

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA**

LARISSA PROCÓPIO CARVALHO

**Aspectos da heterogeneidade genética de *Leishmania*
(*Leishmania*) *major*-like isoladas no Brasil**

Belo Horizonte - MG

Junho 2021

LARISSA PROCÓPIO CARVALHO

**Aspectos da heterogeneidade genética de *Leishmania*
(*Leishmania*) *major*-like isoladas no Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais como requisito à obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Norma Melo

Coorientadora: Dr.^a Soraia de Oliveira Silva

Belo Horizonte – MG

Junho 2021

- 043 Carvalho, Larissa Procópio.
Aspectos da heterogeneidade genética de *Leishmania (Leishmania) major*-like isoladas no Brasil [manuscrito] / Larissa Procópio Carvalho. - 2021.
85 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Norma Melo. Coorientadora: Dr.^a Soraia de Oliveira Silva.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. Leishmaniose Cutânea. 3. *Leishmania major*. 4. Heterogeneidade Genética. 5. Dados de Sequência Molecular. I. Melo, Maria Norma. II. Silva, Soraia de Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Larissa Procópio Carvalho423/2021/06
entrada
1º/2019
2019654100

Às nove horas do dia 22 de junho do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://meet.google.com/mwj-mcne-hds>, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Aspectos da heterogeneidade genética de *Leishmania (Leishmania) major-like* isoladas no Brasil" área de concentração: **Protozoologia**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dra. Maria Norma Melo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Maria Norma Melo	UFMG	Aprovada
Dra. Andrea Mara Macedo	UFMG	Aprovada
Dra. Patrícia Flávia Quaresma	IRR/FIOCRUZ	Aprovada
Dra. Soraia de Oliveira Silva	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.**CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):**

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Correções e redação de artigo científico

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada digitalmente por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 22 de junho de 2021.

Dra. Maria Norma Melo
(Orientadora)

Maria Norma Melo

Dra. Andréa Mara Macedo

Andreia Mara Macedo

Dra. Patrícia Flávia Quaresma



Documento assinado digitalmente

Patrícia Flávia Quaresma

Data: 28/06/2021 22:01:23-0300

CPF: 054.504.436-76

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Dra. Soraia de Oliveira Silva
(Coorientadora)

Soraia de Oliveira Silva

Dissertação desenvolvida no Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a orientação da Profa. Dra. Maria Norma Melo e da Dra. Soraia De Oliveira Silva. Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq Processo 30952/2017-3 e Bolsa de Mestrado (2020/2021) concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/CAPES.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vanessa e Silvério, pelo incentivo nesta jornada. Por serem exemplos, por estarem presentes em todos os momentos, motivando, aconselhando diante das tomadas de decisões e por depositarem tanto amor e cuidado em nossas relações.

Ao meu querido avô Otelito, que já não se encontra entre nós, por tudo que fez por mim. Sei que de onde ele está também compartilha dessa realização.

À minha orientadora Maria Norma Melo por ter proporcionado a realização dos objetivos previstos neste trabalho. Agradeço pela oportunidade, carinho e incentivo durante todo o processo.

À minha coorientadora Soraia de Oliveira pelos grandes ensinamentos, pelas oportunidades de aprender coisas diferentes e pela paciência. Por sempre me ajudar, me ensinar e me dar conselhos. Obrigada pelo apoio e incentivo, sem você nada disso seria possível. Saiba que te admiro muito, você é uma excelente profissional. Obrigada por acreditar em mim, mesmo antes da seleção do mestrado.

Agradeço Antônio Augusto Fonseca Júnior e Tiago Antônio de Oliveira Mendes pela colaboração e expertise em bioinformática.

Aos colegas de mestrado, em especial Kenyzinha e Danizinha pela companhia apoio e eternas risadas. Por sempre apresentarmos os trabalhos em trio, mesmo quando os professores pediam duplas, afinal éramos nós três juntas desde o início. Nunca me esquecerei do trabalho de campo em São Joaquim. (Da casa das sete mulheres, menos uma. Hahaha). Obrigada pela amizade meninas!

Às minhas amigas que sempre me incentivaram e me escutaram Alinne e Ju.

À banca examinadora por ter aceitado o convite para avaliar este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À secretaria da Pós-graduação em Parasitologia, às secretárias Sumara e Sibebe, por sempre estarem dispostas em solucionar minhas dúvidas sobre as normas e regulamento da pós-graduação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento que permitiu a realização deste trabalho.

RESUMO

Segundo a Organização Mundial da Saúde as leishmanioses são consideradas importantes doenças negligenciadas, que estão amplamente distribuídas no Velho e no Novo Mundo. São endêmicas em cinco continentes, sendo registradas em 98 países e três territórios, abrangendo países subdesenvolvidos, em desenvolvimento ou mesmo desenvolvidos, com prevalência nas áreas de clima temperado a tropical. Estima-se que cerca de 14 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo e que 350 milhões estejam em situações de risco de infecção. As espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* são as principais espécies que causam formas tegumentares de leishmanioses no Novo Mundo e *L. (L.) major* no Velho Mundo. No entanto, em alguns países do continente americano, como Brasil, Venezuela, Peru, Paraguai, Equador e México, já foram isolados parasitos semelhantes a *L. major* de pacientes que nunca estiveram fora destes países. Esses parasitos foram denominados *Leishmania (L.) major-like*. Vários estudos caracterizaram essas cepas usando técnicas bioquímicas, biológicas e moleculares, porém, a presença desse parasito no Novo Mundo ainda não está esclarecida. No Brasil, oito espécies do gênero *Leishmania* já foram caracterizadas como causadoras da leishmaniose tegumentar americana incluindo *L. (L.) major-like*. O presente estudo investigou a heterogeneidade genética de *L. major-like* isoladas no Brasil BH49, BH70, BH121, BH122, BH129 e BH135 utilizando tipagem por microssatélites (MLMT) e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados com três alvos moleculares (ITS-1, *hsp70* e *nagt*), em comparação com *L. major*, a fim de verificar a ocorrência de diversidade genética inter e intraespecífica nesses parasitos. Os resultados deste estudo são relevantes para o estabelecimento de medidas de saúde pública e para a identificação das espécies de *Leishmania* antes do tratamento, em regiões geográficas distintas onde diferentes espécies podem estar circulando. Além disso, este estudo contribui para mostrar a complexidade de espécies de *Leishmania*, dentro de um país continental como o Brasil, com ampla diversidade de parasitos e vetores.

Palavras-chave: Leishmanioses, Leishmaniose Tegumentar Americana, *Leishmania (Leishmania) major-like*, Caracterização molecular, Microssatélites, Sequenciamento, Heterogeneidade genética.

ABSTRACT

The World Health Organization (WHO) considers Leishmaniasis one of the most important health problems. Cutaneous leishmaniasis is widely distributed in the Old and New World. They are endemic on five continents, being registered in 98 countries and three territories, covering underdeveloped, developing or even developed countries, with prevalence in areas of temperate to tropical climate. It is estimated that around 14 million people are infected worldwide and 350 million are at risk of infection. In the New World, the species *Leishmania* *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* and *L. (L.) major* in the Old World are the main species that cause cutaneous forms of leishmaniasis. However, in some countries of the American continent, such as Brazil, Venezuela, Peru, Paraguay, Ecuador and Mexico, parasites similar to *L. major* have already been isolated of patients who have never been outside these countries. These parasites were named *Leishmania (L.) major*-like. Several studies have characterized those strains using biochemical, biological and molecular techniques, however, the presence of this parasite in the New World is still unclear. In Brazil, eight of genus *Leishmania* species have already been characterized as causing American cutaneous leishmaniasis including *L. (L.) major*-like. The present study investigated the genetic heterogeneity of BH49, BH70, BH121, BH122, BH129 e BH135 *L. major*-like isolates in Brazil, using microsatellite typing (MLMT) and sequencing of amplified DNA fragments with three molecular targets (ITS-1, *hsp70* and *nagt*), compared to *L. major*, in order to verify the occurrence of inter and intraspecific genetic diversity in these parasites. The results of this study are relevant for the establishment of public health measures for identification of *Leishmania* species before treatment in geographic regions where different species can be circulating. In addition, it contributes to show the complexity of *Leishmania* species within a continental country as Brazil with a high of parasite and vectors diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manifestações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	18
Figura 2. Áreas de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar no mundo.....	19
Figura 3. Casos de Leishmaniose Tegumentar, Região das Américas em 2019.....	20
Figura 4. Áreas de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar no Brasil, 2017.....	21
Figura 5. Lesão de paciente com leishmaniose cutânea zoonótica do Velho Mundo.....	22
Figura 6. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	27
Figura 6. Localização das amostras de <i>Leishmania</i> utilizadas no estudo.....	36
Figura 8. Eletroforese em PAGE 5% do ITS1-PCR.....	44
Figura 9. Eletroforese em PAGE 5% do PCR-RFLP.....	44
Figura 10. Perfis de eletrofluorogramas representativos obtidos do sequenciador automático de DNA ALF.....	46
Figura 11. Proporção dos alelos únicos identificados pelos <i>loci</i> 71AT e 27GTG na cepa de <i>L. major</i> 5ASKH do Sudão.....	51
Figura 12. Proporção dos alelos únicos identificado pelos <i>loci</i> 27GTG e 28AT na cepa de <i>L. major</i> BH13 do Iraque.....	52
Figura 13. Proporção dos alelos únicos compartilhados entre os isolados de <i>L. major</i> -like..	53
Figura 14. Proporção dos alelos comuns compartilhados entre as amostras de <i>Leishmania</i> estudadas.....	55
Figura 15. Proporção dos alelos compartilhados entre as cepas de <i>L. major</i> do Iraque e os isolados de <i>L. major</i> -like.....	57
Figura 16. Eletroforese em PAGE 5% do <i>hsp70</i> -PCR.....	58
Figura 17. Eletroforese em PAGE 5% do <i>nagt</i> -PCR.....	58
Figura 18. Árvore filogenética concatenada das amostras estudadas utilizando microssatélites.....	59
Figura 19. Árvore filogenética das amostras estudadas utilizando as sequências obtidas com o marcador ITS1.....	60
Figura 20. Árvore filogenética das amostras estudadas utilizando as sequências obtidas com o marcador <i>hsp70</i>	61
Figura 21. Árvore filogenética das amostras estudadas utilizando as sequências obtidas com o marcador <i>nagt</i>	62
Figura 22. Árvore filogenética concatenada das amostras estudadas utilizando as sequências obtidas com os marcadores ITS1, <i>hsp70</i> e <i>nagt</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Leishmania</i> que causam Leishmaniose no homem.....	17
Tabela 2. Amostras de <i>Leishmania</i> utilizadas no estudo.....	35
Tabela 3. Ciclo de amplificação utilizado para o alvo ITS-1.....	37
Tabela 4. Sequências dos marcadores de microssatélites descritos para <i>L. major</i>	39
Tabela 5. Ciclo de amplificação utilizado para os marcadores de microssatélites.....	39
Tabela 6. Sequência dos marcadores dos alvos moleculares utilizados no estudo.....	41
Tabela 7. Ciclos de amplificação utilizados para os alvos moleculares <i>hsp70</i> e <i>nagt</i>	42
Tabela 9. Número de repetições de nucleotídeos identificados nas amostras de <i>Leishmania</i> estudadas com os <i>loci</i> de microssatélites.....	45
Tabela 10. Tamanho em pares de bases (pb) dos alelos observados nas amostras de <i>Leishmania</i> estudadas os 10 <i>loci</i> de microssatélites utilizados.....	47
Tabela 11. Características da diversidade genética das amostras de <i>Leishmania</i> estudadas por MLMT.....	48
Tabela 12. Genótipos identificados nas amostras de <i>Leishmania</i> estudadas por MLMT.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALF	(<i>Automated Laser Fluorescent Sequencer</i>): Sequenciador Automático de Laser Fluorescente
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP's	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
F	<i>Forward</i>
<i>hsp70</i>	Proteína de choque térmico de 70 kilodaltons
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITS1	<i>Internal Transcribed Spacer 1</i>
kDNA	DNA do cinetoplasto
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
M	Marcador molecular
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	minuto
mL	mililitro
MLEE	(<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>): Eletroforese Enzimática em Múltiplos <i>loci</i>
MLMT	(<i>Multilocus Microsatellite Typing</i>): Tipagem de Microsatélites em Múltiplos <i>loci</i>
mM	milimolar
<i>ngt</i>	(<i>N-acetylglucosamine-1-phosphate Transferase</i>): N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferase
ng	nanograma
PAGE	(<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>): Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PAHO	(<i>Pan American Health Organization</i>): Organização Pan-Americana da Saúde
pb	Pares de bases
PBS	(<i>Phosphate Buffered Saline</i>): Solução de Fosfato Tamponada
pH	Potencial Hidrogeniônico
PCR	(<i>Polimerase Chain Reaction</i>): Reação em Cadeia da Polimerase
R	<i>Reverse</i> (anti-senso)
rpm	Rotação por minuto
pmol	picomol
RFLP	(<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>): Polimorfismo de tamanho de Fragmentos de Restrição
TA	Tampão da Amostra
TBE	Tris-Borato-EDTA
WHO	(<i>World Health Organization</i>): Organização Mundial de Saúde (OMS)
U/μL	Unidade por microlitro
μg	micrograma
μL	microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. <i>Leishmania</i> e Leishmanioses.....	14
1.1.2. Leishmaniose Tegumentar.....	18
1.1.3. Leishmaniose Tegumentar Americana.....	19
1.1.4. <i>Leishmania (Leishmania) major</i>	22
1.1.5. <i>Leishmania (Leishmania) major-like</i>	22
1.2. Interação parasito-hospedeiro.....	25
1.3. Técnicas moleculares usadas para caracterização taxonômica e epidemiologia de <i>Leishmania</i>	27
1.3.1. Microssatélites.....	28
1.3.2. Sequenciamento.....	29
2. JUSTIFICATIVA	32
3. OBJETIVOS	33
3.1. OBJETIVO GERAL.....	33
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4. METODOLOGIA	34
4.1. Delineamento Experimental.....	34
4.2. Contexto geográfico dos isolados de <i>Leishmania</i> em estudo.....	34
4.3. Cultivo dos Parasitos.....	36
4.4. Obtenção de massa celular.....	36
4.5. Extração do DNA genômico dos parasitos.....	36

4.6. Identificação dos isolados estudados por PCR-RFLP.....	37
4.7. Eletroforese em gel de Poliacrilamida não-desnaturante (PAGE).....	38
4.8. Estudo da variabilidade inter e intraespecífica das amostras de <i>Leishmania</i>	38
4.8.1. Análise de polimorfismos de microssatélites pelo Método de MLMT.....	38
4.8.2. Determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites.....	40
4.8.3. Análise dos dados obtidos por MLMT.....	40
4.9. Sequenciamento.....	41
4.9.1. Purificação dos Produtos das PCRs para o sequenciamento.....	42
4.10. Análise do Sequenciamento.....	42
4.10.1. Análises Filogenéticas.....	43
4.11. Análises Estatísticas.....	43
5. RESULTADOS.....	44
5.1. Identificação genética dos isolados de <i>Leishmania</i>	44
5.2. Análise da variabilidade genética das amostras de <i>Leishmania</i> por MLMT.....	45
5.2.1 Análise de polimorfismos de microssatélites.....	45
5.2.2 Genótipos identificados nas amostras de <i>Leishmania</i> estudadas.....	49
5.2.2.1 Genótipos únicos.....	50
5.2.2.2 Genótipos compartilhados.....	50
5.2.3 Proporção de alelos únicos identificados nas amostras de <i>Leishmania</i>	51
5.2.4 Proporção de alelos compartilhados entre as amostras de <i>Leishmania</i>	54
5.2.5 Proporção de alelos compartilhados entre cepas de <i>L.major</i> do Iraque e os isolados de <i>L. major</i> -like.....	56
5.3. Análise do sequenciamento das amostras estudadas com os alvos moleculares.....	58
6. DISCUSSÃO.....	64
7. CONCLUSÕES.....	72
8. REFERÊNCIAS.....	73
9. ANEXOS.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Leishmania* e Leishmanioses

As leishmanioses são doenças crônicas que apresentam um amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica. São causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania* (ROSS, 1903), cujos vetores são Diptera, Psychodidae, Phlebotominae, dos gêneros *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (LAINSON & RANGEL 2005). Apresentam uma grande diversidade epidemiológica, mantendo o seu ciclo de infecção entre flebotomíneos e hospedeiros mamíferos (READY, 2013).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) as leishmanioses são consideradas importantes doenças negligenciadas que estão amplamente distribuídas no Velho e no Novo Mundo. São endêmicas em cinco continentes, sendo registradas em 98 países e três territórios, abrangendo países subdesenvolvidos, em desenvolvimento ou mesmo desenvolvidos, com prevalência nas áreas de clima temperado a tropical. Estima-se que cerca de 14 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo e que 350 milhões estejam em situações de risco de infecção. O Brasil está entre os países com maior número de casos de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar no mundo (ALVAR *et al.*, 2012; PIGOTT *et al.*, 2014).

A grande variedade de espécies de *Leishmania* que infectam o homem, associadas aos mecanismos de resposta imune do hospedeiro favorece o aparecimento de diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas (ANVERSA *et al.*, 2018). De acordo com as espécies, as leishmanioses podem ser classificadas em dois grandes grupos: 1 Leishmaniose Tegumentar (LT) com as formas: cutânea localizada (LCL), mucocutânea (LMC), cutânea difusa (LCD) e cutânea disseminada (LD), e 2 Leishmaniose Visceral (LV) conhecida como calazar, que pode assumir um caráter espectral com diversas formas clínicas, variando de uma forma assintomática, às formas subclínicas ou oligossintomáticas, agudas e o calazar clássico (BANULS *et al.*, 2011; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

O diagnóstico da leishmaniose envolve a associação de aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, uma vez que a aplicação e a sensibilidade de cada método podem variar de acordo com a forma clínica, tempo de evolução da doença e com as diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (PISCOPO TV & MALLIA AZZOPARDI, 2007). As técnicas que permitem a demonstração de parasitos no microscópio óptico constituem o “padrão ouro” no diagnóstico da doença, devido à sua alta especificidade. Na LT, a investigação do parasito pode ser realizada por escarificação, biópsia, impressão e

aspiração de punção, geralmente realizadas na borda da lesão. São técnicas rápidas e baratas, embora com sensibilidade limitada, principalmente em lesões crônicas. O cultivo “*in vitro*” e o inóculo de material obtido de amostras clínicas em animais de laboratório podem melhorar a positividade do resultado e a segurança do diagnóstico. No entanto, esses métodos raramente são utilizados na prática clínica, pois além da complexidade e do alto custo, o crescimento dos parasitos pode levar semanas ou meses (VON STEBUT, 2015).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem mostrado resultados promissores no diagnóstico das leishmanioses. Além de apresentar alta sensibilidade, a PCR pode ser realizada a partir de diferentes amostras clínicas e dependendo do alvo escolhido, a reação pode apresentar alta sensibilidade e especificidade e possibilitar a definição da espécie. Apesar de ser amplamente utilizada para fins de pesquisa, não é frequentemente utilizada na rotina de diagnóstico, pois além do alto custo, a técnica exige padronização, infraestrutura laboratorial e rigor técnico (KEVRIC *et al.*, 2015).

Técnicas sorológicas, como imunofluorescência indireta (IFAT), aglutinação direta (DAT) e ensaio enzimático imunossorbente (ELISA) padronizadas para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*, são ferramentas importantes para o diagnóstico de casos de Leishmaniose Visceral (LV). Estes são geralmente associados a uma resposta humoral proeminente. No entanto, eles não são comumente usados nos casos de LT, devido a taxas variáveis de sensibilidade, especificidade e níveis reduzidos de anticorpos (KEVRIC *et al.*, 2015).

O tratamento bem sucedido das leishmanioses envolve vários fatores, como (1) fatores do hospedeiro, como genética, resposta imune e apresentação clínica da doença; (2) recursos de tratamento, como qualidade do medicamento, dosagem, duração e conclusão da terapia; e (3) características do parasito, como sensibilidade intrínseca da espécie e falta de resistência ao medicamento (SUNDAR, 2016). Os medicamentos de primeira escolha no tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose são antimoniais pentavalentes (Sb^V), Estibogluconato de sódio (Pentostan®) e Antimoniato de meglucamina (Glucantime®), sendo este último comercializado e distribuído exclusivamente pelo Ministério da Saúde no Brasil (BRASIL, 2017). Apesar dos antimoniais pentavalentes mostrarem uma eficácia de aproximadamente 90% na maioria dos casos, esses medicamentos são bastante tóxicos levando a vários efeitos colaterais. Além disso, as diferentes espécies de *Leishmania* apresentam níveis distintos de sensibilidade à droga (CROFT SL & YARDLEY V, 2006; ZERPA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2019). Desta forma o emprego de estratégias

terapêuticas espécie-específicas é importante para sucesso do tratamento (RAMANATHAN, 2011).

Epidemias recentes de leishmaniose em áreas endêmicas têm sido relatadas, com evidências de disseminação para áreas previamente não endêmicas. Tais aumentos podem ser explicados em parte, pelo aprimoramento do diagnóstico e notificação de casos, mas também resultam de fatores associados ao aumento da migração populacional, aumento da detecção de leishmaniose associada a infecções oportunistas, surgimento de resistência a medicamentos utilizados no tratamento e adaptação dos ciclos de transmissão aos ambientes peridomiciliares, devido à urbanização e desmatamento (HARHAY *et al.*, 2011; HAY *et al.*, 2013). Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma grande diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores (hospedeiros invertebrados - flebotomíneos) e reservatórios (hospedeiros vertebrados). Mais de 50 espécies de *Leishmania* foram identificadas em todo o mundo e, pelo menos, 17 delas (Tabela 1) são patogênicas para o homem (AKHOUNDI, M. *et al.*, 2016).

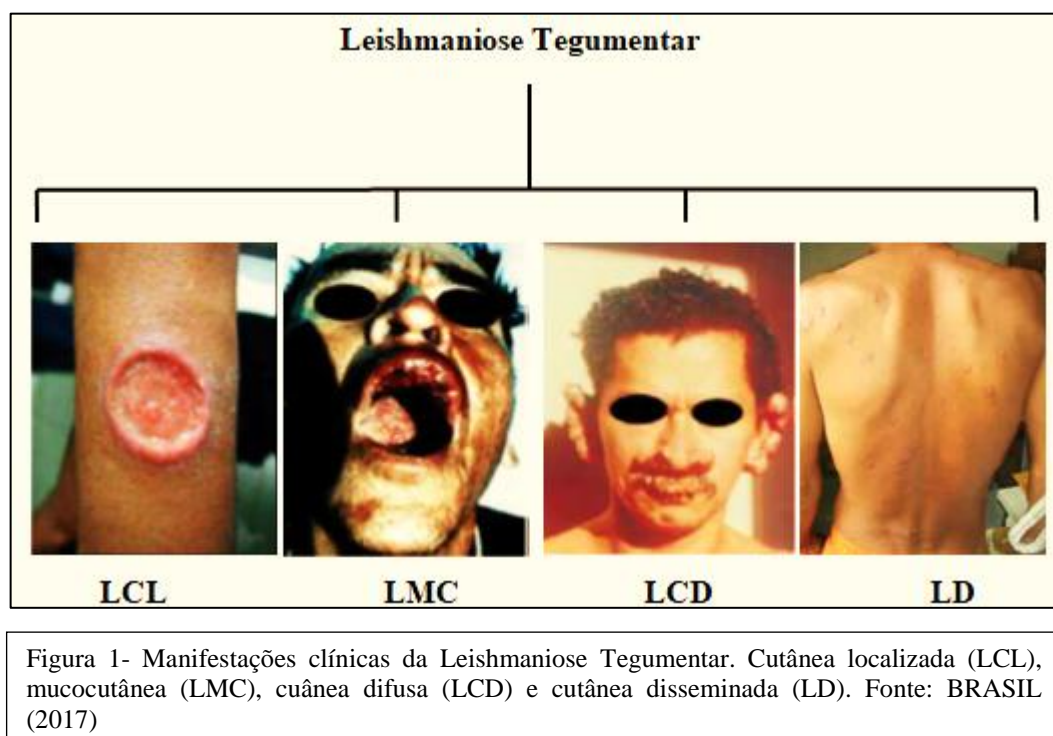
Tabela 1. Espécies de *Leishmania* que causam Leishmaniose no homem.

Subgênero	Espécies	Velho/Novo Mundo	Doença clínica	Distribuição
<i>Leishmania</i>	<i>L. amazonensis</i> (sin. de <i>L. garnhami</i>)	NM	LCL, LCD, LMC.	América do Sul (Brasil , Bolívia e Venezuela).
	<i>L. donovani</i> (sin. <i>L. archibaldi</i>)	VM	LV, LDPC	África Central, Sul da Ásia, Oriente Médio, Índia e China.
	<i>L. infantum</i> (sin. de <i>L. chagasi</i>)	VM, NM	LV, LC	Norte da África, Países do Mediterrâneo (Europa e Norte da África), Sudeste da Europa, Oriente Médio, Ásia Central, América do Norte (México), América Central e América do Sul (México, Venezuela, Brasil , Bolívia).
	<i>L. major</i>	VM	LCL	África do Norte e Central Oriente Médio, Europa Mediterrânea e Subcontinente Indiano- Ásia Central.
	<i>L. major-like</i>	NM	LCL	América do norte (México) e América do sul (Brasil , Equador Paraguai, Peru, Uruguai, Venezuela).
	<i>L. mexicana</i> (sin. <i>L. pifanoi</i>)	NM	LCL, LCD	EUA, Equador, Venezuela, Peru.
	<i>L. tropica</i> (sin. de <i>L. killicki</i>)	VM	LC, LV	África Central, África do Norte, Oriente Médio, Ásia Central e Índia.
	<i>L. venezuelensis</i>	NM	LCL	Norte da América do Sul e Venezuela.
<i>Viannia</i>	<i>L. braziliensis</i>	NM	LCL, LMC	Bacia Amazônica Ocidental e América do Sul (Brasil , Bolívia, Guatemala, Peru, Venezuela).
	<i>L. guyanensis</i>	NM	LCL, LMC	Norte da América do Sul, Guiana Francesa, Suriname, Brasil e Bolívia.
	<i>L. lainsoni</i>	NM	LCL	Brasil , Bolívia e Peru.
	<i>L. lindenbergi</i>	NM	LCL	Brasil
	<i>L. naiffi</i>	NM	LCL	Brasil e Guiana Francesa.
	<i>L. panamensis</i>	NM	LCL, LMC	América Central e América do Sul (Brasil , Colômbia, Panamá, Venezuela).
	<i>L. peruviana</i>	NM	LCL, LMC	Peru e Bolívia.
<i>L. shawi</i>	NM	LCL	Brasil	
<i>Mundinia</i>	<i>L. martiniquensis</i>	NM, VM	LCL, LV	Martinica e Tailândia.

Abreviações: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC), Leishmaniose Visceral (LV), Novo Mundo (NV) e Velho Mundo (VM). Adaptado e modificado de AKHOUNDI, M. *et al.*, (2016).

1.1.2. Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose tegumentar (LT) é amplamente distribuída no mundo e cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas: nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e Ásia Oriental - do Oriente Médio à Ásia Central (ALVAR *et al.*, 2012). É a forma mais comum de leishmaniose e causa lesões na pele, principalmente úlceras em partes do corpo expostas, deixando cicatrizes ao longo da vida e incapacidade ou estigmas graves (Figura 1).



Em 2019, 12 países relataram mais de 5.000 casos de LT: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Iraque, Líbia, Marrocos, Paquistão, Peru, República Árabe da Síria e Tunísia, que juntos respondem por 91% de incidência global de LT relatada (WHO, 2020). A Figura 2 apresenta as áreas de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar no mundo.

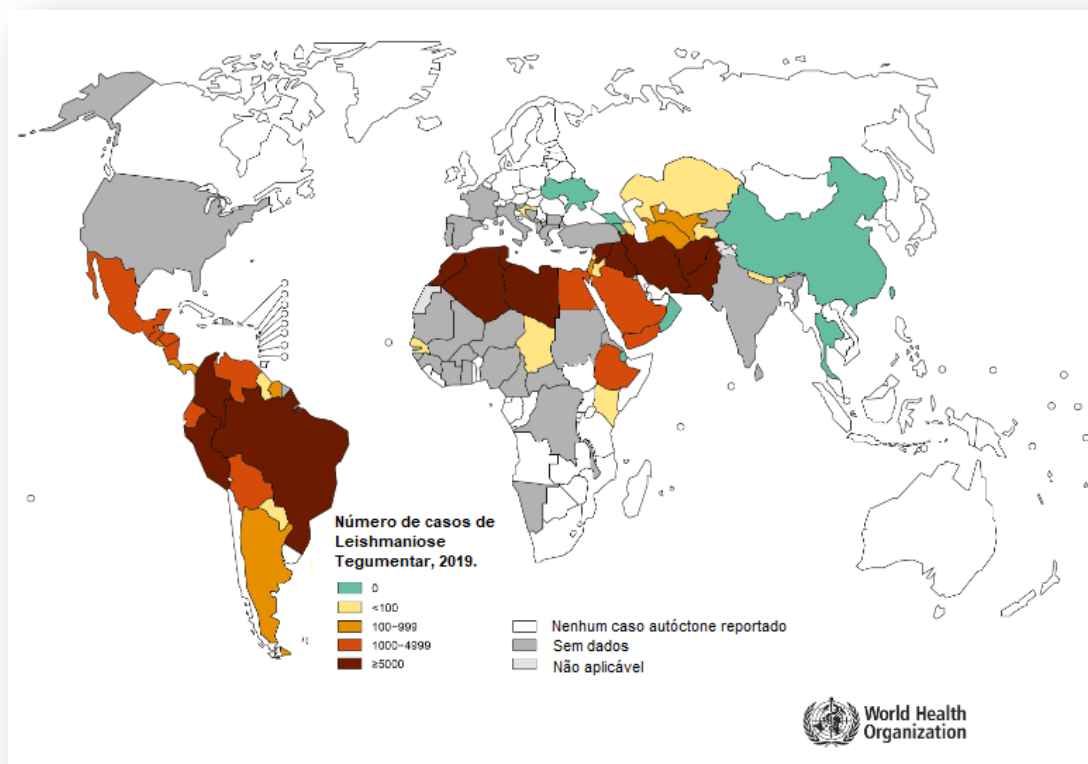


Figura 2- Áreas de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar no mundo.
Fonte: WHO (2019).

Fatores abióticos combinados, como as variáveis de temperatura, vegetação, cobertura do solo e precipitação são importantes fatores de distribuição da LT no Velho e Novo Mundo. No Velho Mundo, a presença da LT está mais associada a áreas urbanas e periurbanas da Bacia do Mediterrâneo, do leste ao noroeste da Índia, com alguns focos na China Central e também em uma pequena faixa na África Ocidental. No Novo Mundo, a LT ocorre principalmente na bacia amazônica e em outras áreas da floresta tropical. Fora de seus principais focos, a doença está associada estritamente às áreas urbanas e periurbanas, resultando em uma distribuição focal (PIGOTT *et al.*, 2014).

1.1.3. Leishmaniose Tegumentar Americana

Relatos de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) nas Américas datam desde o século I d.C. (LAINSON, 1997), sendo notificada do sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina (PAHO, 2013). A LTA é causada por espécies de *Leishmania* dos complexos *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana*. *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* é a responsável pela maior parte dos casos de LTA na América do Sul (Brasil,

Peru e Colômbia), com nítida expansão da doença em todo o continente Latino-Americano. Dentre as espécies causadoras de LTA, 12 são encontradas no Novo Mundo (Tabela 1).

Entre 2001 a 2019, 1.028.054 casos de LTA foram notificados a Organização Pan-Americana de Saúde (PAHO, 2020), com uma média de 54.108 casos por ano. Em 2015 foi registrado o maior número de casos (67.949). Em 2019, os países com maior número de casos notificados foram Brasil, Colômbia, Peru, Nicarágua e Bolívia respectivamente, que somados representam 77% dos casos na Região (PAHO, 2020). A Figura 3 mostra a ocorrência de LT nas Américas em 2019.

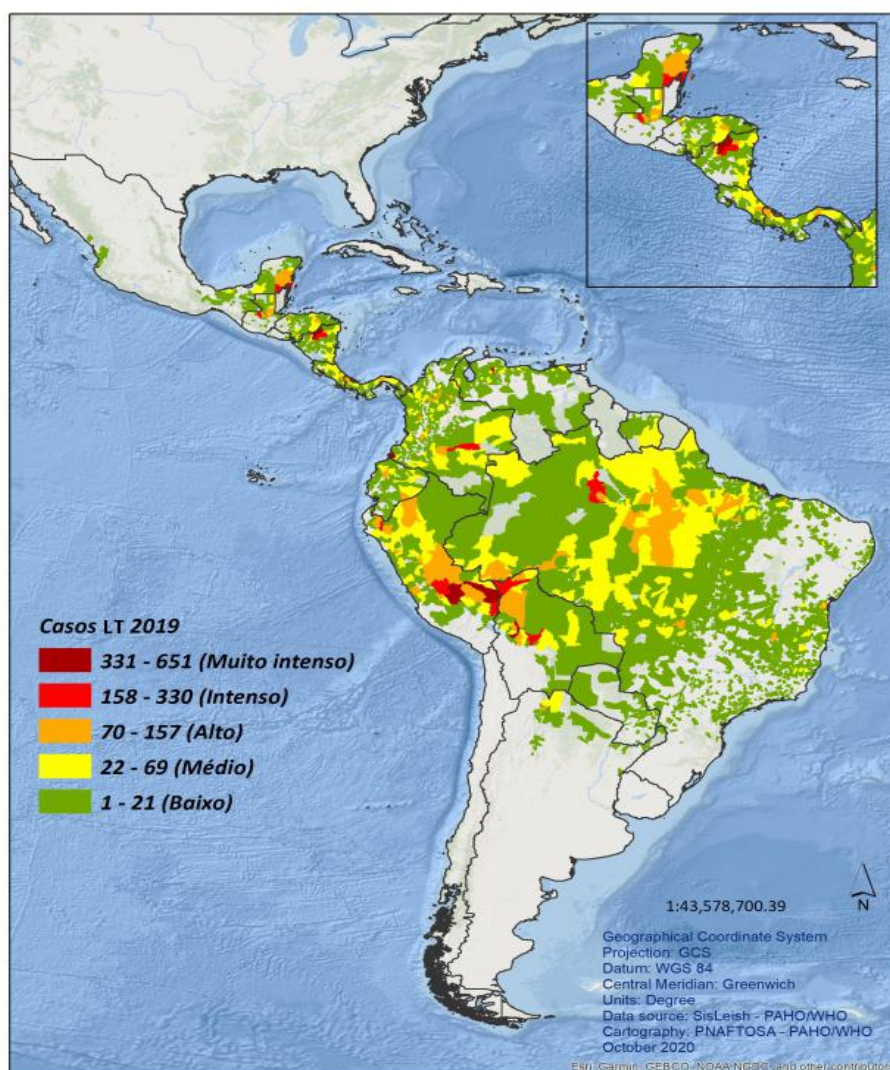


Figura 3- Casos de Leishmaniose Tegumentar, Região das Américas em 2019.
Fonte: PAHO (2020).

No Brasil a LTA é considerada uma zoonose, mantida na natureza pelos animais sinantrópicos, com a participação secundária de animais domésticos e acidentalmente o homem. Atualmente, apresenta-se em franco crescimento e expansão geográfica (Figura 4),

observando-se a coexistência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos dos focos antigos ou de áreas próximas a eles e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores como, o acelerado processo de expansão das fronteiras agrícolas, áreas de garimpo, construção de estradas, bem como, o processo de crescimento dos centros urbanos (QUARESMA *et al.*, 2011; RANGEL *et al.*, 2014). Esses fatores contribuem para que a LTA seja uma das endemias de maior importância em saúde pública no Brasil, podendo causar reflexos nos campos social e econômico.

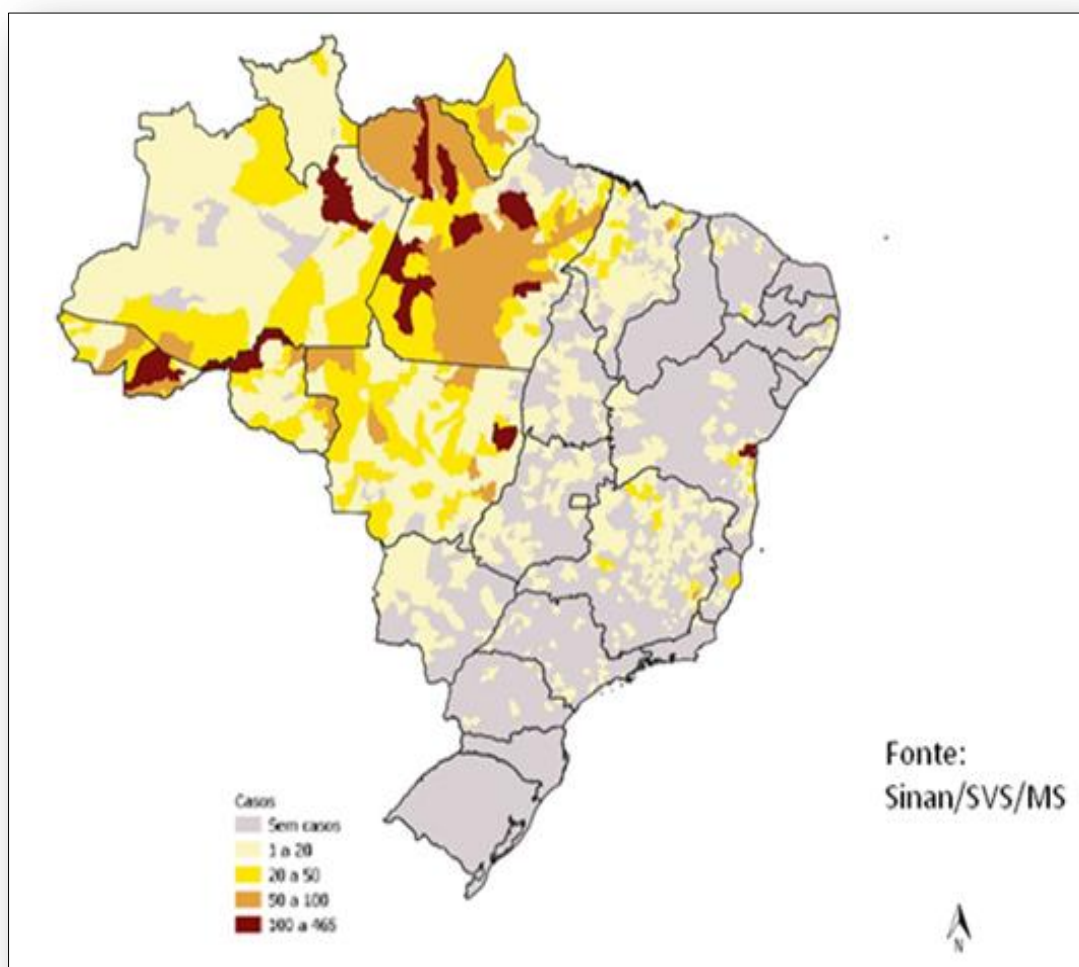


Figura 4- Áreas de ocorrência da Leishmaniose Tegumentar no Brasil, 2017.
Fonte: SINAN/SVS/MS (2019)

A LTA consiste numa das afecções dermatológicas que merece atenção, não só pela frequência, mas principalmente pelas dificuldades terapêuticas, deformidades e sequelas que pode acarretar. As manifestações clínicas da infecção dependem, dentre outros fatores, da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. Podem variar desde uma forma inaparente ou subclínica, a um amplo espectro de manifestações envolvendo a pele e mucosas,

com lesões sujeitas a diferentes graus de severidade (TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

Oito espécies de *Leishmania* são reconhecidas como agentes etiológicos de LTA no território brasileiro (Tabela 1), sendo que para a espécie *L. (L.) major*-like os vetores e hospedeiros permanecem desconhecidos.

1.1.4. *Leishmania (Leishmania) major*

Embora não pertença às espécies do Novo Mundo, *L. major* será apresentada devido ao registro de ocorrência de *L. major*-like no Brasil e em outros países da América Latina. *L. major* é uma importante espécie de *Leishmania* causadora de LT no homem no Velho Mundo e encontra-se distribuída desde a África Subsaariana ao Sul do subcontinente Indiano - Ásia Central. Nesses continentes, focos endêmicos estáveis de leishmaniose tegumentar são bem caracterizados, como zoonose e antroponose, causados por *L. major* e *L. tropica* (ELFARI *et al.*, 2005; AL-JAWABREH *et al.*, 2008). Dependendo da região, essas espécies são transmitidas por *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi*, envolvendo diferentes espécies de roedores silvestres como reservatórios. O reservatório primário é um grande gerbil (*Rhombomys opimus*) com quatro subespécies, que normalmente apresentam um alto índice de infecção (ANDERSON *et al.*, 2011; SALAM *et al.*, 2014).



Figura 5- Lesão clássica de paciente com leishmaniose cutânea zoonótica do Velho Mundo.
Fonte: ZAHIRNIA (2018)

1.1.5. *Leishmania (Leishmania) major*-like

O primeiro relato de ocorrência de *L. major*-like em países do continente americano foi realizado por MOMEN *et al.*, (1985). Durante esse estudo envolvendo diversos isolados do gênero *Leishmania* provenientes de diferentes regiões do Brasil, foi observado que certos isolados do parasito apresentavam diferentes padrões fenotípicos, quando se analisavam

zimodemas, esquizodemas e reatividade de anticorpos monoclonais, em comparação com as espécies que causavam LT no Novo Mundo (MOMEN *et al.*, 1985). Contudo, nesse mesmo estudo foi possível observar através de análises de eletroforese de enzimas e reatividade de anticorpos, que esses isolados eram semelhantes às cepas de referência de *L. major* presentes no Velho Mundo. Com isso, os autores caracterizaram esses isolados como *L. major*-like. No entanto, a análise do perfil de restrição do kDNA foi diferente daquele observado em todas as espécies de referência utilizadas, inclusive de *L. major*. Estes dados levaram os autores a propor a existência de um tipo de *Leishmania* ainda não caracterizada no Brasil, com perfil semelhante ao de *L. major* e, além disso, sugeriram que esta espécie poderia ter sido introduzida no país por imigrantes ou animais (roedores ou cães), uma vez que os isolados avaliados foram obtidos de pacientes que relataram nunca ter viajado para fora do país (MOMEN *et al.*, 1985).

Além do Brasil, a *L. major*-like também foi encontrada em outros países do continente americano. No Equador foram observados dois isolados de pacientes com perfis isoenzimáticos e reatividade a anticorpos similares a *L. major* (HASHIGUSHI *et al.*, 1991). Outro estudo realizado no Paraguai, também identificou *L. major*-like utilizando as mesmas técnicas. Dois destes isolados apresentaram diferentes perfis de zimodemas das espécies de referência, tanto do Velho, como do Novo Mundo, porém os perfis foram idênticos ao de um isolado de *L. major*-like de uma paciente do Equador (YAMASAKI *et al.*, 1994). No Peru, também foram identificadas amostras muito semelhantes a *L. major* (SHAW, 1994). Em um estudo que avaliou a função do citocromo *b* como fator para determinar relações filogenéticas entre as espécies de *Leishmania*, demonstrou-se uma homologia de 99,9% dos genes de isolados de *L. major*-like do Equador com a cepa 5ASKH utilizada como referência de *L. major* (LUYO-ACERO *et al.*, 2004).

Segundo CALVOPINA *et al.*, (2004), isolados de *Leishmania* com perfil genotípico parecido com o de *L. major* observados no Brasil, Paraguai, México e Venezuela sugerem que, algumas dessas populações possam ter sido importadas de países do Velho Mundo. Em recente revisão sobre o perfil das leishmanioses no Equador, HASHIGUCHI *et al.*, (2016) ressaltaram a *L. major*-like como uma das oito espécies de *Leishmania* caracterizadas no país, mas que ainda não foram identificados possíveis vetores e reservatórios.

Outro estudo utilizando os isolados BH49 e BH121 de *L. major*-like do Brasil, mostraram que apenas o isolado BH49 foi capaz de infectar camundongos, enquanto que o isolado BH121 conseguiu infectar apenas células *in vitro*. Além disso, observou-se que o curso da infecção por BH49 foi diferente da cepa *L. major* utilizada como referência

(Friedlin), sendo encontrados menos parasitos nas lesões dos camundongos. Porém, após 10 semanas de infecção, ainda foi possível encontrar parasitos nas lesões causadas por BH49, o que não ocorreu na infecção com a cepa Friedlin (SILVA, S. DE O. *et al.*, 2009). Também foi observado que o isolado BH121 foi capaz de infectar *Lutzomyia longipalpis* em condições de laboratório, mas não há estudos suficientes e capazes de incriminar essa espécie como vetora (DA SILVA, A. L. *et al.*, 1991).

WU *et al.*, (2015) compararam os isolados BH49 e BH121 utilizando a técnica de *suppression subtractive hybridization* (SSH), que combina hibridizações de cDNA com amplificação por PCR. Nessa pesquisa foram identificados alguns genes que estavam com expressão aumentada no isolado infectivo (BH49), como a *α -hemolysin*, uma proteína tóxica que age na membrana celular aumentando a permeabilidade das células, podendo levar a perda de proteínas citoplasmáticas essenciais para o funcionamento celular. Além disso, as formas promastigotas do parasito usam a *α -hemolysin* para destruir eritrócitos presentes no intestino médio dos flebotomíneos (CHACRAVARTY *et al.*, 1994), sendo considerado um fator de virulência. *Coenzyme Q* já foi observada participando na translocação de elétrons e prótons na cadeia respiratória do parasito, entretanto, nenhum papel na virulência já foi associado com essa enzima (RASSAM *et al.*, 1988). *Phosphoglycan β -1,3-galactosyltransferase 3* é importante na transferência de β -1,3-galactoses para os LPGs de *L. major*, que são os glicoconjugados mais abundantes da superfície de promastigotas, também considerados um fator de virulência (ASSIS *et al.*, 2012).

GUIMARÃES *et al.*, (2018) abordaram a diferença de infectividade dos isolados BH49 e BH121 nos vetores *Phlebotomus papatasi* (VM) e *Lutzomyia longipalpis* (NM) e relacionaram com uma possível diferença na glicobiologia desses isolados de *L. major*-like. Foi possível observar nesse estudo que o isolado BH49, assim como a cepa de *Leishmania major* (Friedlin) de referência apresentaram resíduos de β -galactosil nos LPGs, enquanto o isolado BH121 apresentou baixa ou nenhuma galactosilação nos seus LPGs, mostrando desse modo, variações intraespecíficas nos glicoconjugados de *L. major*-like. Esse estudo também verificou se a diferença na galactosilação dos LPGs influenciava a infecção do vetor. Foi observado que tanto BH49 quanto BH121 foram capazes de infectar e realizar metaciclôgenese nos vetores *Phlebotomus papatasi* (VM) e *Lutzomyia longipalpis* (NM), com infecção foi mais baixa para o isolado BH121. As diferenças observadas na infecção dos flebotomíneos foram atribuídas, entre outros fatores, às variações nos resíduos de galactose nos LPGs destes isolados.

ALMEIDA, (2019) analisou o sequenciamento genômico dos isolados de *L. major*-

like BH49, BH121 e BH129 e concluiu por análises filogenéticas, que são *L. major* importadas do Velho Mundo e introduzidas no Novo Mundo em pelo menos dois eventos diferentes. No entanto, ainda existem muitas incertezas a respeito da origem e introdução desses parasitos muito semelhantes a *L. major* nas Américas.

1.2. Interação parasito-hospedeiro

Leishmania tem um ciclo de vida complexo que envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados e dois estágios de desenvolvimento: promastigotas, a forma proliferativa encontrada no lúmen da fêmea de flebotomíneo e amastigotas, a forma proliferativa encontrada dentro de vários tipos de células hospedeiras de mamíferos. Entre os hospedeiros mamíferos encontra-se grande variedade de espécies de roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambás), canídeos e primatas (LAINSON & SHAW, 1988). A infecção começa quando um flebotomíneo infectado com *Leishmania* pica um hospedeiro. Após a ingestão de sangue, promastigotas metacíclicas são liberadas e entram na pele do hospedeiro via regurgitação (TURCO & DESCOTEAUX, 1992). Uma simples picada libera muitas substâncias que induzem infiltração rápida de neutrófilos e recrutamento substancial de macrófagos na pele. Os parasitos alcançam a pele do mamífero e primeiro invadem neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o local da picada, juntamente com macrófagos. No entanto, outros tipos de células, como células de *Langerhans* e fibroblastos, também podem ser infectadas (PETERS *et al.*, 2008). As células do sistema mononuclear desempenham funções de reconhecimento e adesão, o que é seguido por sinalização e invasão (HANDMAN & BULLEN, 2002). Acredita-se que os neutrófilos desempenhem um papel importante, agindo como um "cavalo de Tróia" (PETERS *et al.*, 2008), enquanto os macrófagos são importantes para o estabelecimento final e aumento da infecção. O parasito se liga à superfície da célula hospedeira por meio do flagelo ou do corpo celular. Essa adesão envolve o reconhecimento de moléculas expostas na superfície do parasito, como os lipofosfoglicanos (LPGs) (TURCO & DESCOTEAUX, 1992) e a glicoproteína *gp63* (RUSSEL & WILHELM, 1986). Essas moléculas se ligam a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos, incluindo receptores de complemento (CR1 e CR3), receptores de manose (MRs) e receptores de fibronectina (FnRs) (UENO & WILSON, 2012). O processo de internalização via fagocitose começa com a formação de pseudópodes. Assim, o parasito se liga a superfície do macrófago e é então internalizado em um vacúolo,

conhecido como vacúolo parasitóforo (VP). No VP, as promastigotas metacíclicas se transforma em amastigotas; isso é seguido por fusão dos lisossomos da célula hospedeira com o VP. Algumas amastigotas se ligam à membrana do vacúolo, enquanto outros permanecem livres no vacúolo e começam a proliferar, dividindo várias vezes. Após intensa multiplicação, a membrana do macrófago se rompe, liberando assim amastigotas no tecido. Essas amastigotas podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridas por uma fêmea de flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.

A infecção do hospedeiro invertebrado começa quando uma fêmea de flebotomíneo pica um mamífero infectado durante o repasto sanguíneo. A fêmea usa seu aparelho bucal para furar a pele, dilacerando capilares e formando uma poça hemorrágica. A partir disso, ingere sangue contendo macrófagos infectados com amastigotas. O sangue é digerido no trato digestório do inseto. As formas amastigotas ingeridas com o sangue são agrupadas e envolvidas por uma matriz (matriz peritrófica - MP). Em seguida as amastigotas, transformam-se em uma forma replicativa chamada de promastigotas procíclicas. Posteriormente, a porção anterior da MP se rompe, e os parasitos são liberados no epitélio do intestino médio do inseto. As formas promastigotas se dividem por fissão binária e se ligam a microvilosidades do epitélio do intestino médio. Esta adesão ocorre predominantemente em toda a região do flagelo e envolve a participação de fosfolipídios (LPGs) presentes na superfície das promastigotas (SECUNDINO, 2005). Quando os parasitos se desprendem do epitélio, as promastigotas migram em direção à válvula estomodeal localizada no intestino médio anterior, onde se concentram e reiniciam a divisão celular. Estas são responsáveis pela produção e secreção de um gel, que atua como um tampão, obstruindo o intestino médio e a faringe. Durante a produção do gel, os parasitos começam a transformar-se em formas promastigotas metacíclicas infectantes (Figura 6). Este processo de diferenciação é denominado metaciclogênese. Parasitos causam danos à válvula estomodeal, interferindo em sua função e facilitando um refluxo dos parasitos da região torácica e intestino médio (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

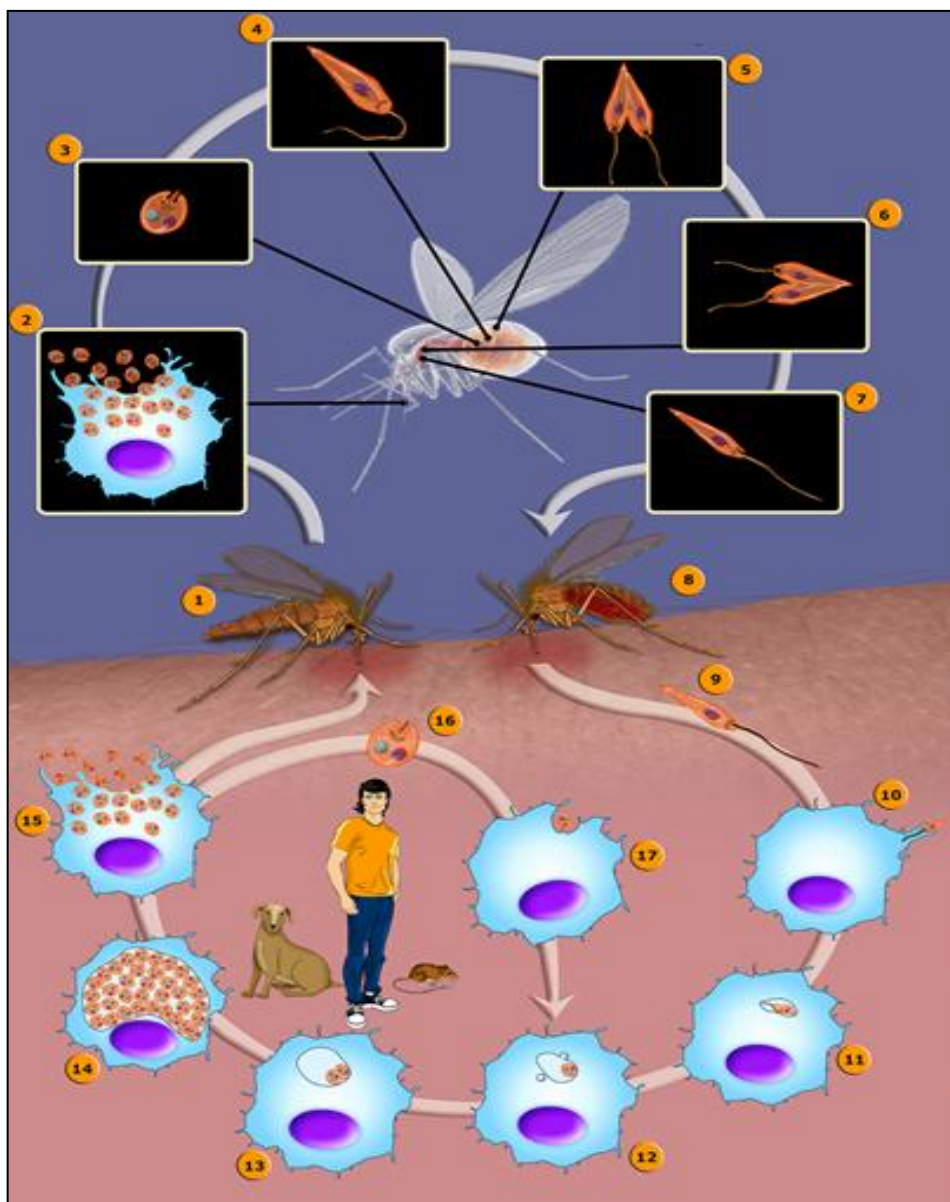


Figura 6- Ciclo biológico de *Leishmania* no hospedeiro vertebrado e invertebrado. TEIXEIRA *et al.*, 2013.

1.3. Técnicas moleculares usadas na caracterização taxonômica e epidemiologia de *Leishmania*

A taxonomia de *Leishmania* é complexa e desde a criação do gênero, o número de espécies tem aumentado significativamente, com propostas de novos esquemas de classificação. A exata identificação das espécies de *Leishmania* é de grande importância quando se tratam dos aspectos clínicos, epidemiológicos, diagnóstico, controle e tratamento das leishmanioses.

Várias técnicas, incluindo cultivo *in vitro* dos parasitos, microscopia, abordagens

bioquímicas, imunológicas e moleculares têm sido utilizadas para identificação e caracterização de *Leishmania* (NEMATÍ *et al.*, 2017). *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) é considerada o método de referência para identificação e caracterização de *Leishmania* spp. (SCHONIAN *et al.*, 2013). Entretanto, essa técnica requer o cultivo em massa dos parasitos e não detecta diferenciação em zimodemas de genótipos distintos. Por outro lado, os métodos envolvendo Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Polimorfismo de tamanho de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), Tipagem genotípica usando marcadores de microssatélites (MLMT), análise do sequenciamento de DNA da região intergênica do DNA de *Leishmania* (*Internal Transcribed Spacer 1- ITS1*) e de fragmentos de genes, como por exemplo, os genes da *N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferase* (*nagt*), proteinase cisteína *b* (*cytb*), proteína de choque térmico de 70k (*hsp70*) são altamente informativos para o estudo das relações filogenéticas do parasito (NEMATÍ *et al.*, 2017).

Vários níveis de diferenciação inter e intraespecíficos têm sido observados em espécies de *Leishmania* do Velho e Novo Mundo, nos espaçadores internos transcritos 1 e 2 (ITS1 e ITS2), presentes em multicópias do gene ribossomal não expresso (SCHONIAN *et al.*, 2003). Os genes codificadores da proteína *b* cisteínase (*cytb*) (MONTALVO *et al.*, 2008) e da proteína de choque térmico de 70k (*hsp70*) estão presentes como multicópias de repetições *in tandem* e são altamente conservados no genoma de *Leishmania* (NEMATÍ *et al.*, 2017). O gene *nagt* possui cópia única, igualmente conservado e funcionalmente indispensável, o que o torna considerável como marcador para identificação de espécies e análises filogenéticas do parasito (SABERI *et al.* 2018).

1.3.1. Microssatélites

A identificação de marcadores polimórficos aumentou significativamente com a descoberta dos microssatélites ou SSR - repetições de sequências simples (*Single Sequence Repeat*), ou Repetições de Sequências Curtas - STRs (*Short Tandem Repeats*). Microssatélites são sequências curtas (*Sequence Motif*) de repetição em “*tandem*” de 1 a 6pb, amplamente distribuídos nos genomas de procariotos e eucariotos (ELLEGREN, 2004). Podem ser encontrados em qualquer parte do genoma, tanto em regiões codificadoras como não codificadoras (ELLEGREN, 2004). Quando encontrados em regiões não codificadoras do genoma, são considerados marcadores neutros, constituindo-se em excelentes marcadores para mapeamentos de alta resolução genética (OCHSENREITHER *et al.*, 2006). Os *loci* de microssatélites são caracterizados pela alta heterozigosidade e presença de alelos múltiplos,

em contraste com as sequências únicas de DNA. Apresentam polimorfismos, principalmente devido às variações de tamanho nos alelos. São marcadores codominantes, pois possibilitam diferenciar os *loci* heterozigóticos dos homozigóticos (CABALLERO *et al.*, 2008; KUHLIS *et al.*, 2011).

O genoma de *Leishmania* é relativamente rico em microssatélites, com cerca de 600 repetições do tipo (CA)_n por *locus* haplóide (ROSSI *et al.*, 1994; TÓTH *et al.*, 2000). As variações nos *loci* individuais podem ser facilmente identificadas após a amplificação por PCR (SCHWENKENBECHER *et al.*, 2004).

A técnica MLMT (*Multilocus Microsatellite Typing*) é uma das ferramentas moleculares e epidemiológicas mais relevantes em relação ao seu desempenho para classificação e análises filogenéticas das populações de *Leishmania* em nível de espécies e detecção de mutações (SCHONIAN, G. *et al.*, 2008). Alguns estudos aplicaram MLMT na população de *L. major*. Dois desses estudos mostraram que esse método é promissor na avaliação do polimorfismo genético intraespecífico dessa espécie (AL-JAWABREH *et al.*, 2008; MAHNAZ T. *et al.*, 2011). MLMT tem fornecido importantes informações sobre a epidemiologia das leishmanioses, com a caracterização de cepas de diferentes áreas geográficas e endêmicas, estreitamente relacionadas dentro de uma região, de um país para outro e em todos os continentes (ELFARI *et al.*, 2005; AL JAWABREH *et al.*, 2008). Dessa forma, já foram referidas correlações entre a diversidade genética de *L. major* com sua origem geográfica (AL-JAWABREH *et al.*, 2008; MAHNAZ T *et al.*, 2011). Um estudo realizado no Paquistão usando MLMT revelou polimorfismos significativos com heterozigosidade alélica rara e permitiu identificar duas populações de *L. major* dentro dos mesmos focos (ALAM *et al.*, 2014). Isso foi explicado pela diversidade genética de vetores (HAMARSHEH *et al.*, 2009) e/ou espécies de reservatórios presentes nas áreas de estudo.

1.3.2. Sequenciamento

O mapeamento e o sequenciamento do genoma de *Leishmania* sp., *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* revelaram que, os cromossomos de *Leishmania* diferem dessas espécies de tripanosomatídeos, por não apresentarem extensas regiões subteloméricas que contém os genes espécie-específicos. Várias espécies de *Leishmania* já possuem seus genomas sequenciados e armazenados em bancos *on-line*. O primeiro genoma de *Leishmania* sequenciado foi o de *Leishmania major* (IVENS *et al.*, 2005). Em seguida foram publicados os genomas de outras espécies, como por exemplo, *L. braziliensis* e *L. infantum* (PEACOCK

et al., 2007), *L. mexicana* (ROGERS *et al.*, 2011), *L. donovani* (DOWNING *et al.*, 2011) e *L. amazonensis* (REAL *et al.*, 2013).

A comparação dos genomas dessas espécies identificou um alto nível de sequências codificantes conservadas e homologia entre os genes. Entre os genes identificados, poucos são espécie-específicos, e podem estar envolvidos na virulência e tropismo destes parasitos, estando associados com as diferentes formas de leishmanioses (PEACOCK *et al.*, 2007).

O genoma de *Leishmania* é constituído pelo DNA nuclear e pelo DNA mitocondrial ou DNA do cinetoplasto (kDNA), presente na única mitocôndria desses parasitos. O DNA mitocondrial é formado por maxicírculos e minicírculos que se unem para formar uma rede de DNA, que representa 10-15% do DNA total do parasito. Nos maxicírculos, encontra-se o DNA que codifica RNAs ribossomais e transportadores, enquanto no DNA dos minicírculos localizam-se os RNAs guias (SIMPSON, 1987; SHAPIRO & ENGLUND, 1995; MORRIS *et al.*, 2001).

As várias espécies de *Leishmania* apresentam arranjos genômicos similares, geralmente consistindo em 34 a 36 pares de cromossomos, numerados de 1 a 36 de acordo com o tamanho, que varia de ≈ 250 kilobases (Kb) até ≈ 4 megabases (Mb). As espécies do Velho Mundo (*L. donovani* e *L. major*) têm 36 cromossomos e as espécies do Novo Mundo têm somente 34 em *L. mexicana* e *L. amazonensis* ou 35 nas espécies do complexo *L. braziliensis* (BANULS *et al.*, 2007). *L. infantum* (Complexo *L. donovani*) contém 19 a 25 genes que estão ausentes ou presentes como pseudogenes em *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis*. As funções de alguns desses 25 genes podem ser preditas por similaridades de sequência, embora a maioria codifique proteínas hipotéticas sem função conhecida (ROGERS *et al.*, 2011).

O uso de novas tecnologias de sequenciamento do DNA (*Next Generation Sequencing*) proporcionou uma produção de dados em larga escala, abrindo novas oportunidades para as análises pós-genômicas. A partir disso, tem-se investigado as diferenças genéticas, peculiaridades fenotípicas como tropismo de tecidos, diferenças na apresentação clínica e os genes envolvidos no mecanismo de sobrevivência e resistência a fármacos (PEACOCK *et al.*, 2007; SMITH *et al.*, 2007; IMAMURA *et al.*, 2016). Desta maneira, a montagem e anotação das leituras geradas por sequenciamento tornam-se extremamente úteis para caracterização e inferência evolutiva de genomas, bem como, para promover o desenvolvimento de novas ferramentas necessárias para o controle das leishmanioses.

No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de parasitos, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado

sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle. Compreender o genoma das espécies de *Leishmania*, sua variação natural e a estrutura genética de populações nas regiões endêmicas são essenciais para sustentar e melhorar as estratégias de vigilância e de intervenção na saúde pública.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são doenças de transmissão vetorial e integram o grupo de doenças infecciosas negligenciadas, uma vez que ocorrem nos países mais pobres e atingem as populações mais vulneráveis e com difícil acesso aos serviços de saúde. Apresentam uma ampla distribuição global e a maioria dos casos ocorre na África, Ásia e nas Américas. Nas Américas, as leishmanioses estão presentes em 18 países e a forma clínica mais comum é a leishmaniose cutânea (LC). Além disso, a leishmaniose mucocutânea (LMC) possui evolução crônica podendo causar deformidades e sequelas.

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um importante problema de saúde pública no Brasil, que tem se agravado devido ao crescente processo de urbanização da doença. Estudos envolvendo isolados de *L. major*-like são fundamentais para o conhecimento dessa espécie e para acrescentar informações sobre o quadro eco-epidemiológico da LTA no país.

O controle da LTA depende do conhecimento de vários aspectos da sua epidemiologia, das espécies de *Leishmania* envolvidas e das características peculiares do foco em questão.

Este é o primeiro estudo investigando a heterogeneidade genética de isolados de *L. major*-like do Brasil em comparação com cepas de *L. major* utilizando tipagem por microssatélites e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados, com os alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

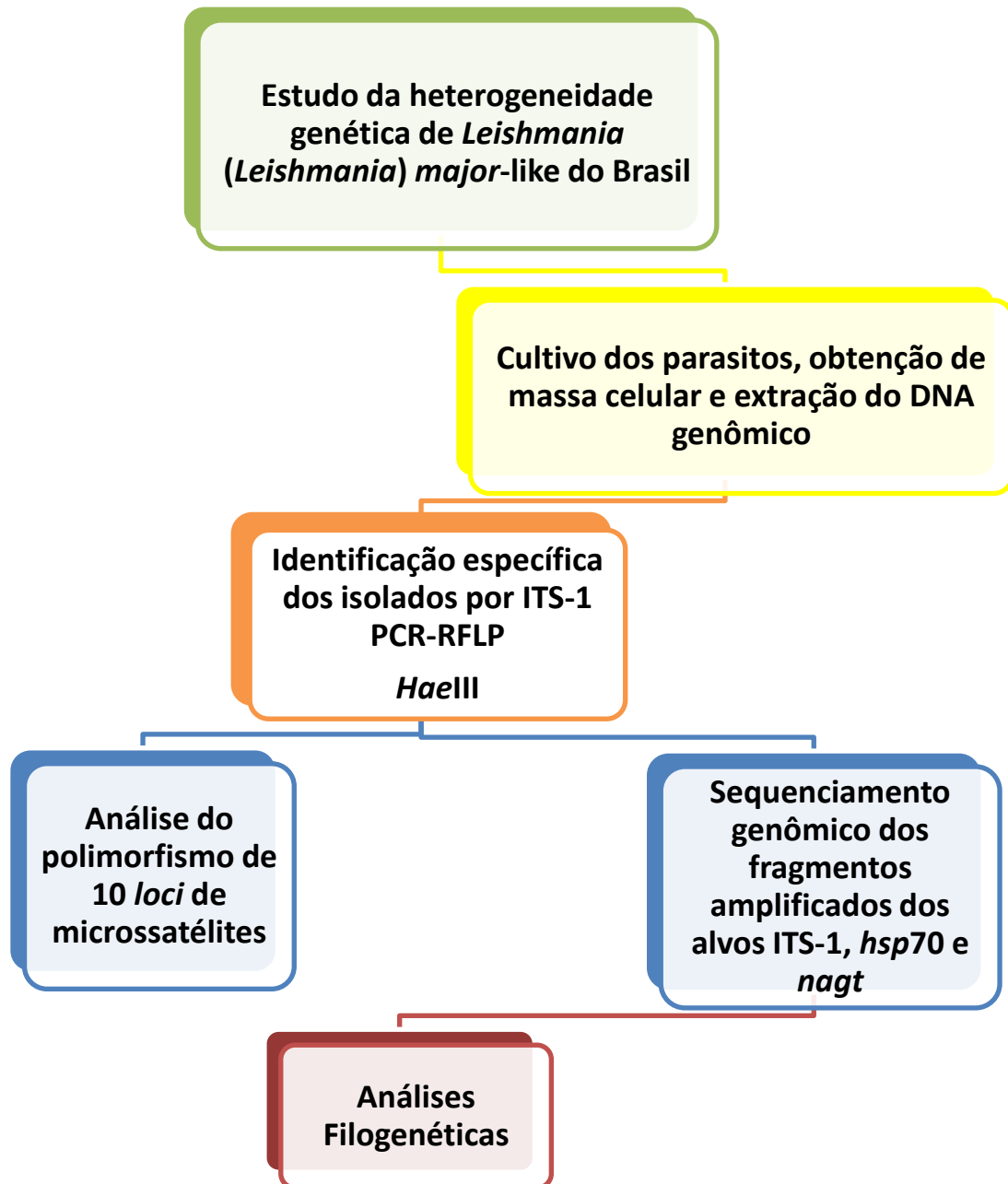
O objetivo deste estudo foi caracterizar isolados de *L. major*-like do Brasil utilizando técnicas de biologia molecular, em comparação com cepas de *L. major*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Investigar a diversidade genética de isolados de *L. major*-like do Brasil com marcadores de microssatélites, através da tipagem de 10 *loci* previamente descritos para *L. major*;
- ✓ Investigar a diversidade genética de isolados de *L. major*-like do Brasil através da análise do sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados, com o espaçador interno transcrito 1 de *Leishmania* (ITS-1); com o gene da proteína de choque térmico 70k (*hsp70*) e gene N-acetil-glucosamina-1-fosfato transferase (*nagt*);
- ✓ Realizar análises de filogenia molecular, comparando as cepas de *L. major* com os isolados de *L. major*-like do Brasil.

4. METODOLOGIA

4.1. Delineamento Experimental



4.2. Contexto geográfico dos isolados de *Leishmania* em estudo

A tabela 2 apresenta as cepas de *L. major* e os isolados de *L. major*-like que foram utilizados neste estudo.

Tabela 2. Amostras de *Leishmania* utilizadas no estudo

Denominação	Código Internacional	Espécie
PH8	IFLA/BR/1968/PH8	<i>L. (L.) amazonensis</i>
M2903	MHOM/BR/1975/M2903	<i>L. (V.) braziliensis</i>
M1176	MHOM/BR/1970/M1176	<i>L. (Viannia) guyanensis</i>
BEL21	MHOM/BR/1982/BEL21	<i>L. (L.) mexicana</i>
5ASKH	MHOM/SU/1973/5ASKH	<i>L. (L.) major</i>
BH10	MHOM/IQ/1985/BH10	<i>L. (L.) major</i>
BH12	MHOM/IQ/1985/ BH12	<i>L. (L.) major</i>
BH13	MHOM/IQ/1985/ BH13	<i>L. (L.) major</i>
BH15	MHOM/IQ/1985/ BH15	<i>L. (L.) major</i>
BH49	MHOM/BR/1971/ BH49	<i>L. (L.) major</i> -like
BH70	MCAN/BR/1973/ BH70	<i>L. (L.) major</i> -like
BH121	MHOM/BR/1973/ BH121	<i>L. (L.) major</i> -like
BH122	MHOM/BR/1982/ BH122	<i>L. (L.) major</i> -like
BH129	MHOM/BR/1986/ BH129	<i>L. (L.) major</i> -like
BH135	MHOM/BR/1986/ BH135	<i>L. (L.) major</i> -like

Com exceção do isolado BH49, proveniente de caso humano de leishmaniose tegumentar do estado de Goiás, os demais isolados de *L. major*-like foram provenientes de casos humanos de leishmaniose tegumentar da região do Vale do Rio Doce-MG. Todos os isolados de *L. major*-like do Brasil são de indivíduos que nunca viajaram para fora do país. Um isolado, BH70 foi obtido de pele de cão procedente da mesma área. As cepas caracterizadas como *L. major* foram isoladas em Belo Horizonte - MG, de pacientes que se infectaram no Iraque, na região de Basra, durante a construção de uma estrada de ferro de Basra a Bagdá (Figura 7). Todas as amostras encontravam-se criopreservadas no Criobanco de cepas do laboratório de Biologia de *Leishmania*, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais e no criobanco da *London School of Hygiene and Tropical Medicine - University of London*.



Figura 7- Localização das cepas de *Leishmania major* e dos isolados de *Leishmania major*-like incluídos no presente estudo. Sudão: 5ASKH e Iraque: BH10, BH12, BH13, BH15 (*L. major*). Brasil: BH49, BH70, BH121, BH122, BH129, BH135 (*L. major*-like).

4.3. Cultivo dos Parasitos

Os parasitos foram cultivados em frascos de 25mL (*Sarstedt*) contendo 10mL de meio α -MEM (*Gibco, Invitrogen, NY, USA*) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (*Cultilab, Campinas, Brasil*), 100U/mL de penicilina e 100U/mL de estreptomicina, pH 7,2 (denominado Meio α -MEM Completo). Os parasitos foram mantidos incubados em estufa BOD a $24\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.4. Obtenção de massa celular

Os parasitos foram coletados na fase logarítmica de crescimento, quantificados em câmara de Neubauer e lavados três vezes em tubos cônicos de 15mL (*Sarstedt*), por centrifugação ($800\times g$ por 15min à 4°C) com 10mL de PBS 0,15M (salina fosfatada). A massa celular dos isolados foi estocada à temperatura de -80°C até o uso.

4.5. Extração do DNA genômico dos parasitos estudados

A extração do DNA genômico foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Sambrook *et al.*, (1989), utilizando uma massa celular de 1×10^8 promastigotas/mL com

fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (24:24:1). As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro a 260nm (*Gene Quant*®, *Biotec*), diluídas em água ultrapura para uma concentração final de 1ng/μL e estocadas à -20°C até o momento do uso.

4.6. Identificação dos isolados estudados por PCR-RFLP

O DNA das amostras estudadas foi usado para a amplificação de fragmentos da região intergênica do DNA de *Leishmania* (*Internal Transcribed Spacer 1- ITS1*), com os iniciadores LITSR e L5.8S, como previamente descrito por SCHONIAN *et al.*, (2003). Os DNAs foram submetidos à reação da PCR utilizando *Illustra™ PureTaq™ Ready To go™ PCR Beads* (*Amersham Biosciences*), composto por reagentes otimizados para reações de PCR, sob a forma de pérolas liofilizadas reconstituídas para um volume final de 25μL (dNTPs 200mM, Tris-HCl (pH 9,0) 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM e enzima TaqDNA polimerase 0,04U/μL). A cada tubo contendo uma pérola foram adicionados 19μL de água ultrapura e 2μL de cada iniciador na concentração de 10pmoles/μL. Após a completa dissolução da pérola, foi adicionado à mistura de reagentes 2μL da amostra de DNA (1ng/μL) e as reações foram submetidas ao termociclador PT100 *MJ Research* (*Wartertown, MA, USA*).

Tabela 3. Ciclo de amplificação utilizado para o alvo ITS-1.

<i>Alvo</i>	<i>Fases</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
ITS-1	Desnaturação Inicial	95°C	5min	1
	Desnaturação	94°C		
	Anelamento	55°C	30seg	35
	Extensão	72°C		
	Extensão Final	72°C	10min	1

Cinco microlitros de cada produto amplificado foram digeridos com a enzima de restrição *HaeIII* (*Biolabs, Inc New England*) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (PAGE) para verificação dos padrões de restrição. Os padrões de restrição obtidos foram comparados com aqueles das cepas de referência da Organização Mundial de Saúde (OMS) - *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. guyanensis* (MHOM/BR/1970/M1176), *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) e *L. major*

(MHOM/SU/1973/5ASKH).

4.7. Eletroforese em gel de Poliacrilamida não-desnaturante (PAGE)

Os produtos obtidos através da amplificação do DNA genômico das amostras estudadas, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (PAGE), para verificação dos fragmentos de interesse amplificados. Os fragmentos amplificados foram visualizados por coloração em nitrato de prata, de acordo com o protocolo descrito por SANTOS *et al.*, (1993). Para a corrida eletroforética foi utilizada uma alíquota de 3 a 5µL do produto amplificado, diluída em tampão da amostra 2X (0,5% de azul de bromofenol, 0,5% de xileno-cianol, 400mM de Ficoll). O gel foi submetido a uma corrente elétrica de 100volts em TBE 1X (89mM de Tris base, 89mM de ácido bórico, 2mM de EDTA), até a completa migração dos fragmentos em comparação com os fragmentos constituintes de marcadores de peso molecular de 1Kb ou 100pb (*Promega, USA*). Os géis foram documentados para análise dos resultados.

4.8. Estudo da variabilidade inter e intraespecífica das amostras de *Leishmania* estudadas

4.8.1. Análise de polimorfismos de microssatélites pelo Método de MLMT

Para a análise da presença de sítios polimórficos de microssatélites, as amostras de DNA de cepas de *L. major*-like foram submetidas à reação de PCR, utilizando 10 pares de oligonucleotídeos. Os *loci* de microssatélites utilizados foram previamente descritos por AL-JAWABREH *et al.* (2008) para *L. major*. As sequências dos marcadores e suas respectivas temperaturas de anelamento estão descritas na Tabela 4. A Tabela 5 descreve o ciclo de amplificação para os marcadores utilizados neste estudo.

Tabela 4. Sequências dos marcadores de microsatélites descritos para *L. major*.

Iniciador	Sequência	Tamanho (pb)	TA	Cromossomo
4GTG	F: 5'CGGTTTGGCGCTGAAAGCGG R: 5'CGTGAGGACGCCACCGAGGC	70	58°C	35
27GTG	F: 5'GGAGGTGGCTGTGGTTGTTG R:5'GCCGCTGACGCTGCAGGCT	75	58°C	3
36GTG	F: 5'AGCGAAGAAGAGTCGGGCAG R: 5' GCGCCTTCAGTGGTCGTCC	68	62°C	1
39GTG	F:5'GTCTTGCCGCAGGGTGACC G R:5'CCAGCACCAGCACCACCATC	86	58°C	1
45GTG	F:5'ACGGCCGGGTGGTCGTGGGT R:5'CGTTCGCACGCAGCACGCA	86	58°C	1
1GC	F:5'CTGGCACGCACCCACACA R:5' ATCTGCGCTCATCTGGCGAG	64	60°C	3
28AT	F:5' TTGCCTATCAACACAAGGCT R:5' AGTCTCTCTCTCTCTATA	65	42°C	5
7IAT	F:5' TCTTGCGAAGGTGTTGGTCTT R:5' AGCCACGTGTACATGTGTG	55	50°C	21
1GACA	F:5' GAAAGGGCAGGAGGACGGAT R:5' CACACACACATACACATA	75	54°C	1
1CA	F:5' TTAGTTCCATCATAACCG R:5' CGTTCGACATGGAGAATAAG	87	48°C	35

Fonte: AL-JAWABREH *et al.*, (2008) pb pares de bases; TA Temperatura de Anelamento

Tabela 5. Ciclo de amplificação utilizado para os marcadores de microsatélites.

Fases	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
Desnaturação Inicial	95°C	6min	1
Desnaturação	94°C	30seg	
Anelamento	TA	30seg	35
Extensão	72°C	1min	
Extensão Final	72°C	10min	1

Os DNAs das amostras foram submetidos à reação da PCR utilizando o Kit *PureTaq Ready To go PCR Beads* (Amersham Biosciences), composto por reagentes sob a forma de pérolas liofilizadas reconstituídas para um volume final de 25 μ L (dNTPs 200mM, Tris-HCl (pH 9,0) 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1.5mM e enzima TaqDNA polimerase 0,04U/ μ L). A cada tubo contendo uma pérola foram adicionados 19 μ L de água ultrapura e 2 μ L de cada iniciador na concentração de 10pmoles/ μ L (iniciador direto marcado com fluoresceína na extremidade 5' e reverso não marcado). Após a completa dissolução da pérola, foram adicionados 2 μ L da amostra de DNA (1ng/ μ L) à mistura de reagentes e as reações foram submetidas ao termociclador PT 100 *MJ Research* (Wartertown, Mass USA). Os produtos das PCRs foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (PAGE) para verificação dos fragmentos de interesse amplificados.

4.8.2. Determinação do tamanho dos alelos dos microssatélites

Para determinar os tamanhos dos alelos amplificados do genoma de *L. major*-like, 0,8-1,2 μ L dos produtos fluorescentes da PCR obtidos com os iniciadores para microssatélites foram analisados em gel de poliacrilamida 6% (PAGE), no sequenciador automático de Laser Fluorescente - ALF (*Automated Laser Fluorescent Sequencer, GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, EUA*). Foram utilizadas escalas alélicas como padrão externo das corridas eletroforéticas, contendo uma mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares de 75, 155, 210, 280 e 320pb (*IDT, Integrated DNA Technologies, Brasil*), na concentração de 5fmol por fragmento. Foi acrescentada uma alíquota da mistura de fragmentos fluorescentes de pesos moleculares de 75-320pb a cada canaleta do gel como controle de padrão interno da corrida.

4.8.3. Análise dos dados obtidos por MLMT

Os resultados obtidos sob a forma de cromatogramas foram analisados utilizando o *Software AlleleLocator 1.4* (*GE Healthcare, Milwaukee, Wisconsin, EUA*). Os fragmentos de tamanhos conhecidos presentes nos padrões (externo e interno) das corridas foram alinhados, sendo então calculados os tamanhos dos alelos para cada *locus* de microssatélite. A variedade e a frequência de alelos nos *loci* de microssatélites estudados foram analisados utilizando o *Software GenAIEx* versão 6.3 (PEAKALL & SMOUSE, 2006).

4.9. Sequenciamento

Os iniciadores dos alvos moleculares ITS-1, *hsp70* e *nagt* (Tabela 6) foram explorados para a amplificação do DNA das amostras estudadas e sequenciamento dos fragmentos amplificados pelo método de Sanger (1975).

Tabela 6. Sequência dos marcadores dos alvos moleculares utilizados no estudo.

Alvo	Iniciador	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
ITS1	F 5' CTGGATCATTTTCCGATG 3'	300-350	El Tai <i>et al.</i> , (2000)
	R 5' TGATACCACTTATCGCACTT 3'		El Tai <i>et al.</i> , (2001)
<i>hsp70</i>	F 5'GACGGTGCCTGCCTACTTCAA3'	1422	Nemati <i>et al.</i> , (2017)
	R 5'CCGCCATGCTCTGGTACATC3'		
<i>nagt</i>	F 5'TCATGACTCTTGGCCTGGTAG3'	1450	Waki <i>et al.</i> , (2007)
	R 5'CTCTAGCGCACTTCATCGTAG3'		

Os DNAs das amostras estudadas foram submetidos à reação da PCR utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 4.6. Os protocolos de amplificação dos iniciadores ITS-1, *hsp70* e *nagt* estão descritos nas Tabelas 3 e 7. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (PAGE) para verificação dos fragmentos de interesse amplificados. O sequenciamento dos fragmentos de DNA amplificados por ITS-1, *hsp70* e *nagt* com as amostras estudadas foi realizado pelo CT Vacinas/UFMG, utilizando sequenciador automático (ABI 3730xl DNA Analyzer Applied Biosystems TM). Visando corrigir possíveis erros ou ambiguidades de sequenciamento, foram sequenciadas ambas as fitas “*Forward e Reverse*” de cada amostra de DNA amplificado.

Tabela 7. Ciclos de amplificação utilizados para os alvos moleculares *hsp70* e *nagt*

<i>Alvo</i>	<i>Fases</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Tempo</i>	<i>Nº de Ciclos</i>
<i>hsp70</i>	Desnaturação Inicial	95°C	5min	1
	Desnaturação	94°C	30seg	
	Anelamento	61°C	1min	35
	Extensão	72°C	3min	
	Extensão Final	72°C	10min	1
<i>nagt</i>	Desnaturação Inicial	94°C	1min	1
	Desnaturação	94°C	1min	
	Anelamento	58°C	30seg	35
	Extensão	72°C	1,5min	
	Extensão Final	72°C	10min	1

4.9.1. Purificação dos produtos amplificados com os alvos moleculares para o sequenciamento

Um volume de 50µL dos produtos amplificados com os alvos moleculares de interesse foi transferido para tubos cônicos de 1.5mL, contendo o mesmo volume de (PEG - polietilenoglicol 20% NaCl 2.5M+PEG 20%). Após agitação em vortex por 20s, os tubos foram incubados por 15min em banho-maria a 37°C, centrifugados (20000×g por 15min à 4°C) e o sobrenadante descartado. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com 125 µL de álcool etílico P.A. 80% gelado e centrifugado após cada adição de álcool etílico (20000×g por 15min à 4°C) e o sobrenadante descartado. Após, o *pellet* foi secado a temperatura ambiente. As amostras dos DNAs amplificados foram eluídas em 20µL de água ultra-pura, quantificadas em espectrofotômetro (*Gene Quant*®, *Biotec, USA*) a 260nm.

4.10. Análise do Sequenciamento

Para a análise do sequenciamento, os dados brutos em forma de cromatogramas (arquivos.abi) gerados pelo sequenciador automático “*Analyzer Applied Biosystems*” foram visualizados e convertidos em arquivos no formato texto contendo as sequências, utilizando o

Software Electropherogram quality analysis (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Em seguida foram identificadas e retiradas as regiões que estavam abaixo do valor de qualidade e sequências contaminantes. Com esse *software* os fragmentos das sequências “Forward e Reverse” foram montados gerando os “contigs”. Finalizada a montagem dos “contigs”, as sequências obtidas foram comparadas, sendo então estabelecidas as relações filogenéticas entre as sequências de interesse.

4.10.1. Análises Filogenéticas

As árvores filogenéticas foram construídas usando o método de *maximum likelihood* (ML) utilizando o *software* MEGA versão 7.0 (KUMAR *et al.*, 2016). O dendrograma baseado nos *loci* foi construído por clusterização hierárquica utilizando o pacote pvclust versão 2.2-0 (1) implementado em plataforma R 4.1.0 (2). Para a análise dos microssatélites, o parâmetro de distância foi ajustado para correlação (R. DEVELOPMENT CORE TEAM, 2008; SUZUKI & SHIMODAIRA, 2006). Para avaliar a confiança no suporte de cada nó da topologia do dendrograma, os valores de *bootstrap* foram determinados com 1000 replicatas dos dados.

4.11. Análises Estatísticas

Para análise estatística foi utilizado o suplemento de dados do Excel. As amostras estudadas foram divididas em dois grupos para as análises estatísticas dos microssatélites: cepas de *L. major* do Velho Mundo e isolados de *L. major*-like do Brasil. Os *loci* de microssatélites foram avaliados quanto à presença de *outliers*. Foram realizados os testes ANOVA para os dados paramétricos e Kruskal Wallis para os dados não paramétricos. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados indicativos de significância para a análise.

5. RESULTADOS

5.1. Identificação genética dos isolados de *Leishmania*

As amostras utilizadas neste estudo já haviam sido caracterizadas em estudos prévios, como *L. major* e *L. major*-like e encontravam-se criopreservadas por longo período. Após serem descongeladas e cultivadas foi realizada uma nova identificação específica, para assegurar que se tratavam das espécies referidas.

O DNA genômico das amostras estudadas amplificou um fragmento de 300-350 pares de bases (pb) na reação de ITS1-PCR (Figura 8). O PCR-RFLP *Hae*III mostrou dois fragmentos de aproximadamente 130 e 200pb, correspondendo ao mesmo padrão de restrição da cepa de referência 5ASKH de *L. major* utilizada como controle (Figura 9).

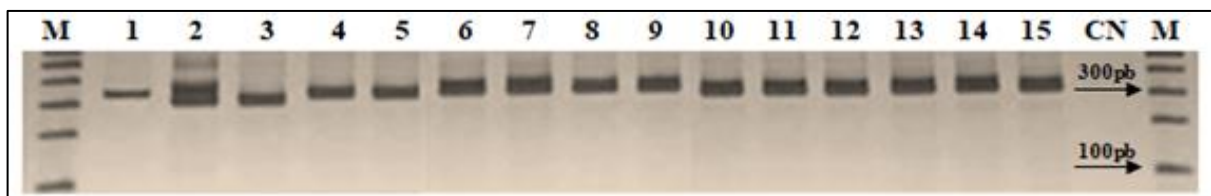


Figura 8- Eletroforese em PAGE 5% do alvo molecular ITS1-PCR. M: marcador molecular 100pb (*Promega, USA*). Linhas: 1- *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 2- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), 3- *L. guyanensis* (MHO/BR/1970/M1176), 4- *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), 5- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), 6-9 Cepas de *L. major* estudadas, 10-15 Cepas de *L. major*-like estudadas, CN Controle negativo da reação.

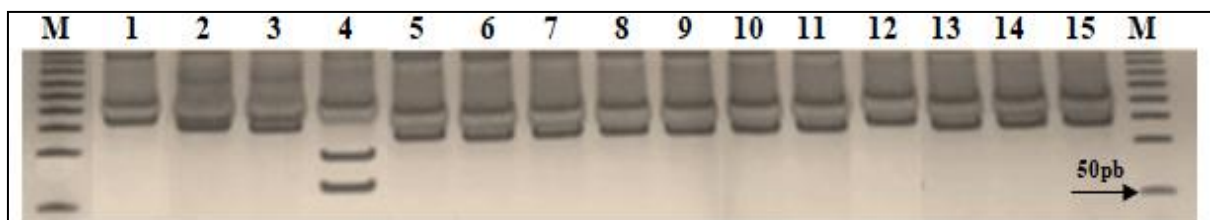


Figura 9- Eletroforese em PAGE 5% do ITS1 PCR-RFLP com enzima de restrição *Hae*III. M: marcador molecular 50pb (*Promega, USA*). Linhas: 1- *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 2- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), 3- *L. guyanensis* (MHO/BR/1970/M1176), 4- *L. mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21), 5- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), 6-9 cepas de *L. major* estudadas, 10-15 cepas de *L. major*-like estudadas.

5.2. Análise da variabilidade genética das amostras de *Leishmania* estudadas pela técnica de MLMT (*Multilocus Microsatellite Typing*)

5.2.1 Análise de polimorfismos de microssatélites

Os 10 *loci* de microssatélites utilizados (4GTG, 27GTG, 36GTG, 39GTG, 45GTG, 1GC, 28AT, 71AT, 1GACA e 1CA) amplificaram o DNA de todas as amostras estudadas. Foram encontrados de 4 a 21 repetições de nucleotídeos com fragmentos que variaram de 62-101pb, dependendo do marcador utilizado (Tabela 9).

Tabela 9. Número de repetições de nucleotídeos identificados nas amostras de *Leishmania* estudadas com os 10 *loci* de microssatélites utilizados.

Origem	Amostras	Marcador/ N° de nucleotídeos									
		4GTG	27GTG	36GTG	39GTG	45GTG	1GC	28AT	71AT	1GACA	1CA
Sudão	5ASKH	6/7	8/10	8	11/12	12	7	9	18/19	6	13
Iraque	BH10	5/6	8	7	11/12	10	7	9	17	6	21
	BH12	5/6	8	7	11/12	10	7	9	17	6	21
	BH13	6/7	6	9	11/12	12	7	10	17	6	13
	BH15	6/7	8	8	11/12	11	7	13	17	6	21
Brasil	BH49	6/7	8	9/10	09/10	10/12	7	9	20/21	7	17
	BH70	6	8	9/10	9/10	11/12	7	9	20/21	7	17
	BH121	6/7	7	9/10	9/10	11/12	7	9	20/21	7	17
	BH122	6/7	8	7	11/12	13/14	7	9/13	17	6	21
	BH129	4/5	8	7	11/12	9	7	9	17	7	21
	BH135	7/8	7	9/10	9/10	10/12	7	9	20	6	18

Os produtos amplificados das amostras estudadas com os 10 *loci* de microssatélites e analisados no sequenciador automático de DNA ALF (*Automated Laser Fluorescent*), geraram eletrofluorogramas. Para cada *locus* estudado, o perfil do eletrofluorograma com um pico foi interpretado como sendo homozigoto e dois picos heterozigoto (Figura 10).

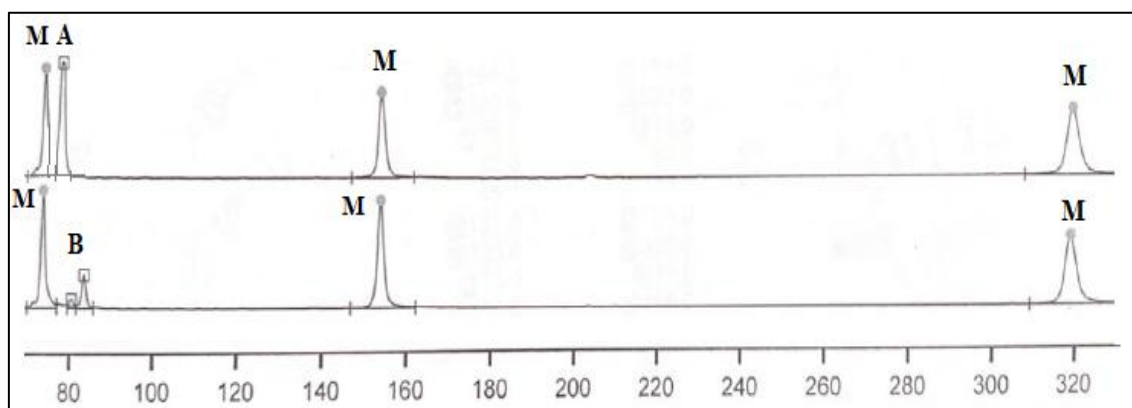


Figura 10- Perfis de eletrofluorogramas representativos obtidos do sequenciador automático de DNA, ALF (*Automated Laser Fluorescent Sequencer*) dos fragmentos amplificados por PCR com o *locus* 45GTG mostrando em A - padrão homozigoto (79pb) e B - padrão heterozigoto (81/85pb) dos isolados de *L. major*-like BH129 e BH135, respectivamente; M corresponde aos marcadores internos de peso molecular.

Os *loci* de microssatélites que mostraram perfis de heterozigotos para a cepa de *L. major* 5ASKH do Sudão foram 4GTG, 27GTG, 39GTG e 71AT; para as cepas de *L. major* do Iraque 4GTG e 39GTG, e para os isolados de *L. major*-like 4GTG, 36GTG, 39GTG, 45GTG, 28AT e 71AT (Tabela 10, Anexo A - Figuras 23 a 32). Todos os marcadores utilizados também detectaram perfis de homozigotos nas amostras estudadas, variando em números de repetições e tamanhos de fragmentos (Tabelas 9 e 10).

Na cepa 5ASKH do Sudão foram encontrados seis perfis de homozigotos e quatro de heterozigotos. Os *loci* 27GTG e 71AT identificaram dois perfis de heterozigotos distintos 71/77 e 64/66, respectivamente. As cepas de *L. major* do Iraque apresentaram 16 perfis de homozigotos e três de heterozigotos. Cinco perfis de homozigotos distintos foram identificados com os *loci* 27GTG na cepa BH13 (65/65), 36GTG nas cepas BH13 (67/67), 45GTG em BH15 (83/83), 28AT em BH13 (66/66) e BH15 (72/72). Os isolados de *L. major*-like apresentaram 14 perfis de homozigotos e 12 de heterozigotos. Seis perfis de homozigotos distintos foram identificados com os *loci* 4GTG no isolado BH70 (66/66), 27GTG nos isolados BH121 e BH135 (71/71), 71AT em BH135 (68/68), 1GACA em BH49, BH70, BH70, BH121 e BH129 (73/73) e 1CA em BH49, BH70, BH121 (93/93) e (95/95) em BH135. Nove perfis de heterozigotos distintos foram identificados com os *loci* 4GTG em

BH129 (62/64) e BH135 (70/72), 36GTG e 39GTG em BH49, BH70, BH121, BH135 (67/71 e 88/90, respectivamente), 45GTG em BH49 (81/85), BH70 e BH121 (83/85) e BH122 (89/91), 28AT em BH122 (64/72) e 71AT em BH49, BH70 e BH121(68/70) (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10. Tamanho em pares de bases (pb) dos alelos observados nas amostras de *Leishmania* estudadas com os 10 *loci* de microssatélites utilizados.

Origem	Amostras	Marcador/Tamanho alelos									
		4GTG	27GTG	36GTG	39GTG	45GTG	1GC	28AT	71AT	1GACA	1CA
Sudão	5ASKH	66/70	71/77	65/65	92/94	85/85	63/63	64/64	64/66	69/69	85/85
Iraque	BH10	64/66	73/73	63/63	92/94	79/79	63/63	64/64	62/62	69/69	101/101
	BH12	64/66	73/73	63/63	92/94	79/79	63/63	64/64	62/62	69/69	101/101
	BH13	66/70	65/65	67/67	92/94	85/85	63/63	66/66	62/62	69/69	85/85
	BH15	66/70	73/73	65/65	92/94	83/83	63/63	72/72	62/62	69/69	101/101
Brasil	BH49	66/70	73/73	67/71	88/90	81/85	63/63	64/64	68/70	73/73	93/93
	BH70	66/66	73/73	67/71	88/90	83/85	63/63	64/64	68/70	73/73	93/93
	BH121	64/66	71/71	67/71	88/90	83/85	63/63	64/64	68/70	73/73	93/93
	BH122	66/70	73/73	63/63	92/94	89/91	63/63	64/72	62/62	69/69	101/101
	BH129	62/64	73/73	63/63	92/94	79/79	63/63	64/64	62/62	73/73	101/101
	BH135	70/72	71/71	67/71	88/90	81/85	63/63	64/64	68/68	69/69	95/95

Foram identificados de um a seis variantes alélicas no conjunto das amostras de *Leishmania* estudadas. Os isolados de *L. major*-like apresentaram maior diversidade genética. O *locus* 27GTG foi o mais polimórfico para as cepas de *L. major* com quatro variantes alélicas, seguido por 4GTG, 36GTG, 45GTG, 28AT e 71AT com três variantes. O *locus* mais polimórfico para os isolados de *L. major*-like foi o 45GTG com seis variantes alélicas, seguido por 4GTG com cinco, 39GTG com quatro, 36GTG, 71AT e 1CA com três variantes. A frequência alélica foi baixa nas amostras de *Leishmania* estudadas, variando de 0,167 a 0,917. A heterozigosidade observada (*Ho*) foi maior que a esperada (*He*) para os *loci* 4GTG e 39GTG em todas as amostras de *Leishmania* estudadas, e nos isolados de *L. major*-like para o *locus* 45GTG. (Tabela 11).

Tabela 11. Características da diversidade genética das amostras de *Leishmania* estudadas por MLMT

<i>Loci</i>	Origem	N	Número de alelos	Alelos	Frequência alélica	<i>Ho</i>	<i>He</i>
4GTG	Sudão Iraque	5	3	64	0,250	1	0,625
				70	0,375		
				66	0,375		
	Brasil	6	5	62	0,083	0,833	0,722
				64	0,167		
				66	0,417		
				70	0,250		
27GTG	Sudão Iraque	5	4	65	0,250	0,200	0,375
				71	0,500		
				73	0,750		
	Brasil	6	2	77	0,500	0	0,444
				71	0,333		
				73	0,667		
36GTG	Sudão Iraque	5	3	63	0,375	0	0,625
				65	0,375		
				67	0,250		
	Brasil	6	3	63	0,333	0,667	0,667
				67	0,333		
				71	0,333		
39GTG	Sudão Iraque	5	2	92	0,500	1	0,500
				94	0,500		
	Brasil	6	4	88	0,333	1	0,722
				90	0,333		
				92	0,167		
				94	0,167		
45GTG	Sudão Iraque	5	3	79	0,375	0	0,625
				83	0,250		
				85	0,375		
	Brasil	6	6	79	0,167	0,833	0,792
				81	0,167		
				83	0,167		
				85	0,333		
				89	0,333		
				91	0,333		
					0,083		
1GC	Sudão Iraque	5	1	63	1	0	0
	Brasil	6	1	63	1	0	0
28AT	Sudão Iraque	5	3	64	0,600	0,200	0,500
				66	0,200		
				72	0,200		
	Brasil	6	2	64	0,917	0,167	0,153
				72	0,083		
71AT	Sudão Iraque	5	3	62	0,600	0,200	0,500
				64	0,200		
				66	0,200		
	Brasil	6	3	62	0,333	0,500	0,553
				68	0,417		
				70	0,250		
1GACA	Sudão Iraque	5	1	69	0,333	0	0
	Brasil	6	2	69	0,500	0	0,444
1CA	Sudão Iraque	5	2	85	0,750	0	0,375
				101	0,250		
	Brasil	6	3	93	0,500	0	0,611
				95	0,167		
				101	0,333		

N: número de isolados; *Ho*: número de heterozigotos observados; *He*: número de heterozigotos esperado

5.2.2 Genótipos identificados nas amostras de *Leishmania* estudadas

As amostras de *Leishmania* estudadas com os *loci* de microssatélites utilizados apresentaram 36 genótipos. Esses genótipos foram nomeados com números de 1 a 36 (Tabela 12).

Tabela 12. Genótipos identificados nas amostras de *Leishmania* estudadas por MLMT

Genótipo	Tamanho dos alelos	Locus	Amostras	Alelos
1	66/70	4GTG	5ASKH, BH13 e BH15; BH49 e BH122 BH10 e BH12; BH121 BH129 BH135 BH70	5
2	64/66			
3*	62/64			
4*	70/72			
5*	66/66			
6	71/77	27GTG	5ASKH BH10, BH12 e BH15; BH49, BH70, BH122 e BH129 BH13 BH121 e BH135	4
7	73/73			
8	65/65			
9*	71/71			
10	65/65	36GTG	5ASKH e BH15 BH10 e BH12; BH122 e BH129 BH13 BH49, BH70, BH121 e BH135	4
11	63/63			
12	67/67			
13*	67/71			
14	92/94	39GTG	5ASKH, BH10, BH12, BH13 e BH15; BH122, BH129 BH49, BH70, BH121 e BH135	4
15*	88/90			
16	85/85	45GTG	5ASKH e BH13 BH15 BH10 e BH12; BH129 BH49 e BH135 BH122 BH70 e BH121	6
17	83/83			
18	79/79			
19*	81/85			
20*	89/91			
21*	83/85			
22	63/63	1CG	5ASKH, BH10, BH12, BH13 e BH15; BH49, BH70, BH121, BH122, BH129 e BH135	1
23	64/64	28AT	5ASKH, BH10, BH12; BH49, BH70, BH121, BH129 e BH135 BH13 BH122 BH15	4
24	66/66			
25*	64/72			
26	72/72			
27	64/66	71AT	5ASKH BH10, BH12, BH13 e BH15; BH122 e BH129 BH49, BH70 e BH121 BH135	5
28	62/62			
29*	68/70			
30*	68/68			
31	69/69	1GACA	5ASKH, BH10, BH12, BH13 e BH15; BH122 e BH135 BH49, BH70, BH121 e BH129	2
32*	73/73			
33	85/85	1CA	5ASKH e BH13 BH10, BH12, e BH15; BH122 e BH129 BH49, BH70 e BH121 BH135	4
34	101/101			
35*	93/93			
36*	95/95			

*Genótipos únicos de *L. major*-like

Os genótipos distintos identificados exclusivamente em uma determinada amostra foram denominados genótipos únicos. Os genótipos presentes em mais de uma amostra foram denominados genótipos compartilhados.

5.2.2.1 Genótipos únicos

Nove dos 10 *loci* utilizados (4GTG, 27GTG, 36GTG, 39GTG, 45GTG, 28AT, 71AT, 1GACA e 1CA) identificaram genótipos únicos nas amostras de *Leishmania* estudadas. Somente o *locus* 1CG não identificou genótipos únicos nas amostras de *Leishmania* estudadas. Foram identificados dois genótipos únicos para a cepa de *L. major* 5ASKH do Sudão, 6 e 27 com os *loci* 27GTG e 71AT, respectivamente. As cepas de *L. major* do Iraque apresentaram cinco genótipos únicos 8 (27GTG), 12 (36GTG), 17 (45GTG), 24 e 26 (28AT), e os isolados de *L. major*-like apresentaram 15 genótipos únicos 3, 4, 5 (4GTG), 9 (27GTG), 13 (36GTG), 15 (39GTG), 19, 20, 21 (45GTG), 25 (28AT), 29, 30 (71AT), 32 (1GACA), 35 e 36 (1CA). A análise de *outliers* nos *loci* dos microssatélites estudados apresentaram valores dentro da normalidade. Três *loci* apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$), na análise da variabilidade genética dos isolados de *L. major*-like do Brasil: 39GTG para os isolados BH49, BH70, BH121, BH135 ($p = 0,0174$); 71AT para os isolados BH49, BH70, BH121, BH135 ($p = 0,0260$) e 1GACA para os isolados BH49, BH70, BH121, BH129 ($p = 0,0004$).

5.2.2.2 Genótipos compartilhados

Com relação aos genótipos compartilhados entre as amostras de *Leishmania* estudadas, cinco genótipos (1, 14, 22, 23 e 31) foram compartilhados entre as cepas de *L. major* 5ASKH do Sudão, do Iraque e os isolados de *L. major*-like. O genótipo 1 identificado com o *locus* 4GTG foi compartilhado entre as cepas 5ASKH, BH13 e BH15, e os isolados BH49 e BH122. O genótipo 14 identificado com o *locus* 39GTG foi compartilhado entre todas as cepas de *L. major* e os isolados BH122 e BH129. O genótipo 22 identificado com o *locus* 1GC foi compartilhado entre todas as cepas de *L. major* e todos os isolados de *L. major*-like. O genótipo 23 identificado com o *locus* 28AT foi compartilhado entre as cepas 5ASKH, BH10 e BH12, e os isolados BH49, BH70, BH121, BH129 e BH135. O genótipo 31 identificado com o *locus* 1GACA foi compartilhado entre todas as cepas de *L. major* e os isolados BH122 e BH135.

Três genótipos (10, 16 e 33) foram compartilhados somente entre as cepas de *L. major* do Sudão e do Iraque. O genótipo 10 identificado com o *locus* 36GTG foi compartilhado entre as cepas 5ASKH e BH15. Os genótipos 16 e 33 identificados respectivamente, com os *loci* 45GTG e 1CA foram compartilhados entre as cepas 5ASKH e BH13.

Além disso, seis genótipos (2, 7, 11, 18, 28, 34) foram compartilhados somente entre cepas de *L. major* do Iraque e isolados de *L. major*-like. O genótipo 2 identificado com o *locus* 4GTG foi compartilhado entre as cepas BH10 e BH12 e o isolado BH121. O genótipo 7 identificado com o *locus* 27GTG foi compartilhado entre as cepas BH10, BH12 e BH15, e o isolados BH49, BH70, BH122 e BH129. O genótipo 11 identificado com o *locus* 36GTG foi compartilhado entre as cepas BH10 e BH12, e os isolados BH122 e BH129. O genótipo 18 identificado com o *locus* 45GTG foi compartilhado entre as cepas BH10 e BH12 e o isolado BH129. O genótipo 28 identificado com o *locus* 71AT foi compartilhado entre todas as cepas de *L. major* do Iraque e os isolados BH122 e BH129. O genótipo 34 identificado com o *locus* 1CA foi compartilhado entre as cepas BH10, BH12 e BH15 e os isolados BH122 e BH129 (Tabela 13).

5.2.3 Proporção de alelos únicos identificados nas amostras de *Leishmania* estudadas

Em relação à proporção de alelos únicos observados nos genótipos das amostras de *Leishmania* estudadas, a cepa de *L. major* 5ASKH do Sudão apresentou três alelos únicos identificados com os *loci* 27GTG e 71AT. O *locus* 27GTG identificou o alelo 77 na proporção de 50% e o *locus* 71AT identificou os alelos 64 e 66 na mesma proporção (Figura 11).

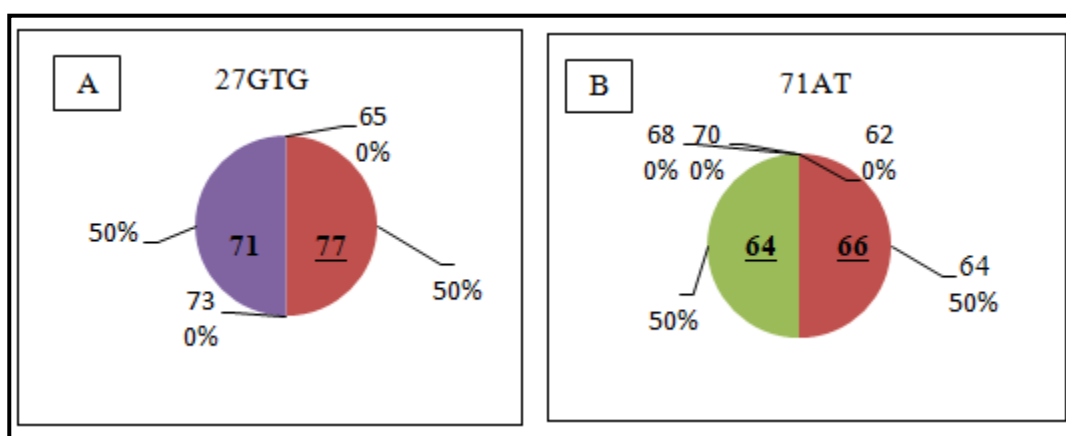


Figura 11. Proporção dos alelos únicos identificados pelos *loci* 27GTG e 71AT na cepa de *L. major* 5ASKH do Sudão. Sublinhado: alelos únicos

Somente a cepa de *L. major* do Iraque BH13 apresentou dois alelos únicos identificados pelos *loci* 27GTG e 28AT. Estes *loci* identificaram 25% dos alelos 65 e 66, respectivamente (Figura 12).

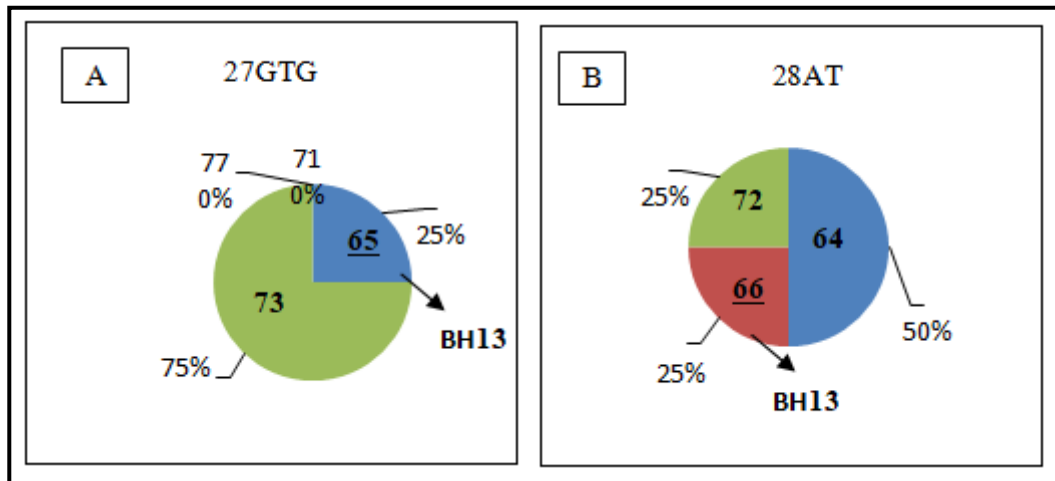


Figura 12. Proporção dos alelos únicos identificado pelos *loci* 27GTG e 28AT na cepa de *L. major* BH13 do Iraque. Sublinhado: alelos únicos

Os isolados de *L. major*-like apresentaram 13 alelos únicos identificados pelos *loci* 1CA, 4GTG, 36GTG, 39GTG, 1GACA, 45GTG e 71AT compartilhados entre esses isolados, com porcentagens que variaram de 8% a 67% (Figura 13).

O *locus* 1CA identificou 50% do alelo 93 para os isolados BH49, BH70 e BH121, e 17% do alelo 95 no isolado BH135.

O *locus* 4GTG identificou 8% dos alelos 62 e 72 para os isolados BH129 e BH135, respectivamente.

O *locus* 36GTG identificou 33% do alelo 71 para os isolados BH49, BH70, BH121 e BH135.

O *locus* 39GTG identificou 33% dos alelos 88 e 90 para os isolados BH49, BH70, BH121 e BH135.

O *locus* 1GACA identificou 67% do alelo 73 para os isolados BH49, BH70, BH121 e BH129.

O *locus* 45GTG identificou 17% do alelo 81 para os isolados BH49 e BH135 e 8% dos alelos 89 e 91 para o isolado BH122.

O *locus* 71AT identificou 42% do alelo 68 para os isolados BH49, BH70, BH121 e BH135 e 25% do alelo 70 para os isolados BH49, BH70 e BH121.

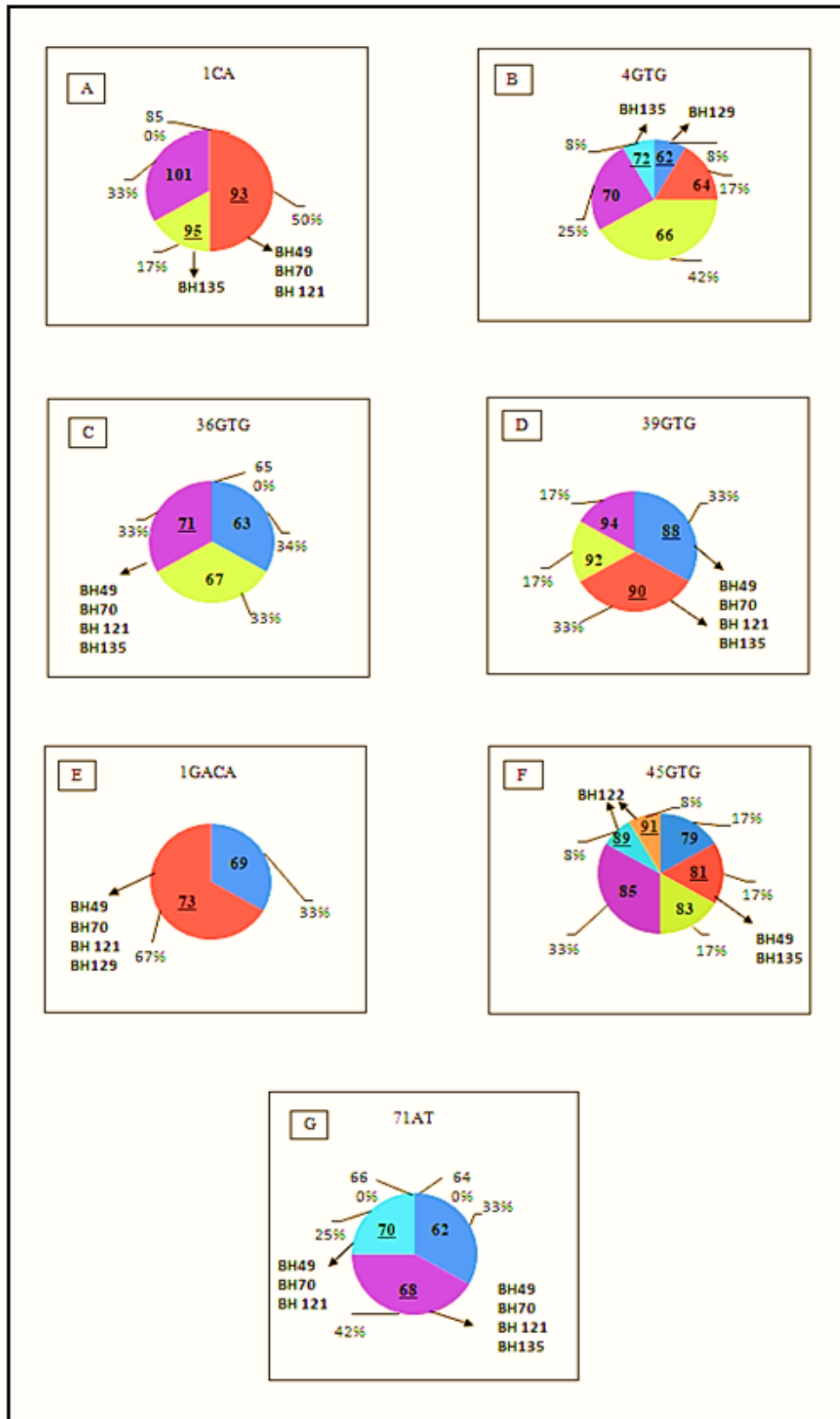


Figura 13. Proporção dos alelos únicos compartilhados entre os isolados de *L. major*-like identificados pelos loci A: ICA, B: 4GTG, C: 36GTG, D: 39GTG, E: 1GACA, F: 45GTG e G: 71AT. Sublinhados: alelos únicos

5.2.4 Proporção de alelos compartilhados entre as amostras de *Leishmania* estudadas

A Figura 14 apresenta a proporção dos alelos compartilhados entre as amostras estudadas, identificados pelos os *loci* 27GTG, 28AT, 39GTG, 45GTG, 4GTG, 1GACA e 1GC com porcentagens que variaram de 17 a 100%.

O *locus* 27GTG identificou 50% do alelo 71 para a cepa 5ASKH e 33% para os isolados BH121 e BH135. Este *locus* também identificou 75% do alelo 73 para as cepas BH10, BH12 e BH15, e 67% desse alelo para os isolados BH49, BH70, BH122 e BH129.

O *locus* 28AT identificou 100% do alelo 64 para a cepa 5ASKH, 50% para as cepas BH10 e BH12, e 92% para todos os isolados de *L. major*-like. Esse *locus* também identificou 8% do alelo 72 para o isolado BH122 e 25% desse alelo para a cepa BH15.

O *locus* 39GTG identificou 50% dos alelos 92 e 94 para a cepa 5ASKH e 50% desses alelos para todas as cepas de *L. major* do Iraque. Os isolados BH122 e BH129 apresentaram 17% de cada um desses alelos.

O *locus* 45GTG identificou 100% do alelo 85 para a cepa 5ASKH e 25% para a cepa BH13. Os isolados BH49, BH70, BH121 e BH135 apresentaram 33% desse alelo. Esse *locus* também identificou 25% do alelo 83 para a cepa BH15 e 17% para os isolados BH70 e BH121, 50% do alelo 79 para as cepas BH10 e BH12, e 17% para o isolado BH129.

O *locus* 4GTG identificou 50% do alelo 70 para a cepa 5ASKH do Sudão, 25% para as cepas BH13 e BH15, e 25% para os isolados BH49, BH122 e BH135. Esse *locus* também identificou 50% do alelo 66 para todas as cepas de *L. major* do Iraque, 42% para os isolados BH49, BH70, BH121 e BH122, e 25% do alelo 64 para as cepas BH10 e BH12, e 17% para os isolados BH121 e BH129.

O *locus* 1GACA identificou 100% do alelo 69 para todas as cepas de *L. major* e 33% desse alelo para os isolados BH121 e BH135.

O *locus* 1GC identificou 100% do alelo 63 para todas as cepas de *L. major* e para todos os isolados de *L. major*-like.

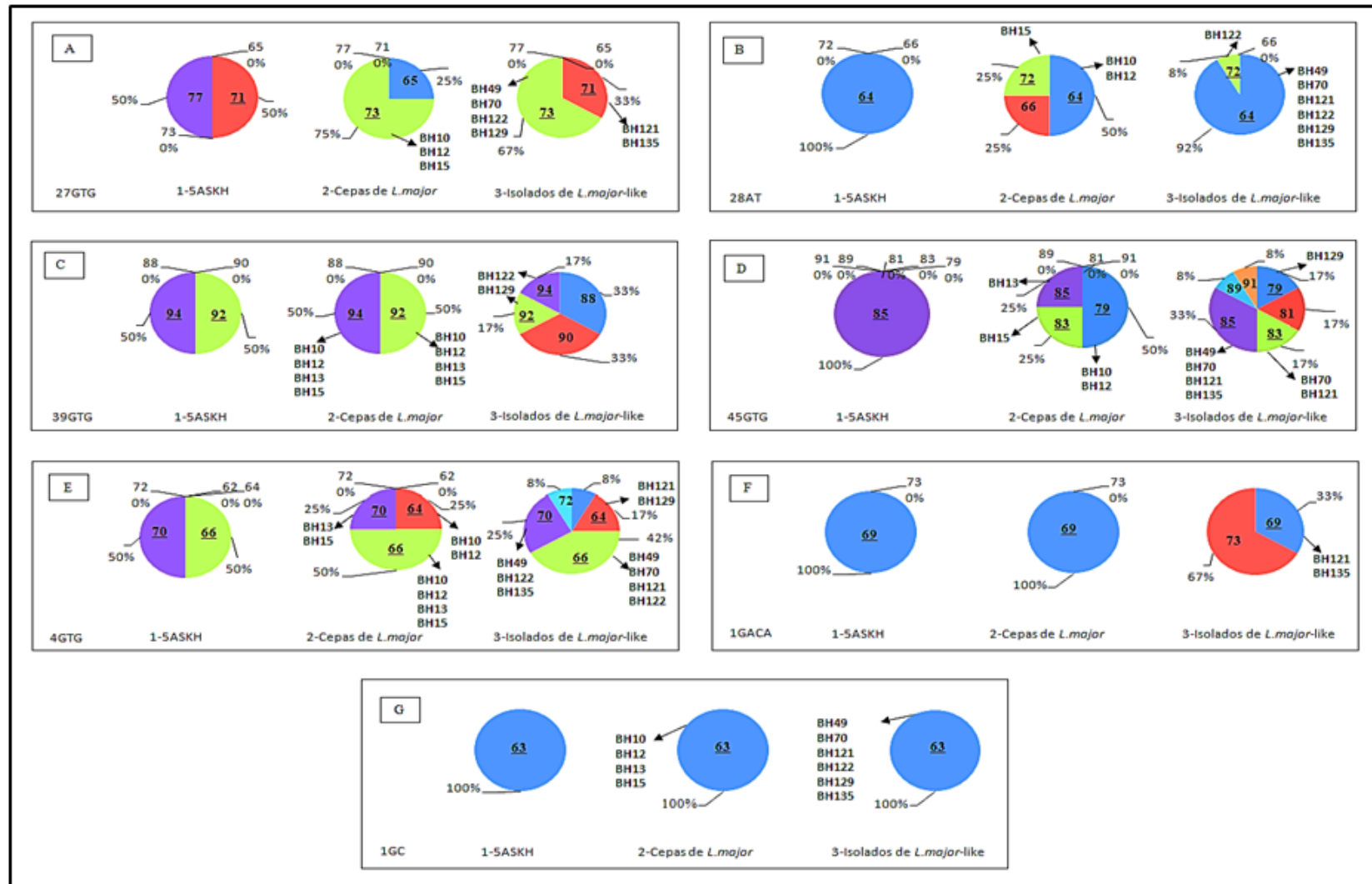


Figura 14. Proporção dos alelos comuns compartilhados entre as amostras de *Leishmania* estudadas identificados pelos loci A: 27GTG, B: 28AT, C: 39GTG, D: 45GTG, E: 4GTG, F: 1GACA e G:1GC. Sublinhados: alelos compartilhados

5.2.5 Proporção de alelos compartilhados entre cepas de *L.major* do Iraque e isolados de *L. major-like*

Foram identificados oito alelos comuns compartilhados somente entre cepas de *L.major* do Iraque e isolados de *L. major-like*, com os *loci* 71AT, 1CA, 36GTG, 27GTG, 28AT e 45GTG, com porcentagens que variaram de 8 a 100% (Figura 15).

O *locus* 71AT identificou 100% do alelo 62 para todas as cepas de *L. major* do Iraque e 33% desse alelo para os isolados BH122 e BH129.

O *locus* 1CA identificou 75% do alelo 101 para as cepas BH10, BH12 e BH15, e 33% desse alelo para os isolados BH122 e BH129.

O *locus* 36GTG identificou 50% do alelo 63 para as cepas BH10 e BH12, e 34% desse alelo para os isolados BH122 e BH129. Esse *locus* também identificou 25% do alelo 67 para a cepa BH13 e 33% para os isolados BH49, BH70, BH121 e 135.

O *locus* 27GTG identificou 75% do alelo 73 para as cepas BH10, BH12 e BH15, e 67% para os isolados BH49, BH70, BH122 e BH129.

O *locus* 28AT identificou 25% do alelo 72 para a cepa BH15 e 8% desse alelo para o isolado BH122.

O *locus* 45GTG identificou 50% do alelo 79 para as cepas BH10 e BH12, e 17% para o isolado BH129. Esse *locus* também identificou 25% do alelo 83 para a cepa BH15 e 17% para os isolados BH70 e BH121.

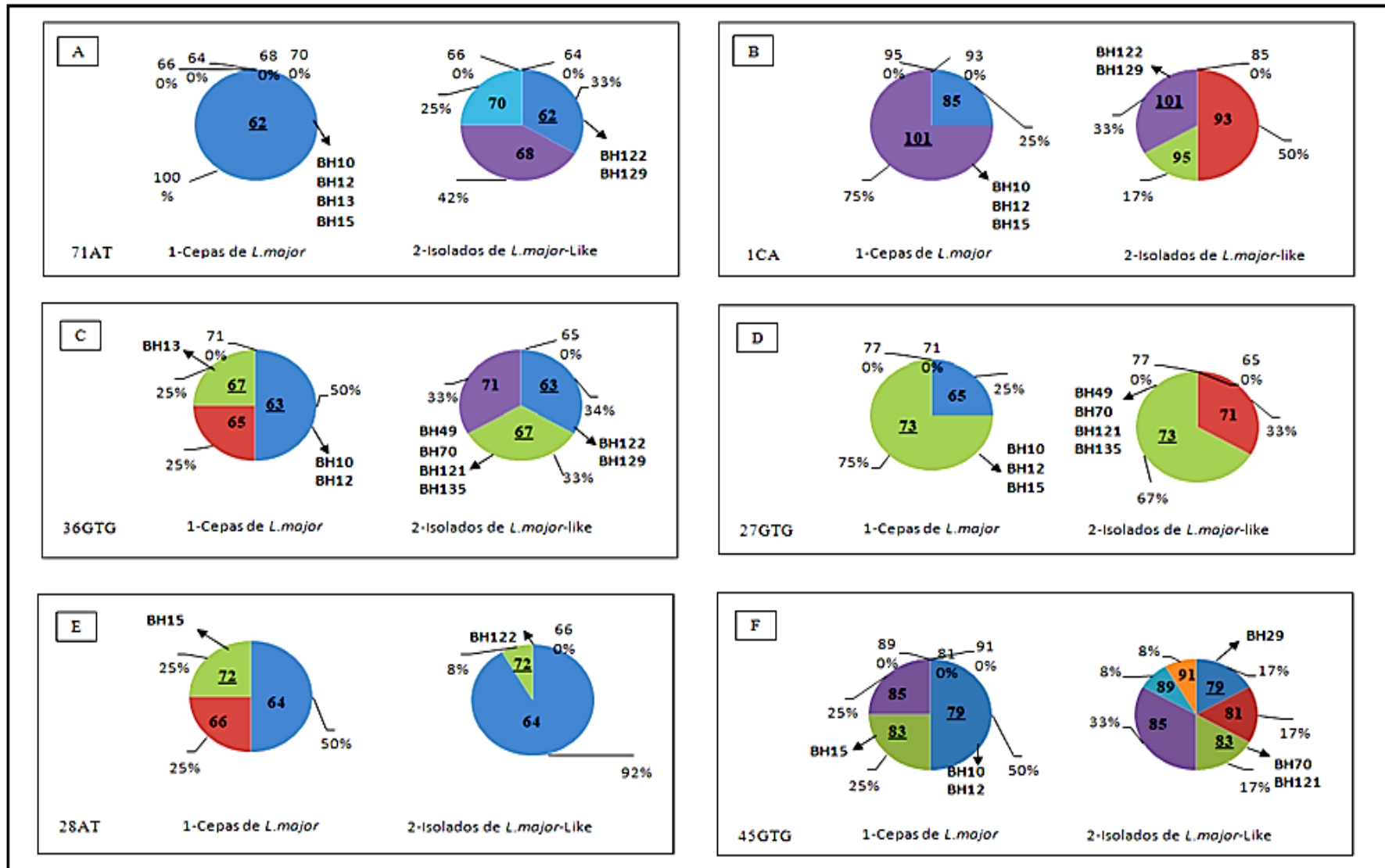


Figura 15. Proporção dos alelos comuns compartilhados entre as cepas de *L. major* de do Iraque e os isolados de *L. major*-like identificados pelos loci A: 71AT, B: 1CA, C: 36GTG, D: 27GTG, E: 28AT e F: 45GTG. Sublinhados: alelos compartilhados

5.3. Análise do sequenciamento das cepas de *L. major* e isolados de *L. major*-like com os alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt*

Os alvos ITS1, *hsp70* e *nagt* amplificaram o DNA genômico de todas as amostras de *L. major* e *L. major*-like estudadas, com fragmentos que variaram aproximadamente de 350, 1422 e 1450pb, respectivamente (Figuras 8, 16 e 17).

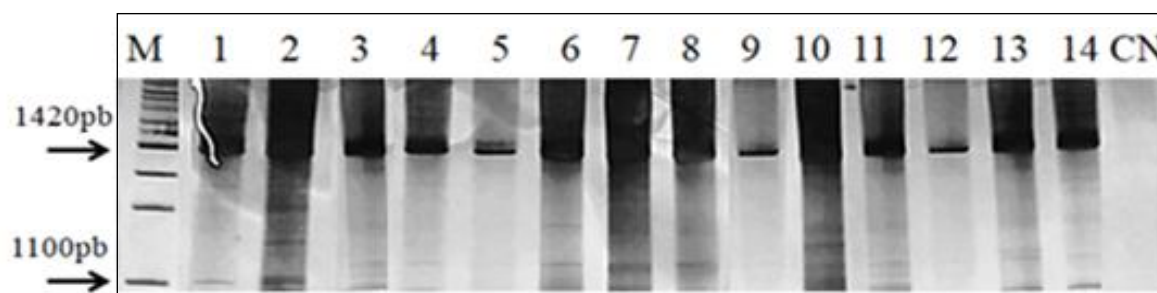


Figura 16- Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados pelo alvo *hsp70*. M: marcador molecular 1Kb (*Promega USA*). Linhas: 1- *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 2- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), 3- *L. guyanensis* (MHO/BR/1970/M1176), 4- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), 5-8 cepas de *L. major* estudadas, 9-14 isolados de *L. major*-like estudados, CN Controle Negativo da reação.

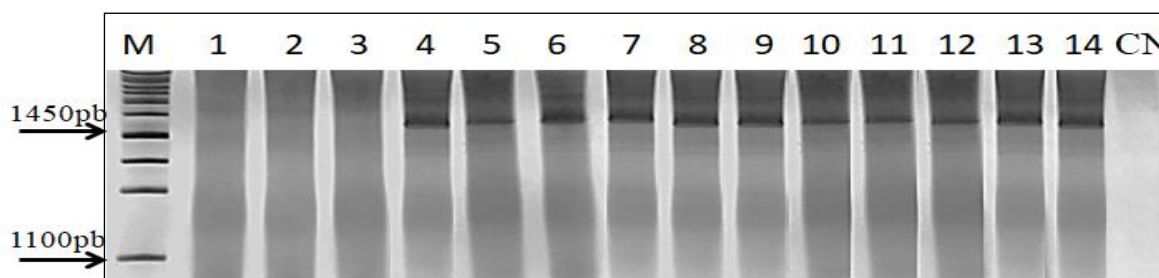


Figura 17- Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados pelo alvo *nagt*. M: marcador molecular 1Kb (*Promega, USA*). Linhas: 1- *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), 2- *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), 3- *L. guyanensis* (MHO/BR/1970/M1176), 4- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), 5-8 cepas de *L. major* estudadas, 9-14 isolados de *L. major*-like estudados, CN Controle Negativo da reação.

Os dados obtidos das análises dos 10 marcadores de microssatélites e as sequências amplificadas pelos alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt* com as amostras de *Leishmania* estudadas foram utilizados na construção de dendogramas.

As árvores obtidas por MLMT e com o alvo *nagt* foram feitas somente com as cepas de *L. major* e os isolados de *L. major*-like, pois esses marcadores são específicos para *L. major* e, portanto, não amplificaram as demais espécies utilizadas como *outgroup*.

A árvore concatenada obtida com os dados do MLMT mostrou que as cepas 5ASKH e BH13 foram agrupadas em um mesmo ramo posicionadas com distâncias iguais. Outro ramo derivou três agrupamentos. Um ramo derivou um grupo com a cepa BH15 e o isolado BH122 com distâncias iguais e outro grupo foi formado com o isolado BH129, que derivou as cepas BH10 e BH12 com distâncias iguais. O último grupo foi formado com isolados de *L. major*-like. Nesse grupo o isolado BH135 ficou mais distante e derivou um ramo com o isolado BH49, que por sua vez derivou os isolados BH70 e BH121 com distâncias iguais. Os valores de *bootstrap* ficaram acima de 70% (Figura 18).

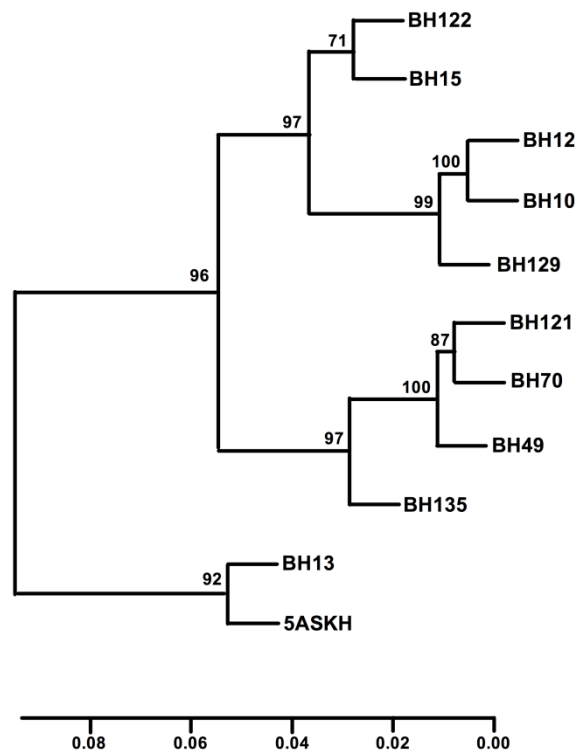


Figura 18- Árvore filogenética concatenada obtida com os dados do MLMT das amostras de *Leishmania* estudadas. Análise filogenética por máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*.

A árvore obtida utilizando as sequências das amostras de *Leishmania* estudadas amplificadas pelo alvo ITS1 mostrou dois ramos mais distantes com as cepas referência do Novo Mundo PH8, M2903 e M1176 utilizadas como *outgroup*. Um ramo derivado da cepa 5ASKH agrupou com a mesma distância as outras cepas de *L. major* e os isolados de *L. major-like*. Os valores de *bootstrap* foram superiores a 50% (Figura 19).

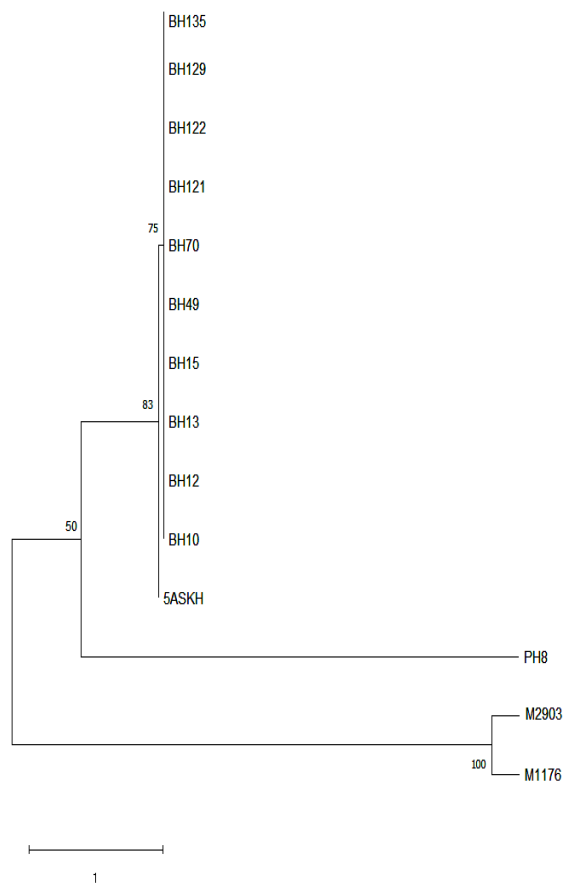


Figura 19- Árvore filogenética das amostras de *Leishmania* estudadas utilizando as sequências amplificadas pelo alvo ITS1. Análise filogenética por máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*.

A árvore obtida utilizando as sequências das amostras de *Leishmania* estudadas amplificadas pelo alvo *hsp70* mostrou que dois ramos distintos posicionaram as cepas referência do Novo Mundo PH8, M2903 e M1176 utilizadas como *outgroup*. Outro ramo derivou as cepas BH12 e 5ASKH mais distante, e sucessivamente mais um ramo, com o isolado BH135, o qual derivou ramos menores com a cepa BH13 e os isolados BH70, BH121, BH122 e BH129. A cepa BH15 e o isolado BH49 agruparam-se num ramo derivado da cepa BH10, que ficou mais distante. Os valores de *bootstrap* foram superiores a 60% (Figura 20).

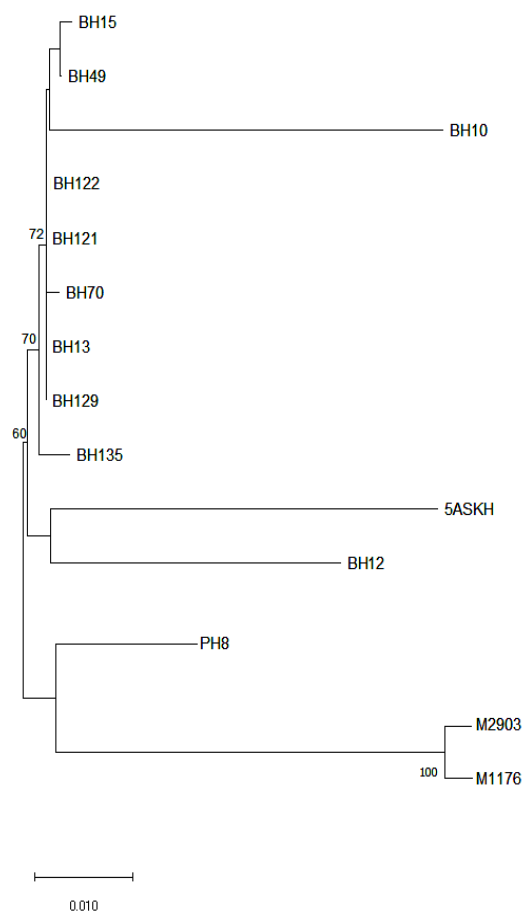


Figura 20- Árvore filogenética das amostras de *Leishmania* estudadas utilizando as sequências amplificadas pelo alvo *hsp70*. Análise filogenética por máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*.

A árvore obtida utilizando as sequências das amostras de *Leishmania* estudadas amplificadas pelo alvo *nagt* mostrou um ramo agrupando as cepas 5ASKH, BH15 e BH13 posicionada mais distante, e os isolados BH49 e BH121 com sobreposição de distâncias em pontos específicos. Esse ramo derivou as cepas BH10 e BH12 posicionadas com sobreposição de distâncias em pontos específicos, e os isolados BH70, BH129 e BH135. Desse grupo foi derivado um ramo com o isolado BH122 mais distante das demais amostras de *Leishmania* estudadas. Os valores de *bootstrap* foram superiores a 85% (Figura 21).

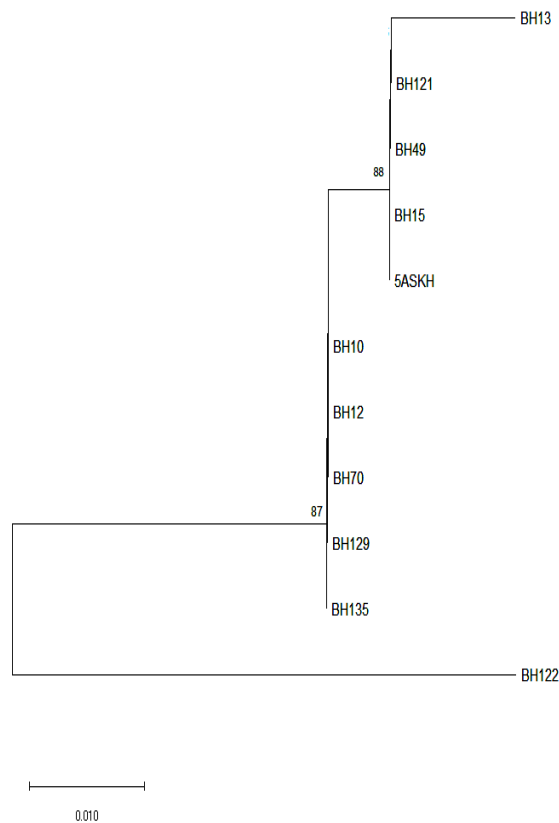


Figura 21- Árvore filogenética das amostras de *Leishmania* estudadas utilizando as sequências amplificadas pelo alvo *nagt*. Análise filogenética por máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*.

A Figura 22 mostra a árvore concatenada gerada com todos os dados obtidos do sequenciamento dos alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt*. Essa árvore apresentou um ramo que derivou três agrupamentos: um grupo com as cepas BH10 em um ramo separado e outro ramo com as cepas BH12 e 5ASKH mais distante, um grupo com o isolado BH121, a cepa BH13 em um ramo mais distante, o isolado BH49 e a cepa BH15 posicionados com igual distância e um grupo com os isolados BH70 e BH129, que derivou um ramo com os isolados BH135 e BH122 mais distante das demais amostras estudadas.



Figura 22- Árvore filogenética concatenada das amostras de *Leishmania* estudadas utilizando as sequências amplificadas pelos alvos ITS1, *hsp70* e *nagt*. Análise filogenética por máxima verossimilhança com 1000 replicatas de *bootstrap*.

As sequências de DNA obtidas com os três alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt* serão depositadas no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

6. DISCUSSÃO

O número de espécies de *Leishmania* tem aumentado continuamente desde a primeira descrição do gênero (Ross, 1903). Técnicas moleculares têm sido muito importantes para o conhecimento da história natural das leishmanioses, possibilitando revelar as relações filogenéticas desses parasitos.

Leishmania major é um dos principais agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar previamente descrito, como restrito ao Velho Mundo (ELFARI *et al.*, 2005). Porém já foram identificados isolados semelhantes a *L. major* em diversos países da América Latina como Brasil, Equador, Peru, Venezuela, México e Paraguai que foram chamados de *L. major*-like (MOMEN *et al.*, 1985; HASHIGUSHI *et al.*, 1991; SHAW, 1994; YAMASAKI *et al.*, 1994; CALVOPINA *et al.*, 2004). Embora vários casos de infecção por *L. major*-like tenham sido identificados no homem na América Latina, desde seu primeiro registro no Brasil por Momen *et al.*, em 1985, sua identidade e origem têm sido pouco estudadas e as abordagens científicas até agora utilizadas não foram suficientes para chegar a uma conclusão definitiva, se esta é uma espécie distinta ou importada do Velho Mundo. Portanto, novos estudos precisam ser realizados no Brasil.

O presente estudo investigou a heterogeneidade genética de isolados de *L. major*-like do Brasil, utilizando tipagem por microssatélites (MLMT), com um painel de marcadores previamente descritos para *L. major* e o sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados com os alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt*, em comparação com a cepa de *L. major* 5ASKH do Sudão e cepas de *L. major* do Iraque, a fim de verificar a ocorrência de diversidade genética inter e intraespecífica nesses parasitos.

A variabilidade genética dos parasitos é sempre objeto de muito interesse e controvérsia. A heterogeneidade genética pode produzir diferentes fenótipos que podem estar associados à diversidade de manifestações clínicas importantes. Especialmente no caso da leishmaniose tegumentar, a identificação exata das espécies de *Leishmania* é de grande importância para o diagnóstico, prognóstico da doença, vigilância epidemiológica e a escolha do tratamento (CARVALHO *et al.*, 2019).

Muitas técnicas, incluindo microscopia, cultura *in vitro*, abordagens bioquímicas, imunológicas e moleculares têm sido aplicadas para a detecção, identificação e caracterização de *Leishmania* em áreas endêmicas. Métodos baseados em PCR, como a técnica de tipagem por microssatélites e análises de sequências de DNA são altamente informativos, e têm

permitido a correta identificação de espécies de *Leishmania* (SCHONIAN *et al.*, 2008; NEMATİ *et al.*, 2017).

A tipagem por microsstélites (MLMT) tem se tornado uma ferramenta cada vez mais importante e utilizada para tipagem molecular e estudos genéticos de espécies de *Leishmania*, principalmente num contexto eco-geográfico. Dados altamente reprodutíveis e informativos como os microssatélites são uma ferramenta importante para diferenciar parasitos estritamente relacionados, como é o caso de *L. major*-like da América Latina e *L. major* do Velho Mundo, que exigem marcadores de maior poder discriminatório.

A técnica de MLMT (NEMATİ *et al.*, 2017) é uma das mais relevantes tecnologias moleculares, no que diz respeito ao seu desempenho para classificação e análises filogenéticas de populações de *Leishmania* a níveis inter e intraespecíficos. Esta técnica revelou significativa variabilidade genética entre todas as espécies de *Leishmania* estudadas, como citado por alguns autores no Velho Mundo em *L. tropica* (SALLOUM *et al.*, 2020), *L. infantum* (AMRO *et al.*, 2013) e *L. major* (AL-JAWABREH *et al.*, 2008) e no Novo Mundo em *L. braziliensis* (KUHLS *et al.*, 2013) e *L. infantum* (SEGGATO *et al.*, 2012) isoladas de vários estados do Brasil.

Neste estudo, o MLMT mostrou interessante heterogeneidade genética nas cepas de *L. major* e nos isolados de *L. major*-like estudados, com diferentes perfis homozigotos e heterozigotos. Mesmo sendo detectados poucos perfis de heterozigotos, os *loci* 4GTG, 36GTG, 39GTG e 45GTG identificaram esses perfis nas cepas e isolados de *Leishmania* estudados, destacando o *locus* 45GTG que identificou perfis heterozigotos somente nos isolados de *L. major*-like. Dependendo do *locus* analisado e mesmo que algumas amostras tenham sido caracterizadas por baixa diversidade genética e genotípica, exibindo poucos alelos por *locus* e menos genótipos, ainda foi possível identificar genótipos únicos e compartilhados nas cepas e isolados de *Leishmania* estudados. Estudos prévios, que aplicaram MLMT em diferentes populações de *L. major* relataram níveis variados de polimorfismo genético nesses parasitos (ALAM *et al.*, 2014; AL-JAWABREH *et al.*, 2008).

A presença de perfis genotípicos únicos nas cepas de *L. major* do Sudão, do Iraque e nos isolados de *L. major*-like do Brasil também sugerem uma correlação entre a diversidade genética dos parasitos e a sua origem geográfica, o que já foi descrito para *L. major* por vários autores (AL-JAWABREH *et al.*, 2008; MAHNAZ, T. *et al.*, 2011; ALAM *et al.*, 2014). Os isolados de *L. major*-like apresentaram maior diversidade genética. BH70, BH121 e BH135 apresentaram o maior número de genótipos únicos. Três marcadores de microssatélites 39GTG, 71AT e 1GACA apresentaram diferenças estatisticamente significantes para a

presença de alelos únicos nos isolados de *L. major*-like BH49, BH70, BH121, BH129 e BH135. O MLMT revelou que *L. major*-like possui uma composição alélica diferente.

A comparação dos dados de genotipagem com os marcadores de microsatélites utilizados também mostrou uma forte ligação entre as cepas e isolados de *Leishmania* estudados, através do compartilhamento de genótipos e alelos. A cepa de *L. major* do Sudão usada como cepa-referência apresentou genótipos pouco variáveis, mas o fato interessante é que esses genótipos foram identificados em cepas de *L. major* do Iraque e em isolados de *L. major*-like do Brasil. Seis dos dez *loci* pesquisados identificaram alelos compartilhados somente entre as cepas de *L. major* do Iraque BH10, BH12 e BH15 e os isolados de *L. major*-like do Brasil BH49, BH70, BH122 e BH129.

ALAM *et al.*, 2014 relatou fluxo gênico entre populações de *L. major*, possivelmente através de migração. Além disso, o polimorfismo genético de *L. major* e sua relação com a área geográfica de origem, também foi correlacionada com a diversidade genética de vetores e/ou espécies de reservatórios vertebrados, presentes nas áreas de estudo (HAMARSHEH *et al.*, 2009).

Desde os tempos remotos, existe uma importante rota comercial-migratória que vai do Sudão ao Iraque via Basra, uma das três principais cidades do Iraque e o principal porto do país. Na década de 70, a empresa Mendes Júnior de Minas Gerais levou cerca de 10 mil trabalhadores brasileiros para trabalhar no Oriente Médio, principalmente no Iraque, quando iniciou a construção da Ferrovia *Baghdad-Akashat-Alqaim*, que liga três cidades naquele país e esses brasileiros chegaram a morar e atuar nas obras no país. Nessa época, muitos brasileiros foram trabalhar, na construção de rodovias, estação de bombeamento do Rio Eufrates e ferrovias. Dentre as ferrovias, a mais importante foi a que liga a capital de Bagdá ao porto de Basra, no golfo pérsico. As cepas de *L. major* do Iraque foram isoladas de pacientes que trabalharam na construção dessa ferrovia entre as cidades de Bagdá a Basra.

Como resultado da grande mobilidade humana, as doenças infecciosas são ocasionalmente transportadas, como ocorre muitas vezes com pacientes com leishmaniose, que foram infectados em uma área endêmica fora de seu próprio país. Provavelmente mais trabalhadores retornaram do Oriente Médio ao Brasil, infectados com *L. major*. O diagnóstico e tratamento precários da doença em áreas endêmicas de leishmaniose constituem um cenário favorável à sobrevivência de várias espécies de *Leishmania*. Seria esta a provável justificativa para a presença de *L. major*-like no Brasil, que foram isoladas de pacientes que nunca viajaram para fora do país, mas que residiam em áreas endêmicas de leishmanioses?

As amostras de *L. major*-like utilizadas neste estudo foram isoladas de casos humanos

de leishmaniose cutânea, de pacientes que residiam no Vale do Rio Doce, região geográfica do estado de Minas Gerais no sudeste do Brasil, correspondente ao leste mineiro, que abrange uma área de aproximadamente 41,8 mil km², com uma população de mais de 1,7 milhões de habitantes, segundo informações do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2020).

Diferentes combinações de vetores, parasitos, reservatórios, sintomas clínicos, condições ecológicas, epidemiológicas e culturais contribuem para a transmissão de *Leishmania* spp. (ASHFORD, 1996). Na área do Rio Doce a espécie de *Leishmania* predominante é *L. (V.) braziliensis* (MAYRINK *et al.*, 1979), mas *Leishmania (Leishmania) infantum* também ocorre na área. A principal espécie de flebotomíneo presente nessa região é *Lutzomyia whitmani*, mas outras espécies de flebotomíneos, como *Lu. migonei*, *Lu. fischeri* e *Lu. intermedia* também foram encontradas no Vale do Rio Doce e já foram registradas picando o homem em outras regiões do Brasil. A região também é uma área endêmica para leishmaniose visceral com presença de *Lu. longipalpis*.

Notadamente, os isolados de *L. major*-like do Brasil exibiram diversidade genética, com considerável número de alelos e genótipos únicos, sugerindo plena adaptação local e boas condições para transmissão do parasito. Se a espécie *L. major*-like foi introduzida na America Latina através de pessoas infectadas no Velho Mundo, pelo menos na região do Vale do Rio Doce, *Lu. migonei* e *Lu. longipalpis*, duas espécies oportunistas presentes na área, poderiam funcionar como espécies vetoras. Estudos em laboratório têm mostrado que *Lu. migonei* pode se infectar com diferentes espécies de *Leishmania* (GUIMARÃES, V.C. *et al.*, 2016). Por sua vez, *Lu. longipalpis* tem sido mostrada em vários estudos experimentais, que é uma espécie capaz de sustentar o desenvolvimento de outras espécies de *Leishmania* e não somente de *L. infantum*. Recentemente foi relatado que *Lu. longipalpis* é um vetor competente de *L. major*, sendo capaz não só de se infectar com parasitos de lesões cutâneas ativas de leishmaniose, mas de sustentar a infecção e transmiti-las à hospedeiros “naive”, causando a doença. (CECÍLIO *et al.*, 2020).

Segundo EL BAIDOURI *et al.*, (2013) a manutenção do parasito depende de sua capacidade de sobreviver em um ciclo complexo, que envolve pelo menos um reservatório e um vetor competente (restritivo ou permissivo). Consequentemente, sua distribuição deve ser principalmente influenciada pela região geográfica dos reservatórios e vetores. No entanto, a capacidade do parasito de saltar de um ciclo para outro, pode modificar amplamente essa relação e explicar a disseminação inesperada de algumas espécies.

GUIMARÃES *et al.*, 2018 estudando lipofosfoglicanos (LPGs) demonstraram que,

três isolados de *L. major*-like aqui também estudados BH49, BH121 e BH129 foram capazes de infectar com sucesso vetores do Velho e Novo Mundo, *Phlebotomus papatasi* e *Lu. longipalpis* respectivamente, utilizando o método de infecção experimental por alimentador artificial. *Lu. longipalpis* é amplamente distribuído no Brasil, conhecido por ser um vetor permissivo ao desenvolvimento de várias espécies de *Leishmania*, que provavelmente são independentes do LPG para o estabelecimento de uma infecção (KAMHAWI, 2006; MYSKOVA *et al.*, 2007). Entretanto, considerando o caráter rural da transmissão de LT, outros vetores poderiam também contribuir para a transmissão de *L. major*-like no Brasil, como por exemplo, *L. migonei*, *L. whitmani*, *L. intermedia*. Além disso, a presença de um isolado de *L. major*-like de cão (BH70) implica indícios de infecção em outros vertebrados, que não o homem. Cães já foram encontrados infectados com *L. major* no Oriente Médio (MORSY *et al.*, 1987; BANETH *et al.*, 2017). Devido à diversidade de reservatórios e vetores potenciais, provavelmente muitos ciclos ainda precisam ser identificados. Essas considerações reforçam a necessidade da importância dos estudos epidemiológicos para novas espécies de *Leishmania* em hospedeiros e vetores.

A árvore filogenética do MLMT reuniu todos os achados de variabilidade genética inter e intraespecífica com essa técnica, mostrando que as cepas de *L. major* e *L. major*-like compartilham vários genótipos entre si. Contudo, um braço dessa árvore reuniu separadamente, quatro dos seis isolados de *L. major*-like estudados BH49, BH70, BH121 e BH135 das cepas de *L. major* utilizadas neste estudo. Isso demonstra a capacidade desta técnica para o estudo de espécies intrinsicamente relacionadas e nos permite perguntar, até que ponto esse dado reflete somente heterogeneidade genética ou se está apontando para a evidência de formação de um grupo filogeográfico.

Sequências do espaçador ribossômico transcrito interno - ITS1 (SCHONIAN *et al.*, 2003), do gene *N-acetilglucosamina-1-fosfato transferase - nagt* (SABERI *et al.*, 2018) e da subfamília do gene da proteína de choque térmico 70 - *hsp70* (FRAGA *et al.*, 2010) têm sido muito utilizadas como alvos para reconstrução da filogenia dentro do gênero *Leishmania*.

A baixa diversidade genética mostrada pelo sequenciamento do fragmento amplificado pelo alvo ITS1 não foi capaz de detectar variações intraespecíficas. No entanto, esse alvo é bastante específico e foi capaz de distinguir as espécies, separando *L. major* e *L. major*-like das espécies *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* usadas como *outgroup*. A árvore filogenética gerada por esse alvo mostrou grande similaridade das cepas de *L. major* com todos os isolados de *L. major*-like estudados. Como já demonstrado por outros autores, a caracterização específica por ITS1 é uma ferramenta polivalente para o diagnóstico

de *Leishmania* a partir de amostras clínicas, permitindo a determinação da espécie infectante (SCHONIAN *et al.*, 2003; CUPOLLILO *et al.*, 2003; MONROY-OSTRIA *et al.*, 2014).

Por outro lado, o sequenciamento do fragmento amplificado pelo alvo *hsp70* foi mais informativo, mostrando considerável heterogeneidade entre as cepas e os isolados de *Leishmania* estudados, o que se reflete nos agrupamentos formados e na distância observada entre os braços que suportam as amostras estudadas. A árvore filogenética gerada por esse alvo também mostrou que não foi possível distinguir claramente cepas de *L. major* e isolados de *L. major*-like, mas houve uma tendência de agrupamento dos isolados de *L. major*-like BH70, BH121, BH122, BH129 e BH135 em braços bem próximos, quase sem separação de distância. As espécies do Novo Mundo usadas como *outgroup* foram separadas corretamente. Estes resultados estão de acordo com a maioria dos estudos, direcionados às sequências do gene da proteína *hsp70* até o momento, que relatam baixos níveis de diversidade genética a níveis intraespecíficos, o que o torna bastante útil também para distinguir os parasitos em nível de espécie (SCHONIAN *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2004; FRAGA *et al.*, 2010).

O sequenciamento do fragmento amplificado pelo alvo *nagt* mostrou similaridade entre as amostras por ser um alvo específico para *L. major*. Na árvore filogenética gerada por esse alvo, as cepas de *L. major* e os isolados de *L. major*-like se mostraram intercalados, às vezes com distâncias sobrepostas entre os braços. Somente o isolado BH122 se posicionou mais distante das outras amostras estudadas. SABERI *et al* 2018, estudando *L. major* no Irã não observaram variações genéticas entre as sequências de *nagt* obtidas dos isolados estudados. No entanto, outros pesquisadores iranianos relataram variabilidade intraespecífica em *L. major* estudando esse gene (HAJJARAN *et al.*, 2014; SARKARI *et al.*, 2016).

Em vista disso, a árvore filogenética concatenada dos dados dos sequenciamentos dos fragmentos de DNA amplificados pelos alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *nagt* quando comparada com a árvore filogenética gerada pelos dados do MLMT, mostrou que ambas as técnicas utilizadas identificaram variabilidade inter e intraespecífica entre as cepas e os isolados de *Leishmania* estudados. Os dados dos sequenciamentos estão de acordo com o que foi observado no MLMT, mostrando variabilidade entre as cepas e os isolados de *Leishmania* estudados, o que se reflete no posicionamento das amostras e nas distâncias entre os ramos. Ambas as árvores, com suas diferentes topologias revelaram existir um complexo compartilhamento de perfis genotípicos entre as cepas de *L. major* e os isolados de *L. major*-like. Mesmo neste contexto as árvores apontaram um agrupamento somente com isolados de *L. major*-like. Os isolados BH49, BH70, BH121 e BH135 foram agrupados no MLMT e BH70, BH122, BH129 e BH135 no sequenciamento. Desse modo, quatro dos seis isolados de

L. major-like foram separados das cepas de *L. major* e desses, dois isolados BH70 e BH135 foram distribuídos de forma semelhante nas duas árvores. Além disso, quatro dos isolados citados nos agrupamentos distintos formados com *L. major*-like (BH49, BH70, BH122 e BH129) compartilharam genótipos somente com cepas de *L. major* do Iraque, destacando mais uma vez a provável origem, introdução e adaptação desses parasitos no Brasil.

Além do sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados de *loci* simples para a discriminação de espécies, as informações genômicas por meio do sequenciamento completo podem revelar importantes diferenças intraespecíficas em *Leishmania*. ALMEIDA, 2019 analisou três dos isolados de *L. major*-like, aqui também estudados, (BH49, BH121 e BH129) por abordagens de genômica comparativa baseando-se em análises de filogenia nuclear, de componentes principais, SNPs e busca por regiões específicas, concluindo que esses isolados se tratam de *L. major*, que foram importadas do Velho Mundo em pelo menos dois eventos diferentes. Segundo essa autora o sequenciamento genômico desses isolados apresentou um complexo padrão de aneuploidia em mosaico e diferenças no número de cópias gênicas relacionadas a fatores de virulência nos isolados BH49 e BH121. Foi observado que todos os isolados estudados eram aneuploides, ou seja, apresentaram ao menos um cromossomo expandido ou reduzido, variando de acordo com o isolado estudado. Além disso, foram encontrados poucos SNPs heterozigóticos (polimorfismos de nucleotídeos únicos) por cromossomo.

De fato, o presente estudo identificou baixo número de heterozigotos nas amostras de *Leishmania* estudadas com os *loci* de microssatélites utilizados, mas com maior heterogeneidade genética e presença de genótipos únicos nos isolados de *L. major*-like do Brasil. Ao mesmo tempo, esses isolados também compartilharam genótipos com as cepas de *L. major* do Sudão e do Iraque, assinalando sua ancestralidade no Velho Mundo. Contudo, as árvores filogenéticas geradas por MLMT e pelas sequências dos fragmentos de DNA amplificados com os alvos moleculares apontaram para a formação de um grupo distinto de *L. major*-like do Brasil.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, posso corroborar que *L. major*-like do Brasil possui um padrão alélico diferente das cepas de *L. major* aqui estudadas. *L. major* é uma espécie geograficamente muito distante e com diferentes vetores. Na verdade, ainda existe uma série de interações complexas e não totalmente compreendidas envolvendo *L. major* e *L. major*-like. A eventualidade da co-adaptação permanece uma questão em aberto.

Distinguir as espécies de *Leishmania* é um dos elementos chaves nos estudos epidemiológicos, no tratamento da doença e na adoção de medidas de controle adequadas em

áreas endêmicas de leishmanioses.

7. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo investigando a heterogeneidade genotípica de isolados de *L. major*-like do Brasil em comparação com cepas de *L. major* por MLMT e sequenciamento de fragmentos de DNA amplificados com os alvos moleculares ITS1, *hsp70* e *ngt*. No presente trabalho foi possível observar que:

- As cepas de *L. major* e os isolados de *L. major*-like estudados apresentaram variabilidade genética inter e intraespecífica com as técnicas utilizadas.
- Três marcadores de microssatélites 39GTG, 71AT e 1GACA apresentaram diferenças estatisticamente significantes para a presença de alelos únicos nos isolados de *L. major*-like BH49, BH70, BH121, BH129 e BH135.
- No MLMT as cepas de *L. major* do Sudão e do Iraque compartilharam genótipos com os isolados de *L. major*-like do Brasil, assinalando a sua ancestralidade no Velho Mundo.
- No MLMT foram encontrados genótipos compartilhados somente entre alguns isolados de *L. major*-like e cepas de *L. major* do Iraque.
- O alvo molecular *hsp70* mostrou maior variabilidade genética nas sequências de DNA amplificado das cepas e isolados de *L. major*-like.
- As árvores filogenéticas geradas por MLMT e pelas sequências dos fragmentos de DNA amplificados com os alvos moleculares apontaram para a formação de um grupo distinto de *L. major*-like do Brasil.

8. REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTYPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P. *et al.* A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl. Trop. Dis**, v. 10, n.3:e0004349, 2016. doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349.

AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTYPKA, J. *et al.* infections: Molecular targets and diagnosis. **Mol Aspects Med**, v.57, p.1-29, 2017. doi: 10.1016/j.mam.2016.11.012.

ALAM, M.Z.; BHUTTO, A.M.; SOOMRO, F.R.; BALOCH, J.H. *et al.* Population genetics of *Leishmania (Leishmania) major* DNA isolated from cutaneous leishmaniasis patients in Pakistan based on multilocus microsatellite typing. **Parasites vectors**, v.7, p.332, 2014. doi: 10.1186 / 1756-3305-7-332.

AL-JAWABREH, A.; DIEZMANN, S.; MULLER, M. *et al.* Identification of geographically distributed sub-populations of *Leishmania (Leishmania) major* by microsatellite analysis. **BMC Evol Biol**, v. 8, p. 183, 2008. doi: 10.1186/ 1471-2148-8-183.

ALMEIDA, L.V. Análise de isolados de *Leishmania major*-like por abordagens de genômica comparativa. Dissertação (Mestrado em Parasitologia)- **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2019.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v.7 (5):e35671, 2012. doi: 10.1371 /journal.pone. 0035671.

AMRO A, HAMDY S, LEMRANI M. *et al.* Moroccan *Leishmania infantum*: genetic diversity and population structure as revealed by multi-locus microsatellite typing. **PLoS One**, v. 8, n.10:e77778, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0077778.

ANDERSON, J.M.; SAMAKE, S.; JARAMILLO-GUTIERREZ, G. *et al.* Seasonality and prevalence of *Leishmania major* infection in *Phlebotomus duboscqi* Neveu-Lemaire from two neighboring villages in central Mali. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5(5):e1139, 2011. doi: 10.1371/ journal.pntd. 0001139.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281-289. doi: 10.1590/1806- 9282.64.03.281, 2018.

ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin Dermatol**, v.14, n.5, p.523-32, 1996. doi: 10.1016/0738-081x(96)00041-7.

ASSIS, T.S.; BRAGA, A.S.; PEDRAS, M.J. *et al.* Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, v.2, p.81-5, 2011. doi: 10.1016/j.trstmh.2010.09.004.

- ASSIS, R. R.; IBRAIM, I.C.; NORONHA, F.S. *et al.* Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 6, n. 2:e1543, 2012. doi: 10.1371/journal.pntd.0001543.
- BANETH, G.; YASUR-LANDAU, D.; GILAD, M.; NACHUM-BIALA, Y. Canine leishmaniosis caused by *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: comparative findings and serology. **Parasit Vectors**, v.10, n.1, p.113, 2017 doi: 10.1186/s13071-017-2050-7.
- BANULS, 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. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3.
- BANULS, A. L.; BASTIEN, P.; POMARES, C. *et al.* Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clin Microb and Infect**, v. 17, n.10, p.1451-1461, 2011. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03640.x.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar**. 1. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- CABALERRO, A.; QUESADA, H.; ROLAN-ALVAREZ, E. Impact of Amplified Fragment Length Polymorphism Size Homoplasmy on the Estimation of Population Genetic Diversity and the Detection of Selective *Loci*. **Genetics**, v.179, n.1, p.539–54, 2008. doi: 10.1534/genetics.107.083246.
- CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge – A review. **Mem Inst Osw Cruz**, v. 99, n.7, p. 663-672, 2004. doi: 10.1590/s0074-02762004000700001.
- CARVALHO, S.H.; FRÉZARD, F.; PEREIRA, N.P. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Trop Med Int Health**. 2019 Apr;24(4):380-391. doi: 10.1111/tmi.13210.
- CECÍLIO, P.; PIRES, ACAM.; VALENZUELA, J.G. *et al.* Exploring *Lutzomyia longipalpis* Sand Fly Vector Competence for *Leishmania major* Parasites. **J Infect Dis**, v. 222, n.7, p.1199-1203, 2020. doi: 10.1093/infdis/jiaa203.
- CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des**, v.8, n.4, p.319-42, 2002. doi:10.1016 / s0925-4439 (99) 00065-4.
- CUPOLILLO, E.; BRAHIM, L.R.; TOALDO, C.B. *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, 2003. doi: 10.1128/jcm.41.7.3126-3132.2003.
- DESCOTEAUX, A.; TURCO JS. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1455, (2-3), p. 341-52. doi: 10.1016/s0925-4439(99)00065-4.

- DOWNING, T.; IMAMURA.; DECUYPERE, S. *et al.* Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. **Genome Res**, v.21,n.12, p. 2143–2156, 2011. doi:10.1101/gr.123430.111.
- EL BAIDOURI, F.; DIANCOURT, L.; BERRY, V.*et al.* Genetic Structure and Evolution of the *Leishmania* Genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n.6, e2255, 2013. doi.org/10.1371/journal.pntd.0002255.
- ELFARI, M.; SCHNUR, L.F.; STRELKOV, A. M. *et al.* Genetic and biological diversity among populations of *Leishmania major* from Central Asia, the Middle East and Africa. **Microbes Infect**, v.7, n.1, p. 93-103, 2005.doi: 10.1016/j.micinf.2004.09.010.
- ELLEGREN, H. Microsatellites Simple sequence with complex evolution. **Nat Rev Genet**, v.5, n.6, p. 435-445, 2004.doi: 10.1038/nrg1348.
- ESPINOSA, O.A.; SERRANO, M.G.; CAMARGO, E.P. *et al.* An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitol**, v. 45, n.4, p.430-442,2016. doi: 10.1017/S0031182016002092.
- FRAGA, J.; MONTALVO, A.M.; DE DONCKER S. *et al.* Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infect Genet Evol**, v. 10, n. 2, p. 238-45, 2010. doi: 10.1016 / j.meegid.2009.11.007.
- GARCIA, L.; KINDT, A.; BERMUDEZ, H. *et al.* Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. **J Clin Microbiol** , v. 42, n.5, p. 2294-2297, 2004.doi: 10.1128/jcm.42.5.2294-2297.2004.
- GUIMARÃES, A. C.; NOGUEIRA, P.M.; SILVA. S.O. *et al.* Lower galactosylation levels of the Lipophosphoglycan from *Leishmania (Leishmania) major*-like strains affect interaction with *Phlebotomus papatasi* and *Lutzomyia longipalpis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 5, p. e170333, 2018.doi: 10.1590/0074-02760170333.
- GUIMARÃES, V.C.; PRUZINOVA, K.; SADLOVA. J. *et al.* *Lutzomyia migonei* is a permissive vector competent for *Leishmania infantum*. **Parasit Vectors**, v. 17, n. 9, p.159, 2016 doi: 10.1186/s13071-016-1444-2.
- HAJJARAN H, MOHEBALI M, TEIMOURI A. *et al.* Identification and phylogenetic relationship of Iranian strains of various *Leishmania* species isolated from cutaneous and visceral cases of leishmaniasis based on *N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase* gene. **Infect Genet Evol**, v. 26, p. 203–12, 2014.doi: 10.1016/j.meegid.2014.05.026.
- HAMARSHEH, O.; PRESBER, W.; YAGHOobi-ERSHADI, M.R.*et al.* Population structure and geographical subdivision of the main vector of *Leishmania*, *Phlebotomus papatasi*, revealed by microsatellite variation.**Med Vet Entomol**, v. 23, n.1, p. 69–77, 2009.doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00784.x.
- HANDMAN, E & Bullen, D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends Parasitol**, v. 18, n.8, p.332-4, 2002.doi: 10.1016/s1471-4922(02)02352-8.

- HARHAY, M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L. AND COSTA, C.H.N. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n.9, p.403-409, 2011. doi: 10.1016/j.pt.2011.04.001.
- HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ, E. A.; CORONEL, V. V.; MIMORI, T. *et al.* Andean Leishmaniasis in Ecuador caused by infection with *Leishmania mexicana* and *L. major*-like parasites. **Am J Trop Med Hyg**, v. 44,n.2, p. 205-217, 1991.doi: 10.4269 / ajtmh.1991.44.205.
- HASHIGUCHI, Y.; VELEZ, L. N.; VILLEGAS, N. V.*et al.* Leishmaniases in Ecuador: Comprehensive review and current status. **Acta Trop**, v. 166, p.299-315, 2016. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.039.
- HAY, S.I.; BATTLE, K. E.; PIGOTT, D. M.; SMITH, D.L.Global mapping of infectious disease. **Philos Trans R Soc of Lond B Biol Sci**, v. 368 (1614):20120250, 2013. doi: 10.1098/rstb.2012.0250.
- IMAMURA, H.; DOWNING, T.; VAN DEN BROECK, F.*et al.* Evolutionary genomics of epidemic visceral Leishmaniasis in the Indian subcontinent. **Elife**, v. 5:e126132016, 2016. doi: 10.7554/eLife.12613.
- IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WHORTHEY, E.A. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, v.309,n.5733,p.436–442,2005 doi: 10.1126/science.1112680.
- KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends Parasitol**, v.22, p.439-45, 2006.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New world and old world leishmania infections: A practical review. **Dermatol Clin**, v.33, n.3, p.579-93,2015.doi:10.1016 /j.det.2015.03.018.
- KUHLS, K.; ALAM, M.Z.; CUPOLILLO, E. *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:e1155, 2011. doi: 10.1371/journal.pntd.0001155.
- KUHLS, K.; CUPOLILLO, E.; SILVA SO. *et al.* Population structure and evidence for both clonality and recombination among Brazilian strains of the subgenus *Leishmania* (*Viannia*). **PLoS Negl Trop Dis**, v. 7, n.10,:e2490,2013. doi: 10.1371/journal.pntd.0002490.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**, v.7, p. 1870-4,2016.doi:10.1093/molbev/msw054.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Observations on the developement of *Leishmania* (*L.*) *chagasi* (Cunha and Chagas) in the midgut of the sandfly vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva). **Ann Parasitol Hum Comp**, v.63, n.2, p.134-145, 1988.doi:10.1051/parasite/1988632134.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. New world Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In: Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections** 9º ed. London: Edit. Feg Cox, 1988.

LAINSON, R. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.92, n.3, p.377-387, 1997.doi: 10.1590/s0074-02761997000300014.

LAINSON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-27, 2005. doi:10.1590/s0074-02762005000800001.

LUYU-ACERO, G. E.; UEZATO, H.; OSHIRO, M. *et al.* Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. **Parasitology**, v.128, (Pt5): 483-91, 2004. doi: 10.1017/s0031182004004792.

MAHNAZ, T.; AL-JAWBREHJ, A.; KUHL, K.; SCHONIAN, G. Microsatellite typing in multiple focus shows three different *Leishmania* major genetic clusters in Iran. **Microbes Infect**, v. 13, n.11, p. 937–942, 2011. doi: 10.1016/j.micinf.2011.05.005.

MAROLI, M.; FELICIANGELI, M.D.; BICHAUD, L. *et al.* Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med. Vet. Entomol**, v. 27, n. 2, p. 123-147, 2013.doi: 10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x.

MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COELHO, M.V. *et al.* Epidemiology of dermal leishmaniasis in the Rio Doce Valley, State of Minas Gerais, Brazil. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 73, n.2, p.123-37, 1979. doi: 10.1080/00034983.1979.

MOMEN, H.; GRIMALDI, J.R.; PACHECO, R.S. *et al.* Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v.34, n.6, p.1076-1084, 1985. doi: 10.4269 / ajtmh.1985.34.1076.

MONROY-OSTRIA, A.; NASEREDDIN, A.; MONTEON, V.M. *et al.* ITS1 PCR-RFLP Diagnosis and Characterization of *Leishmania* in Clinical Samples and Strains from Cases of Human Cutaneous Leishmaniasis in States of the Mexican Southeast. **Interdiscip Perspect Infect Dis**, 6072872014, 2014.doi: 10.1155/2014/607287.

MONTALVO, A.M.; MONZOTE, L.; FRAG, A J. *et al.* PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania* neotropical. **Biomédica**, v. 28, n.4, p.597 – 606,2008. doi: doi.org/10.7705/biomedica.v28i4.66.

MORRIS J.C.; DREW, M.E.; KLINGBEIL, M.M.; MOTYKA, S.A. *et al.* Replication of kinetoplast DNA: an update for the new millennium. **Int. J. Parasitol**, v.31, n.5-6, p. 453–458, 2001.

MORSY, T.A.; SCHNUR, L.F.; FEINSOD, F.M.; *et al.* Natural infections of *Leishmania* major in domestic dogs from Alexandria, Egypt. **Am J Trop Med Hyg**, v. 37, n.1, p. 49-52, 1987 doi: 10.4269/ajtmh.1987.37.49.

MYSKOVA, J.; SVOBODOVA, M.; BEVERLEY, S.M.; VOLF, P. A lipophosphoglycan-independent development of *Leishmania* in permissive sand flies. **Microbes Infect**, v.9, n.3, p.317-24, 2007. doi: 10.1016/j.micinf.2006.12.010.

NEMATI, S.; FAZAELI, A.; HAJJARAN, H. *et al.* Genetic Diversity and Phylogenetic Analysis of the Iranian *Leishmania* Parasites Based on HSP70 Gene PCR-RFLP and Sequence Analysis. **Korean J Parasitol**, v.55, n.4, p.367-374, 2017. doi: 10.3347/kjp.2017.55.4.367.

OCHSENREITHER, S.; KUHL, K.; SCHAAR, M. *et al.* Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. **J Clin Microbiol**, v.44, n.2, p. 495-503, 2006. doi: 10.1128/JCM.44.2.495-503.2006.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO)/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epidemiological report of the Americas. **Report Leishmaniases**, n.1, 2013. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51680>.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO)/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Epidemiological report of the Americas **Report Leishmaniasis** n. 9, 2020. Available from: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/53090>.

PEACOCK CS, SEEGER K, HARRIS D, M. *et al.* Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat Genet**, v.39, n.7, p.839-47, 2007. doi: 10.1038/ng2053.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N. *et al.* *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 322, n.5908, p.1634, 2008. doi: 10.1126/science.1159194.

PISCOPO, T.V.; MALLIA, AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v. 83, n.976, p.649-57, 2006. doi: 10.1136/pgmj.2006.047340corr1.

PIGOTT, D.M.; GOLDING, N.; MESSINA, J.P. *et al.* Global database of leishmaniasis occurrence locations, 1960-2012. **Sci Data**. v.1:140036, 2014 doi: 10.1038/sdata.2014.36.

PIGOTT, D.M.; BHATT, S.; GOLDING, N. *et al.* Global distribution maps of the leishmaniases. **Elife**, v.3: e02851, 2014. doi: 10.7554/eLife.02851.

QUARESMA, P.F.; RÊGO, F.D.; BOTELHO, H.A.; *et al.* Wild, synanthropic and domestic hosts of *Leishmania* in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in Minas Gerais State, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 105, p. 579-585, 2011. doi:10.1016/j.trstmh.2011.07.005.

RAMANTHAN, R.; TALAAT, R.K.; FEDORKO, D.P. *et al.* A species-specific approach to the use of non-antimony treatment for cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 84, p. 107-117, 2011. doi: 10.4269/ajtmh.2011.10-0437.

RANGEL, E.; COSTA, S.M.; CARVALHO, B.M. Environmental Changes and the Geographic Spreading of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil. **IntechOpen**, 2014. From available: <http://dx.doi.org/10.5772/57207>.

RASSAM, M. B.; SHANSHAL, M.; GARGEES, G. S. Isolation and identification of coenzyme Q from *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 29, n. 1, p. 61–64, 1988. doi: 10.1016/0166-6851(88)90120-x.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2020. URL: <https://www.R-project.org/>.

REAL, F.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F. *et al.* The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Res**, v.20, n.6, p.567-581, 2013. doi: 10.1093 / dnares / dst031.

READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annu Rev Entomol**, v. 58, p. 227-250, 2013. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153557.

ROGERS, M. B.; HILLEY, J.D.; DICKENS, N.J. *et al.* Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res**, v. 21, n. 12, p. 2129-2142, 2011. doi: 10.1101/gr. 122945.111.

RUSSELL, D.G & WILHELM, H. The involvement of the *major* surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. **J Immunol**, v.1, n. 136 (7), p. 2613-20, 1986. PMID: 3950420.

SABERI, R.; MOIN-VAZIRI, V.; HAJJARAN, H. *et al.* Identification of *Leishmania* species using *N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase* gene in a zoonotic cutaneous leishmaniasis focus of Iran. **J Vector Borne Dis**, v. 55, n.1, p. 14-19, 2018 doi: 10.4103/0972-9062.234621.

SALAM, N.; AL-SHAQHA, W.M.; AZZI, A. Leishmaniasis in the Middle East: incidence and epidemiology. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n.10: e32082001, 2014. doi: 10.1371/journal.pntd.0003208.

SALLOUM, T.; MOUSSA, R.; RAHY, R.; AL DEEK J.; KHALIFEH, I.; EL HAJJ, R. *et al.* Expanded genome-wide comparisons give novel insights into population structure and genetic heterogeneity of *Leishmania tropica* complex. **PLoS Negl Trop Dis** 14(9): e0008684, 2020 doi.org/10.1371/journal.pntd.0008684

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a Laboratory Manual. 2 ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum Genet**, v.6, p.655-6, 1993. doi: 10.1007/BF00202486.

SARKARI, B.; AHMADPOUR, N.B.; MOTAZEDIAN. M. *et al.* Inter- and intra-specific variation of *Leishmania* strains isolated from patients with cutaneous and visceral leishmaniasis in Fars province, south of Iran. **Iran J Med Sci**, v. 41, n.3, p. 209–16, 2016. PMID: PMC4876299.

SECUNDINO, N.F.; EGER-MANGRICH, I.; BRAGA, E.M. *et al.* Lutzomyia longipalpis peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **J Med Entomol**, v. 42, n. 6, p. 928-38, 2005. doi: 10.1093/jmedent/42.6.928.

SEGATTO, M.; RIBEIRO, L.S.; COSTA DL. *et al.* Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.107, n.1, p.39-47,2012.doi: 10.1590/s0074-02762012000100006.

SCHWENKENBECHER, J.M.; WIRTH, T.; SCHNUR, L.F. *et al.* Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. **Intern J Parasitol**, v.36, n.2, p. 237-246, 2004.doi: 10.1016/j.ijpara.2005.09.010.E.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 47, n.1, p.349-58,2003.doi: 10.1016/s0732-8893(03)00093-2.

SCHONIAN, G.; MAURICIO, I.; GRAMICCIA, M. *et al.* Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. **Trends Parasitol**, v.24, n. 3, p. 135-42, 2008. doi:10.1016/j. p. 2007.12.006.

SCHONIAN, G.; NASEREDDIN, A.; DINSE, N. *et al.* PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.47, n.1, p.349-358, 2013.doi: 10.1016/s0732-8893(03)00093-2.

SCHONIAN, G.; CUPOLLILO, E.; MAURÍCIO I. Molecular evolution and phylogeny of *Leishmania*. In: Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M. (eds) Drug Resistance in Leishmania Parasites. **Springer**, PP.15-44, 2013. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1125-3_2.

SHAPIRO, T.A.; ENGLUND, P.T. The structure and replication of kinetoplast DNA. **Annu. Rev. Microbiol**, v.49, p. 117–143,1995. doi: 10.1146/ annurev.mi.49.10 0195.001001.

SHAW, J. J. The meeting of two worlds: Eco-epidemiology and molecules. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.89, suppl I, p. 7, 1994.

SILVA, Sde, O.; WU, A. A.; EVANS, D. A. *et al.* *Leishmania* sp. isolated from human cases of cutaneous leishmaniasis in Brazil characterized as *Leishmania major*-like. **Acta Trop**, v.112, p.239-48, 2009. Doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.026.

SIMPSON, L.The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. **Annu Rev Microbiol**, v.41, p. 363–382, 1987. doi: 10.1146 / annurev.mi.41.100187.002051.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C.S.; CRUZ, A.K. Comparative genomics: from genotype to disease phenotype in the leishmaniasis. **Int J Parasitol**, v.37, n.11, p. 1173–1186, 2007. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.05.015.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Ther Adv Infect Dis**, v. 3, n. 3-4, p. 98-109, 2016. doi: 10.1177/2049936116646063.

SUZUKI, R.; SHIMODAIRA, H. Pvclost: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. **Bioinformatics**, v 22, Issue 12, 15 June, p. 1540–1542, 2006.

TEIXEIRA, D.E.; BENCHIMOL, M.; RORIGUES, J.C. *et al.* The cell biology of Leishmania: how to teach using animations. **PLoS Pathog**, v.9, n. 10:e1003594, 2013 doi: 10.1371/journal.ppat.1003594.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J. AND ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v.6, p.750, 2017. doi: 10.12688/f1000research.11120.1

TURCO, S.J. & DESCOTEAUX A. The lipophosphoglycan of Leishmania parasites. **Annu Rev Microbiol**, v. 46, p. 65-94, 1992. doi: 10.1146/annurev.mi.46.100192.000433.

UENO, N. & WILSON, M.E. Receptor-mediated phagocytosis of Leishmania: implications for intracellular survival. **Trends Parasitol**, v. 28, n.8, p. 335-44, 2012 doi: 10.1016/j.pt.2012.05.002.

VON, STEBUT, E. Leishmaniosis. **J Dtsch Dermatol Ges**, v.13, n.3, p.191-200, 2015. doi: 10.1111 / ddg.12595.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases. **Geneve:WHO**; 2017. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diaseases. **Leishmaniasis**, 2020. Avaiable from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topicdetails/GHO/leishmaniasis>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diaseases. **Leishmaniasis**, 2021. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/topic-details/GHO/leishmaniasis>.

WU, Â. C.; FREITAS, M. A.; SILVA, Sde. O. *et al.* Genetic differences between two *Leishmania major*-like strains revealed by suppression subtractive hybridization. **Mol Biochem Parasitol**, v. 203, n. 1–2, p. 34–38, 2015.doi: 10.1016/ j.molbiopara.2015.10. 005.

YAMASAKI, H.; AGATSUMA, T.; PAVON, B.*et al.* *Leishmania major*-like parasite, a pathogenic agent of cutaneous Leishmaniasis in Paraguay. **Am J Trop Med Hyg**, v. 51, n.6, p. 749-757, 1994.doi: 10.4269 / ajtmh.1994.51.749.

ZAHIRNIA, A.H.; BORDBAR, A.; EBRAHIMI, S. *et al.* Predominance of *Leishmania major* and rare occurrence of *Leishmania tropica* with haplotype variability at the center of Iran. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n.4, p.278-287, 2018 doi: 10.1016/j.bjid.2018.07.005.

ZERPA, O.; PADRÓN-NIEVES, M.; PONTE-SUCRE, A. American Tegumentary Leishmaniasis. Drug Resistance in *Leishmania* Parasites. **Springer, Cham**, 2018 doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-74186-4_8.

ANEXO A

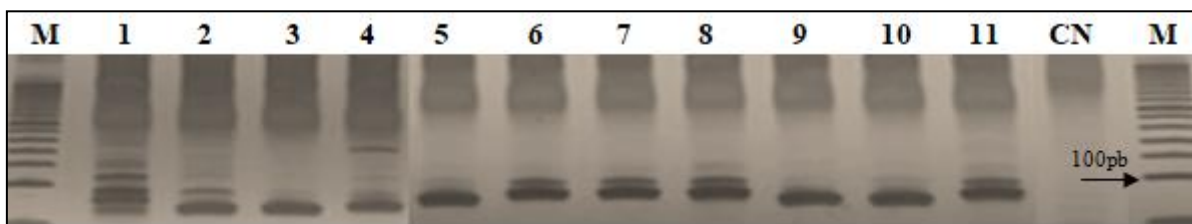


FIGURA 23 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 36GTG das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.



FIGURA 24 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 28AT das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.



FIGURA 25 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 71AT das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

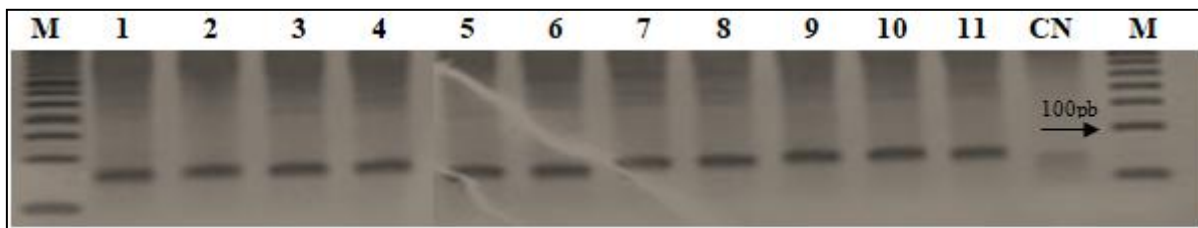


FIGURA 26 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 1GC das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

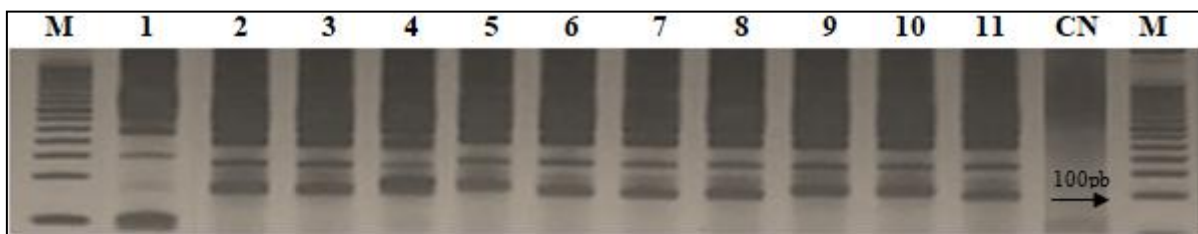


FIGURA 27 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 1GACA das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.



FIGURA 28 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 1CA das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

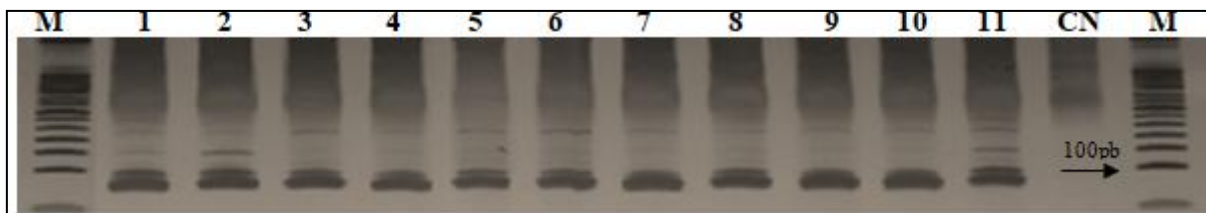


FIGURA 29 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 4GTG das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

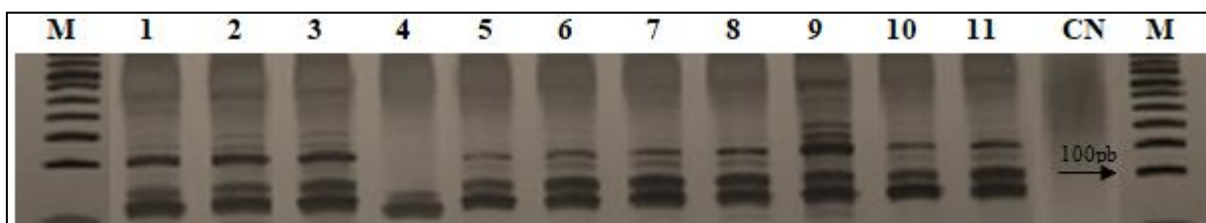


FIGURA 30 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 27GTG das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

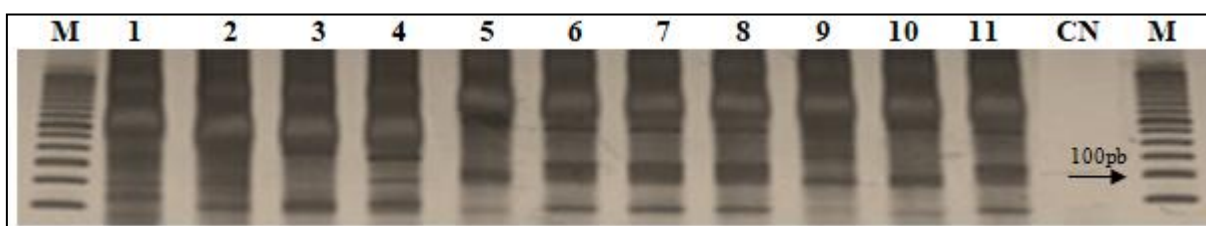


FIGURA 31 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 39GTG das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L.major-like* (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.

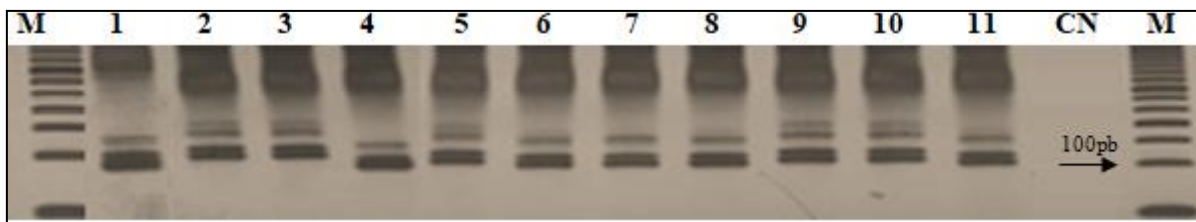


FIGURA 32 - Eletroforese em PAGE 5% dos produtos amplificados com o iniciador 45GTG das amostras estudadas. M: Marcador molecular 50pb (*Promega, USA*); 1- *L. major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) (SUDÃO); 2-5 isolados de *L. major* (IRAQUE); 6-11 isolados de *L. major*-like (BRASIL); CN- Controle negativo da reação.