.5	Análise de sequências multilocus (MLSA).....	52
4.2.5.1	Análise de complexos clonais por BURST.....	54
4.2.5.2	Análise da estrutura populacional por STRUCTURE.....	55
4.2.5.3	Rede <i>Median-Joining</i>	57
5	RESULTADOS	59
5.1	A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA É EMERGENTE EM SANTA CATARINA, COM ÁREAS ENDÊMICAS RECENTES NA REGIÃO NORDESTE.....	59
5.2	O PERFIL DE CASOS DE LTA POR CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ENTRE AS REGIÕES NORDESTE E SUDOESTE DO ESTADO	61
5.3	<i>LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS</i> É A ESPÉCIE PREDOMINANTE NO ESTADO DE SANTA CATARINA.....	69
5.4	AS CEPAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> DE SANTA CATARINA SÃO GENETICAMENTE HOMOGÊNEOS EM COMPARAÇÃO COM CEPAS DE OUTROS ESTADOS BRASILEIROS.	74
6	DISCUSSÃO	87

7	CONCLUSÕES	103
	REFERÊNCIAS	105
	APÊNDICE A – Dados dos pacientes das cepas de MLSA	121
	APÊNDICE B – Dados adicionais dos pacientes de Santa Catarina de MLSA	123
	APÊNDICE C – Dados da MLSA	124
	APÊNDICE D – Avaliação de ΔK por CLUMPP.....	129
	ANEXO A – Condições de reação de PCR para loci genéticos de MLSA	133

1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários parasitos (Kinetoplastidae: Trypanosomatidae) pertencentes ao gênero *Leishmania* (ROSS, 1903). O parasito apresenta duas formas evolutivas distintas durante seu ciclo de vida: a promastigota, forma flagelada encontrada no inseto vetor e também forma infectante para o hospedeiro mamífero; e a amastigota, encontrada no interior de células do sistema monocítico fagocitário de mamíferos, a qual é responsável pela doença.

Diferentes espécies de *Leishmania* são transmitidas por fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) que atuam como vetor do parasito. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas de flebotomíneos ingerem formas amastigotas que se transformam em formas promastigotas e se multiplicam por divisão binária no trato digestório do vetor, onde se diferenciam para formas infectantes denominadas promastigotas metacíclicas. Durante o novo repasto sanguíneo, formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas no tecido do hospedeiro e são fagocitadas por macrófagos onde se transformam em formas amastigotas (LAINSON, 2010) (Figura 1).

A forma cutânea da leishmaniose apresenta-se através de lesões únicas ou múltiplas, de aspecto arredondado, indolores e bem delimitadas com uma crosta central sobre a área exposta da pele (GOTO, LINDOSO, 2010). As lesões cutâneas podem regredir espontaneamente (autocura) em alguns casos, deixando uma cicatriz hipopigmentada, lisa e fina (GOTO, LINDOSO, 2010).

L. (V.) braziliensis é a espécie mais comumente incriminada como o parasito responsável pela forma mucocutânea (MARSDEN, 1986; DAVIES et al., 2000; CHAPPUIS et al., 2007; REITHINGER et al., 2007). É caracterizada pela inflamação da mucosa oral e/ou nasal causando lesões desfigurantes e destrutivas (MARSDEN, 1986), embora *L. (V.) guyanensis* (SANTRICH et al., 1990; GUERRA et al., 2011; ZANGGER et al., 2013), *L. (V.) panamensis* (SARAVIA et al., 1985), e *L. (L.) amazonensis* (BARRAL et al., 1991) têm sido identificadas ou suspeitas em alguns casos.

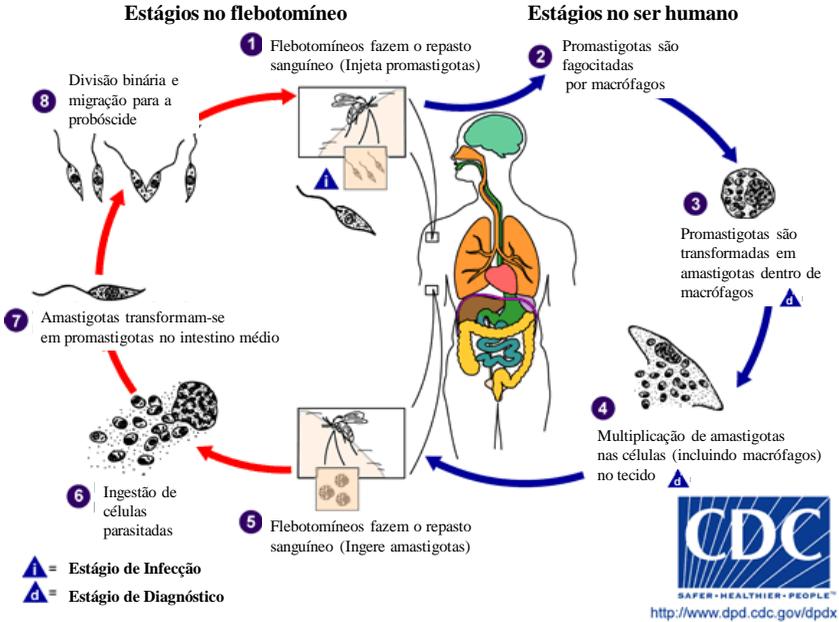


Figura 1. Ciclo de transmissão da leishmaniose. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention. Texto traduzido por autor deste trabalho.

Coletivamente, leishmaniose cutânea e mucocutânea são referidas como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Novo Mundo (GOTO, LINDOSO, 2010). Em casos raros, a LTA pode evoluir para duas formas mais graves da doença, a forma disseminada ou difusa (BARRAL et al., 1995; SILVEIRA et al., 2004). Exemplos das várias intensidades das formas clínicas diferentes da LTA e das espécies de *Leishmania* são apresentados na Figura 2.

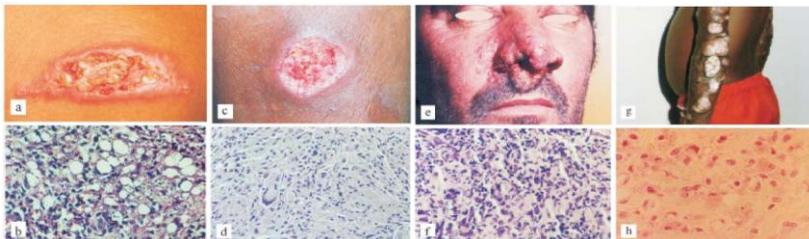


Figura 2. Apresentação clínica e histopatologia das diferentes formas clínicas da LTA. Fonte: SILVEIRA et al., 2004.

a. Lesão ulcerada típica num caso da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), causada por *L. (L.) amazonensis*; b. Seção histológica da mesma lesão; c. Lesão ulcerada típica em um caso de LCL causada por *L. (V.) braziliensis*; d. Seção histológica da mesma lesão; e. Lesão mucosa do nariz e nos tecidos adjacentes num caso de leishmaniose mucocutânea de *L. (V.) braziliensis*; f. Seção histológica da lesão do mesmo paciente; g. Lesões nodulares cutâneas típicas no braço de um paciente com leishmaniose cutânea anérgica difusa, causado por *L. (L.) amazonensis*; h. Seção histológica da lesão do mesmo homem (Linfócitos e plasmócitos x 400).

L. (L.) infantum, sinônima de *L. (L.) chagasi* no Novo Mundo, e *L. (L.) donovani* são as espécies incriminadas como causadoras da leishmaniose visceral (DESJEUX, 2001; CHAPPUIS et al., 2007). Essa forma da doença é a mais grave das formas clínicas, causada por parasitas que migram a partir do local de inoculação para proliferar no fígado, baço e medula óssea, o que resulta em imunossupressão do hospedeiro e pode causar a morte do paciente na ausência de tratamento (CHAPPUIS et al., 2007), sendo a principal causa de mortalidade entre as leishmanioses (DESJEUX, 1996). Assim, o conhecimento sobre as espécies presentes numa área geográfica, bem como a caracterização da(s) espécie(s) infectante(s) na apresentação clínica do paciente são aspectos importantes na determinação do tratamento e acompanhamento dos pacientes pelos médicos.

Outra parte importante do mapa epidemiológico da leishmaniose é a identificação dos reservatórios. Os mamíferos vertebrados silvestres e domésticos incriminados abrangem as ordens Rodentia, Marsupialia, Carnivora, Artiodactyla, Xenarthra e Primates (LAINSON, 2010). Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais, permanecendo controverso se os mesmos podem agir como hospedeiros reservatórios do parasito (ASHFORD, 1996). Os estudos têm sugerido o potencial de portadores assintomáticos de serem reservatórios silenciosos (COSTA et al., 2002; FAKHAR et al., 2008). Um estudo recente de Hide et al.

(2013) mostrou evidências dos diferentes genótipos de *Leishmania* entre pacientes sintomáticos e assintomáticos, porém, mais estudos com maior amostragem e representatividade são necessários antes que a hipótese possa ser concluída.

Uma vez que a questão seja determinada definitivamente, essa característica dos reservatórios humanos terá implicações epidemiológicas importantes. Um reservatório humano significaria novas hipóteses sobre a distribuição geográfica da doença. Isso enfatiza a necessidade de estudos que validem métodos de genotipagem como instrumentos epidemiológicos, a fim de que a epidemiologia molecular passe a ser usada como uma ferramenta para determinar a associação entre as características do hospedeiro e do parasito.

Dados recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que, anualmente, ocorram entre 1,5 a 2 milhões de novos casos da doença: 0,2 a 0,4 milhões casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões casos de LC, com 20.000 a 40.000 mortes decorrentes, majoritariamente, da forma visceral da doença (ALVAR et al., 2012). Esse número pode parecer baixo em relação à mortalidade de outras doenças infecciosas, mas o impacto estimado da leishmaniose como agravo é de 2,4 milhões de anos de vida ajustados pela incapacidade (DALYs) para cada ano (WHO, 2002; DESJEUX, 2004), representando um enorme peso econômico e social.

No entanto, este cálculo de DALYs está desatualizado. A última estimativa ocorreu há mais de 10 anos e as dificuldades em calcular os DALYs para a leishmaniose, causadas pela complexidade da doença, podem ser vistas na ausência do cálculo de DALYs das leishmanioses no relatório mais recente de OMS (BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008; ALVAR et al. 2012).

Apesar da incidência crescente e representar a nona maior carga de doença entre doenças infecciosas individuais (HOTEZ et al., 2004; HOTEZ et al., 2006), as leishmanioses permanecem na categoria das doenças negligenciadas e recebem menor atenção por parte das agências financiadoras, das autoridades de saúde pública e dos profissionais de saúde responsáveis pela implementação de atividades de investigação, prevenção e controle (REITHINGER et al., 2007; ALVAR et al., 2012). Essa falta de atenção por parte da comunidade de saúde pública pode ser influenciada por diversos fatores, dentre eles: complexidade da doença, falta de ferramentas para gestão de casos, falta de informações confiáveis sobre a incidência e escassez de métodos de controle comprovadamente eficazes (ALVAR, YACTAYO, BERN, 2006; BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008). Estratégias globais se concentram

no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e estratégias de tratamento, controle de vetores e prevenção da infecção dos reservatórios (DAVIES et al., 2003).

1.1 EPIDEMIOLOGIA E CICLO DA TRANSMISSÃO DA LEISHMANIOSE NO BRASIL

Atualmente, o Brasil é o país sul-americano com o maior número de casos de LTA. O aumento na incidência da LTA é de cerca de oito vezes em 15 anos, passando de 4.560 casos em 1980 para 35.748 casos em 1995. Essa incidência é sujeita às flutuações na transmissão de cinco em cinco anos, com uma tendência que está aumentando desde a introdução de medidas de controle (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O Brasil figura como um dos dez países que possuem aproximadamente 75% dos casos da LTA, registrando uma média de 26 mil casos por ano, entre os anos de 2003 e 2007, com uma incidência de casos estimada entre 72.800 a 119.600 casos por ano (ALVAR et al., 2012).

De maneira geral, menos de 10% dos casos de LTA no Brasil ocorrem em crianças com idade inferior a 10 anos e os homens representam 74% do total de casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Estes dados podem justificar a menor atenção dada a essa doença em particular, tanto em escala global quanto nacional, como as doenças que afetam as mulheres e crianças (populações que são conhecidas como vulneráveis) tendem a ser priorizadas.

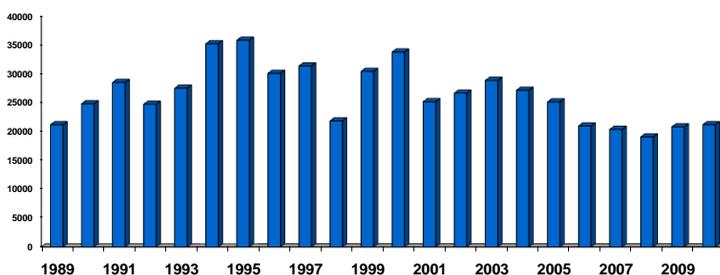


Figura 3. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil por ano (1989-2010). Fonte: ALVAR et al. 2012.

Na década de 1980, casos autóctones de LTA eram relatados em 19 estados do Brasil. Em 2003, todos os 27 estados brasileiros apresentaram transmissão autóctone de LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), demonstrando a expansão geográfica contínua da doença em todo o país. As regiões Norte e Nordeste continuam tendo o maior número de casos e a maior incidência da parasitose (ALVAR, et al. 2012), como demonstrado na Figura 4. A presença da LTA na região Sudeste foi relatada pela primeira vez na década de 1900 em trabalhadores envolvidos na construção da Estrada de Ferro Noroeste do Brasil e na implantação de fazendas e povoações em São Paulo (PESSÔA, MARTINS, 1982).

Além desses locais em São Paulo, nessa época, foram relatados vários surtos em outras partes da região Sudeste, como em Minas Gerais, onde ocorreu um grande surto nos vales dos Rio Doce e Mucuri na construção em andamento da Estrada de Ferro Vitória a Minas na densa floresta (PESSÔA, MARTINS, 1982). Esses surtos fortaleceram a ideia de que a doença ocorria apenas nas proximidades das matas, remanescentes de mata ou em áreas recém-desmatadas, afetando os trabalhadores rurais e os colonos que migraram para áreas colonizadas (FORATTINI, 1973; LAINSON, 1982).

Ao longo da segunda metade do século, em Minas Gerais, a LTA continuou a aumentar em algumas áreas rurais com a ocorrência de surtos agrupados no espaço e no tempo (MACHADO-COELHO et al., 1999). No estado do Rio de Janeiro, foram observados surtos na Ilha Grande (ARAUJO FILHO, 1978) e nos bairros de Jacarepaguá e Campo Grande na cidade de Rio de Janeiro (PESSÔA, MARTINS, 1982).

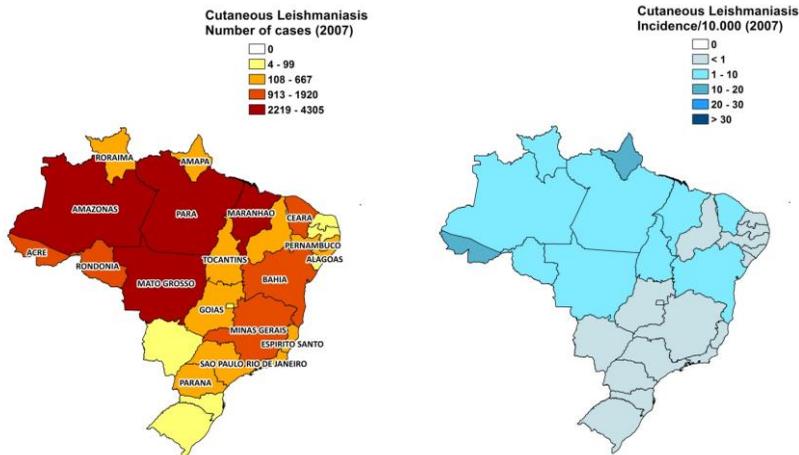


Figura 4. Distribuição nacional de LTA em Brasil (2007). Fonte: ALVAR et al. 2012.

No entanto, começando entre as décadas de 1960 e de 1970, casos de LTA foram registrados em áreas agrícolas assentadas onde a mata havia sido removida. A distribuição de casos foi semelhante em mulheres e homens, bem como em todos os grupos etários, como foi mostrado no estudo feito por Mayrink et al. (1979) em Minas Gerais. Desde então, essa emergência tem sido caracterizada nos habitats peri-urbanos e urbanos por surtos de casos e aumento da competência de *Leishmania* e seus vetores nessas áreas (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; PASSOS, FALCÃO, KATZ, 1990; PASSOS et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2004).

L. (V.) braziliensis tem sido mais frequentemente identificada como uma espécie capaz de se adaptar ao ciclo de transmissão urbano (OLIVEIRA-NETO et al., 1988; PASSOS et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2004). Hoje, as leishmanioses é reconhecida como uma doença rural e urbana, mas a urbanização da doença tem sido apontada como um fator importante para a expansão geográfica, bem como aumento de sua incidência (DESJEUX, 2001; ALVAR et al., 2012).

As leishmanioses estão presentes em uma ampla variedade de nichos ecológicos e podem infectar uma grande variedade de hospedeiros mamíferos e vetores (BAÑULS, HIDE, PRUGNOLLE et al., 2007). O Brasil apresenta um grande número de espécies silvestres e

domésticas que já foram incriminadas como reservatórios naturais do parasito (YOSHIDA et al., 1990; REITHINGER, DAVIES, 1999; DANTAS-TORRES, 2007). Cães, gambás, raposas e até, possivelmente, os gatos são exemplos de animais no Brasil que transitam entre os ambientes doméstico e silvestre e poderiam trazer a doença mais perto de populações humanas (MAIA, CAMPINO, 2011). O cão doméstico é o principal reservatório da LV urbana e acredita-se que, possivelmente, também pode contribuir para o aumento observado na urbanização do ciclo de transmissão da LTA (DANTAS-TORRES, 2007). Métodos de controle de LV no Brasil, principalmente, têm-se centrado na eliminação de cães infectados (ALVAR et al., 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Contudo, a ausência de eficácia comprovada desse método é dada pela sua incapacidade de reduzir a incidência da parasitose, muito provavelmente devido aos atrasos no diagnóstico, amostragem e abate de cães positivos (DAVIES et al., 2003).

Dez espécies de *Leishmania* dos dois subgêneros já foram encontradas causando LTA em humanos do Novo Mundo, sendo a *L. (Viannia) braziliensis*, seguido pela *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* as espécies mais amplamente distribuídas no Brasil (BAÑULS, HIDE, PRUGNOLLE, 2007). A complexidade epidemiológica e clínica da doença dificulta o desenvolvimento de métodos de controle eficazes (ASHFORD, 2000). A ausência de uma vacina (humana e canina) com eficácia aceitável dificulta o controle, e a expansão da LTA e LV pode ser esperada se apenas os métodos de controle atualmente disponíveis continuarem como a única abordagem (ASHFORD, 2000). Além disso, quando LTA emerge em uma área nova, a caracterização de parâmetros epidemiológicos, clínicos e biológicos são necessários, visto que as características da doença em uma dada região geográfica não podem ser assumidas para a região vizinha. A extensão dessa complexidade foi demonstrada num estudo realizado por Falqueto et al. (2003), que mostrou que diferentes genótipos de *L. (V.) braziliensis* foram encontrados em ciclos de transmissão específicos no estado do Espírito Santo (FALQUETO et al., 2003).

1.2 O APARECIMENTO DA LEISHMANIOSE NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Sendo o Brasil o quinto maior país do mundo, seu território abrange diferentes biomas geográficos que vão desde as regiões tropicais amazônicas do Norte, às planícies da região central, até o Sul subtropical, onde são registradas temperaturas negativas em algumas cidades durante os meses de inverno. De maneira geral, a incidência da grande maioria das doenças infecciosas é encontrada nas regiões Norte e Nordeste, onde fatores geográficos, econômicos e sociais favorecem a transmissão (BARRETO et al., 2011). No entanto, apesar das características populacionais e geográficas contrastantes entre a região Sul e o resto do país, a migração humana, animal e, possivelmente, de populações de vetores permitiu que várias dessas doenças como a dengue e a malária, classicamente "tropicais", fossem introduzidas na região Sul a partir de áreas tropicais do Brasil (POCAI et al., 1998; PETERSON, SHAW, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SOUZA et al., 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Já conhecida por emergir em várias regiões do mundo e ser adaptável a novos vetores e hospedeiros (ASHFORD, 2000; VOLF, PECKOVA, 2007), LTA é uma das doenças infecciosas que foi relatada nos estados de Santa Catarina e Rio Grande de Sul do Sul do Brasil, começando durante as últimas décadas (LIMA FILHO, STEINDEL, 1998; RAZERA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2009).

Desde a década de 1980, Santa Catarina tem registrado regularmente casos importados de LTA. As publicações sobre a leishmaniose e vetores de *Leishmania* nos últimos dez anos, especificamente para Santa Catarina, são escassas. O primeiro relato de casos de LTA autóctone no Estado foi na região oeste, nos municípios de Quilombo e Coronel Freitas, e foi publicado em 1990 (SÃO THIAGO, GUIDA, 1990). Nesse estudo, dos 14 casos confirmados, 11 foram considerados autóctones. Em 1998, Lima Filho e Steindel relataram que de 26 casos da LTA diagnosticados em Santa Catarina no período entre 1994 e 1997, 23 (88%) eram importados e 3 (12%) eram autóctones. Nesse estudo, os autores mostraram que, dos 23 casos importados, 52,1% eram provenientes da região Centro-Oeste (Mato Grosso), 21,7% da região Norte, 8,6% da região Sudeste e 17,6% do Paraguai (LIMA FILHO, STEINDEL, 1998). Dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) mostram que a LTA autóctone ocorre em 24 municípios das regiões oeste, nordeste e Vale do

Itajaí (SINAN, 2011). A partir de 2007 a LTA vem sendo registrada em Florianópolis.

Em 2010, um surto da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) foi reportado envolvendo 29 cães de seis distritos da cidade (STEINDEL et al., 2013). A ocorrência desse surto atraiu o interesse da mídia, chamando a atenção do público como um todo para a atual situação da leishmaniose em Florianópolis e no estado de Santa Catarina.

As três publicações principais, além da vigilância da doença, relatam a identificação de espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* como agentes etiológicos da LTA em Santa Catarina (GRISARD et al., 2000). Estudos iniciais sobre a fauna flebotomínica mostraram a presença de *Nyssomia. neivai*, *Lu. fischeri*, e *Lu. ayrozai* no município de Piçarras como potenciais vetores (MARCONDES et al., 2005). Posteriormente, a infecção natural de *Ny. neivai* por *L. (V.) braziliensis* foi comprovada no mesmo município (MARCONDES et al., 2009). Dado que a *L. (V.) braziliensis* tem sido a espécie mais frequentemente relatada na área, cepas isoladas de pacientes foram submetidas a estudos de genotipagem para avaliação da variabilidade genética do parasito.

1.3 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DA LEISHMANIOSE

Além dos métodos epidemiológicos tradicionais, a aplicação de métodos moleculares na pesquisa epidemiológica pode aumentar consideravelmente a eficácia, a abrangência e o entendimento dos resultados da pesquisa. Estudos epidemiológicos estão progressivamente utilizando métodos moleculares para a investigação das leishmanioses (SCHÖNIAN et al., 2008). A epidemiologia molecular pode contribuir para a identificação das espécies, especialmente na investigação de surtos, estudos de prevalência e identificação da estrutura populacional, padrões de migração e dispersão do parasito e dos vetores. Além disso, os métodos moleculares possibilitam o rastreamento e o conhecimento sobre a origem de novos genótipos, a investigação de marcadores genéticos de suscetibilidade ou resistência para o hospedeiro humano e ao tratamento medicamentoso, a identificação da fonte de *Leishmania* (hospedeiros naturais), e determinação da existência de fluxo gênico entre as populações provocada pelas migrações do reservatório humano ou não-humano (SCHÖNIAN et al., 2008; SCHÖNIAN, KUHL, MAURICIO, 2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Questões epidemiológicas a serem abordadas por ferramentas de diferenciação das espécies e das cepas de *Leishmania*.

	PCR RFLP (kDNA, hsp70, gp63)*		
	MLEE	MLST	MLMT
Tipagem da espécie			
<i>Identificação de espécies simpátricas e importadas</i>	X	(X)	X
<i>Identificação das espécies associadas com a falha ao tratamento</i>	X	(X)	X
<i>Identificação de novos hospedeiros reservatórios não humanos</i>	X	X	X
<i>Incriminação de novos vetores</i>	X	X	X
<i>Detecção de novas combinações parasita-inseto-vetor</i>	X	X	X
<i>Detecção de híbridos</i>	X		
Tipagem da cepa			
<i>Comparação de cepas isoladas de hospedeiros diferentes</i>	X		X
<i>Diferenciação de ciclos de transmissão zoonótico vs antroponótico</i>	X		X
<i>Identificação de novos genótipos de hospedeiros e vetores</i>	X		X
<i>Identificação das origens de novos genótipos</i>	X		X
<i>Busca de genótipos relacionados com a resistência à droga</i>			X
<i>Diferenciação entre casos de reinfecção ou recidivas</i>			X
<i>Detecção de epidemias</i>	X		X
<i>Identificação das fontes de Leishmania</i>	X		X
<i>Estudo da estrutura populacional em espécies de Leishmania</i>			X
<i>Estudo de fluxo gênico entre as populações e para os híbridos</i>	X	X	X

Fonte: SCHÖNIAN, KUHL, MAURICIO, 2011 et al., 2011. (X)= aplicação limitada. *Texto atualizado pelo autor deste trabalho (técnicas de PCR RFLP foram agrupadas). Texto traduzido por autor deste trabalho.

Assim, a seleção de técnicas moleculares depende da questão epidemiológica de interesse. Para o diagnóstico da LTA, os laboratórios utilizam a identificação direta do parasito microscopicamente pelo esfregaço corado por Giemsa de biópsia das lesões ou linfonodo ou pela cultura. Entretanto, esses métodos são incapazes de definitivamente diferenciar as espécies (exceto pelos pesquisadores extensivamente treinados e experientes) e têm baixa sensibilidade (GOTO, LINDOSO, 2010). Por isso, muitos laboratórios passaram a usar métodos de PCR para o diagnóstico de casos, quando possível.

Várias regiões genômicas, como os genes de rRNA, os minicírculos de DNA do cinetoplasto (k-DNA) ou os genes do mini-exon, e outras sequências repetidas e polimórficas que apresentam maior discriminação, como gp63, hsp70, e cisteíno-proteinases têm sido investigadas para identificação de *Leishmania* via PCR. A técnica de análise de polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP) do produto amplificado tem sido incorporada destes métodos para a diferenciação das espécies (VAN EYS et al., 1992; MARFURT et al., 2003; VICTOIR et al., 2003; VOLPINI et al., 2004; REITHINGER, DUJARDIN, 2007; DA SILVA et al., 2010). No entanto, apesar da gama dos métodos de PCR para a caracterização de espécies, a técnica bioquímica de eletroforese de isoenzimas (MLEE), estabelecida para *Leishmania* na década 1970 (EBERT, 1973; EBERT, 1974; GARDNER, CHANCE, PETERS, 1974; CHANCE, GARDNER, PETERS, 1977), continua sendo o padrão-ouro para a caracterização de espécies de *Leishmania* tanto do Novo Mundo como do Velho Mundo (BAÑULS, HIDE, PRUGNOLLE, 2007; REITHINGER, DUJARDIN, 2007; SCHÖNIAN, MAURICIO, CUPOLILLO, 2010).

A MLEE é uma técnica dispendiosa, demorada e requer o isolamento e a cultura de parasitas, o que nem sempre é possível em todos os laboratórios. Apesar de a MLEE ter capacidade de distinguir os polimorfismos entre as espécies (RICHARDSON, BAVERSTOCK, ADAMS, 1986; CUPOLILLO, MOMEN, GRIMALDI, 1998), não tem poder discriminatório adequado para estudos de genotipagem mais aprofundados da fenologia e das cepas estreitamente relacionadas (por exemplo, os da mesma região) (SCHÖNIAN, KUHL, MAURICIO, 2011). Assim, a técnica da tipagem de multiloci por sequenciamento (MLST) ou análise de sequências multilocus (MLSA), que geralmente envolve o sequenciamento dos genes do painel de isoenzimas utilizadas na MLEE, está rapidamente se tornando o novo padrão-ouro na identificação de *Leishmania* (SCHÖNIAN, KUHL, MAURICIO, 2011). Contudo, essa metodologia requer que os laboratórios tenham a

capacidade de realizar o sequenciamento, que ainda não é uma tecnologia disponível em muitos laboratórios, principalmente no Novo Mundo.

A maioria dos estudos de epidemiologia molecular sobre a leishmaniose utiliza a técnica de PCR-RFLP devido a sua simplicidade e aplicação às amostras clínicas (SCHÖNIAN et al., 2008). No entanto, essa metodologia não permite a diferenciação ao nível populacional ou subpopulacional dentro das espécies (Tabela 2), restringindo os estudos em suas questões epidemiológicas.

No entanto, apesar dessa amplitude de técnicas e suas potenciais aplicações demonstradas nas Tabelas 1 e 2, não existe nenhum consenso da comunidade científica sobre qual é a técnica mais adequada para estudar as populações genéticas de *Leishmania* atualmente (SCHÖNIAN, KUHLS, MAURICIO, 2011). Ademais, não existe qualquer seleção definitiva dos iniciadores ou de loci gênicos mais adequados para estudos de diferenciação intra e interespecíficos, particularmente no caso de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo.

Outro aspecto do gênero *Leishmania* é a reprodução do parasito. Embora considerada principalmente clonal, evidências recentes sugerem que a recombinação pode ocorrer com mais frequência do que foi anteriormente observado (ROUGERON et al., 2010; BOITÉ et al., 2012).

Os métodos moleculares propostos, como a MLST e a tipagem por sequenciamento de microssatélites (MLMT), foram adaptados a partir do estudo de populações bacterianas (MAIDEN et al., 1998). Considerando que os parasitos do gênero *Leishmania* podem possuir um genoma diplóide (ou aneuploide), a análise de populações torna-se consideravelmente mais complexa e demorada. Assim, a escolha de métodos moleculares para este estudo foram baseados nos critérios de avaliação de técnicas de tipagem de cepas para estudos de epidemiologia molecular estabelecidos por Maslow et al. (1993), os quais incluem a tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório, exequibilidade e facilidade de interpretação dos resultados (MASLOW, MULLIGAN, ARBEIT, 1993). Com base na capacidade dos métodos disponíveis atualmente mostrados na Tabela 2 (SCHÖNIAN et al., 2008), a MLSA foi escolhida como ferramenta molecular para a caracterização das cepas de *L. (V.) braziliensis* de Santa Catarina e para comparação com outras cepas da mesma espécie de diferentes regiões geográficas do Brasil, dado sua reprodutibilidade, poder discriminatório e confiabilidade.

Tabela 2. Comparação de ferramentas moleculares epidemiológicas utilizadas para leishmaniose no Mediterrâneo.

Alvo	Isoenzimas	Impressão digital	kDNA	hsp70*/cpB/gp63	ITS1	Genes constitutivos	Micro-satélites
Método	MLEE	DNA-FP RAPD	PCR-RFLP	PCR-RFLP	Sequenciamento	MLST/MLSA* Sequenciamento	MLMT fragment analysis
Resolução							
<i>Espécie</i>	X	X	-	X	X	X	-
<i>Clado</i>	X	X	-	X	X	X	X
<i>Cepa</i>	-	(X)	X	(X)	(X)	-	X
Tipo de amostra	Cultura	Cultura	Amostra clínica	Amostra clínica	Amostra clínica	[Amostra clínica]*	[Amostra clínica]*
Reprodutibilidade	Boa	Inferior	Inferior	Boa	Boa	Boa	Boa
Comparação interlaboratorial	Possível se mesma metodologia	Difícil	Difícil	X	X	X	X
Co-dominância	X	-	-	-	-	X	X
Neutralidade	X/-	X	Não determinado	-	Não determinado	X/-	X
Simplicidade	-	X	X	X	-	-	-
Alto rendimento	-	-	-	-	X	X	X

Fonte: SCHÖNIAN et al., 2008. *Texto atualizado pelo autor deste trabalho. [] aplicação limitada.

Texto traduzido por autor deste trabalho.

Especificamente para as espécies de *Leishmania*, dez genes alvos do complexo de *L. (L.) donovani*; aspartate aminotransferase (ASAT), glucose-6-phosphate isomerase (GPI), nucleoside hydrolase 1 (NH1), nucleoside hydrolase 2 (NH2) e 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) desenvolvido por Mauricio et al. (2006); e isocitrate dehydrogenase (ICD), cytosolic malic enzyme (ME), mannose phosphate isomerase (MPI), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) e fumarate hydratase (FH) desenvolvido por Zemanova et al. (2007) têm sido sequenciados.

Além disso, as regiões que codificam para quatro marcadores enzimáticos metabólicos do painel MLEE (MPI, GPI, malate dehydrogenase (MDH) e 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD)) foram avaliados para sete espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, incluindo *L. (V.) braziliensis* (TSUKAYAMA, LUCAS, BACON, 2009). Recentemente, quatro marcadores (6PGD, MPI, ICD e glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) têm sido propostos para as espécies de *Leishmania (Viannia)* (BOITE et al. 2012). Entretanto, esses estudos têm-se centrado na taxonomia, filogenia, e o desenvolvimento de um método superior para a diferenciação das espécies. A MLSA não tem sido utilizada frequentemente como uma ferramenta epidemiológica para a identificação de subpopulações ou a diferenciação das cepas dentro de uma espécie de *Leishmania*. Os estudos desse tipo tipicamente usam MLMT, que tem o mais elevado poder discriminatório. No entanto, esse poder discriminatório muito elevado resulta em uma análise extensa e complexa, especialmente quando uma grande amostragem é avaliada. Todavia, nem MLSA, nem MLMT têm sido calibrados como ferramentas epidemiológicas para *L. (V.) braziliensis* e, portanto, o presente estudo tem como um objetivo adicional avaliar a aplicabilidade do MLSA como uma ferramenta molecular para os estudos epidemiológicos de *L. (V.) braziliensis* no Brasil, além de avaliar o poder discriminatório do MLSA para diferenciar cepas de *L. (V.) braziliensis*.

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Devido à dificuldade de controle da leishmaniose com as intervenções em curso, um aumento no número de casos, ou, pelo menos, a continuação dos surtos da doença, pode ser esperado nos próximos anos na região. Dentre os fatores que podem contribuir para o aumento dos casos são as mudanças climáticas e a imigração de hospedeiros (PETERSON, SHAW, 2003; THOMAZ-SOCCOL et al., 2009). Esses casos causarão um grande peso econômico e social para o Estado, como já faz para o resto do país. No entanto, apesar de registros contínuos de casos de LTA autóctones no Estado de Santa Catarina no SINAN, nenhuma investigação tinha sido anteriormente conduzida para determinar se LTA surgiu ou tornou-se endêmica na região. Além disso, não foram determinados o perfil epidemiológico atual, os fatores de risco, a prevalência das espécies e a distribuição geográfica de espécies e casos. Sem o estabelecimento de parâmetros epidemiológicos e caracterização de espécies, a doença continuará negligenciada, permanecendo sem intervenção e deixando mais vulneráveis à emergência contínua e surtos no Estado, a vizinha Argentina e outros estados do Sul do Brasil.

O presente estudo demonstra que LTA é uma doença emergente e endêmica no Estado de Santa Catarina. A caracterização do perfil epidemiológico da doença e das espécies de parasitos envolvidas são pontos-chave para propor estratégias de controle.

A caracterização das espécies é a primeira peça do quebra-cabeça no estabelecimento do conhecimento sobre o complexo ciclo de transmissão na região, bem como um fator importante para o diagnóstico e tratamento. Além disso, como não foi estabelecido nenhum conjunto definido de loci para a investigação epidemiológica dos agrupamentos genéticos de *L. (V.) braziliensis*, este estudo também ajuda determinar a viabilidade dos seis loci escolhidos para a técnica da tipagem de multi loci por sequenciamento como uma ferramenta epidemiológica para estudar *Leishmania* no Brasil.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar as características epidemiológicas e moleculares da Leishmaniose Tegumentar Americana de casos relatados no estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 2001 até 2009.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Produzir um perfil epidemiológico retrospectivo da LTA no Estado de Santa Catarina e analisar a relação de fatores demográficos e clínicos dos casos entre as duas regiões geográficas (Nordeste e Sudoeste) do Estado;
- II. Determinar os fatores de risco específicos para recidivas de LTA neste Estado;
- III. Identificar e caracterizar as espécies de *Leishmania* presentes no estado de Santa Catarina;
- IV. Estudar a variabilidade genética e os possíveis agrupamentos genéticos de *L. (V.) braziliensis* em Santa Catarina;
- V. Avaliar a capacidade dos seis locos gênicos de MLSA para distinguir características epidemiológicas entre as populações de *L. (V.) braziliensis* de Santa Catarina e de outros estados brasileiros;
- VI. Criar mapas espaciais da distribuição de casos de LTA, das espécies de *Leishmania* e agrupamentos genéticos de *L.(V.) braziliensis* para a visualização de tendências geográficas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MÉTODOS EPIDEMIOLÓGICOS

4.1.1 Área de estudo e coleta de dados

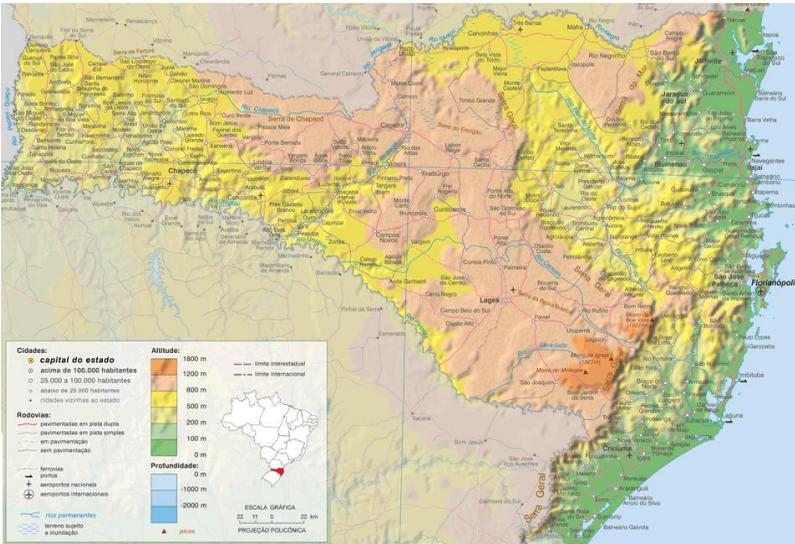
Os dados utilizados para este estudo transversal retrospectivo foram restritos aos casos notificados no estado de Santa Catarina, Brasil.

O território político do estado de Santa Catarina abrange uma área total de 95.703,49 km². Durante o período do estudo, o Estado manteve uma população média de 5.763.329 habitantes (IBGE, Estados: Santa Catarina, 2010). Geograficamente, Santa Catarina faz limites com os estados do Paraná ao norte, Rio Grande do Sul ao sul, a oeste faz fronteira com a Argentina e a leste com o Oceano Atlântico. O clima predominante é subtropical com temperatura média variando de 8,5°C no inverno, com a possibilidade de neve nas regiões mais altas, a 28,7°C no verão (IBGE, 2012). A região da costa leste é separada da região oeste pela Serra do Mar, criando seis mesorregiões com diferentes características geográficas. Para este estudo, as mesorregiões foram agrupadas em duas regiões, com base em semelhanças geográficas, bioma, bacia e tipo de migração da população (Figura 5).

A região Nordeste (NE) inclui as mesorregiões da Grande Florianópolis, Norte Catarinense e Vale do Itajaí localizadas a leste da Serra do Mar na costa atlântica, apresenta cobertura vegetal de Mata Atlântica e é abastecida hidricamente pela Bacia do Atlântico Sul. Estas regiões possuem a maior densidade demográfica e urbanização. Devido aos numerosos destinos turísticos, possuem elevada migração interna e externa.

A região Sudoeste (SO) abrange as regiões da Oeste Catarinense, Serrana e Sul Catarinense contem ou são a oeste da Serra Geral e/ou Serra do Mar e a vegetação inclui Mata Tropical e Mata Araucária, é abastecida pela Bacia do Rio Uruguai, e tem, principalmente, migração externa de outros estados brasileiros para fins de trabalho rural.

(A)



(B)



Figura 5. Geografia (A) e as mesorregiões (B) de Santa Catarina agrupadas em duas sub-regiões do Nordeste e Sudoeste. Fonte: Primeiro mapa- <http://www.infoescola.com>; segundo mapa- autor.

Os dados dos pacientes da LTA foram coletados a partir do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Todos os casos suspeitos de LTA por indicação clínica foram confirmados por métodos parasitológicos (esfregaço corado por Giemsa e/ou PCR). Apenas os casos positivos em pelo menos um método parasitológico foram considerados como casos confirmados e foram notificados ao SINAN para acompanhamento.

A notificação de casos iniciou com a coleta de informações do paciente em entrevista realizada por um profissional de saúde durante a avaliação nos centros de saúde. Em seguida, os dados de casos confirmados foram digitados no banco de dados do SINAN pela Secretaria de Vigilância Epidemiológica dos municípios. Durante a entrevista, os pacientes foram questionados sobre viagens anteriores para fora do Estado nos dois anos anteriores à apresentação da doença, a fim de determinar se o caso foi importado ou resultou de transmissão autóctone no Estado. Uma vez transcrito eletronicamente, os dados foram enviados para a Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Estadual de Saúde de Santa Catarina (DIVE), onde os relatórios, caso a caso, foram revisados para a consistência e completude das informações por funcionários do Estado especializados em doenças transmitidas por vetores. Através da avaliação da história do paciente, um caso seria considerado um caso recidiva se tivesse sido previamente diagnosticado e tratado para LTA antes ou dentro do período de estudo, sendo classificado como curado com base em remissão dos sintomas da doença e depois apresentando novamente sintomas da doença e esfregaço, cultura e/ou PCR positivo.

Para o presente estudo, foram investigados os dados de todos os casos de LTA de Santa Catarina registrados no SINAN no período de 1^o de janeiro de 2001 a 31 de dezembro de 2009. Procedimentos adequados de confidencialidade foram observados para proteger a confidencialidade das informações do paciente. O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (003/07/CPSH) no dia 6 de março de 2007.

4.1.2 Coleta dos dados laboratoriais e integração com dados do SINAN

Todos os bancos de dados disponíveis no Laboratório de Protozoologia da UFSC (Laboratório de Referência Estadual para o diagnóstico de Leishmanioses) e do SINAN foram combinados utilizando a técnica de *merge*, ou seja, a integração de bancos de dados

por um campo chave para criar um banco de dados completo com os dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes (Figura 6).

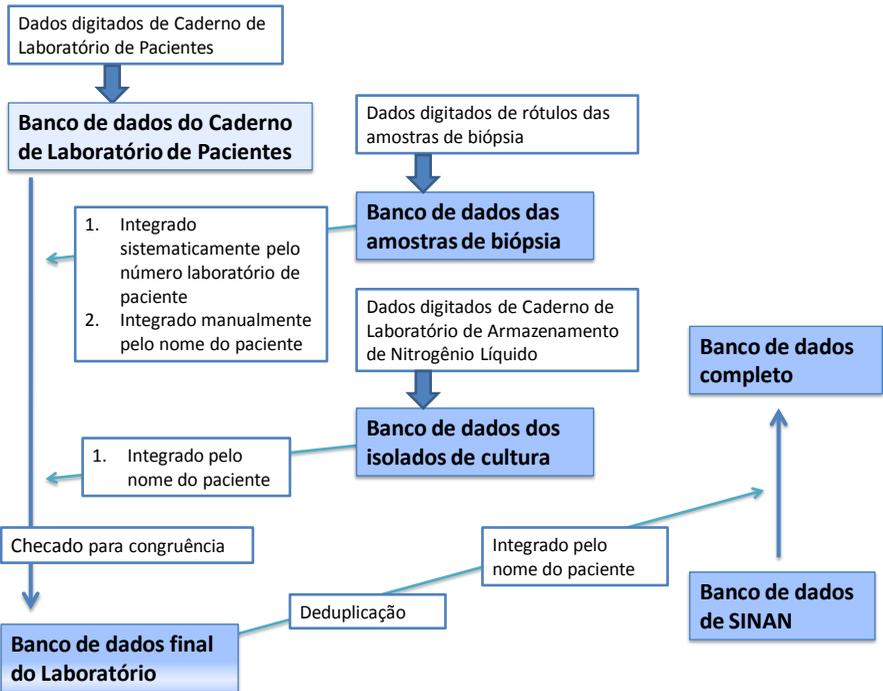


Figura 6. Fluxo de integração de todos os bancos de dados do Laboratório de Protozoologia e SINAN. Fonte: autor.

O banco de dados principal foi programado em Microsoft Access contendo todos os campos possíveis de variáveis incluídos no Caderno de Pacientes de Leishmaniose do Laboratório de Protozoologia. Os dados do Caderno foram digitados no banco de dados de Access e, após a conclusão da entrada de dados, 10% dos dados escolhidos aleatoriamente foram checados para medir a quantidade de erros de digitalização. Uma taxa de 3% de erros (os dados digitados incorretamente no banco de dados) foi definida como o limite aceitável de erro. Se a taxa de erros superaria o limite de 3%, todos os dados seriam digitados novamente. As variáveis registradas no Caderno não foram consistentes para todos os pacientes com dados faltantes e variou de uma a todas as seguintes variáveis: número de laboratório do paciente

(atribuído pelo Laboratório de Protozoologia no Caderno); data da coleta; nome do paciente, data da PCR; resultado da PCR; data da PCR da camada leucócitos (*buffy coat*); resultado de PCR da camada leucócitos (*buffy coat*); data da cultura; resultado da cultura; data da RIFI; resultado da RIFI; RIFI IgG; RIFI IgM; IRM (positivo, negativo); tamanho de IRM (mm); exame parasitológico; *imprinting*. A única variável registrada para todas as amostras de pacientes foi o número do paciente atribuído pelo Laboratório (não relacionado com o número da identificação do SINAN ou da identificação clínica do paciente).

O segundo banco de dados das amostras de biópsia foi criado a partir de dados escritos nos rótulos de amostras armazenadas no Laboratório de Protozoologia. As amostras foram armazenadas a -20°C após o diagnóstico inicial pela PCR e os conteúdos de rotulagem (dados escritos nos tubos) das amostras variaram devido à mudança do pesquisador responsável pelo diagnóstico. Assim, os rótulos das amostras tinham de uma até três variáveis escritas neles: nome do paciente, número do paciente (atribuído pelo Laboratório de Protozoologia no Caderno) e data de armazenamento. As amostras foram removidas do freezer -20°C , em grupos de 15-20 amostras de cada vez, os dados contidos nas etiquetas individuais foram registrados, e as amostras devolvidas ao freezer em menos de 10 minutos.

O terceiro banco de dados dos isolados de cultura de pacientes foi criado a partir dos dados contidos no Caderno de Amostras de *Leishmania* Armazenadas em Nitrogênio Líquido. Essas amostras foram identificadas apenas com o nome do paciente.

Todos os três bancos de dados completos, (Caderno de Pacientes do Laboratório, dados das amostras de biópsia e dados dos isolados de cultura de pacientes), foram integrados sequencialmente pelos campos-chave de número laboratório do paciente e nome do paciente, utilizando o banco de dados do Caderno de Laboratório de Pacientes como o banco de dados principal usando comandos *proc sort* seguido por *proc merge* no programa de software SAS (versão 9.1.3, SAS Institute, Cary NC, EUA).

Inicialmente, o banco de dados das amostras de biópsia foi integrado com o banco de dados do Caderno de Pacientes do Laboratório por campo-chave do número laboratório do paciente. Amostras de biópsia que não foram integradas com sucesso utilizando o campo-chave do número laboratório de paciente ou que não possuíam o número laboratório de paciente escrito na amostra foram manualmente integradas pelo campo-chave do nome do paciente, sendo confirmadas pela data da amostra. As amostras com o nome do paciente e/ou data

disconcordantes nos dois bancos não foram integradas e foram deixadas como amostras separadas no banco de dados, como dados incompletos.

Após isso, o banco de dados foi escaneado manualmente para verificar se amostras integradas pelo campo-chave do número do paciente correspondiam aos nomes de pacientes em ambos os bancos de dados. As amostras com nome de pacientes disconcordantes foram avaliadas e inconsistências foram corrigidas/removidas do banco de dados. Em seguida, o banco de dados de isolados de cultura foi integrado com o banco de dados do Caderno de Pacientes do Laboratório/das amostras de biópsia, da mesma forma como o banco de dados das amostras de biópsia foi incorporado, mas utilizando o nome do paciente como campo-chave em vez do número laboratório de paciente. O banco de dados final do Laboratório foi ordenado por nome do paciente e checado para verificar a inexistência de duplicatas e/ou dados de pacientes com recidivas e, portanto, com registros múltiplos.

Por fim, o banco de dados do Laboratório foi integrado com o banco de dados do SINAN pelo campo-chave do nome do paciente, usando a programa SAS como descrito acima. Os dados laboratoriais que não corresponderam foram manualmente integrados.

4.1.3 Análise estatística

As estatísticas descritivas foram produzidas para todos os casos. Testes de qui-quadrado ou testes exatos de Fisher (quando a frequência prevista foi menor que 5) foram usados para determinar as associações significativas entre as regiões Nordeste e Sudoeste e características demográficas e clínicas dos casos. A análise de regressão logística bivariada prevendo a probabilidade de um caso ser recidiva foi realizada para cada um dos fatores de risco potenciais analisados: pertencer ao sexo masculino, viver em zona rural, ter 50 ou mais anos de idade, forma clínica mucocutânea, e casos importados de outros estados brasileiros. Fatores encontrados como significantes na análise bivariada foram incluídos na análise de regressão logística multivariada. O teste de *goodness-of-fit* (GOF) de Hosmer-Lemeshow foi usado para avaliar a qualidade do modelo de regressão logística.

Para calcular as probabilidades previstas, novos registros teóricos com cada possibilidade de valores pré-determinados (0,1) para cada combinação dos valores de variáveis significativas foram inseridos no banco de dados original, e, em seguida, o modelo foi reexecutado. Uma variável nova de probabilidade prevista foi criada usando o comando *predict* na declaração de *proc logistic*.

Os dados foram analisados usando o software de SAS (versão 9.1.3, SAS Institute, Cary NC, EUA). Odds ratios não ajustados, Odds ratios ajustados, intervalos de confiança de 95%, e valores de p são reportados.

4.1.4 Mapeamento

Todas as localizações dos casos de LTA foram georreferenciados em lotes (batch) por endereço (quando disponível), utilizando o Geocoder de GPS Visualizer's Address Locator que converte os endereços para coordenadas geográficas (latitude, longitude) através do Google Maps (disponível no site www.gpsvisualizer.com/geocoder/), e o nível de precisão de geocodificação (endereço, rua, cidade, estado ou país) para cada caso foi registrado. Apenas os casos que puderam ser mapeados no nível da cidade ou inferior (endereço, rua) foram utilizados para a análise geográfica. Arquivos básicos de formato de *shape* (.shp) do território brasileiro foram obtidos a partir dos arquivos de acesso aberto fornecidos no site da Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (www.ibge.gov.br). Os dados dos casos foram importados no software geográfica ArcGIS 10 (ESRI, Redlands, CA, USA).

Os casos foram mapeados através da criação de pontos x, y com base nas posições geocodificados (lat/long) que foram correlacionados com os dados clínicos/epidemiológicos de cada caso individual, bem como espécies de *Leishmania* identificadas na amostra clínica do paciente. Além de mapeamento dos casos individuais, os dados de casos foram "dissolvidos (*dissolved*)" na camada de município para caracterizar os municípios por características de casos, em particular, origem de caso (autóctone/importado).

4.2 MÉTODOS MOLECULARES

4.2.1 Extração de DNA

Para identificação das espécies de *Leishmania* nas amostras clínicas, o DNA foi extraído de biópsias de pacientes coletadas antes do início do tratamento. As biópsias foram maceradas em 500 µl de tampão de lise (10 mM Tris HCl pH 7,4, 10mM NaCl, 25mM EDTA pH 8, 1% SDS) e incubadas com proteinase K (20 mg/ml) overnight a 42°C. Os lisados resultantes foram, em seguida, submetidos à extração pelo método fenol-clorofórmio como descrito por SAMBROOK e RUSSELL, 2001. O DNA foi precipitado com isopropanol, lavado duas

vezes com 500 µl de etanol 70% gelado, reconstituído em 50 µl de água ultrapura, contendo RNase A (10 mg/ml), incubado a 37°C por 1 hora e, em seguida, armazenado a -20°C até sua utilização. Para monitorar a possível contaminação durante a extração de DNA, controles negativos de extração de DNA de pacientes com resultados negativos para *Leishmania* e água DNA-free foram usados. A pureza e concentração dos DNAs extraídos foram avaliadas por espectrofotômetro.

4.2.2 Diagnóstico por kDNA PCR e caracterização molecular de espécies de *Leishmania* por kDNA PCR-RFLP

A amplificação por PCR da região conservada dos minicírculos de kDNA foi utilizada para o diagnóstico do paciente e a técnica de análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição do produto amplificado (PCR-RFLP) foi utilizada para determinar as espécies de *Leishmania* presentes na biópsia do paciente, empregando a metodologia desenvolvida por Volpini et al. (2004). Resumidamente, a banda de DNA de 120 pb, correspondente do fragmento de minicírculo k-DNA de *Leishmania* foi amplificado por PCR usando os iniciadores 150 [5'- GGG (G/T)AG GGG CGT TCT (G/C)CG AA -3'] e 152 [5'- (G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C -3']. A reação foi realizada em volume final de 20µl, contendo 1µl de DNA (diluído 1:10), 2µl de tampão de reação 10 X (50mM KCl, 10mMTris-HCl pH 8,3), 1,5mM MgCl₂, 0,25µM de iniciadores, 0,2µM de trifosfato desoxirribonucleotídeo (dNTP) e 1U de *Taq* polimerase. O DNA foi desnaturado a 94°C por 10 minutos e amplificado com 5 ciclos de 94°C por 1 min, 56°C por 30 s e 72°C por 10 s, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 30 s e 72°C por 10 s, e extensão final de 72°C por 5 minutos.

DNA de pacientes com resultados negativos para *Leishmania* e água DNA-free foram utilizados como controles negativos e DNA de cepas de referência *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904) e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram utilizados como controles positivos. Cinco µl de cada produto de amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 3%, corado por brometo de etídio e gravados digitalmente. Após amplificação e precipitação com isopropanol, cinco µl de produto de PCR foi digerido separadamente com 1 µl da enzima de restrição de *HaeIII* ou *AvaI* (New England Biolabs), 2,0 µl de tampão de reação 10 X (New England Biolabs NEBuffer 2: 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7.9 ou New England Biolabs NEBuffer 4: 50mM Acetato de Potássio, 20mM Tris-acetato, 10mM

Acetato de Magnésio, 1mM DTT, pH 7.9, respectivamente), e 12,5 µl de água ultrapura, sendo incubadas a 37°C overnight, de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 10%.

As amostras consideradas positivas para *L. (V.) braziliensis* foram aquelas que produziram fragmentos de 40 pb e 80 pb, quando digerido com *HaeIII* e não foram digeridas por *AvaI*. As amostras consideradas positivas para *L. (L.) amazonensis* foram aqueles que produziram fragmentos de 38 pb e 78 pb, quando digerido com *AvaI* e não foram digeridas por *HaeIII*.

4.2.3 Cultura de parasitos e o depósito na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz

Quando biópsia ou aspirado que foram preparados adequadamente estavam disponíveis para o isolamento de *Leishmania*, as amostras foram cultivadas a 26°C em meio de Schneider suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF) inativado a 56°C. As culturas positivas foram amplificadas e criopreservadas em nitrogênio líquido. As amostras foram reativadas em meio de Schneider, suplementado com 10% de SBF, mantidas a 26°C e enviadas ao Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, para depósito no criobanco internacional da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) (WDCM731, <http://clioc.ioc.fiocruz.br>) no Rio de Janeiro, Brasil. As amostras recebidas pelo CLIOC foram caracterizadas por eletroforese de isoenzimas (MLEE), o padrão-ouro atual para a caracterização de *Leishmania*, seguindo protocolos padronizados estabelecidos no CLIOC.

4.2.4 Caracterização molecular de espécies de *Leishmania* por hsp70 PCR-RFLP

A amplificação e PCR-RFLP do gene da proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70) (heat-shock protein 70), descrita por (DA GRAÇA et al., 2012), foi utilizada para caracterizar as espécies de *Leishmania* e validar os resultados da PCR-RFLP de kDNA.

Resumidamente, para as amostras em que o isolamento do parasito foi possível, um fragmento de 234 bp correspondente a hsp70 foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores [5'- GGA CGAGATCGAGCGCATGGT -3'] e [5'-

TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG -3`], numa reação de volume final de 50µl, contendo 3 µl de DNA, 10µl de tampão de reação (100 mM Tris-HCl, pH 8.8; 500 mM KCl, 1% Triton X-100), 1,5mM MgCl₂, 0,2 pmol de cada iniciador, 0,25 µM de dNTP e 1.0 U de *Taq* polimerase. A amplificação consistiu um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, ligação dos iniciadores a 62°C por 1min e extensão a 72 °C por 1min e 30s, seguido de uma extensão final de 10min a 72°C. Tubos contendo todos os componentes da reação, à exceção do DNA molde, foram utilizados como controle negativo. Como controle positivo foi utilizado o DNA das cepas de referência: *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147), *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408), e *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8L). Os produtos de amplificação foram digeridos separadamente com *Hae*III e *Sau*3AI, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (Genephor ®) e corado pelo nitrato de prata para visualização das bandas resultantes.

4.2.5 Análise de sequências multilocus (MLSA)

Para a análise de MLSA, o DNA extraído a partir de promastigotas de cultura de isolados de Santa Catarina e isolados de *L. (V.) braziliensis* de 11 outros estados brasileiros foi amplificado via PCR, utilizando iniciadores especificamente desenvolvidos para a amplificação de seis loci conservados de genes constitutivos (Tabela 3): 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGD), manose-6-fosfato isomerase (MPI), isocitrato desidrogenase (ICD) previamente descrita por (BOITÉ et al., 2012); proteína de choque térmico 70 (hsp70) previamente descrita por (DA SILVA et al., 2010); e malato desidrogenase mitocondrial (MDHmt) e malato desidrogenase nuclear (MDHnc), dados não publicados e em desenvolvimento pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmaniose, Departamento de Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz.

Tabela 3. Sequências de iniciadores e tamanhos de amplicons de regiões alvos para cada locus estudado para MLSA.

Locus	Sigla	Tamanho de amplicon (pb)	Sequências do iniciador (5'-3')
6-Fosfogluconato desidrogenase (6-phosphogluconate dehydrogenase)	6PGD	836	CTCAAGGAACATGAGCACGA TTGTCCCTTGACTTGCTCACG
Manose-6-fosfato isomerase (manose-6-phosphate isomerase)	MPI	681	GGCAAGATGTATGCGGAGTT CTCCCCAGGAACCATCTGTA
Isocitrato desidrogenase (isocitrate dehydrogenase)	ICD	1022	GAATCGGGAAGGAGATCACA CATCATAGCCCCAGAGAGGA
Proteína de choque térmico 70 (heat-shock protein 70)	Hsp70	1350	GGA CGAGATCGAGCGCATGGT TCCTTCGACGCCTCCTGGTTG
Malato desidrogenase mitocondrial (malate dehydrogenase mitochondrial)	MDHmt	821	TGCCGACCTCTTCCATATTC GAGTGAGGTGCGTCTTCACA
Malato desidrogenase nuclear (malate dehydrogenase nuclear)	MDHnc	1010	TCACAACCGCAACTACGA CTACTCACGATAACGGCAGA

Fonte: autor.

Foram utilizados 33 isolados de Santa Catarina e 53 isolados dos outros estados brasileiros. Um resumo da origem das amostras e formas clínicas é apresentado no Apêndice A. Informações sobre gênero, evolução, origem do caso e estado de origem (para casos importados) dos casos de SC são fornecidos no Apêndice B.

As condições de reação otimizadas para os ensaios PCR para cada locus genético são descritas no Anexo A. Para a PCR de *hsp70* foram usadas as mesmas condições de reação de PCR-RFLP de *hsp70* descritas na Seção 4.2.4. Os produtos amplificados foram purificados utilizando os *kits* de Wizard SV Gel e PCR Clean-up System (Promega) e sequenciados com os mesmos iniciadores utilizados para a PCR. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático (ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing) da Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz (PDTIS-FIOCRUZ), Rio de Janeiro. Sequências consenso de duas linhas para frente e duas reversas foram obtidos e editados no pacote de software de Phred/Phrap/Consed (University of Washington, Seattle, WA, EUA). Os seguintes tamanhos da sequência foram analisados para cada marcador: 6PGD (666 pb), MPI (569 pb), ICD (755 pb), *hsp70* (896 pb), MDHmt (666 pb) e MDHnc (803pb). Sequências com valores de Phred abaixo de 20 (baixa qualidade) foram descartados e apenas aquelas com valores acima de 20 foram usados para a construção de *contig*. Sequências de DNA que apresentaram locais ambíguos, que significa um local heterozigótico de mais de uma base na sequência, foram manualmente codificados utilizando os códigos normalizados da IUPAC. *Contigs* de todas as amostras foram montados e alinhados em MEGA4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versão 4.0; TAMURA et al., 2007). O banco de dados na forma de FASTA (.fas) gerado a partir MEGA4, de todas as sequências, que ainda continha os locais ambíguos, foi importado para o programa DnaSP5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). No DNA SP5, os locais ambíguos foram separados em duas colunas individuais das duas possibilidades de alelos para todos os macardores, utilizando o algoritmo PHASE.

4.2.5.1 Análise de complexos clonais por BURST

Complexos clonais foram definidos após análise de BURST no software eBURSTv3 (Imperial College London, Londres, Reino Unido).

O algoritmo BURST primeiramente identifica grupos mutuamente exclusivos de genótipos relacionados na população MLSA e tenta identificar os genótipos fundadores dos tipos de sequência de

cada grupo. Em seguida, o algoritmo prevê a descida do genótipo fundador previsto para os outros genótipos do grupo (FEIL et al., 2004; SPRATT et al., 2004). A partir dessa análise, os complexos clonais podem ser inferidos, permitindo uma análise epidemiológica mais manejável.

Um complexo clonal (CC) compreende organismos geneticamente relacionados, mas não idênticos. Para essa análise, os critérios para a formação dos CCs foram fixados no nível máximo exatidão. Definiram-se os conjuntos de cepas relacionadas como contendo pares de cepas que compartilham pelo menos $L-1$ alelos idênticos dos L loci com pelo menos um outro membro do CC, o que para os seis loci deste estudo resultaram em (6-1) ou cinco alelos idênticos.

Uma vez que o software eBURSTv3 foi originalmente criado para a análise MLST de bactérias, ou seja, organismos monoplóides, e as *Leishmania* apresentam possível recombinação e reprodução sexual, os dois alelos (locais ambíguos) separados pelo algoritmo PHASE para cada marcador foram divididos aleatoriamente em dois bancos de dados, representando as combinações possíveis de dois alelos de cada isolado para os marcadores. Cada um dos bancos de dados foi então analisado separadamente para as análises BURST, produzindo dois resultados separados de possíveis complexos clonais. Dada a mínima diferença entre os dois resultados, um dos conjuntos de CCs foi escolhido ao acaso para representar os complexos clonais na última comparação com dados epidemiológicos.

4.2.5.2 Análise da estrutura populacional por STRUCTURE

As sequências haplóides reconstruídas a partir do algoritmo PHASE no DNAsp, contendo alelos homozigotos e heterozigotos, foram importadas para o software STRUCTURE 2.3.4 (University of Chicago, Chicago, IL, EUA) para investigar a estrutura da população das 86 amostras de *L. (V.) braziliensis* com base nos seis loci (marcadores) da MLSA.

Utilizando uma abordagem estatística Bayesiana, o programa STRUCTURE utiliza um método de agrupamento modelo-baseado para inferir a estrutura da população e atribuir indivíduos às populações com base em dados do genótipo multilocus (PRITCHARD, STEPHENS, DONNELLY, 2000). Populações geneticamente distintas (K) são identificadas com base na frequência dos alelos, atribuindo a fração de cada genótipo para cada amostra estudada.

No STRUCTURE, as corridas foram realizadas a partir de um período de *burn-in* de 200.000 iterações, seguido por 600.000 iterações de *running*. As corridas foram repetidas três vezes para a obtenção de dados adequados para estimar o valor de ΔK (definido como a taxa de variação da probabilidade log dos dados entre sucessivos valores de K), o qual fornece o valor mais provável de K para o conjunto de dados para ser usado no programa complementar STRUCTURE HARVESTER (EARL, VONHOLDT, 2012). STRUCTURE HARVESTER combina os resultados produzidos pelo STRUCTURE, permitindo mais facilmente a detecção do número de grupos genéticos (K) que melhor se aplica aos dados. Somado a isso, STRUCTURE HARVESTER reformata os dados para o uso no programa CLUMPP versão 1.1.2 (JAKOBSSON, ROSENBERG, 2007).

O programa CLUMPP alinha múltiplas análises replicadas do mesmo conjunto de dados, facilitando a interpretação dos resultados de agrupamento das populações genéticas. Esse programa foi utilizado para produzir uma medida de dispersão dos valores de Q para cada amostra entre as três corridas do STRUCTURE. Esses valores de Q permitem uma melhor interpretação da consistência na estrutura populacional das amostras individuais para um determinado valor de K . Assim, através da análise hierárquica, comparando os agrupamentos entre os diferentes valores de K , foram determinadas as identificações da população (popID) de cada amostra para o valor predeterminado de ΔK . Os resultados desta análise (popID) foram correlacionados em seguida com os dados clínicos e geográficos das amostras para a análise descritiva.

Para criar o mapa da distribuição geográfica da variação genética entre os estados no ArcGIS 10, a variação genética total por estado foi calculada somando o resultado do STRUCTURE ao popID de cada estado. O tamanho dos gráficos de setores circulares resultantes foi ajustado pelo número total de isolados.

O programa Microsatellite Analyser (MSA) (DIERINGER, SCHLÖTTERER, 2002) foi utilizado para estimar valores de F_{ST} entre as três populações encontradas no STRUCTURE. O F_{ST} fornece uma medida de diferenciação genética entre as populações, com valores variando de 0 (sem diferenciação genética) a 1 (diferenciação completa).

Wright (1978) sugeriu as seguintes diretrizes para a interpretação de F_{ST} : $F_{ST} = 0 - 0.05$, pouca diferenciação genética; $F_{ST} = 0.05 - 0.15$, diferenciação genética moderada; $F_{ST} = 0.15 - 0.25$, diferenciação genética alta; $F_{ST} = > 0.25$, diferenciação genética muito alta. Para o cálculo da heterozigosidade esperada (H_e), a heterozigosidade observada (H_o), o coeficiente de endogamia (F_{IS}), as populações e os marcadores

de MLSA foram analisadas por ligação de computação e desequilíbrio de Hardy-Weinberg no software GDA (Genetic Data Analysis) versão 1.1 (LEWIS, ZAYKIN, 2002). F_{IS} é usado para representar o nível de endogamia entre os indivíduos com base no desvio de acasalamento ao acaso dentro de subpopulações, onde $F_{IS} = 1$ está em endogamia completa, $F_{IS} = 0$ em equilíbrio de Hardy-Weinberg, e $F_{IS} = -1$ em exogamia completa. Grandes F_{IS} negativas são características das populações diplóides clonais (HALKETT, SIMON, BALLOUX, 2005), como seriam esperadas sob o pressuposto de reprodução assexuada de *Leishmania*.

4.2.5.3 Rede *Median-Joining*

Para visualizar as relações populacionais (rede filogenética) entre as cepas e a diferenciação fornecida pelos seis marcadores, a rede *Median-joining* (MJ) foi montada no programa SplitsTree 4.0 (HUSON, BRYANT, 2006).

Redes filogenéticas, tal como a rede MJ, são mais convenientes para representar relações entre sequências intimamente relacionadas do que árvores estritamente hierárquicas, uma vez que permitem a exibição de todas as relações ambíguas em uma única figura (HUSON, BRYANT, 2006).

Redes MJ são especificamente úteis para grandes amostragens e quando as distâncias genéticas entre os indivíduos são pequenas (BANDELT, FORSTER, RÖHL, 1999). A rede MJ foi construída usando as sequências concatenadas de caracteres de nucleotídeos com os locais ambíguos criados a partir do MEGA5 para todos os loci e cepas. Os nodos da rede MJ, representando cepas de indivíduos ou grupos, foram modificados para representarem as variáveis epidemiológicas de origem do caso, forma clínica e cidade de origem.

5 RESULTADOS

5.1 A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA É EMERGENTE EM SANTA CATARINA, COM ÁREAS ENDÊMICAS RECENTES NA REGIÃO NORDESTE.

Dos 669 casos suspeitos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado de Santa Catarina encaminhados ao Laboratório de Protozoologia da UFSC durante o período do estudo, 542 (81,02%) foram confirmados por pelo menos um exame parasitológico e notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) para investigação epidemiológica.

No período foi observado um aumento na incidência de casos de LTA, variando de 14 casos em 2001 para 166 casos em 2006, e depois, gradualmente diminuindo para 48 casos em 2009. O mapeamento dos municípios por origem do caso, separado por intervalos de tempo de 2001 a 2004 e de 2005 a 2009, demonstrou uma mudança geográfica da distribuição por origem do caso ao longo do período (Figura 7). De 2001 até 2004, os casos eram dispersos geograficamente e principalmente importados de outros estados. No entanto, a partir de 2005 até 2009, um aumento drástico de casos autóctones na região Nordeste (NE) pode ser observado. Contrariamente, na região Sudoeste (SO) os casos continuaram sendo principalmente importados.

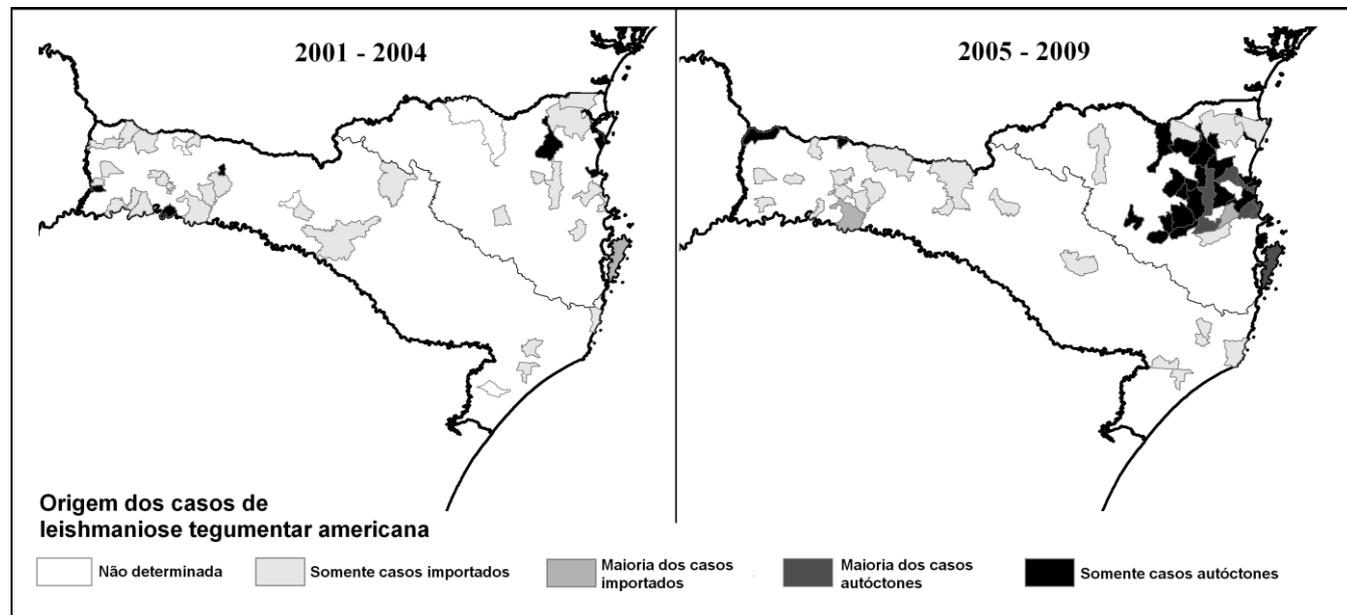


Figura 7. Comparação de mapeamentos que demonstram origem dos casos de LTA por município entre os períodos de 2001-2004 e 2005-2009, Santa Catarina.

5.2 O PERFIL DE CASOS DE LTA POR CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ENTRE AS REGIÕES NORDESTE E SUDOESTE DO ESTADO.

Dos 542 casos confirmados de LTA no período de estudo, 365 (90,96%) eram de indivíduos de etnia branca, 67,34% (n=365) do gênero masculino e 86% (n=422) viviam em zonas urbanas (Tabela 4). A idade média dos pacientes foi 37 anos, com 34 (6,27%) dos casos ocorrendo em crianças com idade igual ou inferior a 10 anos.

Quatrocentos e um casos de LTA (73,99%) foram autóctones em origem e 98,51% (395/401) eram provenientes da região NE. Além disso, a comparação mostrou que a região NE contém 395/469 (84,22%) de casos autóctones enquanto 75,34% (55/73) dos casos provenientes da região SO foram importados ($p < 0,0001$) (Tabela 4).

Além disso, as variáveis de faixa etária, gênero e zona de residência mostraram uma associação significativa com a região ($p = 0,0208$, $< 0,0001$, $0,0003$, $< 0,0001$, e $0,0294$, respectivamente) (Tabela 4). Na região do NE, a idade dos casos foi mais uniformemente distribuída entre as faixas etárias do que na região SO em que os casos tenderam ser de idade adulta. Quase todos os casos em crianças com idade até 10 anos ocorreram na região NE (n= 33/34, 97,06%). A região NE apresentou uma relação de quase 1:2 de mulheres:homens, com uma percentagem de mulheres significativamente maior (177/469, 32,66%) do que na região SO (7/73, 9,59%) ($p < 0,0001$). A maior parte dos casos em ambas as regiões provinham de área urbana. No entanto, a região NE continha uma percentagem mais elevada de casos periurbanos (31/469, 6,61%) e a região SO continha uma percentagem mais elevada de casos rurais (21/73, 28,77%).

Tabela 4. Comparação de dados demográficos dos casos de LTA entre as regiões Nordeste e Sudoeste de Santa Catarina, 2001-2009, por teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Característica		Região Nordeste no. (%)	Região Sudoeste no. (%)	Valor de p	Total no. (%)
Faixa etária	0-10	33 (7,04)	1 (1,37)	0,0208	34 (6,27)
	11-20	69 (14,71)	8 (10,96)		77 (14,21)
	21-30	75 (15,99)	14 (19,18)		89 (16,42)
	31-40	94 (20,04)	13 (17,81)		107 (19,74)
	41-50	77 (16,42)	11 (15,07)		88 (16,24)
	50-65	96 (20,47)	14 (19,18)		110 (20,30)
	>65	24 (5,12)	11 (15,07)		35 (6,46)
	ND	1 (0,21)	1 (1,37)		2 (0,37)
Gênero	Mulher	170 (36,25)	7 (9,59)	<0,0001	177 (32,66)
	Homem	299 (63,75)	66 (90,41)		365 (67,34)
Raça ou etnia	Indígena	0 (0,00)	0 (0,00)	0,2653	0 (0,00)
	Branca	426(90,83)	67 (91,78)		493 (90,96)
	Negra	10 (2,13)	3 (4,11)		13 (2,40)
	Amarela	1 (0,21)	0 (0,00)		1 (0,18)
	Parda	21 (4,48)	0 (0,00)		21 (3,87)
	ND	11 (2,35)	3 (4,11)		14 (2,58)
Zona de residência	Urbana	372 (79,32)	50 (68,49)	0,0003	422 (77,86)
	Rural	53 (11,30)	21 (28,77)		74 (13,65)
	Periurbana	31 (6,61)	1 (1,37)		32 (5,90)
	ND	13 (2,77)	1 (1,37)		14 (2,58)
Origem do caso	Autóctone	395 (84,22)	6 (8,22)	<0,0001	401 (73,99)
	Importado	47 (10,02)	55 (75,34)		102 (18,82)
	ND	27 (5,76)	12 (16,44)		39 (7,20)
Total		469 (86,53)	73 (13,47)		542 (100,00)

ND= não determinado.

Além dos dados demográficos dos casos, a forma clínica e evolução tiveram uma relação significativa com região ($p = <0,0001$ e $0,0294$, respectivamente). Casos no SO pareciam ter uma taxa mais elevada de ambos os casos mucocutânea e casos que recidivaram (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação das características clínicas dos casos de LTA entre as regiões nordeste e sudoeste de Santa Catarina, 2001-2009, por teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

Característica		Região Nordeste no. (%)	Região Sudoeste no. (%)	Valor de p	Total no. (%)	
Forma clínica	Cutânea	455 (97,01)	61 (83,56)	<0,0001	516 (95,20)	
	Muco- cutânea	14 (2,99)	12 (16,44)			26 (4,80)
Evolução do caso	Curado	446 (95,10)	64 (87,67)	0,0294	510 (94,10)	
	Recidiva	18 (3,84)	7 (9,59)			25 (4,61)
	ND	5 (1,07)	2 (2,74)			7 (1,29)
Total		469 (86,53)	73 (13,47)		542 (100,00)	

ND= não determinado.

Quando mapeado por zona de residência, ambos os casos urbanos e rurais foram fortemente agrupados na região NE, enquanto que na região SO os casos foram mais dispersos (Figura 8).

Diferenças na sazonalidade de casos de leishmaniose foram encontradas entre as regiões (Figura 9). A temporada com maior número de casos na região SO ocorreu em agosto e setembro, com 8,22% e 17,81% dos casos, respectivamente. Na região NE o maior número de casos registrados foi em fevereiro e outubro com 9,81% e 15,99% dos casos, respectivamente.

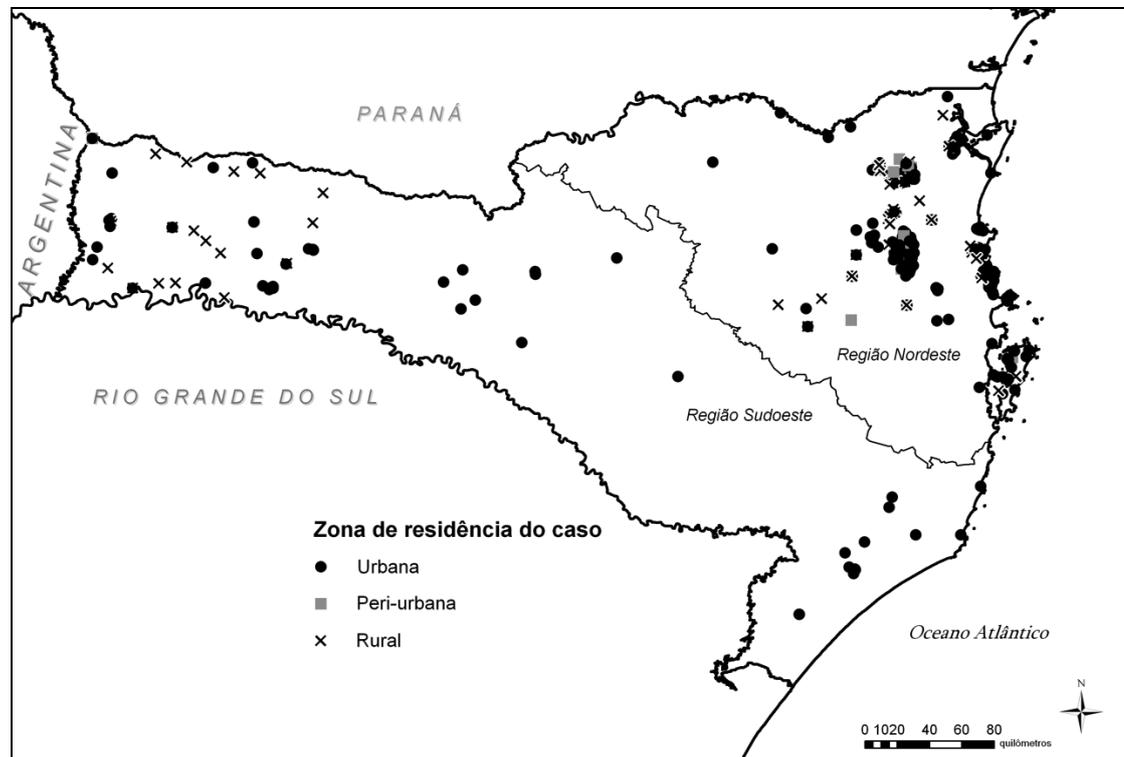


Figura 8. Mapeamento de casos de LTA por zona de residência, Santa Catarina, Brasil (n= 452, 2001-2009).

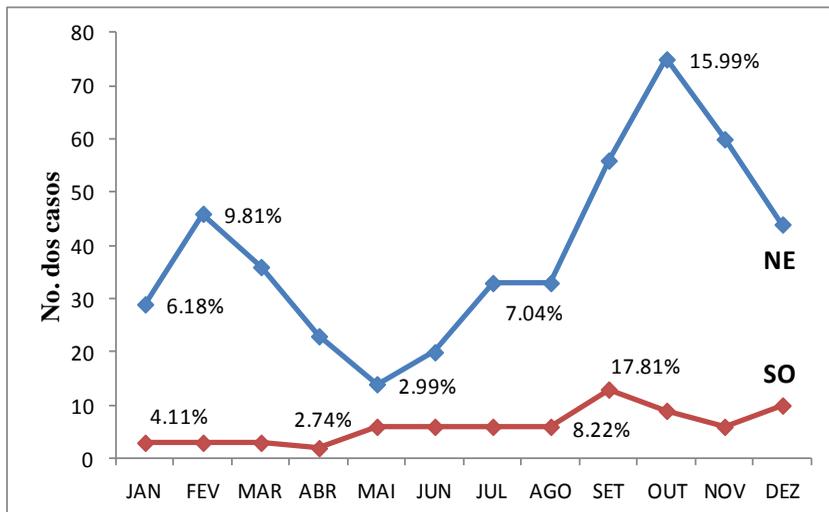


Figura 9. Distribuição sazonal do diagnóstico de LTA dos casos em Santa Catarina, Brasil, por região (n=542, 2001-2009). NE= Região Nordeste, SO= Região Sudoeste.

Comparando as características clínicas dos casos, a região SO apresentou uma percentagem significativamente mais elevada de casos de leishmaniose mucocutânea (12/469, 16,44%) que a região NE. Ademais, uma percentagem significativamente maior de casos de recidivas foi observada na região SO. A investigação de fatores de risco para recidiva de LTA no Estado revelou que idade \geq de 50 anos, ter sido portador da forma clínica mucocutânea da doença e adquirir a infecção fora do Estado foram fatores de risco significativos associados independentes nas regressões logísticas bivariadas ($p = 0,0307$, $<0,0001$, e $<0,0001$, respectivamente).

A regressão logística multivariada mostrou que a chance de recidiva em casos importados foi sete vezes maior que em casos autóctones, mesmo após o ajuste para outros fatores de risco da idade do paciente e forma clínica da LTA (95% IC= 2,56-21,09) (Tabela 6). O modelo logístico foi considerado aceitável dado a não-rejeição da hipótese nula do teste de *Hosmer and Lemeshow goodness of fit*, que provou que a qualidade do modelo foi adequada ($\chi^2=0,035$, $p=0,9828$). A maioria desses casos importados foram provenientes do Estado de Mato Grosso, na região da Amazônia (54/102, 51,43%).

Tabela 6. A regressão logística multivariada para recidiva de LTA em Santa Catarina, Brasil.

Variável	Categoria	N	Odds ratio não ajustado	IC 95%	Odds ratio ajustado	IC 95%
Gênero						
	Mulher	5	1,00	-		
	Homem	20	1,95	0,72 – 5,28	-	-
Zona de residência						
	Urbana ou peri-urbana	21	1,00	-		
	Rural	4	1,16	0,39 – 3,48	-	-
Idade						
	Menos de 50 anos de idade	13	1,00	-	1,00	-
	50 anos de idade ou mais velhos	12	2,44*	1,09 – 5,49	1,52	0,55 - 4,19
Forma clínica						
	Cutânea	18	1,00	-	1,00	-
	Mucocutânea	7	10,05*	3,75 – 26,94	1,82	0,43 - 7,78
Origem do caso						
	Autóctone	6	1,00	-	1,00	-
	Importado	12	8,96*	3,27 – 24,51	7,35†	2,56 - 21,09

*p < 0,05, †p < 0,001.

A regressão logística multivariada foi usada para criar probabilidades previstas de um caso ser recaída, colocando valores fixos para cada uma das três variáveis no modelo desenvolvido. Quando a idade do paciente foi mantida constante, a probabilidade prevista para um caso, importado da forma mucocutânea foi de 0,21, ou em outras palavras, um caso de LTA em SC que é importado e mucocutânea teve uma chance de 21% de ter uma recidiva. No modelo com a variável de forma clínica constante, um caso importado com idade maior ou igual a 50 anos teve a chance de 16% de recidiva, enquanto que para um caso autóctone com menos de 50 anos de idade a chance de recidiva foi de 1%. Quando o fator de risco significativo de ser um caso importado foi mantido constante, casos mucocutâneos com 50 anos de idade ou mais tiveram uma chance de recidiva de 31%, demonstrando que essas duas outras variáveis do modelo são importantes fatores de confundimento, apesar de não terem sido significativas no modelo da regressão logística multivariada (Figura 10).

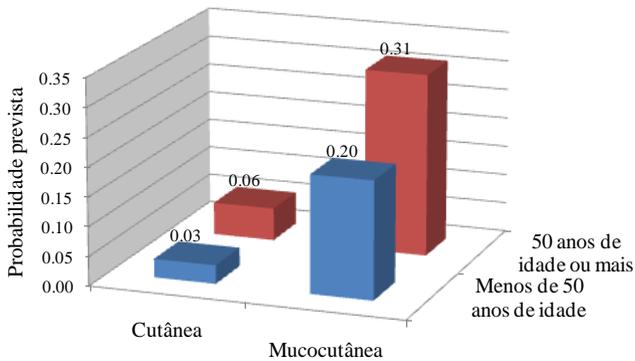
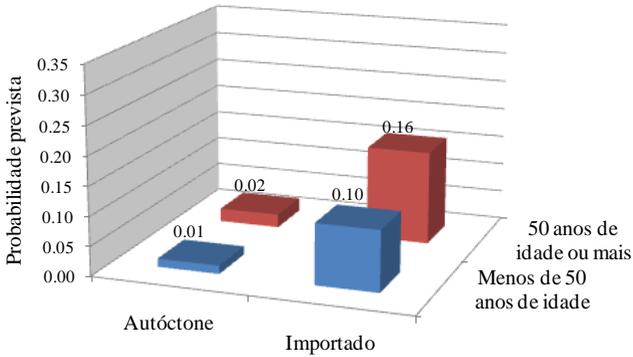
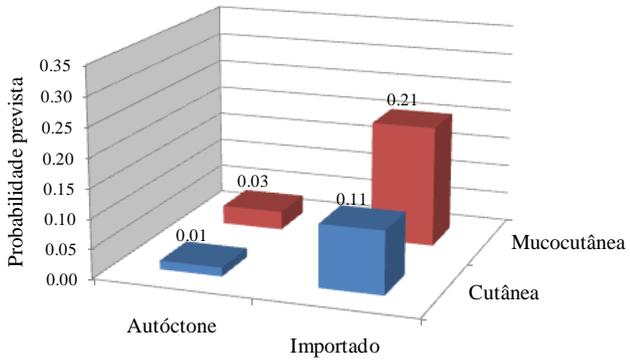


Figura 10. Comparações bivariadas de probabilidades previstas de um caso ser recidiva, como previsto pelo modelo de regressão logística multivariada.

5.3 *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* É A ESPÉCIE PREDOMINANTE NO ESTADO DE SANTA CATARINA.

Dos 542 casos de LTA confirmados por testes parasitológicos, o diagnóstico por kDNA-PCR foi registrado para 331 (61,1%) dos pacientes no Caderno de Pacientes do Laboratório. Os demais casos foram confirmados por *imprinting* corado pelo Giemsa. Biópsias PCR positivas estavam disponíveis para análise de PCR-RFLP de kDNA para 251 (46,31%) pacientes.

Das 251 amostras que puderam ser identificadas em nível de espécie, 248 (98,80%) foram identificadas como *L. (V.) braziliensis* (Figura 11). Três casos, um importado de 2001 do estado de Mato Grosso e dois casos autóctones dos anos de 2002 e 2005, foram identificados como *L. (L.) amazonensis*.

A Figura 11 representa os resultados de um diagnóstico típico por PCR de kDNA, seguidos pela identificação das espécies por digestão do produto amplificado com as duas enzimas de restrição *HaeIII* e *AvaI*. Esse exemplo demonstra a ocorrência das bandas não específicas ou a ausência de bandas que podem ocorrer nesse tipo de método. Especificamente, a segunda banda de 40 pb que falta para o controle de *L. (V.) braziliensis* na digestão por *HaeIII* e a segunda banda de 38 pb que falta para o primeiro caso de *L. (L.) amazonensis* na digestão por *AvaI* podem causar resultados indeterminados. Além disso, a amostra do primeiro caso de *L. (V.) braziliensis* teve uma quantidade maior da amostra aplicada e, portanto, mostrou uma banda residual não digerida por *HaeIII*, que poderia ser confundida com o produto não digerido de *L. (L.) amazonensis* no caso de uma infecção mista. Todos os casos positivos na RFLP para *L. (L.) amazonensis* estavam localizados na região NE, nas cidades de Blumenau, Piçarras, e Brusque (Figura 12).

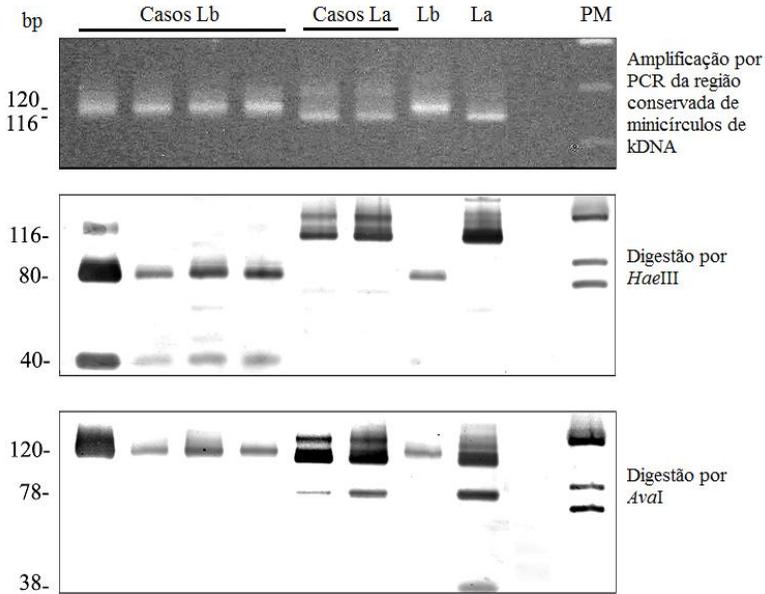


Figura 11. Diagnóstico e identificação molecular por kDNA PCR-RFLP da espécie de *Leishmania* presente na biópsia dos pacientes representivos de LTA em Santa Catarina. (A) Produtos de amplificação por PCR da região conservada de *Leishmania* de minicírculos de kDNA dos casos de LTA em Santa Catarina, corado com brometo de etídio; polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) da amplificação do região conservada de minicírculos de kDNA digeridos pelas enzimas de restrição *HaeIII* (B) e *AvaI* (C), e analisados por electroforese em géis de poliacrilamida 10% com coloração de prata. Casos Lb = dois casos de *L. (V.) braziliensis* da região Nordeste seguido por dois casos de *L. (V.) braziliensis* da região Sudoeste, Casos La = casos de *L. (L.) amazonensis*, Lb = cepa de referência *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M-2904), La = cepa de referência *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), NC = controle negativo, PM= peso molecular.

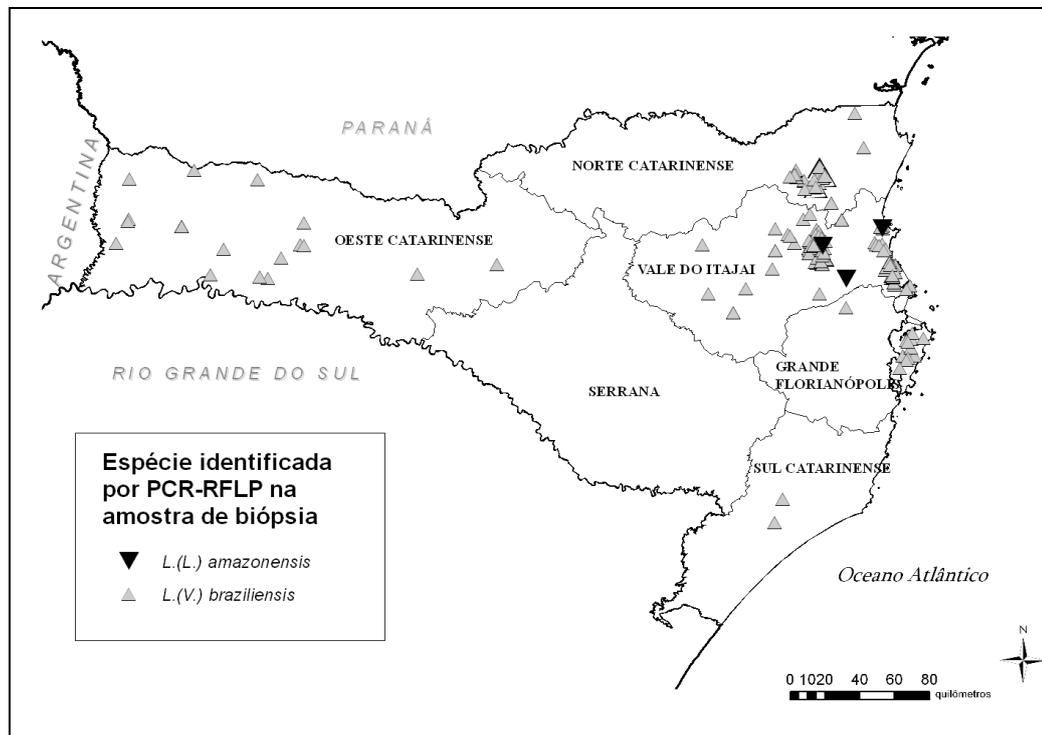


Figura 12. Mapeamento de casos de LTA por espécies de *Leishmania* identificada a partir de amostra de biópsia do paciente utilizando PCR-RFLP de kDNA, Santa Catarina, Brasil (n= 251, 2001-2009).

Considerando esses 251 pacientes, o isolamento do parasito por cultura foi possível em 39 pacientes. Todos os 39 isolados foram depositados na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC) (WDCM731, <http://clioc.ioc.fiocruz.br>). A caracterização dos isolados por MLEE realizada pelo CLIOC foi consistente com os resultados de PCR-RFLP de kDNA encontrados neste estudo, com uma cepa *L. (L.) amazonensis* e 38 cepas de *L. (V.) braziliensis* sendo depositados. A PCR-RFLP do gene de hsp70 foi concordante com os resultados de PCR-RFLP de kDNA e confirmou o subgênero *Viannia* nos isolados do presente estudo (Figura 13).

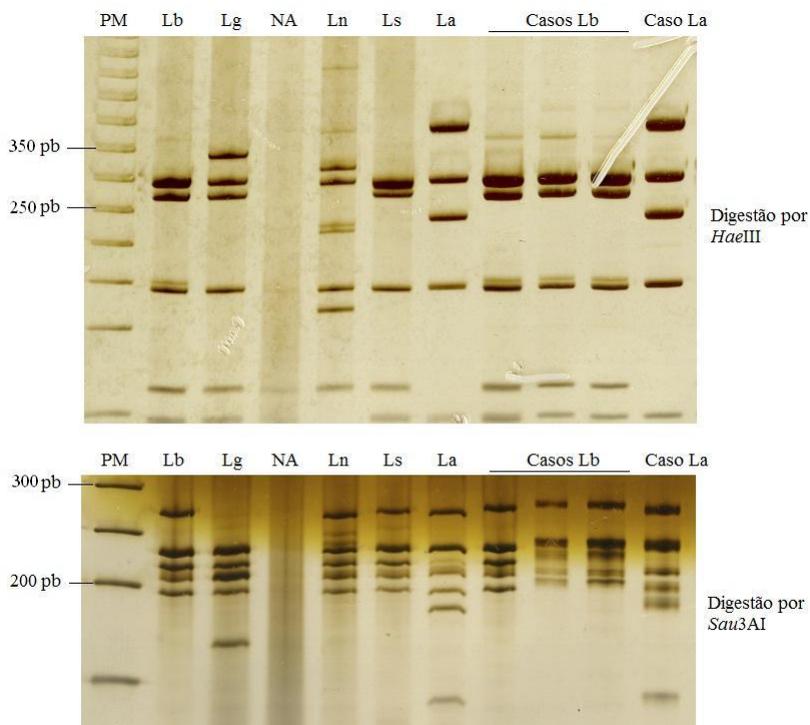


Figura 13. Caracterização molecular de espécies de *Leishmania* por PCR-RFLP dos produtos de amplificação da região conservada de *hsp70* dos casos da LTA de Santa Catarina; polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP da região conservada da *hsp70* amplificado digerido com as enzimas de restrição *HaeIII* (A) e *Sau3AI* (B)), e analisadas por eletroforese em géis de poliacrilamida 12,5% (Genephor®) com coloração de prata. Lb = *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903); Lg = *L. (V.) guyanensis* (MHOM/BR/1975/M4147); NA = produto não amplificado; Ln = *L. (V.) naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533); Ls = *L. (V.) shawi* (MCEB/BR/1984/M8408); La = *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8L); Casos Lb = Casos de *L. (V.) braziliensis* de Santa Catarina; Caso La = Caso de *L. (L.) amazonensis* de Santa Catarina; PM= Peso molecular de 50 bp.

5.4 AS CEPAS DE *L. (V.) BRAZILIENSIS* DE SANTA CATARINA SÃO GENETICAMENTE HOMOGÊNEOS EM COMPARAÇÃO COM CEPAS DE OUTROS ESTADOS BRASILEIROS.

A análise BURST mostrou três complexos clonais (CC) entre as amostras de *L.(V.) braziliensis*, com mais da metade (54,7%, 47/86) de todos as cepas apresentando tipos de sequência únicos. Entre as 86 cepas, 76 tipos de sequências diploides foram capazes de ser distinguidas. O genótipo fundador do CC1 na análise BURST foi identificado como tipo de sequência 12 (13/86), sendo todas as amostras desse tipo provenientes de Santa Catarina, enquanto CC2 e CC3 não tinham os genótipos fundadores definidos.

A maioria (84,8%, 28/33) das cepas de Santa Catarina pertenciam ao CC1, incluindo dois casos importados. As cinco cepas remanescentes de Santa Catarina foram tipos de sequência únicos e todos esses casos foram relatados como importados na investigação epidemiológica.

Não foi encontrada uma associação significativa entre CC e forma clínica pelo teste exato de Fisher ($p= 0,6595$). Dados completos de CC listados pelos isolados podem ser encontrados no Apêndice C.

A Figura 14 mostra a distribuição geográfica do CC por estado, revelando maior variação nas amostras dos estados do bioma Amazônico, dado que as amostras desses locais foram, na sua grande maioria, tipos de sequência únicos.

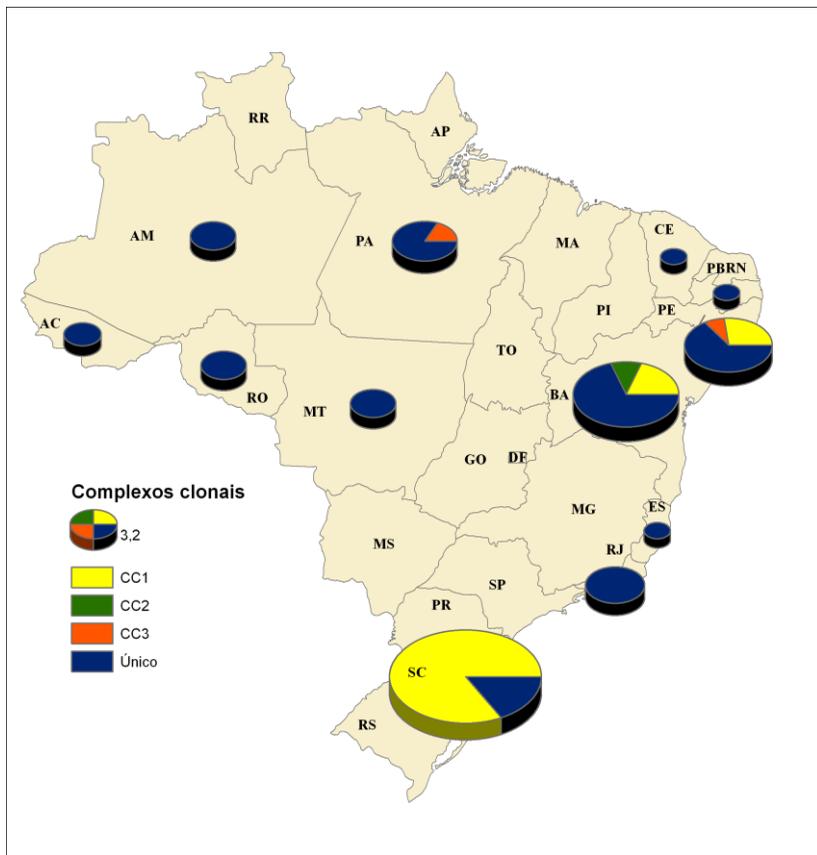


Figura 14. Distribuição geográfica dos complexos clonais por estado entre as cepas brasileiras de *L. (V.) braziliensis* (n=86).

CC1 – Complexo clonal 1

CC2 – Complexo clonal 2

CC3 – Complexo clonal 3

Único - Tipo de sequência único

Tamanho do gráfico de setores circulares individuais varia em função do número de isolados do estado que foram incluídos na análise. Um gráfico de 3,2 amostras é representado acima como referência.

Por meio do cálculo de ΔK das sequências foram definidas três populações (POP) de *L. braziliensis* (Apêndice D) na análise do STRUCTURE. Dados completos de POP listados pelos isolados podem ser encontrados no Apêndice C.

A grande maioria (87,9%, 29/33) das cepas de SC foi agrupada na POP2. As quatro cepas de SC que não se agruparam em POP2 foram casos importados de POP1. De maneira geral, 41,9% (36/86) das cepas pertenciam à POP1, 40,7% (35/86) à POP2, 16,3% (14/86) à POP3. As amostras que se agruparam na POP2 com as amostras de SC incluíram quatro amostras do estado de Pernambuco, uma de Mato Grosso, e uma da Bahia (Figura 15). A POP1 demonstrou uma alta variabilidade geográfica, abrangendo cepas de todos os estados que tiveram amostras analisadas neste estudo (Figura 15).

A distribuição geográfica da soma da variação genética total atribuída pelo STRUCTURE das amostras é mostrada na Figura 16. A distinção pode ser feita entre os estados litorâneos que compreendem Mata Atlântica e os estados do Norte, que incluem a floresta Amazônica. Nos estados da região Amazônica há um predomínio do genótipo da POP1, enquanto que nos estados de domínio da Mata Atlântica há uma predominância dos genótipos das POP2 e POP3 (Figuras 16 e 17).

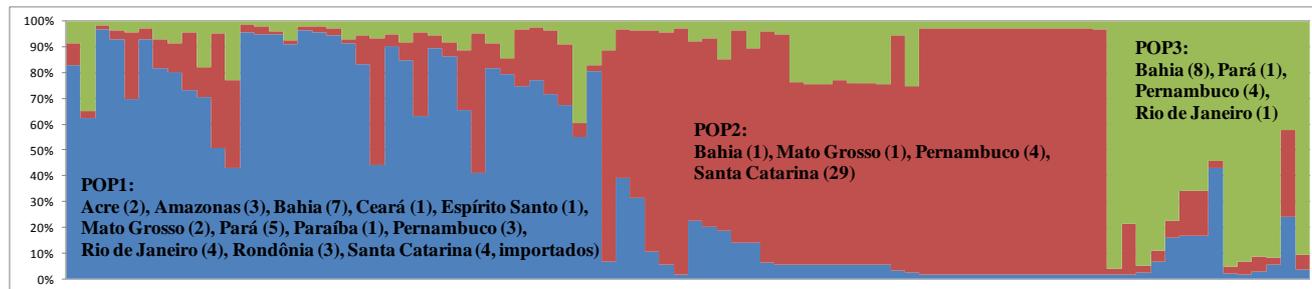


Figura 15. Os resultados (*output*) do programa STRUCTURE estimando a estrutura populacional das cepas de *L. (V.) braziliensis* dos doze estados brasileiros (n=86, k=3).

POP1 – População 1

POP2 – População 2

POP3 – População 3

Estado (número das cepas)

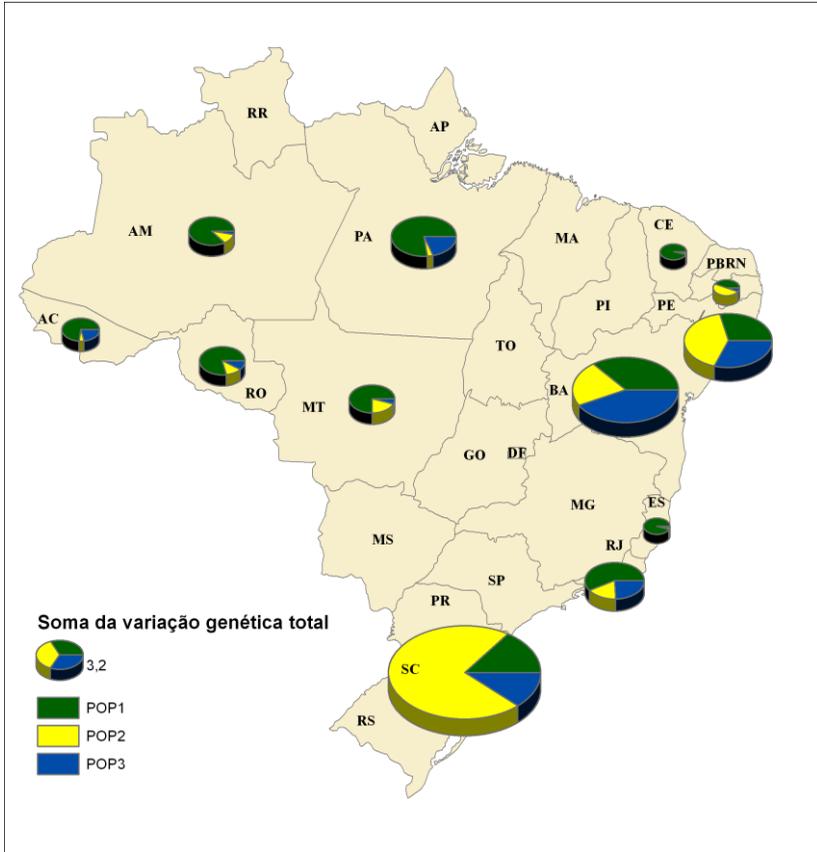


Figura 16. Representação geográfica da soma da variação genética total atribuída pelo STRUCTURE das amostras por estado entre as cepas brasileiras de *L. (V.) braziliensis* ($k=3$, $n=86$).

POP1 – População 1

POP2 – População 2

POP3 – População 3

O tamanho dos gráficos de setores circulares individuais varia em função do número de isolados do estado que foram incluídos na análise. Um gráfico de 3,2 amostras é representado acima como referência.

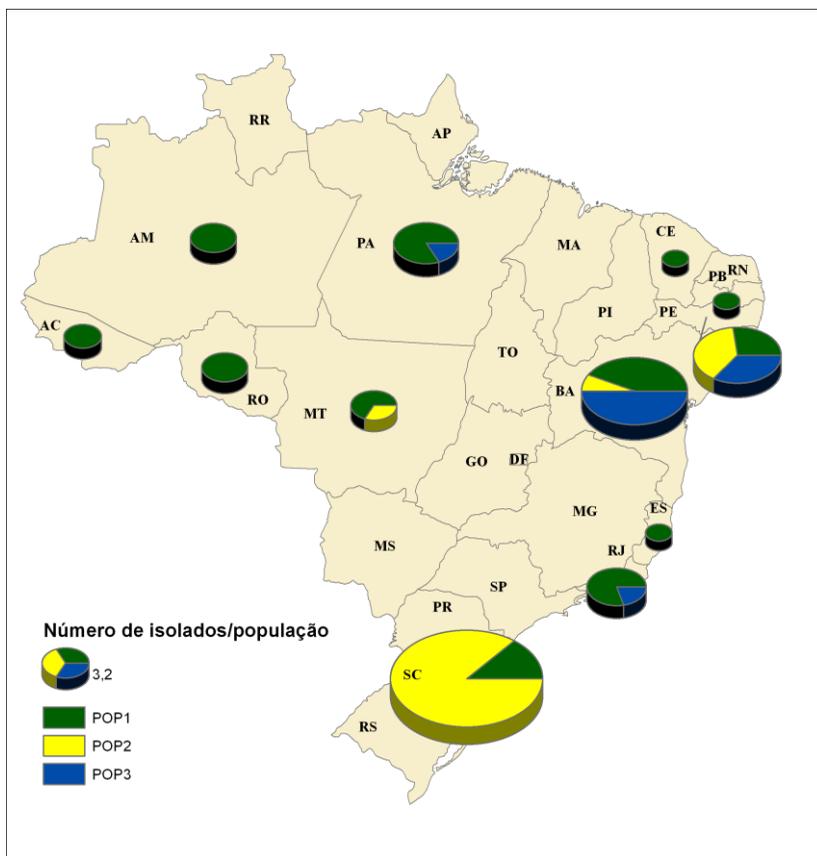


Figura 17. Representação geográfica da estrutura populacional demonstrada como número total de amostras por população designada pelo STRUCTURE por estado entre as cepas brasileiras de *L. (V.) braziliensis* ($k=3$, $n=86$).

POP1 – População 1

POP2 – População 2

POP3 – População 3

O tamanho dos gráficos de setores circulares individuais varia em função do número de isolados do estado que foram incluídos na análise. Um gráfico de 3,2 amostras é representado acima como referência.

Foi encontrada uma associação significativa entre a população e a forma clínica ($p=0,0296$) (Tabela 7). A maioria dos isolados de casos de forma mucocutânea (4/7) pertencem à POP3, incluindo um caso do RJ, um de PE e dois de BA.

Tabela 7. A forma clínica de LTA de pacientes por sua população, atribuído no STRUCTURE dos isolados de *L. (V.) braziliensis* do Brasil.

Forma Clínica	População			Total
	POP1	POP2	POP3	
Cutânea	29	32	10	71
Disseminada	2	0	0	2
Mucocutânea	1	2	4	7
Total	32	34	14	80

Comparando-se o resultado do agrupamento pelos CC e POP entre todos as cepas, existe uma associação significativa entre os dois conjuntos de resultados ($p < 0,0001$), demonstrando concordância entre os aglomerados definidos para ambas as análises. Todos as cepas que pertenciam à POP1 foram incluídos como sequências únicas na análise BURST, enquanto a maioria (88,6%, 31/35) das amostras de POP2 foi incluída no CC1 (Tabela 8).

Tabela 8. A comparação dos resultados das análises de STRUCTURE e BURST das cepas de *L. (V.) braziliensis* do Brasil.

Complexo clonal	População			Total
	POP1	POP2	POP3	
CC1	0	31	3	34
CC2	0	0	2	2
CC3	0	0	2	2
Único	37	4	7	48
Total	37	35	14	86

Com base na escala de interpretação de F_{ST} sugerido pelo Wright (1978), as populações mostraram diferenciação genética significativa (Tabela 9). As POP1/POP3 apresentaram diferenciação genética moderada ($F_{ST} = 0,1087$), enquanto as POP2/POP1 e as POP2/POP3 mostraram grande diferenciação genética ($F_{ST} = 0,1540$ e $0,2028$, respectivamente).

Tabela 9. Matriz dos valores de F_{ST} e correspondentes valores de p para as três populações identificadas no STRUCTURE.

	POP1	POP2	POP3
POP1	0	0,1540	0,1087
POP2	0,0003	0	0,2028
POP3	0,0003	0,0003	0

Os valores de F_{ST} são no triângulo superior direito da matriz, os valores de p com correção Bonferoni no triângulo inferior esquerdo da matriz.

POP1 apresentou o maior número médio de alelos por loco (23.3), enquanto ambas as populações de POP2 e POP3 foram semelhantes no número médio de alelos, sendo aproximadamente cinco alelos por loco. Os valores positivos de F_{IS} foram encontrados para todas as populações. Os valores F_{IS} para POP1 e POP3 foram particularmente elevados. Todos os loci foram polimórficos para POP1 e POP2, e cinco (83,3%) dos seis loci foram polimórficos para POP3 (Tabela 10). O marcador 6PGD não foi polimórfico para POP3.

Tabela 10. Caracterização das três populações encontradas pela análise do STRUCTURE das 86 cepas de *L. (V.) braziliensis*.

População	N	P	A	H_e	H_o	F_{IS}
POP1	37	1,000	23,333	0,825	0,239	0,714
POP2	35	1,000	5,833	0,345	0,276	0,202
POP3	14	0,833	5,167	0,506	0,119	0,772

n - tamanho da amostra; P - proporção de loci polimórficos; A - o número médio de alelos por loco; H_e - a heterozigosidade esperada; H_o - a heterozigosidade observada; F_{IS} - coeficiente de endogamia.

De forma geral, os marcadores MDHmt e MDHnc mostraram o maior número de alelos (40 e 44, respectivamente) de todos os seis loci analisados (Tabela 11).

Tabela 11. Número de alelos encontrados a cada locus genético utilizado na MLSA entre as 86 cepas de *L. (V.) braziliensis*.

Locus	Número de alelos por locus
6PGD	15
MPI	15
ICD	30
Hsp70	35
MDHmt	40
MDHnc	44

A rede *Median-joining* (MJ) foi criada a partir das sequências concatenadas de caracteres dos seis loci para as 86 amostras de *L. (V.) braziliensis* do Brasil.

Amostras de Santa Catarina demonstraram um agrupamento evidente de um tipo de sequência, com a maioria das amostras que não faziam parte do principal aglomerado permanecendo perto, sendo intimamente relacionadas com esse agrupamento. Outras amostras que apareceram próximas das amostras de SC foram duas de PE, uma do RJ e uma do PA (Figura 18). Quando as amostras de SC foram marcadas pela origem do caso, todos os casos de SC que apareceram distantes do agrupamento principal foram casos importados, com a exceção do isolado 605. Essa amostra também agrupou fortemente com amostras de SC, tanto na análise de BURST quanto na de STRUCTURE, demonstrando que esse caso provavelmente foi um caso autóctone, apesar de ser registrado como um caso importado na avaliação epidemiológica.

Quando os casos de doença mucocutânea e disseminada foram destacados na rede MJ, aqueles pertencentes ao estado da Bahia pareceram se agrupar, enquanto os casos mucocutâneos dos outros estados foram intimamente relacionados com as cepas de SC (Figura 19). Quando a rede MJ foi reduzida para apenas as amostras de SC, os resultados mostraram três vertentes principais. Quando marcadas por ano/cidade, pode-se observar um agrupamento principal no centro da rede representando o centro do surto de 2006 em Blumenau. A partir

desse centro, amostras autóctones formaram um ramo específico, aparecendo ao longo do tempo nos municípios vizinhos de Florianópolis, enquanto os casos importados ramificaram-se em dois ramos distintos (Figura 20).

O mapa incluído na Figura 20 mostra que essa cepa principal foi distribuída em uma distância de mais de 80 quilômetros em quatro anos, de Blumenau até Florianópolis. As amostras não das regiões indicadas no mapa da Figura 20 foram todos casos importados de outras regiões do Estado.

6 DISCUSSÃO

As evidências apresentadas neste estudo confirmam a emergência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Estado de Santa Catarina. No entanto, os perfis epidemiológicos encontrados nos casos entre as duas principais regiões do Estado foram significativamente diferentes, demonstrando que essa emergência não está ocorrendo uniformemente. Enquanto na região Sudoeste (SO) os casos são dispersos e principalmente importados, a região Nordeste (NE) é endêmica atualmente para LTA em mais de três zonas urbanas principais.

Apesar da redução gradual de casos notificados no final do período de estudo, o relato continuado de casos autóctones na área fornece evidências da existência de um ciclo de transmissão estabelecido. Dessa forma, a notificação regular de LTA é esperada na região e a continuidade da transmissão da doença é muito provável, dada a ausência de programas eficazes de controle. A notificação reduzida da doença também pode ser devido à perda de interesse dos profissionais de saúde pública após a atenção inicial dada ao surto de 2006, o qual alcançou alta significância e foi amplamente divulgado na mídia local e estadual. Além disso, a LTA segue flutuações sazonais e interanuais em sua incidência, as quais podem estar relacionadas com as mudanças climáticas como o *El Niño* (WHO, 2010). Desse modo, a redução na incidência pode ser reflexo de uma flutuação cíclica regular em vez de uma redução sustentada na incidência da doença.

Esse tipo de emergência de surtos isolados em áreas urbanas com relato contínuo de casos em áreas rurais, em grande parte reflete o surgimento gradual de LTA no Sudeste do Brasil ao longo da segunda metade do século passado (MAYRINK et al., 1979; OLIVEIRA-NETO et al., 1988; PASSOS, FALCÃO, KATZ, 1990; PASSOS et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2004). Quando consideramos a similaridade genética encontrada neste estudo entre as cepas de Rio de Janeiro e Pernambuco com as cepas de Santa Catarina, todos estados com Mata Atlântica, é possível inferir que a leishmaniose poderá se tornar cada vez mais estabelecida, estável e geograficamente difundida dentro dos próximos dez a vinte anos, seguindo o caminho do Sudeste.

A alta taxa de recidiva em casos importados, bem como o elevado índice de casos da forma mucocutânea na região SO é um problema importante para saúde pública. Isso pode refletir um desfecho clínico mais grave em uma população de migrantes, que são potencialmente mais vulneráveis, e/ou numa população rural com acesso

restrito aos serviços de saúde, representando duas populações carentes que necessitam de intervenções direcionadas fora da rotina dos serviços regulares de saúde pública.

Uma das diferenças mais distintas entre as duas regiões de Santa Catarina foi a taxa de casos autóctones na comparação com os casos importados. Na região NE, a maioria dos casos resultou de transmissão autóctone, apoiando as evidências de endemicidade na região. Na região SO, a maioria dos casos importados reflete a migração de trabalhadores rurais, principalmente do estado do Mato Grosso, uma importante fronteira agrícola do país. Isso pode ser comprovado pela origem dos casos que, em sua grande maioria, são de indivíduos naturais de Santa Catarina, mas que exerciam atividades laborais no Mato Grosso. A alta taxa de casos importados também foi observada em 1997, quando 52,1% dos 23 casos importados relatados entre 1994 e 1997 foram procedentes do Mato Grosso (LIMA FILHO, STEINDEL, 1998). Além disso, a presença de somente um caso em criança com menos de 10 anos de idade na região SO suporta a hipótese que esses casos eram em trabalhadores migrantes, principalmente de outros estados.

Das características clínicas dos casos de LTA no Estado, é importante destacar a maior probabilidade de recidivas nesses casos importados, como foi demonstrado na análise de regressão logística multivariada do presente estudo. A ocorrência de recidiva em casos importados foi sete vezes maior, independente da forma clínica ou da idade do paciente. Sendo outro fator de importância clínica, a forma mucocutânea da leishmaniose representa uma forma mais virulenta da doença, o que pode levar os quadros de desfiguração grave, em geral, mais difícil de tratar (MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007). A percentagem de casos de LMC no Estado (4,80%) foi menos à percentagem total de 6,61% reportada no Brasil em 2009 (SINAN, 2011). No entanto, considerando a percentagem de casos LMC somente da região SO de Santa Catarina (16,44%), essa taxa é quase 2.5 vezes maior do que a média nacional. Dada a associação significativa entre a origem do caso e forma clínica, essa percentagem mais elevada de casos LMC reflete a maior percentagem de casos importados da região SO. A maioria dos casos de LMC diagnosticados no presente estudo foram provenientes do estado de Mato Grosso, onde *L. (V.) braziliensis* foi confirmada como a espécie de *Leishmania* mais prevalente (CARVALHO et al., 2006). Entretanto, os dados do SINAN mostram uma média anual de 6,2% de casos de LMC no estado de Mato Grosso (SINAN, 2011).

A maior taxa de LMC na região SO e de casos de recidiva em casos importados pode ser devido a fatores relacionados à espécie e cepa de *Leishmania*, características clínicas dos pacientes e/ou fenômenos epidemiológicos que causam viés.

L. (V.) braziliensis foi a principal espécie do parasito encontrada no presente estudo e representa a espécie mais comumente associada com a forma clínica mucosa no Brasil (SILVEIRA, LAINSON, CORBETT, 2004; REITHINGER et al., 2007; LAINSON, 2010; GUERRA et al., 2011). Além de ter uma associação exclusivamente com espécies do subgênero *Viannia*, evidências recentes têm sugerido uma associação de LMC com um vírus de RNA (*Leishmania* RNA virus- LRV1) (HARTLEY et al., 2012; ZANGGER et al., 2013). Embora a investigação específica desse vírus não tenha sido conduzida, não podemos excluir a possibilidade da circulação do LRV1 na região SO do Estado.

A falha terapêutica, devido à resistência ao tratamento com glucantime em *L. (Viannia)* que infecta o paciente, tem sido reportada em outros estudos (AREVALO et al., 2007; SOUZA et al., 2010). A taxa mais elevada de LMC no SO pode ser devido à presença de uma cepa específica de *L. (V.) braziliensis* que tenha sido importada do Mato Grosso com os migrantes. No entanto, nenhuma ligação definitiva foi confirmada entre a espécie ou cepa da *Leishmania* com a gravidade da doença e/ou LMC. Muitos especialistas, mesmo aqueles que insistem numa associação genética, apoiam a hipótese de que esses desfechos parecem ser dependentes de fatores do hospedeiro (HARTLEY et al., 2012).

Estudos têm mostrado que o tratamento imuno-supressor e o estresse podem desencadear uma reativação de parasitos mesmo naqueles anteriormente menos virulentos e proporcionar o aparecimento de formas mucocutâneas (TRAVI, REY-LADINO, SARAVIA, 1988; TRAVI, OSORIO, SARAVIA, 1996; MOTTA et al., 2003; MIRZABEIGI et al., 2006; RNET, BEVERLEY, FASEL, 2011). Assim, o estresse provocado pela migração e trabalho rural pode ser um fator contribuinte para a maior incidência da forma mucocutânea neste grupo de pacientes. Dados confiáveis sobre co-morbidades, como o HIV, não estavam disponíveis para este estudo, e seriam uma adição valiosa para futuros estudos deste tipo.

Um estudo realizado por Machado-Coelho et al. (2005) mostrou que, entre os indivíduos com mais de 22 anos, o risco de leishmaniose mucosa aumentou significativamente (de 1.9 para 9.6), quando o estado nutricional diminuiu, em comparação com os pacientes mais jovens e

bem nutridos. Nossos resultados mostram que pacientes portadores de LMC com idade superior a 50 anos apresentaram uma chance de recidiva de 30%, a mais alta probabilidade prevista de todos os fatores investigados neste estudo, sendo fatores de confundimento na associação de caso importado com recidiva. Tal comparação sugere que ser um caso importado, pode agir como uma variável *proxy* (representante) para o estado nutricional e que casos importados podem sofrer uma pior evolução da doença, devido à sua má nutrição, justificada por se tratar de uma população deslocada.

Além da influência dos fatores do parasito e hospedeiro no desfecho do caso, vários fenômenos epidemiológicos podem estar causando viés nos dados que dão a aparência de uma taxa mais elevada, nesses casos, do que realmente existe. Casos rurais têm a desvantagem de menor acesso aos cuidados de saúde, bem como aos serviços de saúde especializados disponíveis nas cidades. Portanto, esses casos podem esperar por intervalos de tempo mais longos para o atendimento, e, desse modo, a doença pode avançar para uma forma mais grave. Por outro lado, portadores de formas menos graves podem nunca procurar os serviços de saúde e, como as lesões podem se autocurar sem tratamento, esses casos não são notificados ao SINAN.

Em um estudo realizado por Herwaldt et al. (1992), na Guatemala, foi demonstrado que *L. (V.) braziliensis* tem uma taxa de placebo relativamente baixa, bem como a taxa baixa de autocura, em comparação com *L. (L.) mexicana*. No estudo, das 25 lesões causadas por *L. (L.) mexicana*, 22 (88%) foram reepitelizadas e 18 (68%) foram consideradas curada ou possivelmente curada, enquanto das 32 lesões de *L. (V.) braziliensis*, apenas sete (22%) foram reepitelizadas e duas (6%) foram consideradas curadas após um ano e nove meses de acompanhamento (HERWALDT, ARANA, NAVIN, 1992). Outros estudos têm mostrado maiores taxas de placebo variando de 37% (17/46) e 38% (9/24) por *L. (V.) panamensis* (VELEZ et al., 1997; SOTO et al., 2004). Em outro estudo conduzido na Bolívia, onde as espécies de *Leishmania* identificadas em 30 pacientes foram *L. (V.) braziliensis* (14), *L. (V.) lainsoni* (2), *L. (V.) guyanensis* (1) e 13 sem a espécie identificada, 17% (5/30) dos pacientes que receberam um creme placebo progrediram para auto-cura (SOTO, 2013). Assumindo uma taxa conservadora de 6% de auto-cura para *L. (V.) braziliensis* para os 542 casos notificados em Santa Catarina, aproximadamente 35 casos adicionais teriam sido autocurados e não foram relatados, portanto, não incluídos em nosso estudo. A amostragem do presente estudo não foi representativa de todos os casos registrados e não-registrados no Estado,

e por isso, a possibilidade da presença de outras espécies permanece. Assim, considerando que as outras espécies têm maior taxa de autocura, é ainda mais provável que pacientes infectados por outras espécies de *Leishmania* autocuraram e não foram relatados. Além disso, os profissionais da saúde em áreas mais rurais podem estar menos propensos a ter conhecimento sobre a presença da leishmaniose no Estado e podem tratar a doença como uma infecção por fungos ou bactérias.

Dessa forma, esses casos podem não ser notificados até que progridam para formas mais graves e os pacientes sejam forçados a procurar diagnóstico em serviços mais especializados. Isso pode implicar em um menor número de relatos de casos menos graves, causando uma distorção na taxa final. Até que um estudo de caso-controle específico seja realizado nessas populações, a fonte dessas taxas mais elevadas permanecerá como especulação. No entanto, este estudo fornece um novo fator de risco que é de ser um caso importado. Esta informação é de aplicação prática, especialmente aos profissionais médicos que devem incluir esta informação em suas avaliações do paciente, na decisão do curso do tratamento e no acompanhamento, uma vez que pacientes migrantes são mais propensos a recidiva ou evoluírem com uma forma mais grave.

A LTA vem mostrando uma mudança no cenário epidemiológico, passando de um padrão de transmissão eminentemente rural até a década de 1980 para um padrão de transmissão perirubano e urbano, principalmente na região Sudeste do Brasil (PASSOS et al., 1999; CAMPBELL-LENDRUM et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2009; SINAN, 2011). Em Santa Catarina, onde a LTA é registrada há cerca de 25 anos, os casos da doença eram, em sua maioria, de origem rural até a década de 1990 (SINAN, 2011). No entanto, uma mudança nesse padrão de transmissão rural para urbano tem sido observada na última década. Isso fica mais evidenciado na região NE, que atualmente é a área endêmica mais importante, onde 78% dos casos de LTA resultam de transmissão urbana, seguindo a tendência de aumento na urbanização da doença.

Este estudo não pode concluir a competência vetorial no ambiente doméstico nas regiões estudadas e, portanto, não podemos confirmar se todos os casos urbanos resultam de transmissão urbana ou se parte deles pode ser decorrente do contato do paciente com o vetor nas áreas rurais de transmissão. No entanto, a proporção relativamente maior na região NE de casos de LTA em mulheres e crianças com menos de 10 anos de idade sugere a existência de um ciclo de

transmissão peri-doméstico ou doméstico estabelecido. No estado do Paraná, 59,2% de todos os casos LTA notificados entre 1987-2004 têm sido relatados como urbanos (MONTEIRO et al., 2009). No período entre 2001-2006, 75% dos 80 casos LTA notificados no Rio Grande do Sul foram identificados como urbanos (SINAN, 2011). Todavia, com 78,08% de casos urbanos e 5,80% de casos peri-urbanos, o presente estudo revelou que Santa Catarina atualmente representa o estado com uma das maiores taxas de casos urbanos de LTA no Brasil (SINAN, 2011). Ainda, o mapeamento de casos de LTA tem demonstrado aglomerados em torno de centros urbanos em áreas com intenso crescimento imobiliário.

A sazonalidade observada no mês do diagnóstico dos casos de LTA foi diferente entre as regiões NE e SO. Os dois meses com o maior número de casos de LTA, fevereiro e outubro, coincidem com a alta temporada de turismo na região NE do Estado, resultando das atividades de Carnaval e Oktoberfest, respectivamente. Durante esses meses, a população nessas cidades é capaz de quase quadruplicar, e atraem milhares de turistas a cada ano (SANTUR, 2012). Isso pode ter implicações sérias para a saúde pública, uma vez que uma maior taxa de casos ativos combinado com um fluxo intenso de população tem o potencial de aumentar a taxa de transmissão (maior taxa de hospedeiros suscetíveis) e pode resultar na dispersão geográfica da leishmaniose quando os migrantes retornarem aos seus locais de origem. O turismo tem sido reconhecido como um fator importante no aumento global da incidência e surtos de LTA (REITHINGER, DUJARDIN, 2007). Assim, dado que a sazonalidade calculada aqui é baseada na incidência, ou seja, quando o paciente foi diagnosticado, ela não fornece a sazonalidade de quando os casos são mais susceptíveis de serem infectados com o parasita.

O período de incubação de LTA pode variar de dois a 78 dias (SANCHEZ et al., 1992) até 11-16 meses (VERALDI, 2011) e depende da espécie de *Leishmania* e da resposta imunológica do hospedeiro (AWASTHI, MATHUR, SAHA, 2004). A data da infecção não pode ser inferida a partir da data do diagnóstico, já que os pacientes ainda podem esperar para procurar tratamento em taxas diferentes, dado que as lesões podem durar de semanas até meses (REITHINGER et al., 2007; SOTO, 2013). Este estudo provou que existe uma sazonalidade da doença em SC, mas um estudo separado é necessário para determinar a sazonalidade das taxas de infecção, o que seria uma ferramenta importante para o controle da LTA no Estado.

De forma geral, o padrão da doença é diferente entre as regiões NE e SO. Assim, medidas de controle para evitar adequadamente a expansão contínua de LTA e futuros surtos em Santa Catarina requerem estratégias de controle e abordagens de tratamento adaptadas para cada região separadamente, ao contrário da implementação de um programa estadual ou nacional uniforme.

As espécies encontradas no presente estudo foram concordantes com aquelas encontradas em um estudo anterior, que identificou *L. (L.) amazonensis* em dois isolados do primeiro surto, em 1987, na Região Oeste; *L. (V.) braziliensis* em um isolado da região oeste, em 1996; e em um da região nordeste, em 1997 (GRISARD et al., 2000). No entanto, no presente estudo, *L. (V.) braziliensis* foi a espécie predominante na região e responsável pela emergência da doença em Santa Catarina.

Dados da literatura mostram que *L. (V.) braziliensis* é a espécie mais amplamente distribuída no Brasil (LAINSON, SHAW, 1987; BAÑULS, HIDE, PRUGNOLLE et al., 2007; LAINSON, 2010). É interessante notar que *L. (L.) amazonensis* também foi identificada neste estudo em dois casos autóctones, apesar de não existir nenhum registro de vetores conhecidos da espécie no Estado, sendo as espécies de flebotomíneos *Lutzomyia (Nyssomyia) flaviscutellata*, *Lu. (N.) olmeca* e *Lu. (N.) reducta* (LAINSON, 2010). Em um estudo anterior realizado na região NE no município de Balneário Piçarras, *Lu. (N.) neivai* foi a espécie mais abundante e pela primeira vez encontrada naturalmente infectada por *L. (V.) braziliensis*, sugerindo sua participação no ciclo de transmissão de LTA em Santa Catarina (MARCONDES et al., 2009). Outras espécies observadas em Santa Catarina foram *Lu. (Pintomyia) fischeri* e *Lu. (Psychodopygus) ayrozai* (MARCONDES et al., 2005). Os estudos sobre as espécies de flebotomíneos realizado em Blumenau, Itapema, Balneário Camboriú e Piçarras, durante e após o surto em 2005-2006, demonstrou que *Lu. (N.) neivai* foi a espécie mais abundante nos locais próximos aos casos confirmados, mas não investigaram a infecção natural por *Leishmania* em flebotomíneos coletados (MARCONDES et al., 2005; TORMEN, DO NASCIMENTO, 2006; PORTES, 2008). Estudos semelhantes realizados no Rio Grande do Sul (GONÇALVES, 2003) e Paraná (MEMBRIVE et al., 2004; NEITZKE et al., 2008) demonstraram *Lu. (N.) neivai* como um vetor potencial de LTA dado sua elevada densidade em locais onde casos humanos foram registrados acrescido da observação de infecção natural por *Leishmania* em um flebotomíneo de *Lu. whitmani* (NEITZKE et al., 2008).

Vários modelos de previsão de mudança climática avaliados em 2003 demonstraram a possibilidade de aumentar as condições

ambientais favoráveis para *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia* e *Lu. migonei* no Sul do Brasil (PETERSON, SHAW, 2003). Todas as três espécies de flebotomíneos são vetores comprovados de *L. (V.) braziliensis* em diferentes regiões do Brasil (LAINSON, 2010). O aumento no número de vetores atuais de LTA e o estabelecimento das outras espécies de flebotomíneos no Sul do Brasil poderiam levar a um aumento na incidência da doença, bem como o potencial para o estabelecimento de ciclos de transmissão para outras espécies de *Leishmania*.

Em relação aos reservatórios, em um estudo realizado durante o surto de leishmaniose visceral canina no distrito de Lagoa da Conceição, Florianópolis em 2010, a investigação da infecção por *Leishmania* sp. em 40 pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos (roedores e marsupiais) coletados na região, somente um indivíduo foi positivo para *Leishmania* através da PCR de amostra de fígado (JANSEN et al., 2010). No entanto, nenhum animal apresentou culturas positivas e todos foram negativos no exame sorológico (JANSEN et al., 2010). Isso significa que, apesar de transmissão humana continuada de LTA em Florianópolis e da existência de um ciclo de transmissão silvestre ou sinantrópico definitivo, as espécies de vetores envolvidos e os reservatórios naturais de *Leishmania* spp. necessitam ser elucidadas.

Os resultados da análise de sequências multilocus (MLSA) mostram que o surgimento de *L. (V.) braziliensis* no estado de Santa Catarina parece ser um evento recente, visto a elevada homogeneidade genética das cepas analisadas. Essa conclusão é baseada nos pressupostos do modelo de equilíbrio de populações de Hardy-Weinberg, que estabelece que, se não houver mecanismos de pressão evolutiva (a migração dentro ou fora da população e mutação durante um longo período de tempo) agindo sobre uma dada população, as frequências de genes tenderão a permanecer inalteradas (WEINBERG, 1908; JAMESON, 1977). Assim, durante o período de estudo, as amostras permaneceram em grande parte não influenciadas por cepas de fora, permanecendo como sua própria população aparentemente única. Isso poderia ser devido a um ciclo de transmissão específico em que as outras espécies e/ou cepas da *Leishmania* não se incorporam facilmente, removendo a possibilidade de recombinação, embora a maior força seletiva sobre as populações de *Leishmania* ocorre no hospedeiro invertebrado, durante o desenvolvimento do parasito no trato digestório do vetor (LAINSON, SHAW, 1987) Da mesma forma, a menor amplitude de hospedeiros naturais (reservatórios e espécies vetorais), também pode influenciar positivamente para uma maior homogeneidade genética das populações do parasito.

Essas informações sobre a variabilidade genética dos parasitos podem ser de grande relevância para a saúde pública visando ao controle da transmissão. Considerando a elevada homogeneidade genética das cepas de *L. (V.) braziliensis* em Santa Catarina, que até agora não tem mostrada resistência ao tratamento específico, espera-se que o controle do LTA em uma região com cepas do parasito geneticamente homogêneas seja muito mais eficiente do que em regiões onde a heterogeneidade genética do parasito é elevada e com um ciclo de transmissão complexo.

Na análise BURST, as cepas foram agrupadas em três complexos clonais, onde as amostras dos estados da região Amazônica se apresentaram como tipos de sequências únicos, demonstrando um alto nível da heterogeneidade em comparação com as amostras das regiões litorâneas, especialmente aquelas de Santa Catarina. É provável que, enquanto a análise BURST permitiu que essas amostras não se agrupassem em nenhum CC, a análise da STRUCTURE forçou o agrupamento dessas amostras dentro de uma população, como demonstrado pela associação significativa entre CC e POP ($p < 0.0001$), em que a POP1 é composta por cepas com tipos de sequências únicos. Essa alta heterogeneidade é característica de amostras do bioma amazônico como foi observado anteriormente em outros estudos, e parece refletir uma maior variedade de hospedeiros e vetores na região (GOMES et al., 1995; CUPOLILLO et al., 2003).

A MLSA utilizando o painel de seis marcadores foi capaz de distinguir as características epidemiológicas entre as cepas de *L. (V.) braziliensis*. A MLSA foi compatível com a variável de origem de caso para isolados de Santa Catarina em todas as três análises de STRUCTURE, BURST e Rede *Median-joining*, demonstrando o potencial desse método para a investigação de surtos futuros. Tal como no caso do isolado 605, a caracterização molecular mostrou uma ferramenta mais confiável do que a entrevista epidemiológica para determinar se um caso adquiriu a infecção fora de uma região ou localmente. Isto mostra que a metodologia possui um poder discriminatório para diferenciar casos importados e autóctones e identificar cepas específicos de uma dada região. Além disso, o presente estudo mostrou que esta técnica tem o poder discriminatório para diferenciar as cepas dentro de um local tão específico quanto uma mesorregião de um estado. O conhecimento sobre a origem de um caso é importante para prever seu desfecho, como foi demonstrado neste estudo onde os casos importados foram mais propensos à recidiva. Em outros estudos o desfecho do caso foi relacionado com as características

específicas do parasito que infecta o paciente (AREVALO et al., 2007; SOUZA et al., 2010).

Nessa mesma linha, a MLSA mostrou uma associação significativa entre a população (genótipo) e a forma clínica entre todas as amostras do Brasil avaliadas em nosso estudo ($p= 0,0296$). No entanto, o presente estudo só incluiu um total de sete casos da forma mucocutâneas. Um estudo envolvendo uma amostragem maior desses casos é necessário para que conclusões definitivas possam ser feitas. A identificação de um marcador genético de virulência de *Leishmania* não tem sido feito até o presente (HARTLEY et al., 2012). Embora de um número limitado de amostras, esta metodologia pode ser promissora para identificar uma população específica de *L. (V.) braziliensis* relacionada com a forma mucocutânea que poderá ter um importante significado clínico e farmacológico.

Como nenhum conjunto de marcadores tem sido definido para o estudo das subpopulações dentro de uma dada espécie de *Leishmania*, os marcadores avaliados aqui poderiam ser definidos como potenciais candidatos para este tipo de estudo, especialmente para *L. (V.) braziliensis* que é a principal espécie causadora de LTA no Brasil. Curiosamente, os três novos marcadores, hsp70, MDHnc e MDHmt, foram os mais polimórficos dos seis marcadores, sugerindo que sua adição para os quatro marcadores previamente descritos foi um desenvolvimento importante para distinguir as subpopulações, aumentando consideravelmente o poder discriminatório da técnica. No seu conjunto, esses seis marcadores forneceram um poder discriminatório suficiente para distinguir entre as subpopulações de *L. (V.) braziliensis*, proporcionando uma abordagem mais direta e simples para a análise da estrutura populacional do que a análise mais complexa de MLMT. Um dos benefícios da MLSA é que ela permite a criação de um banco de dados nacional ou internacional de tipos de sequências para comparação global das cepas de *Leishmania* (SCHÖNIAN et al., 2008). O próximo passo será determinar a viabilidade e o poder discriminatório desses seis marcadores para outras espécies de *Leishmania*. Quatro dos marcadores (6PGD, MPI, ICD e Hsp70) provaram ser discriminatórios entre outras espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, incluindo *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) guyanensis* (BOITÉ et al., 2012; DA GRAÇA et al., 2012).

Com o recente aumento no desenvolvimento de marcadores genéticos polimórficos e novos métodos estatísticos para a análise deles, pode ser difícil escolher qual software é mais adequado para sua análise específica, dado que não existem diretrizes disponíveis atualmente

(HALKETT, SIMON, BALLOUX, 2005). Por essa razão, na MLSA, optamos por avaliar nossos resultados de MLSA sob diferentes perspectivas, usando softwares diversos de análise genética (BURST, STRUCTURE e Splitstree) para chegar a nossas inferências sobre a estrutura de subpopulação das amostras de *L. (V.) braziliensis* utilizados no presente estudo. A análise de BURST que é comumente utilizada para MLSA de organismos monoplóides, permitiu a compreensão da variabilidade genética das amostras. Como quase todas as amostras de Santa Catarina se encaixaram em um complexo clonal e o restante das cepas eram principalmente tipos de sequência únicos, podemos inferir que a população do Estado é bastante homogênea em comparação com o que observamos nas cepas de outros estados. A análise de STRUCTURE forçou todos as cepas a compor uma população, o que resultou no agrupamento de todos os tipos de sequência únicos dentro da própria população. Isso demonstra que, apesar da diversidade de cepas provenientes da região Amazônica, as cepas de Santa Catarina continuam geneticamente distintas das demais cepas. Estes dados sugerem, novamente, que o Estado de Santa Catarina tem sua própria população de *L. (V.) braziliensis*, o que reforça a hipótese do recente aparecimento do patógeno no Estado. Em outras palavras, as subpopulações dentro da POP1, como um todo, apesar da sua heterogeneidade, ainda são geneticamente mais distantes das cepas de Santa Catarina.

A rede *Median-joining* produzido no software Splitstree, embora demasiadamente complexa para a comparação de todas as cepas entre si, foi a melhor representação visual dos dados e permitiu, principalmente, a comparação das cepas de Santa Catarina com as cepas dos outros estados. Finalmente, a análise de F_{ST} e F_{IS} demonstrou que esses seis marcadores foram capazes de distinguir entre as subpopulações de *L. (V.) braziliensis*. A grande diferenciação genética entre POP2 (que continha cepas principalmente de Santa Catarina) e as outras duas populações, conforme indicado pelos valores de F_{ST} de >15 <20 , forneceu mais evidências estatísticas da diferenciação da população de Santa Catarina do resto das amostras brasileiras. Além disso, nosso estudo encontrou valores elevados de F_{IS} entre as subpopulações de *L. (V.) braziliensis*, que nega a hipótese da reprodução estritamente clonal entre as espécies de *Leishmania*. Altos valores de F_{IS} também foram encontrados em várias análises de tipagem de microssatélites multilocus para as espécies de *Leishmania*, incluindo um estudo de *L. (V.) braziliensis* de Bolívia e Peru (ROUGERON et al., 2009), um estudo de

L. (L.) infantum das cepas de Velho Mundo e Novo Mundo (KUHLS et al., 2011) e em um estudo das amostras de *L. (L.) donovani* na Etiópia (GELANEW et al., 2010). Nesses estudos, possíveis explicações para os altos valores de F_{IS} foram a presença de uma quantidade considerável da endogamia e/ou subestruturação da população, refletindo um possível efeito de Wahlund. Ambos são prováveis causas dos altos valores do presente estudo, dada a distância geográfica entre as cepas dentro das mesmas populações (POPs).

Em conclusão, a utilização de todas as três análises, quando estejam disponíveis, fica como uma recomendação resultante deste trabalho.

A utilização da técnica de kDNA PCR-RFLP para o diagnóstico e caracterização da espécie de *Leishmania* em estudos que envolvem um grande número de amostras de uma dada espécie tem sido discutida tendo em vista a possibilidade de contaminação cruzada das amostras devido à elevada quantidade de cópias do kDNA, o pequeno tamanho do fragmento amplificado de 120 pb e a menor especificidade do que outros métodos moleculares de caracterização (BENSOUSSAN et al., 2006). Para validar o uso desse método como um método de rastreio no presente estudo, as amostras utilizadas na MLSA foram submetidas à PCR-RFLP de hsp70. Os resultados de PCR-RFLP da hsp70 foram consistentes com os resultados de PCR-RFLP de kDNA para essas amostras. No entanto, é importante ressaltar que uma amostra considerada *L. (L.) amazonensis* por PCR-RFLP de hsp70 foi anotada como questionável e potencial contaminação cruzada na PCR-RFLP de kDNA, dado que a amostra apresentou bandas de *L. (L.) amazonensis*, bem como bandas para *L. (V.) braziliensis*, sendo anteriormente excluída na contagem inicial dos casos de *L. (L.) amazonensis* no Estado. Somente após a confirmação por PCR-RFLP de hsp70 foi incluída na contagem final como um caso de *L. (L.) amazonensis*.

Esses resultados indicam que nos estudos para o rastreio de *Leishmania*, especialmente em áreas que têm principalmente uma espécie presente, pelo menos dois métodos distintos devem ser utilizados para garantir resultados precisos e conclusivos. O protocolo do Laboratório de Protozoologia foi atualizado para incluir PCR-RFLP de hsp70 como um teste confirmatório para caracterização das espécies de *Leishmania* tanto na biópsia, bem como nas amostras de cultura, seguindo os métodos desenvolvidos por da Graça et al. (2012).

Uma limitação importante de nosso estudo foi a possibilidade de subnotificação de LTA. Como a leishmaniose não é reconhecida

como uma doença endêmica em Santa Catarina, muitos médicos não têm conhecimento de sua presença e a doença geralmente não é incluída no diagnóstico diferencial. Essa tendência dos profissionais de saúde em assumir que a leishmaniose não é endêmica no Estado pode ter sido demonstrada pela classificação de origem do caso do isolado 605, que foi coletado a partir de um caso de 2009, como importado, embora a amostra tenha sido idêntica por MLSA com a cepa de *L. (V.) braziliensis* endêmica na região e, portanto, é muito provável que esse caso fosse autóctone.

Alguns casos podem ter sido tratados como infecções bacterianas ou fúngicas e/ou mesmo terem evoluído para autocura e não foram notificados ao SINAN, particularmente aqueles em áreas rurais onde o acesso aos cuidados de saúde é mais restrito, como foi explicado acima na discussão das taxas de autocura e de placebo. No entanto, isso só vem a corroborar o objetivo principal deste estudo que visa provar a emergência da doença no Estado e sugere que o problema da leishmaniose pode ser ainda maior do que a evidência atual demonstra. Estudos futuros devem abordar a avaliação e/ou incluir casos não notificados em seus desenhos, dado que as características desses casos podem ser diferentes dos casos notificados. Além disso, uma falta de representatividade da população dos pacientes de LTA na amostragem das amostras de biópsia e cultura provou ser o maior obstáculo deste estudo, particularmente na análise de MLSA. Vários fatores, incluindo aqueles relacionados com dados demográficos do paciente, instituição (posto de saúde, unidade de pronto atendimento ou hospital) onde o paciente foi atendido, a rotatividade de profissionais de saúde, localização da residência do paciente, as espécies ou cepas de *Leishmania*, ou se a amostra foi coletada de forma adequada, afetam de maneira direta a qualidade da amostra clínica recebida pelo laboratório de referência. Tais fatores têm implicações importantes no resultado do diagnóstico via PCR, bem como no isolamento da amostra. Por exemplo, pacientes com cepas mais virulentas, ou que residem em áreas urbanas, são mais propensos a procurar tratamento ou um centro de referência de diagnóstico da leishmaniose e, dessa forma, essas amostras têm maior chance de serem coletadas. Por outro lado, pacientes que residem em áreas rurais têm maior dificuldade de acesso aos serviços de saúde e, conseqüentemente, essas amostras não são coletadas. Sem contar que as amostras que são mais facilmente cultivadas devido a vários fatores associados com o hospedeiro (carga parasitária em particular), a cepa e/ou espécie são mais estudadas.

Outro fator que pode influenciar se uma amostra seria caracterizada é a capacidade de crescimento em cultura dos parasitos. De forma geral, isolados de *L. (L.) amazonensis* são mais facilmente cultivados do que isolados de *L. (V.) braziliensis*, que via de regra são mais difíceis de cultivar e, em alguns casos, não crescem, mesmo em meios de cultura enriquecidos.

Assim, no presente estudo, as amostras que foram mais facilmente cultivadas podem não ser representativas do Estado e tendem a ser provenientes de zonas urbanas de regiões próximas ao laboratório de referência, de regiões em que o surto inicial ocorreu (dado que mais atenção foi dada por médicos na época) e coletadas entre o período de 2005-2009, após o surto no Vale do Itajaí.

Sem um método de amostragem ativo e adequado, utilizando apenas uma amostragem conveniente, não é possível concluir se essas características são típicas de casos de LTA no Estado ou fatores de risco para aquisição de LTA. Portanto, o MLSA, que inclui apenas as amostras que foram capazes de serem isoladas em cultura, não é capaz de fornecer conclusões epidemiológicas significativas sobre as características de todos os pacientes de LTA no Estado. No entanto, os resultados da MLSA são importantes para o estudo de LTA no Estado dado que as amostras caracterizadas são provenientes da região com a maior incidência, com a mais alta taxa de transmissão urbana das principais áreas endêmicas.

Adicionalmente, as cepas utilizadas neste estudo foram depositadas no CLIOC e podem ser incluídas em estudos futuros de outros laboratórios, auxiliando na compreensão de como as cepas de SC se relacionam às cepas de outros estados e de outros países.

Recentemente nosso grupo de pesquisa concluiu um estudo sobre um surto de leishmaniose visceral canina autóctone no município de Florianópolis e nos próximos meses estará finalizando um segundo estudo de casos importados de LV em humanos. Estudos moleculares são de grande importância no monitoramento de surtos de leishmaniose visceral e um sistema de vigilância ativa que incorpora métodos de genotipagem é necessário para garantir que a leishmaniose visceral humana não se torne endêmica também.

Santa Catarina não tem sido amplamente reconhecida como um estado endêmico para leishmaniose, dificultando a busca do apoio financeiro para pesquisa científica e para o desenvolvimento de programas de controle. Considerada secundária a outros agravos de saúde com maior mortalidade e morbidade, a notificação de casos de leishmaniose pode ser demorada, impedindo a possibilidade de

intervenção precoce em surtos. Considerando que a LTA continua se expandindo no estado de Santa Catarina, os esforços para investigação dos fatores envolvidos na transmissão da doença e na possível ocorrência de surtos, incluindo a determinação de espécies vetoras e reservatórios naturais, são necessários para o desenvolvimento de intervenções e estratégias de controle. Além disso, a LTA requer um regime de tratamento prolongado (MITROPOULOS, KONIDAS, DURKIN-KONIDAS, 2010) e a ocorrência de surtos pode resultar em dificuldades para o sistema público de saúde.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados do presente estudo nos permite concluir que:

- A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica recente no estado de Santa Catarina, Sul do Brasil, e o relato continuado de casos autóctones fornece evidências de um ciclo de transmissão estabelecido;
- Na região Sudoeste (SO) do estado de Santa Catarina, os casos são dispersos e principalmente importados, enquanto que na região Nordeste (NE) os casos se concentram em três zonas urbanas principais;
- A alta taxa de recidiva em casos importados, bem como o alto índice de casos da forma mucocutânea na região SO é um importante problema para saúde pública;
- Santa Catarina é um dos estados brasileiros com a maior taxa de casos urbanos de LTA sugerindo a existência de um ciclo de transmissão doméstico ou peri-doméstico;
- Embora *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* têm sido identificadas em casos autóctones, *L. (V.) braziliensis* foi a espécie predominante na região e responsável pela emergência da doença em Santa Catarina;
- A análise de sequências multilocus (MLSA) revelou padrões epidemiológicos distintos entre as cepas de *L. (V.) braziliensis* dos doze estados brasileiros, demonstrando o potencial da técnica como ferramenta epidemiológica;
- A elevada homogeneidade genética das cepas de *L. (V.) braziliensis* analisados sugere que o aparecimento da LTA no estado de Santa Catarina em casos humanos é um evento recente.

REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 12, p. 552-7, dez 2006.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, jan 2012.
- ARAÚJO FILHO, N.A. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana na ilha Grande**. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1978.
- AREVALO J., et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 195, p. 1846-1851, jun 2007.
- ASHFORD, R. W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, v. 14, p. 523-32, set 1996.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269-1281, nov 2000.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R.M.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v. 119, p. 238-258, jun 2004.
- BANDELT, H.J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol**, v. 16, n. 1, p. 37-48, jan 1999.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol**, v. 64, p. 1-109, 2007.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, v. 44, p. 536-546, maio 1991.

BARRAL, A. et al. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **Int J Dermatol**, v. 34, n. 7, p. 474-9, jul 1995.

BARRETO, M.L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **The Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-1889, maio 2011.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1435-1439, abr 2006.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, out 2008.

BOITÉ, M.C. et al. New insights on taxonomy, phylogeny and population genetics of *Leishmania (Viannia)* parasites based on Multilocus Sequence Analysis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 11, p. e1888, nov 2012.

CAMPBELL-LENDRUM, D. et al. Domestic and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis: changing epidemiological patterns present new control opportunities. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 159-162, fev 2001.

CARVALHO M.L. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the prevalent species infecting patients with tegumentary leishmaniasis from Mato Grosso State, Brazil. **Acta Trop**, v. 98, n. 3, p. 277-285, jul 2006.

CHANCE, M.L.; GARDNER, P.J.; PETERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania* as an ecological tool. Colloques Internationaux de Centre National de la Recherche Scientifique, n. 239, **Ecologie dès leishmanioses**, p. 53-62.

CHANCE, M.L.; WALTON, B.C. **Biochemical characterization of *Leishmania***. Geneva: UNDP/World Bank/WHO, p. 275-280, 1982.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 873-882, nov 2007.

COSTA, C.H. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania chagasi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 66, n. 4, p. 334-7, abr 2002.

CUPOLILLO, E.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G.J.R. genetic diversity in natural populations of New World *Leishmania*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 5, set 1998.

CUPOLILLO, E. et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 7, p. 3126-3132, jul 2003.

DA GRAÇA, G.C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664-74, ago 2012.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, p. 139-146, nov 2007.

DA SILVA, L.A. et al. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 1, p. 77-83, jan 2010.

DAVIES, C.R. et al. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad Saúde Publica**, v. 16, p. 925-950, out-dez 2000.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305-18, set 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clin Dermatol**, v. 14, n. 5, p. 417-23, set-out 1996.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans Royal Soc Trop Med Hyg**, v. 95, p. 239-43, maio-jun 2001.

DIERINGER, D.; SCHLÖTTERER, C. Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, n. 1, p. 167-169, 2002.

EARL, D.A.; VONHOLDT, B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EBERT, F. Charakterisierung von *Leishmania donovani*-Stämmen mit der Disk-Elektrophorese. **Z Tropenmed Parasitol**, v. 24, p. 517-524, 1973.

EBERT, F. Elektrophoretische Untersuchungen an *Leishmania tropica*-Stämmen. **Z Tropenmed Parasitol**, v. 25, p. 49-53, 1974.

FAKHAR, M. et al. Asymptomatic human carriers of *Leishmania infantum*: possible reservoirs for Mediterranean visceral leishmaniasis in southern Iran. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 102, n. 7, p. 577-83, oct 2008.

FALQUETO, A. et al. Epidemiological and clinical features of *Leishmania (Viannia) braziliensis* American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in the State of Espírito Santo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 1003-1010, dez 2003.

FEIL, E.J. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol**, v. 186, n. 5, p. 1518-30, mar 2004.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. São Paulo: Edgard Blucher, p. 658, 1973.

GARDENER, P.J.; CHANCE, M.L.; PETERS, W. Biochemical taxonomy of *Leishmania*. II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 68, n. 3, p. 317-325, set 1974.

GELANEW, T. et al. Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different Ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e889, nov 2010.

GOMES, R.F. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: genetic relationships between strains isolated from different areas of Brazil as revealed by DNA fingerprinting and RAPD. **Exp Parasitol**, v. 80, n. 4, p. 681-7, jun 1995.

GONÇALVES, R.D. Identificação da Fauna de Flebotomíneos em Função de Casos Autóctones de LTA. **Boletim Epidemiológico**. Equipe de controle epidemiológico - Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal de Saúde de Porto Alegre. n. 21, ano V, nov 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n.4, p. 419-433, abr 2010.

GRISARD, E.C. et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 74, p. 89-93, jan 2000.

GUERRA, J.A. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 3, p. e980, mar 2011.

HALKETT, F.; SIMON, J.C.; BALLOUX, F. Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. **Trends Ecol Evol**, v. 20, p. 194-201, abr 2005.

HARTLEY, M.A. et al. *Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 99, jul 2012.

HERWALDT, B.; ARANA, B.; NAVIN, T. The natural history of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J Infect Dis**, v. 165, p. 518-27, mar 1992.

HIDE, M. et al. Parasitic genotypes appear to differ in leishmaniasis patients compared with asymptomatic related carriers. **Int J Parasitol**, v. 43, n. 5, p. 389-97, abr 2013.

HOTEZ, P.J. et al. Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 871-878, mar 2004.

HOTEZ, P.J. et al. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. **PLoS Med**, v. 3, n. 5, p. e102, jan 2006.

HUSON, D. H.; BRYANT, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 2, p. 254-267, fev 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Estados: Santa Catarina**. 2010.

Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>

Acesso em: 25 jun 2012.

JAKOBSSON M, ROSENBERG NA. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v. 23, n. 14, p. 1801-6, jul 2007.

JAMESON, D.L. **Evolutionary Genetics: Benchmark Papers in Genetics 8**). Stroudsburg, PA: Dowden, Hutchinson and Ross, 1977.

JANSEN, A.M. et al. **Estudo da prevalência e perfis de infecção por *Leishmania* sp. em mamíferos silvestres e sinantrópicos na localidade Canto dos Araçás, município de Florianópolis/SC**. Relatório do Laboratório de Referência em Taxonomia e Diagnóstico de Reservatórios Silvestres das Leishmanioses, Florianópolis, Santa Catarina, 26 de set a 01 de out 2010.

KUHLS, K. et al. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 6, p. e1155, jun 2011.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. PETERS, W.; KELLICK-KENDRICK, R. (Eds). London: Academic Press, p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. The American leishmaniasis: some observations on their ecology and epidemiology. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 77, p. 569-596, 1982.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 1, n. 2, p. 13-38, jun 2010.

LEWIS, P.O.; ZAYKIN, D. **Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data**. Version 1.1. 2002. Disponível em: <http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/people/plewis/software.php>. Acesso em: 25 abr 2013.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, jun 2009.

LIMA FILHO, J.H.C.; STEINDEL, M. Aspectos clínicos e epidemiológicos da Leishmaniose Cutânea no Estado de Santa Catarina. **Arq Cat Med**, v. 27, n. 1-4, p. 25-31, jan-dez 1998.

MACHADO-COELHO, G.L. et al. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 99, n. 1, p. 55-61, jan 2005.

MACHADO-COELHO, G.L. et al. American cutaneous leishmaniasis in Southeast Brazil: space-time clustering. **Int J Epidemiol**, v. 28, n. 5, p. 982-9, out 1999.

MAIA, C; CAMPINO, L. Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? **Trends Parasitol**, v. 27, n. 8, p. 341-4, ago 2011.

MAIDEN, M.C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 3140-3145, mar 1998.

MARCONDES, C.B. et al. Phlebotomine sandflies in a focus of dermal leishmaniasis in the eastern region of the Brazilian State of Santa Catarina: preliminary results (Diptera: Psychodidae). **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 38, n. 4, p. 353-355, jul-ago 2005.

MARCONDES, C.B. et al. Natural infection of *Nyssomyia neivai* (Pinto, 1926) (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) by *Leishmania* (*Viannia*) spp. in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 103, n. 11, p. 1093-1097, nov 2009.

MARFURT, J. et al. Diagnostic genotyping of Old and New World *Leishmania* species by PCR-RFLP. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 46, p. 115-124, jun 2003.

MARSDEN, P.D. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 80, p. 859-876, 1986.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 153-162, maio 1993.

MAURICIO, I.L. et al. Towards multilocus sequence typing of the *Leishmania donovani* complex: resolving genotypes and haplotypes for five polymorphic metabolic enzymes (ASAT, GPI, NH1, NH2, PGD). **Int J Parasitol**, v. 36, p. 757-769, jun 2006.

MAYRINK, W. et al. Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce valley, state of Minas Gerais, Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 73, p. 123-137, abr 1979.

MEMBRIVE, N.A. et al. Flebotomíneos de municípios do norte do estado do Paraná, Sul do Brasil. **Entomol Vect**, v. 11, n. 4, p. 673-680, out-dez 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Dengue no Brasil: situação atual e atividades de controle e prevenção.

Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano02_n03_dengue_brasil_si.pdf

Acesso em: fev 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª Edição. Brasília, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Leishmaniose Tegumentar Americana: casos notificados.

Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/lta.def>

Acesso em: set 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, n. 2, p. 11-13, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância em Saúde**. Situação Epidemiológica da Malária no Brasil, Ano de 2007. Brasília, 2007.

MIRZABEIGI, M. et al. Reactivation of dormant cutaneous *Leishmania* infection in a kidney transplant patient. **J Cutan Pathol**, v. 33, n. 10, p. 701-4, out 2006.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 2, p. 309-22, ago 2010.

MONTEIRO, W.M. et al. Mobilidade populacional e produção da leishmaniose tegumentar americana no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 509-14, set-out 2009.

MOTTA, A.C. et al. Disseminated mucocutaneous leishmaniasis resulting from chronic use of corticosteroid. **Int J Dermatol**, v. 42, p. 703-706, set 2003.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p. 1561–1577, out-nov 2005.

NEITZKE, H.C. et al. Pesquisa de infecção natural de flebotômíneos por *Leishmania*, no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 17-22, jan-fev 2008.

OLIVEIRA, C.C.G. et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (CL) in Brazil: a disease of the urban–rural interface. **Acta Tropica**, v. 90, p. 155-162, abr 2004.

OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. An outbreak of American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) in a periurban area of Rio de Janeiro city, Brazil: clinical and epidemiological studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 4, p. 427-435, out-dez 1988.

PASSOS, V.M.A. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis in a periurban area of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 103-10, jan-mar 1993.

PASSOS, V.M.A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the state of Minas Gerais, south-east Brazil. **Acta Tropica**, v. 72, p. 251-258, abr 1999.

PASSOS, V.M.A.; FALCÃO, A.L.; KATZ, N. Urban American cutaneous leishmaniasis in the Metropolitan Region of Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 2, p. 243-4, abr-jun 1990.

PESSÔA, S.B.; MARTINS, A.V. **Parasitologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 79-80, 1982.

PETERSON, A.T.; SHAW, J. *Lutzomyia* vectors for cutaneous leishmaniasis in Southern Brazil: ecological niche models, predicted geographic distributions, and climate change effects. **Int J Parasitol**, v. 33, n. 9, p. 919-931, ago 2003.

PIRES MENEZES, M.L. Current trends of internal migration in Brazil. **Revista Electrónica de Geografía y Ciencias Sociales**. Universidad de Barcelona, v. 69, n. 45, 2000.

POCAI, E.A. et al. Visceral leishmaniasis (Kala-Azar). Five cases in dogs in Santa Maria, Rio Grande do Sul, South Brazil. **Ciência Rural**, v. 28, p. 501-505, jul-set 1998.

PORTES, M.G.T. **Vetores e perfil epidemiológico dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em Santa Catarina, 2001 a 2008**. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Curso de Especialização em Epidemiologia) - Departamento de Saúde Pública da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, jun 2000.

RAZERA, F.; DE OLIVEIRA BLANCO, L.F.; BONAMIGO, R.R. American cutaneous leishmaniasis: the first autochthonous cases reported in Rio Grande do Sul since 2001 and review of the literature. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 165-170, jul-set 2005.

REITHINGER, R.; DAVIES, C.R. Is the dog (*Canis familiaris*) a reservoir host of American Cutaneous Leishmaniasis? A critical review of the current evidence. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, p. 530-41, out 1999.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C. Molecular diagnosis of leishmaniasis: current status and future applications. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 1, p. 21-5, jan 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, p. 581-596, set 2007.

RIBEIRO DE OLIVEIRA, A.T.; ERVATTI, L.R.; CAETANO O'NEILL, M.M.V. Internal Migration: The panorama of population displacement in Brazil: PNADs and Demographic Census. **Reflexões sobre os deslocamentos populacionais no Brasil**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2011.

RICHARDSON, B.J., BAVERSTOCK, P.R., ADAMS, M. **Allozyme Electrophoresis**. Sydney: Academic Press, p. 403, 1986.

RONET, C.; BEVERLEY, S.M.; FASEL, N. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. **Virulence**, v. 2, p. 547–552, nov-dez 2011.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal**, v. 11, p. 1401, 1903.

ROUGERON, V. et al. “Everything you always wanted to know about sex (but were afraid to ask)” in *Leishmania* after two decades of laboratory and field analyses. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 8, p. e1001004, ago 2010.

ROUGERON, V. et al. Extreme inbreeding in *Leishmania braziliensis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 25, p. 10224-10229, jun 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 999, 2001.

SANCHEZ, J.L. et al. Epidemiologic investigation of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in a defined geographic focus of transmission. **Am J Trop Med Hyg**, v. 47, n. 1, p. 47-54, jul 1992.

SANTA CATARINA TURISMO- SANTUR. Secretaria de estado de Turismo, Cultura e Esporte do estado de Santa Catarina. **Estatísticas do Turismo Catarinense**.

Disponível em: <http://www.santur.sc.gov.br/estatistica-do-turismo-catarinense-santur.html>.

Acesso em: 25 nov 2011.

SANTRICH, C. et al. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 42, p. 51-55, jan 1990.

SARAVIA, N.G. et al. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, p. 714-720, jul 1985.

SÃO THIAGO, P.T.; GUIDA, U. Leishmaniose Tegumentar Americana no oeste do estado da Santa Catarina, Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, n. 4, p. 201-203, out-dez 1990.

SCHÖNIAN, G.; KUHLS, K.; MAURICIO, I.L. Molecular approaches for a better understanding of the epidemiology and population genetics of *Leishmania*. **Parasitology**, v. 138, p. 405-425, abr 2011.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends Parasitol**, v. 26, n. 10, p. 466-9, out 2010.

SCHÖNIAN, G. et al. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends Parasitol**, v. 24, n. 3, p. 135-142, mar 2008.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J Vector Borne Dis**, v. 45, p. 255-272, dez 2008.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, maio 2004.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis: placebo-controlled multicenter study. **Clin Infect Dis**, v. 38, p. 1266-72, maio 2004.

SOTO, J. et al. Intralesional antimony for single lesions of bolivian cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 56, n. 9, 1255-60, maio 2013.

SOUZA, A.S. et al. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF-alpha production. **BMC Infect Dis**, v. 10, p. 209, jul 2010.

SOUZA, G.D.; SANTOS, E.; ANDRADE FILHO, J.D. The first report of the main vector of visceral leishmaniasis in America, *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), in

the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1181-1182, dez 2009.

SPRATT, B.G. et al. Displaying the relatedness among isolates of bacterial species -- the eBURST approach. **FEMS Microbiol Lett**, v. 241, n. 2, p. 129-34, dez 2004.

STEINDEL, M. et al. Outbreak of autochthonous canine visceral leishmaniasis in Santa Catarina, Brazil. **Pesq Vet Bras**, v. 33, n. 4, abr 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, maio 2007.

THOMAZ-SOCCOL, V. et al. Casos aloctones de leishmaniose visceral canina no Paraná, Brasil: implicacoes epidemiologicas. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 18, n. 3, p. 46-51, jul-set 2009.

TORMEN, S.H.; DO NASCIMENTO, J.C. Levantamento de fauna flebotomínica relacionado ao surto de leishmaniose tegumentar americana em Blumenau – SC. **Setor de Suporte Laboratorial, Divisão de Vigilância de Vetores, Reservatórios e Outros, Gência de Controle de Zoonoses**, Diretoria de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde, Estado de Santa Catarina, Secretaria de Estado da Saúde, set 2006.

TRAVI, B.; REY-LADINO, J.; SARAVIA, N.G. Behavior of *Leishmania braziliensis* s.l. in golden hamsters: evolution of the infection under different experimental conditions. **J Parasitol**, v. 74, p. 1059-1062, dez 1988.

TRAVI, B.L.; OSORIO, Y.; SARAVIA, N.G. The inflammatory response promotes cutaneous metastasis in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*. **J Parasitol**, v. 82, p. 454-457, jun 1996.

TSUKAYAMA, P.; LUCAS, C.; BACON, D.J. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World *Leishmania*. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 355-362, fev 2009.

VAN EYS, G.J.J.M. et al. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Mol Biochem Parasitol**, v. 51, p. 133-142, mar 1992.

VELEZ, I. et al. Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis. A randomized, controlled trial. **Ann Intern Med**, v. 126, p. 232-6, fev 1997.

VERALDI, S. et al. Latency time in cutaneous leishmaniasis. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 146, n. 2, p. 159-61, abr 2011.

VICTOIR, K. et al. Direct identification of *Leishmania* species in biopsies from patients with American tegumentary leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 97, p. 80-87, jan-fev 2003.

VOLF, P.; PECKOVA, J. Sand flies and *Leishmania*: specific versus permissive vectors. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 3, p. 91-92, mar 2007.

VOLPINI, A.C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 90, p. 31-37, mar 2004.

WEINBERG, W. Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. Jahresh. Ver. Vaterl. Naturkd. **Württemb**, v. 64, p. 369–382, 1908.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. **WHO technical report series**, n. 949, mar 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Annex 3: Burden of disease in DALYs by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. **The World Health Report**. Geneva, p. 192-7, 2002.

WRIGHT, S. Variability within and among Natural Populations. **Evolution and the Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago Press. 1978.

YOSHIDA, E.L.A. et al. Human, canine and equine (*Equus caballus*) leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* (= *L. braziliensis*

braziliensis) in the south-west region of São Paulo State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 133-134, jan-mar 1990.

ZANGGER, H. et al. Detection of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n. 1, p. e2006, jan 2013.

ZEMANOVA, E. et al. The *Leishmania donovani* complex: genotypes of five metabolic enzymes (ICD, ME, MPI, G6PDH, and FH), new targets for multilocus sequence typing. **Int J Parasitol**, v. 37, p. 149-160, fev 2007.

APÊNDICE A – Dados dos pacientes dos isolados de MLSA

Estado, cidade, e forma clínica dos isolados incluídos na MLSA.

Estado	Cidade	Total	Cutânea	Muco- cutânea	Dissem- inada	ND
Acre		2				
	Cabeceira do Rio					
	Acre		1			
	Seringal Macapá		1			
Amazonas		3				
	Manaus		3			
Bahia		16				
	Presidente					
	Tancredo		10	4	1	
	ND		1			
Ceará		1				
	Aquiraz					1
Espírito Santo		1				
	Viana		1			
Mato Grosso		3				
	Cuiabá					3
Pará		6				
	Belém		1			
	Mojuí dos Campos		1			
	Prainha		1			
	Santarém		3			
Paraíba		1				
	ND		1			
Pernambuco		11				
	Amaraji		2	2		
	Moreno		2			
	Paudalho		2			
	Recife		1			
	ND		2			
Rio de Janeiro		6				
	Mesquita		1			
	Niterói			1		
	Rio de Janeiro		1			
	Teresópolis		1			
	ND		2			
Rondônia		3				
	Porto Velho		1			1
	Vilhena		1			

A tabela continua na próxima página.

Estado	Cidade	Total	Cutânea	Muco- cutânea	Dissem- inada	ND
Santa Catarina		34				
	Águas de Chapecó		1			
	Balneário					
	Camboriú		3			
	Blumenau		12			
	Brusque		2			
	Camboriú		2			
	Florianópolis		8			
	Itajaí		1			
	Itapema		1			
	Luiz Alves		1			
	Rio do Sul				1	
	Videira		1			
	Xaxim		1			
ND		1				
	ND					1

Fonte: autor.

ND - Não determinada

APÊNDICE B – Dados adicionais dos pacientes de Santa Catarina de MLSA

Dados dos isolados (informações clínicas e demográficas dos patients) de *L. (Viannia) braziliensis* de Santa Catarina utilizado na MLSA.

No. de Amostra	Ano	Gênero	Evolução	Origem	Estado do Origem (Importados)
78	2005	M	Curado	Importado	MT
114	2005	F	Curado	Autóctone	
119	2006	M	Curado	Autóctone	
126	2006	M	Curado	Autóctone	
128	2006	F	Curado	Autóctone	
132	2006	M	Curado	Autóctone	
145	2006	F	Recidiva	Autóctone	
153	2006	M	Curado	Importado	PA
179	2006	M	Curado	Autóctone	
180	2006	F	Curado	Autóctone	
181	2006	M	Curado	Autóctone	
183	2006	F	Curado	Autóctone	
184	2006	F	Curado	Autóctone	
185	2006	F	Curado	Autóctone	
192	2006	M	Curado	Autóctone	
249	2006	M	Curado	Importado	MT
271	2006	M	Curado	Autóctone	
356	2007	M	Curado	Importado	MT
358	2007	F	Curado	Autóctone	
392	2007	F	Curado	Autóctone	
408	2008	M	Curado	Autóctone	
430	2008	M	Curado	Autóctone	
534	2008	M	Curado	Importado	MT
548	2009	M	Curado	Autóctone	
552	2009	F	Curado	Autóctone	
553	2009	M	Recidiva	Importado	MT
585	2009	M	Curado	Autóctone	
588	2009	F	Curado	Autóctone	
589	2009	M	Curado	Autóctone	
594	2009	F	Curado	Autóctone	
605	2009	M	Curado	Importado	BA
663	2010	F	Curado	Autóctone	
684	2010	M	Curado	Autóctone	
SEKU	2008	M	Recidiva	Importado	

PA= Pará; BA= Bahia; MT= Mato Grosso.

APÊNDICE C – Dados da MLSA

Dados dos isolados (informações clínicas, geográficas e moleculares) para cepas de *L. (Viannia) braziliensis* utilizadas na MLSA.

IOCL*	Estado	6PG		Hsp70		MDHmt		ICD		MDHnc		MPI		Tipo de sequência	Complexo clonal	Population
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
2491	AC	1	1	10	10	11	11	10	10	3	3	1	1	4	Único	1
2494	AC	2	6	12	12	12	12	3	3	21	22	1	1	62	Único	1
1734	AM	3	4	7	7	6	6	5	5	7	8	1	1	58	Único	1
2344	AM	5	5	3	3	7	7	3	3	13	14	1	1	59	Único	1
3011	AM	2	10	22	22	20	21	18	18	3	3	10	10	67	Único	1
2871	BA	2	2	3	3	16	17	3	3	25	26	1	1	21	Único	1
2891	BA	2	2	19	19	3	4	14	14	27	27	1	1	45	Único	1
2927	BA	1	1	3	3	18	18	16	16	2	3	1	1	1	Único	1
3086	BA	2	2	23	23	22	22	3	3	31	32	1	1	46	Único	1
3089	BA	11	11	3	3	23	24	3	3	33	34	4	4	68	Único	1
3090	BA	12	12	3	3	3	3	3	3	4	35	1	4	69	Único	1
3126	BA	1	1	24	24	3	4	20	20	31	31	1	1	5	Único	1
2468	BA	2	2	3	3	3	3	3	3	1	1	1	1	8	Único	2
2469	BA	2	2	10	10	3	4	3	3	15	16	1	1	34	CC1	3
2475	BA	2	2	10	10	3	4	3	3	17	18	1	1	35	CC1	3
2480	BA	2	2	10	10	3	3	3	3	3	3	1	1	32	CC1	3
2847	BA	2	2	10	10	15	15	3	3	3	3	4	4	38	CC2	3
2854	BA	2	2	18	18	15	15	3	3	3	3	4	4	44	CC2	3

IOCL*	Estado	6PG		Hsp70		MDHmt		ICD		MDHnc		MPI		Tipo de sequência	Complexo clonal	Population
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
2463	BA	2	2	10	10	8	8	3	3	2	3	1	5	36	Único	3
2841	BA	2	2	16	16	3	3	3	3	4	4	4	4	42	Único	3
2853	BA	2	2	17	17	15	15	13	13	3	24	1	1	43	Único	3
918	CE	1	6	3	3	39	39	7	7	47	48	18	18	61	Único	1
3028	ES	1	1	3	3	20	21	19	19	30	30	4	4	2	Único	1
3143	MT	2	2	10	10	25	26	21	21	31	36	11	11	39	Único	1
3163	MT	13	13	10	10	27	28	8	8	31	31	12	12	70	Único	1
3142	MT	2	2	3	3	3	4	4	4	13	14	1	1	15	Único	2
566	PA	2	2	32	32	35	35	7	7	46	46	18	18	52	Único	1
3313	PA	1	16	10	10	31	32	27	27	32	32	1	1	73	Único	1
3314	PA	2	2	27	27	3	4	28	28	27	39	1	1	49	Único	1
3356	PA	2	16	28	28	31	32	5	5	40	41	1	1	4	Único	1
3359	PA	2	2	29	29	33	34	8	29	42	43	1	1	50	Único	1
3308	PA	2	2	10	10	1	1	3	3	2	2	15	15	31	CC3	3
2139	PB	2	2	3	3	3	3	6	6	9	9	1	1	9	Único	1
2951	PE	9	9	20	20	19	19	17	17	2	2	1	1	65	Único	1
2953	PE	9	9	21	21	3	4	17	17	29	29	1	1	66	Único	1
3229	PE	14	14	3	3	3	3	22	22	2	2	13	13	71	Único	1
2148	PE	2	2	3	3	4	4	7	7	2	3	1	1	17	CC1	2
2287	PE	2	2	3	3	4	4	3	3	11	11	1	1	14	CC1	2
2510	PE	2	2	3	3	4	4	3	3	2	2	1	1	11	CC1	2

IOCL*	Estado	6PG		Hsp70		MDHmt		ICD		MDHnc		MPI		Tipo de sequência	Complexo clonal	Population
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
3230	PE	15	15	3	3	4	4	23	23	2	2	1	1	72	Único	2
2427	PE	2	2	10	10	1	1	3	3	2	2	1	1	30	CC3	3
2291	PE	2	2	11	11	1	1	3	3	12	12	1	1	40	Único	3
3232	PE	2	2	25	25	3	4	3	3	37	37	1	1	47	Único	3
077_11	PE	2	2	2	2	1	2	3	3	2	2	1	1	7	Único	3
2152	RJ	1	1	3	10	3	4	5	5	10	10	4	4	3	Único	1
2538	RJ	6	6	13	13	13	13	3	7	3	3	6	6	63	Único	1
2823	RJ	2	2	3	3	3	3	11	11	1	4	7	7	10	Único	1
2918	RJ	2	2	3	3	3	4	15	15	28	28	1	1	18	Único	1
849	RJ	2	2	37	37	2	2	3	3	2	3	1	1	57	Único	3
1731	RO	2	2	6	6	5	5	3	3	6	6	3	3	27	Único	1
3280	RO	2	2	26	26	29	30	24	25	3	3	1	1	48	Único	1
3303	RO	2	2	3	3	3	4	26	26	32	32	14	14	19	Único	1
249	SC	2	2	10	10	9	10	8	9	3	3	1	1	37	Único	1
534	SC	2	2	31	31	3	4	5	5	3	45	1	1	51	Único	1
553	SC	6	6	3	3	3	4	5	5	19	35	1	1	60	Único	1
SEKU	SC	2	2	3	3	40	41	32	32	3	49	1	1	25	Único	1
114	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	3	3	1	1	12	CC1	2
119	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	2	2	13	CC1	2
126	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
128	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2

IOCL*	Estado	6PG		Hsp70		MDHmt		ICD		MDHnc		MPI		Tipo de sequência	Complexo clonal	Population
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
132	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
145	SC	2	2	4	5	3	4	3	3	2	3	1	1	26	CC1	2
153	SC	2	2	3	3	4	4	4	5	3	3	1	1	16	CC1	2
179	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
180	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
181	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
183	SC	2	2	8	8	3	4	3	3	2	3	1	1	28	CC1	2
184	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
185	SC	2	2	9	9	3	4	3	3	2	3	1	1	29	CC1	2
192	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
271	SC	2	2	14	14	3	4	3	3	2	3	1	1	41	CC1	2
358	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
392	SC	2	2	3	3	3	4	31	31	2	3	1	1	20	CC1	2
408	SC	2	2	3	3	3	32	3	3	2	3	1	1	22	CC1	2
430	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
548	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
552	SC	2	2	3	3	32	32	3	3	2	3	17	17	23	CC1	2
585	SC	2	2	33	33	3	4	3	3	2	3	1	1	53	CC1	2
588	SC	2	2	3	3	36	37	3	3	3	3	1	1	24	CC1	2
589	SC	2	2	3	3	3	4	3	3	2	3	1	1	12	CC1	2
594	SC	2	2	34	34	3	4	3	3	2	3	1	1	54	CC1	2

IOCL*	Estado	6PG		Hsp70		MDHmt		ICD		MDHnc		MPI		Tipo de sequência	Complexo clonal	Population
		A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2	A1	A2			
605	SC	2	2	3	10	3	4	3	3	2	3	1	1	33	CC1	2
663	SC	2	2	35	35	3	4	3	3	2	3	1	1	55	CC1	2
684	SC	2	2	36	36	3	4	3	3	2	3	1	1	56	CC1	2
78	SC	2	18	3	3	38	38	3	3	2	2	1	1	76	Único	2
023_08	ND	1	2	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	6	Único	1

Fonte: autor.

*Representa o número da amostra para as amostras de Santa Catarina, em vez de IOCL.

ND= Não determinado

CC1= Complexo clonal 1

CC2= Complexo clonal 2

CC3= Complexo clonal 3

A1= Alelo 1

A2= Alelo 2

SC= Santa Catarina

PA= Pará

BA= Bahia

RJ= Rio de Janeiro

CE=Ceará

RO= Rondônia

AM= Amazonas

PE= Pernambuco

PB= Paraíba

MT= Mato Grosso

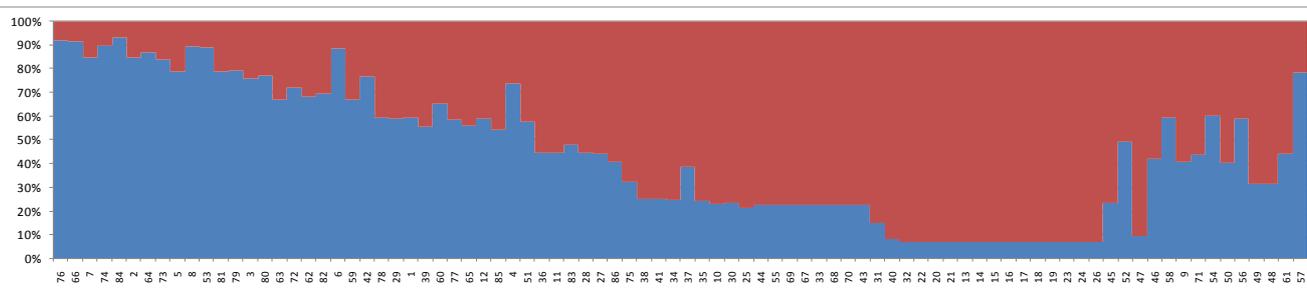
ES= Espírito Santo

AC= Acre

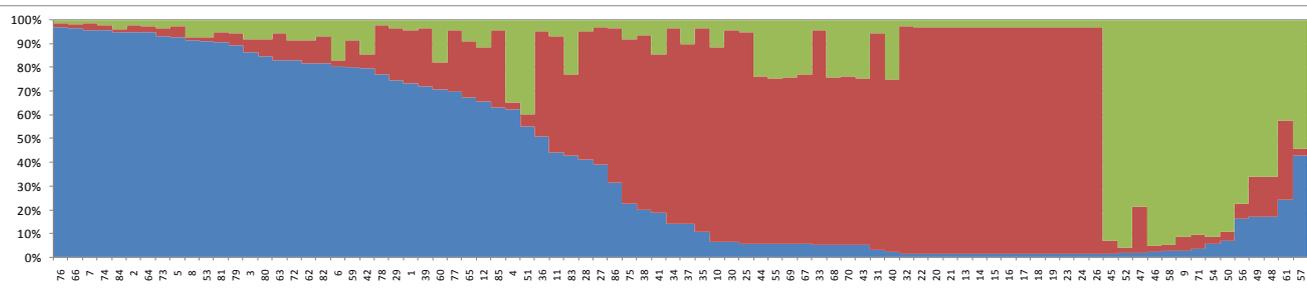
APÊNDICE D – Avaliação de ΔK por CLUMPP

Comparação dos corridos no STRUCTURE por análise CLUMPP de $2 < k < 7$ para a determinação do melhor valor de k (número mais adequado de populações de entre as amostras).

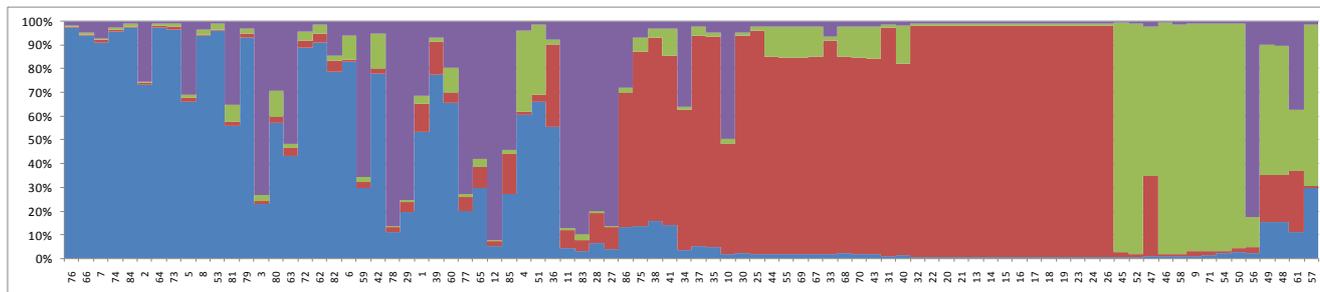
K=2



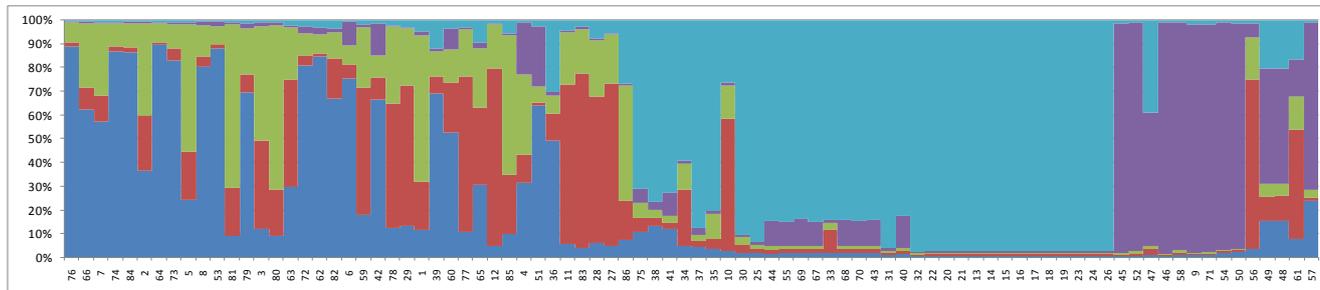
K=3



K=4



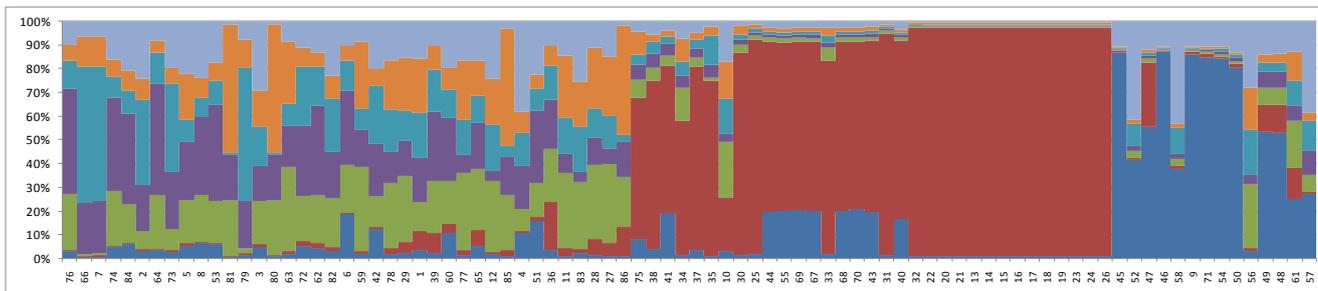
K=5



K=6



K=7



ANEXO A – Condições de reação de PCR para loci genéticos de MLSA

Gene: MPI

	[] no tubo	Unidade
<i>Buffer</i>	1	X
<i>MgCl2</i>	1.5	mM
<i>primer F</i>	0.1	pmol
<i>primer R</i>	0.1	pmol
<i>dNTP</i>	0.25	mM
<i>Taq</i>	0.025	U/microl
<i>H2O</i>		
<i>DNA</i>	20	ng/microl

Programa		
94°C	02:00	} 35 X
94°C	00:30	
58°C	00:30	
68°C	01:00	
68°C	05:00	

Gene: 6PG

	[] no tubo	Unidade
<i>Buffer</i>	1	X
<i>MgCl2</i>	1.5	mM
<i>primer F</i>	0.1	pmol
<i>primer R</i>	0.1	pmol
<i>dNTP</i>	0.25	mM
<i>Taq</i>	0.025	U/microl
<i>H2O</i>		
<i>DNA</i>	30	ng/microl

Programa		
94°C	02:00	} 33 X
94°C	00:30	
55°C	00:30	
68°C	01:00	
68°C	05:00	

Gene: ICD

	[] no tubo	Unidade
<i>Buffer</i>	1	X
<i>MgCl2</i>	1.5	mM
<i>primer F</i>	0.1	pmol
<i>primer R</i>	0.1	pmol
<i>dNTP</i>	0.25	mM
<i>Taq</i>	0.025	U/microl
<i>H2O</i>		
<i>DNA</i>	20	ng/microl

Programa		
94°C	02:00	} 33 X
94°C	00:30	
55°C	00:30	
68°C	01:00	
68°C	05:00	

Gene: MDHmt

	[] no tubo	Unidade
<i>Buffer</i>	1	X
<i>primer F</i>	0.2	pmol
<i>primer R</i>	0.2	pmol
<i>dNTP</i>	0.25	mM
<i>Taq</i>	0.03	U/microl
<i>H2O</i>		
<i>DNA</i>	30	ng/microl

Programa		
94°C	02:00	} 33 X
94°C	00:30	
55°C	00:30	
68°C	01:00	
68°C	05:00	

Gene: MDHnc

	[] no tubo	Unidade
<i>Buffer</i>	1	X
<i>primer F</i>	0.2	pmol
<i>primer R</i>	0.2	pmol
<i>dNTP</i>	0.25	mM
<i>Taq</i>	0.03	U/microl
<i>H2O</i>		
<i>DNA</i>	30	ng/microl

Programa		
94°C	02:00	} 33 X
94°C	00:30	
50°C	00:30	
72°C	01:00	
72°C	05:00	

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.