

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL COMO FERRAMENTA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO SUBGÊNERO *Leishmania Viannia*
(Lainson & Shaw, 1987).

ORIENTADA: Isabella Figueiredo de Andrade

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Andrea Mara Macedo – ICB/UFMG

CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a Maria Norma Melo – ICB/UFMG

BELO HORIZONTE

MAIO – 2014

Isabella Figueiredo de Andrade

ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL COMO FERRAMENTA PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DO SUBGÊNERO *Leishmania Viannia*
(Lainson & Shaw, 1987).

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Molecular

Orientadora: Prof^a Dr^a Andrea Mara Macedo

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Maria Norma Melo

Belo Horizonte

Maio – 2014

Andrade, Isabella Figueiredo de.

Análise do DNA mitocondrial como ferramenta para identificação de espécies de subgênero *Leishmania Viannia* (Lainson & Shaw, 1987) [manuscrito] / Isabella Figueiredo de Andrade. – 2014.

92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Andrea Mara Machado. Co-orientadora: Maria Norma Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Leishmaniose - Teses. 2. *Leishmania Viannia*. 3. DNA mitocondrial – Teses. 4. Bioquímica – Teses. I. Macedo, Andrea Mara. II. Melo, Maria Norma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

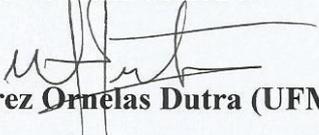
CDU: 577.1



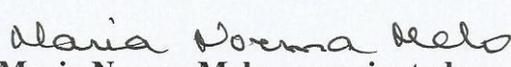
Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615

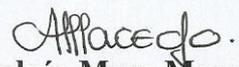


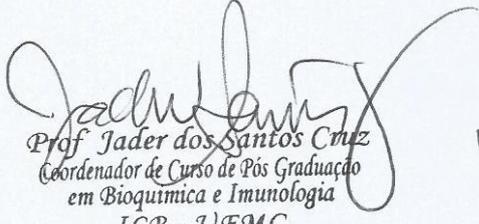
ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELLA FIGUEIREDO DE ANDRADE. Aos oito dias do mês de maio de 2014 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Análise do DNA mitocondrial como ferramenta para identificação de espécies do subgênero *Leishmania viannia* (Lainson & Shaw, 1987)", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof. Andréa Mara Macedo, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Walderez Ornelas Dutra (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria de Fátima Martins Horta (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Maria Norma Melo - co-orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Andréa Mara Macedo - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 08 de maio de 2014.


 Dra. Walderez Ornelas Dutra (UFMG)


 Dra. Maria de Fátima Martins Horta (UFMG)


 Dra. Maria Norma Melo - co-orientadora (UFMG)


 Dra. Andréa Mara Macedo - Orientadora (UFMG)


 Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Dedico esta dissertação a duas pessoas: ao meu pai Carlos e a minha mãe Emília, que me apoiaram em todas as decisões e sempre fizeram tudo que tinham ao alcance para a realização dos meus sonhos. Nada seria possível sem eles. Obrigada por tudo, pelo apoio, carinho, aprendizado e compreensão. Mesmo com a distância, jamais deixaram de se preocupar comigo e não mediram esforços para que eu conseguisse chegar onde estou hoje, eu amo vocês. Pai, aonde quer que você esteja, esta conquista é nossa.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Andrea Mara Macedo, a quem devo total gratidão pelos conhecimentos adquiridos em todo o desenvolvimento desse projeto e em todo esse tempo de convivência, pela oportunidade de realizar um projeto sob sua orientação e pela pessoa humilde, sábia e dedicada;

À Professora Doutora Maria Norma Melo do Laboratório de Biologia de Leishmanias, minha coorientadora, pela oportunidade de compartilhar parte do seu vasto conhecimento sobre o mundo das Leishmanias;

Aos demais Professores do Laboratório de Genética e Bioquímica (LGB) pelos auxílios durante os protocolos experimentais, pelas sugestões quando tive dúvidas, e pelos momentos alegres no laboratório;

À técnica do LGB, Neuzinha, que foi uma grande amiga durante estes dois anos, pelas vezes que se dispôs a fornecer materiais e responder dúvidas para a concretização dos protocolos experimentais desse trabalho;

À Doutoranda Soraia de Oliveira Silva por sempre me receber de portas abertas no Laboratório de Biologia de Leishmanias, cuidar e ceder as cepas utilizadas neste estudo;

Ao mestrando Ítalo Faria do Valle, sempre presente durante os experimentos, com imensurável disposição, auxiliando no entendimento e realização deste trabalho, principalmente com as análises de bioinformática;

Aos doutorandos bioinformatas Rodrigo Baptista, Mariana Boroni e Thiago Mafra pelos conhecimentos ensinados e ajuda para a realização da segunda parte do trabalho;

À banca, pela disposição em participar da avaliação do meu trabalho;

A Deus, por tudo o que me concedeu desde o nascimento e principalmente pela oportunidade desta conquista;

Aos amigos do LGB e de Bases, pela amizade, cumplicidade e incentivo, sem os quais não tornariam felizes e agradáveis esses dois anos de pós graduação;

A minha mãe por todos os incentivos dados até hoje e pelo imenso apoio que me deu força para concluir o Mestrado;

Ao meu pai que sempre sonhou com este momento e com certeza, onde estiver, estará sempre torcendo por mim;

Ao meu irmão Matheus, que só me dá alegrias e mesmo pequeno sempre soube demonstrar seu carinho, atenção e amor por mim;

Ao meu namorado Fernando pela paciência, carinho, atenção, confiança e amor que foram essenciais para me dar força para continuar;

A todos os mestres que fizeram parte da minha graduação, sem os quais eu não adquiriria o conhecimento que tenho hoje, não somente para a minha formação profissional, entretanto para toda a vida.

“A leitura após certa idade distrai excessivamente o espírito humano das suas reflexões criadoras. Todo homem que lê demais e usa o cérebro de menos adquire preguiça de pensar.” (Albert Einstein)

“Imaginação é mais importante do que conhecimento. Enquanto o conhecimento define o que todos nós sabemos e compreendemos, a imaginação aponta para tudo que pode ser descoberto e criado.” (Albert Einstein)

APOIO FINANCEIRO

O apoio financeiro do presente projeto foi fornecido pelas agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

RESUMO

A leishmaniose é uma doença vetorial crônica causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Ross, 1903) que são divididos em dois subgêneros, o *Viannia* e o *Leishmania*. Ela pode se manifestar em duas formas principais: visceral e tegumentar (LT); sendo a última dividida em cutânea simples, cutânea disseminada, cutânea difusa e mucocutânea. O foco deste trabalho foi nas espécies causadoras de LT, do subgênero *Viannia*. No Brasil são mais de 25 mil casos de LT por ano e ela é considerada pela Organização Mundial de Saúde uma das seis principais doenças infecciosas. A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a principal espécie causadora da forma tegumentar no Brasil. Atualmente, os métodos para diagnóstico utilizados na prática clínica são baseados em resposta imunológica (teste de intradermorreação) e exame microscópico direto da amostra coletada no local de lesão, corada pelos corantes tipo Romanowsky. Tais métodos são eficazes para o diagnóstico da doença, porém não permitem a determinação da espécie presente. A determinação da espécie presente é importante para direcionar o melhor tratamento para a doença e seu prognóstico, visto que algumas espécies respondem melhor com determinadas drogas e diferentes quantidades da terapia. A identificação das espécies é possível através da eletroforese de isoenzimas, porém esta técnica depende da cultura dos parasitos da lesão para se obter quantidade suficiente de proteínas, está sujeita à contaminação por bactérias e leveduras, é de difícil interpretação e o resultado pode levar de 3 a 5 semanas para ser disponibilizado, inviabilizando seu uso na clínica. A busca por metodologias moleculares que envolvam a reação em cadeia da polimerase (PCR) é recente, mais ainda as que se baseiam no DNA mitocondrial (kDNA). O maior problema nesta metodologia é a escassez de sequências de kDNA no GenBank do NCBI, principalmente para as espécies do subgênero *Viannia*. Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi o de pesquisar genes candidatos a identificação das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar, com foco nas do subgênero *Viannia* e enriquecer o GenBank com novas sequências para estudos futuros. Para isso, utilizamos duas abordagens. A primeira teve como objetivo a amplificação dos genes ATPase subunidade 6 (ATP6), Citocromo Oxidase subunidade II (COII), Citocromo Oxidase subunidade III (COIII) e Citocromo b (Cyt b) de cepas referência de espécies do subgênero *Viannia*. A segunda teve como objetivo a amplificação completa da região codificadora do maxicírculo da *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2903 com a finalidade de fornecer mais sequências gênicas para estudos diversos. A primeira parte do nosso trabalho gerou 27 novas sequências e todas elas

foram analisadas quanto a presença de sítios polimórficos, capazes de permitir a identificação das espécies do subgênero *Viannia*. O gene que se mostrou melhor candidato para desenvolvimento de uma metodologia que envolva iniciadores alelo específicos foi o gene Cyt b. Porém mais genes devem ser estudados e outras cepas incluídas na análise. A segunda parte do trabalho nos forneceu a sequência de 16 genes do maxicírculo do kDNA, possibilitando assim mais genes para serem estudados quanto a possibilidade de se tornarem alvos para diagnóstico molecular espécie-específico.

Palavras-chave: Leishmaniose, subgênero *Leishmania* (*Viannia*), DNA mitocondrial, SNPs.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a vectorial chronic disease caused by flagellated protozoa of genus *Leishmania* (Ross, 1903) which are divided into two subgenera, *Leishmania* and *Viannia*. It can be manifested in two major forms: tegumentary and visceral, the latter being divided into cutaneous, disseminated, diffuse and mucocutaneous. The focus of this work was on species that cause cutaneous leishmaniasis of the subgenus *Viannia*. It is reported in Brazil more than 25.000 cases of tegumentary leishmaniasis each year and it is considered by the World Health Organization one of the six major infectious diseases. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species that causes tegumentary leishmaniasis in Brasil. Currently, the diagnosis methods used in clinical practical guide are based on immune response (Montenegro intradermal test) and direct microscopic examination of the sample collected from lesion, fixed and Giemsa-stained. Such methods are effective for disease diagnostic but do not allow determining which species is present. The determination of this species is important to determine the prognostic and the best treatment for the disease, since some species respond better to certain drugs and to different amounts of therapy. The identification of species is possible by isoenzyme analysis method, but this technique depends on the culture of parasites isolated from lesion to obtain sufficient amounts of protein, is inclined to contamination by bacteria and yeast, is difficult to interpret and result can lead 3-5 weeks to be available, precluding its clinical use. The search for molecular methodologies involving polymerase chain reaction (PCR) is recent, even those based on mitochondrial DNA (kDNA). The problem for further study of this methodology is lack of kDNA sequences on NCBI GenBank, especially for species of subgenus *Viannia*. Thus, the aim of our study was to investigate candidate genes to identify species that cause tegumentary leishmaniasis, focusing on subgenus *Viannia*, and enrich GenBank with new sequences to future studies. We used two approaches. The first aimed to amplify genes: ATPase subunit 6 (ATP6), cytochrome oxidase subunit II (COII), cytochrome oxidase subunit III (COIII) and cytochrome b (Cyt b) of reference species of World Health Organization – WHO strains of subgenus *Viannia*. The second aimed to amplify the complete coding region of *Leishmania (V.) braziliensis* strain M2903 maxicircle in order to provide others gene sequences to study. The first part of our work has generated 27 new sequences and all of them were analyzed for presence of polymorphic sites able to identificate species of subgenus *Viannia*. Cyt b gene was the one that showed to be best candidate for development of a methodology involving allele-specific

primers. But more genes must be studied and other strains included in analysis. The second part generated 16 gene sequences of maxicircle kDNA, allowing more genes to be studied about the possibility of becoming targets to species-specific molecular diagnosis.

Keywords: Leishmaniasis, subgenus *Leishmania* (*Viannia*), mitochondrial DNA, SNPs.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- 9srRNA:** subunidade menor 9s do RNA ribossomal
- 12srRNA:** subunidade maior 12s do RNA ribossomal
- μL:** microlitros
- ABACAS:** *algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences*
- aCSDI:** *absolute Chromosomal Size Difference Index*
- ATP6:** ATPase subunidade 6
- Blast:** *Basic local alignment search tool*
- COI:** Citocromo Oxidase subunidade I
- COII:** Citocromo Oxidase subunidade II
- COIII:** Citocromo Oxidase subunidade III
- Cyt b:** Citocromo b
- DNA:** *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)
- DNAsp:** *DNA sequence polymorphism*
- ELISA:** *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (imunoabsorção ligada a enzima)
- G3:** região 3 rica em G
- G4:** região 4 rica em G
- gp63:** glicoproteína 63
- gRNA:** RNA guia
- HIV:** *Human Immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
- hsp70:** proteína *heat-shock* 70
- ICB:** Instituto de Ciências Biológicas
- RIFI:** Reação de Imunofluorescência Indireta
- ITS:** *Internal transcribed spacer* (Região espaçadora interna transcrita)
- kb:** quilo bases (1000 bases)
- kDNA:** *Kinetoplast DNA* (DNA mitocondrial)
- L.(Leishmania):** Subgênero *Leishmania Leishmania*
- L.(Viannia):** Subgênero *Leishmania Viannia*
- LT:** Leishmaniose tegumentar
- MEM:** *Minimum Essential Medium Eagle*
- MLEE:** *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (Eletroforese de isoenzimas)
- mRNA:** RNA mensageiro
- MURF2:** *maxicircle unassigned reading frame 2*
- MURF5:** *maxicircle unassigned reading frame 5*
- MUSCLE:** *Multiple Sequence Comparison by Log Expectation*
- NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*
- ND1:** NADH desidrogenase subunidade 1
- ND2:** NADH desidrogenase subunidade 2
- ND3:** NADH desidrogenase subunidade 3
- ND4:** NADH desidrogenase subunidade 4
- ND5:** NADH desidrogenase subunidade 5
- ND7:** NADH desidrogenase subunidade 7

ND8: NADH desidrogenase subunidade 8

ND9: NADH desidrogenase subunidade 9

ng: nanograma

pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PCR real-time: PCR em tempo real

PCR-RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* PCR

PEG: Polietilenoglicol

RATT: *Reference Anotation Transfer Tool*

RNA: *Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico)

rpoIILS: Subunidade maior da RNA polimerase II

RPS12: proteína ribossomal S12

rRNA: RNA ribossomal

sp.: espécie não explicitada

spp.: várias espécies não explicitadas

TM: *Temperature melting* (temperatura de anelamento)

WHO: *World Healt Organization* (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes do maxicírculo.....	40
Quadro 2: Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do maxicírculo....	45
Quadro 3: Espécies que amplificaram para cada gene alvo.....	49
Quadro 4: Representação dos tamanhos preditos dos genes anotados do genoma parcial do maxicírculo de <i>Leishmania braziliensis</i> cepa M2903.....	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp.....	22
Figura 2: Distribuição das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil.....	26
Figura 3: Representação esquemática do maxicírculo da <i>L. braziliensis</i>	44
Figura 4: Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Leishmania</i> para o gene ATPase subunidade 6.....	50
Figura 5: Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Leishmania</i> para o gene Citocromo Oxidase subunidade II.....	51
Figura 6: Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Leishmania</i> para o gene Citocromo Oxidase subunidade III.....	51
Figura 7: Árvore filogenética das espécies do gênero <i>Leishmania</i> para o gene Citocromo b.....	52
Figura 8: SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	53
Figura 9: SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) naiffi</i>	53
Figura 10: SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	54
Figura 11: SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepa M2904.....	54

Figura 12: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) panamensis</i>	55
Figura 13: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	55
Figura 14: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepa M2904.....	56
Figura 15: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepa M2903.....	56
Figura 16: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepas M2903 e M2904.....	57
Figura 17: SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	57
Figura 18: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) shawi</i>	58
Figura 19: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) peruviana</i>	58
Figura 20: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) panamensis</i>	59
Figura 21: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) naiffi</i>	59
Figura 22: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) lainsoni</i>	60

Figura 23: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) colombiensis</i>	60
Figura 24: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) guyanensis</i>	61
Figura 25: SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> cepas M2903 e M2904.....	61
Figura 26: SNP no gene Cyb potencialmente característico para identificação da espécie <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	62
Figura 27: Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo com produtos de amplificação da Long PCR.....	63
Figura 28: Qualidade das <i>reads</i> forward e reverse geradas por sequenciamento no aparelho Illumina.....	64
Figura 29: Imagem gerada pelo programa Circos, onde podem ser visualizados os graus de similaridade entre as seqüências das espécies <i>Sauroleishmania tarentolae</i> e <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	65
Figura 30: Representação esquemática do maxicírculo de <i>L. (V.) braziliensis</i> de acordo com a anotação obtida.....	67
Figura 31: Arquivo de anotação visualizado pelo programa Artemis, usando como referência a <i>Leishmania (L.) donovani</i>	67

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	19
1.1. O gênero <i>Leishmania</i> e a doença.....	20
1.2. Principais espécies de <i>Leishmania</i> que infectam o homem.....	22
1.3. Formas clínicas da Leishmaniose.....	23
1.4. A Leishmaniose no Brasil.....	25
1.5. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar.....	26
1.5.1. Diagnóstico clínico e epidemiológico.....	26
1.5.2. Diagnóstico laboratorial.....	27
1.6. Diagnóstico molecular das Leishmanioses e identificação da espécie.....	29
1.7. Ferramentas moleculares baseadas no DNA mitocondrial para o diagnóstico da Leishmaniose.....	31
1.8. Tratamento da Leishmaniose.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	35
3.OBJETIVOS.....	37
3.1. Objetivo Geral.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
3.3. Estratégias utilizadas.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS – ESTRATÉGIA I.....	40
4.1.1. Escolha dos genes alvo para estudo e desenho dos iniciadores.....	40
4.1.2. Obtenção de culturas das principais espécies do subgênero <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>).....	40
4.1.3. Extração do DNA das cepas do subgênero <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) para PCR convencional.....	41
4.1.4. Amplificação dos genes de interesse.....	41
4.1.5. Purificação e dosagem dos produtos de PCR obtidos.....	42
4.1.6. Sequenciamento dos genes de interesse.....	42
4.1.7. Análise dos genes de interesse.....	42
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS – ESTRATÉGIA II.....	43
4.2.1. Obtenção de cultura da cepa <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> (MHOM/BR/1975/M2903).....	43
4.2.2. Extração do DNA da cepa <i>Leishmania</i> (<i>Viannia</i>) <i>braziliensis</i> M2903 para Long PCR.....	43

4.2.3. Escolha dos genes alvo e desenho dos iniciadores.....	43
4.2.4. Amplificação do maxicírculo.....	45
4.2.5. Purificação e dosagem dos produtos de PCR obtidos.....	45
4.2.6. Sequenciamento da região codificadora do maxicírculo obtido por LongPCR.....	45
4.2.7. Montagem e anotação da região codificadora do maxicírculo obtido por LongPCR.....	46
4.2.8. Pipeline utilizado para montagem do fragmento do maxicírculo obtido por Long PCR.....	47
5. RESULTADOS.....	48
5.1. RESULTADOS – ESTRATÉGIA I.....	49
5.1.1. Dosagem do DNA obtido após extração.....	49
5.1.2. Amplificação dos genes alvo.....	49
5.1.3. Sequenciamento dos genes de interesse.....	50
5.1.4. Construção das árvores filogenéticas.....	50
5.1.5. Busca por SNPs específicos para cada espécie.....	52
5.2. RESULTADOS – ESTRATÉGIA II.....	63
5.2.1. Amplificação da região codificadora do maxicírculo.....	63
5.2.2. Obtenção das <i>reads</i>	64
5.2.3. Montagem do genoma parcial do maxicírculo sequenciado.....	64
5.2.4. Anotação do genoma parcial do maxicírculo de <i>Leishmania braziliensis</i> cepa M2903.....	66
5.2.5. Tamanho predito dos genes anotados por transferência da anotação.....	68
8. DISCUSSÃO.....	69
9. CONCLUSÕES.....	77
10. PERSPECTIVAS.....	79
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Leishmania* e a doença

A leishmaniose é uma doença vetorial crônica causada por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* (Ross, 1903), da família Trypanosomatidae. É transmitida pela picada do inseto flebotomíneo, considerada uma das sete doenças de grande prioridade em diferentes países, afetando cinco continentes, mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 1.5 - 2 milhões de novos casos a cada ano em 98 países, principalmente os em desenvolvimento (Alvar *et al.*, 2012).

Classificação atual do gênero *Leishmania*:

Reino: PROTISTA; Haeckel, 1866

Sub-reino: PROTOZOA; Goldfuss, 1817

Filo: SARCOMASTIGOPHORA; Honigberg & Balamuth, 1963

Sub-filo: MASTIGOPHORA; Desing, 1866

Classe: ZOOMASTIGOPHOREA; Calkins, 1909

Ordem: KINETOPLASTIDA; Honigberg, 1963; Vickerman, 1976

Sub-ordem: TRYPANOSOMATINA; Kent, 1880

Família: TRYPANOSOMATIDAE; Doflein, 1901; Grobben, 1905

Gênero: *Leishmania*; Ross, 1903

O gênero *Leishmania* foi descrito por Ronald Ross em 1903 e compreende 30 membros, dos quais 21 espécies são patogênicas aos mamíferos inclusive humanos (Herwaldt, 1999). O gênero é dividido em dois subgêneros, parasitos de mamíferos: o subgênero *Leishmania (Leishmania)*, descrito por Saf' Janova em 1982 e o subgênero *Leishmania (Viannia)*, descrito por Lainson & Shaw em 1987. Atualmente é bem aceito que o gênero *Leishmania* forma um grupo monofilético com dois subgêneros distintos *L. (Leishmania)*, *L. (Viannia)* (Fraga *et al.*, 2010), e um gênero a parte *Sauroleishmania* (Ranque, 1973).

De acordo com a análise do padrão de diferença absoluta de tamanho cromossomal (aCSDI) de até 31 cromossomos “conservados”, o subgênero *Leishmania* é dividido em dois grupos: (1) representantes do subgênero *Leishmania* no Velho

Mundo e (2) representantes do subgênero *Leishmania* no Novo Mundo e o subgênero *Viannia* com representantes somente no Novo Mundo (Dujardin *et al.*, 2000).

O parasito possui um ciclo de vida digenético, alternando entre hospedeiro mamífero e insetos vetores, flebotomíneos (Ordem Diptera: família Psychodidae, subfamília Phlebotominae). Eles são pequenos (normalmente 1.5 – 2 mm de tamanho), são principalmente encontrados em regiões tropicais e subtropicais e somente as fêmeas são hematófagas. Dois gêneros, *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo), são os de importância na transmissão da leishmaniose (Killick-Kendrick, 1990; Killick-Kendrick, 1999).

Fora do hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida da *Leishmania* é restrito ao trato digestório dos flebotomíneos (Fig. 1). A localização é diferente entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. O subgênero *Viannia*, presente somente no Novo Mundo, cresce no intestino médio e em seguida migra para o intestino posterior, alcançando depois a porção anterior do tubo digestório do inseto, portanto são chamados de parasitos peripilários. Já os parasitos do subgênero *Leishmania*, presentes tanto no Novo quanto no Velho Mundo, são suprapilários e desenvolvem estritamente no intestino médio e anterior (Lainson *et al.*, 1977).

Diferentes tecidos e órgãos acometidos são característicos desta parasitose, caracterizando as chamadas leishmanioses tegumentar e visceral. As causas exatas destas diferenças ainda não estão completamente estabelecidas, mas há uma forte associação da forma clínica com a espécie de *Leishmania* envolvida e a resposta imune do hospedeiro (WHO, 2010).

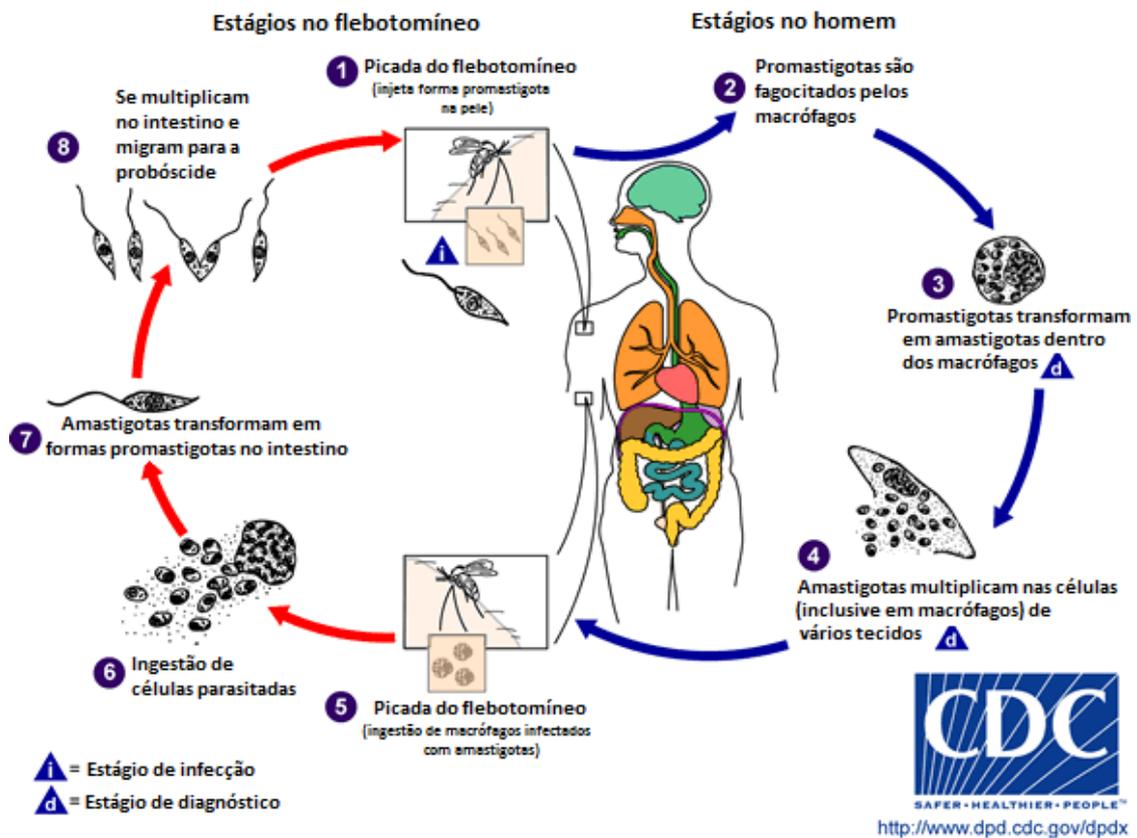


Figura 1 – Ciclo de vida da *Leishmania* sp.. Adaptado de Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern (disponível em: www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.2. Principais espécies de *Leishmania* que infectam o homem

No **Velho Mundo** encontramos somente espécies do subgênero *Leishmania* e as principais causadoras de doença no homem são: *Leishmania (L.) aethiopica*, *Leishmania (L.) major*, *Leishmania (L.) tropica*, *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum*; sendo que as duas últimas causam formas viscerais e as demais formas tegumentares.

No **Novo Mundo** encontramos espécies representantes dos dois subgêneros (Portal da Saúde, 2013):

- Subgênero *Leishmania*: *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania (L.) venezuelensis* e *Leishmania (L.) infantum* (igual a *Leishmania (L.) chagasi* do Novo Mundo); sendo somente a última causadora da forma visceral e as demais de formas tegumentares.

- Subgênero *Viannia*: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) peruviana*, *Leishmania (V.) colombienseis*, *Leishmania (V.) lindenbergi* e *Leishmania (V.) utinguensis*; sendo que todas determinam formas clínicas tegumentares.

1.3. Formas clínicas da leishmaniose

- **Leishmaniose tegumentar – LT** (pele ou mucosa) se manifesta sob quatro formas clínicas.

1. Leishmaniose cutânea simples: caracterizada por uma lesão ulcerosa indolor arredondada ou ovalada confinada a derme, geralmente localizada em áreas expostas da pele. Mede de alguns milímetros até alguns centímetros, com fundo granuloso e bordas elevadas, onde podem ser encontrados os parasitos. Dependendo da espécie causadora da doença e da imunidade do hospedeiro, a lesão pode se disseminar pela pele (Lainson *et al.*, 1986).

2. Leishmaniose cutânea disseminada: relativamente rara, pode ser observada em até 2% dos casos. As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*. Inicia com uma ou várias lesões localizadas, com as características clássicas de úlceras de fundo granuloso e bordas elevadas. Posteriormente ao desenvolvimento das lesões primárias, acontece a disseminação do parasito por via hemática ou via linfática, mais ou menos aguda, que se estabelece em pouco tempo, causando lesões distantes do local de inoculação do parasito, ou seja, da picada do inseto. Pode ocorrer o acometimento mucoso concomitante, que tem sido observado em até 30% dos pacientes; manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros. O encontro do parasito na forma disseminada é baixo, quando comparado com a forma difusa. A maioria dos pacientes requerem uma ou mais séries adicionais de tratamento para alcançar a cura clínica. Esta forma rara de apresentação pode alertar para a possibilidade da coinfeção *Leishmania*-HIV, tornando-se recomendável a investigação da infecção por esse vírus (Turetz *et al.*, 2002).

3. Leishmaniose cutânea difusa: No Brasil, a doença é causada pela *L. (L.) amazonensis*. Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento; evolui de forma lenta, apenas na derme, com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas. A resposta à terapêutica é pobre ou ausente e geralmente a reação intradérmica de Montenegro apresenta-se negativa (Balestieri *et al.*, 2002; Convit *et al.*, 1993).

4. Leishmaniose mucocutânea: O agente etiológico causador desta forma clínica no país é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*. Geralmente é uma lesão destrutiva indolor e inicia no septo nasal cartilaginoso anterior sendo, portanto, de fácil visualização. Sua forma clássica geralmente é secundária a leishmaniose cutânea crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Em 2–5% dos casos de leishmaniose cutânea, o parasito pode migrar para os tecidos da nasofaringe por via hematogênica ou linfática, resultando em leishmaniose mucocutânea, altamente desfigurante e crônica. Entre os pacientes com leishmaniose cutânea que evoluem para leishmaniose mucocutânea, 90% ocorrem dentro de 10 anos, sendo que 50% ocorrem nos primeiros dois anos após a cicatrização das lesões cutâneas. Alguns indivíduos com leishmaniose mucocutânea não apresentam cicatriz sugestiva de leishmaniose cutânea prévia (15% dos casos). Supõe-se, nesses casos, que a lesão inicial tenha sido fugaz. Em 1% dos casos de forma mucosa, a manifestação pode ser só na laringe. (Rogers *et al.*, 2011).

- **Leishmaniose visceral** (vísceras) acomete principalmente a medula óssea, fígado, baço e linfonodos, levando a anomalias de tamanho destes órgãos (hepatomegalia, esplenomegalia e adenomegalia) (Portal da Saúde, 2013). Em regiões urbanas, os cães são os principais reservatórios da doença (Gontijo & Melo, 2004).

1.4. A Leishmaniose no Brasil

A leishmaniose visceral no Brasil é causada pela *L. (L.) infantum* presente tanto no Novo quanto no Velho Mundo (Shaw, 2006).

A LT é o grande problema de Saúde Pública no Brasil, onde as principais espécies de *Leishmania* associadas com a doença são do subgênero *Leishmania* (*Viannia*). A *L. (V.) braziliensis* é a espécie prevalente nas diferentes regiões do Brasil (Fig. 2). A LT é endêmica e sua transmissão está associada com a presença de vetores dípteros febotomíneos e sobretudo animais domésticos e silvestres, que são reservatórios potenciais (Miranda *et al.*, 2002; Rebelo *et al.*, 2010).

No Brasil, já foram identificadas oito espécies causando LT, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania* (Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar, 2013). As três principais espécies são:

- *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-oeste (Goiás) e Sul (Paraná);

- *Leishmania (Viannia) guyanensis* – aparentemente limitada à Região Norte (Acre, Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e estendendo-se pelas Guianas, Peru, Equador, Venezuela e Colômbia (Davies *et al.*, 2000). É encontrada principalmente em florestas de terra firme, em áreas que não se alagam no período de chuvas;

- *Leishmania (Viannia) braziliensis* – foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita e incriminada como agente etiológico da leishmaniose tegumentar. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina. Esta espécie está amplamente distribuída em todo país.

A espécie causadora da leishmaniose mucocutânea, a forma mais grave, no país é a *L. (V.) braziliensis*, entretanto já foram descritos casos na literatura atribuídos à *L. (L.) amazonensis*, e *L. (V.) guyanensis* (Costa *et al.*, 1986).

Quanto ao subgênero *Viannia*, existem outras espécies de *Leishmania* recentemente descritas: *L. (V.) lainsoni* identificada nos estados do Pará, Rondônia e Acre; *L. (V.) naiffi*, ocorre nos estados do Pará e Amazonas; *L. (V.) shawi*, com casos humanos encontrados no Pará e Maranhão; *L. (V.) lindenberg* foi identificada no estado do Pará; e *L. (L.) utingensis* também encontrada no estado do Pará.

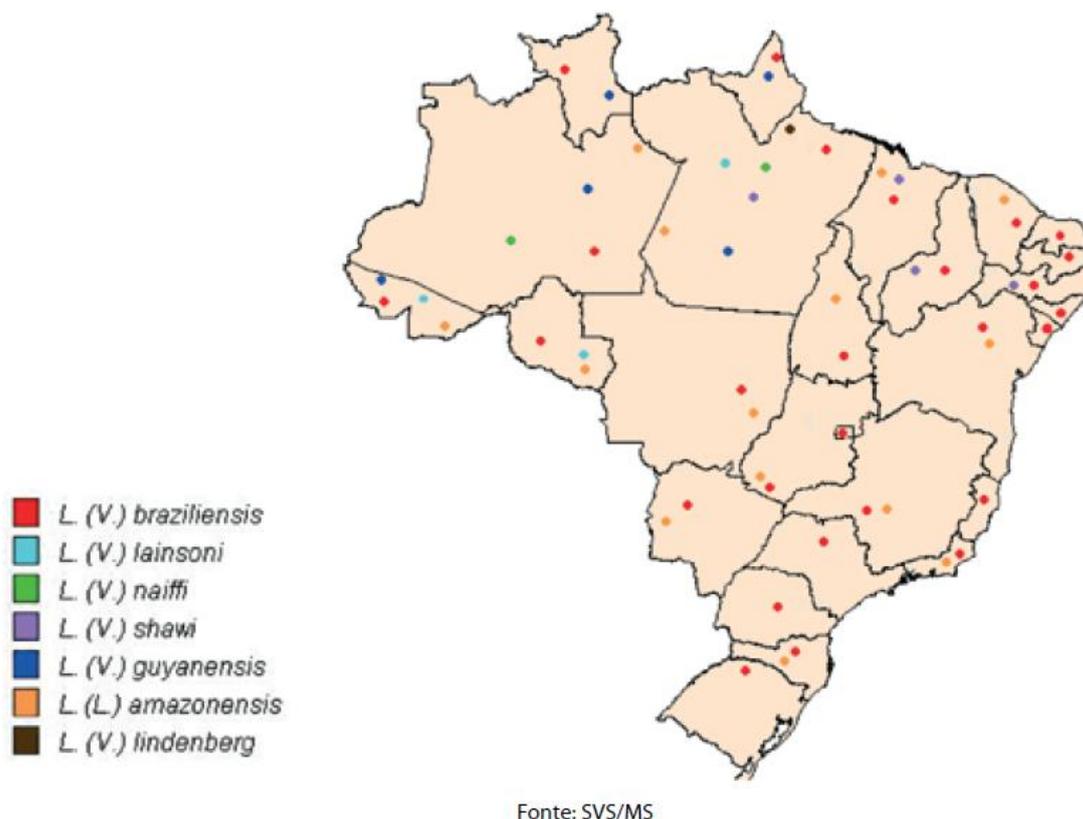


Figura 2 – Distribuição das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil. Retirado do Manual de Vigilância da *Leishmaniose* tegumentar americana, disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf

1.5. Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar

Apesar dos avanços alcançados no diagnóstico da LT nos últimos anos, ainda não foi descrito um método considerado padrão ouro para a detecção e o diagnóstico desta infecção.

1.5.1. Diagnóstico Clínico e Epidemiológico

O diagnóstico clínico é feito com base nas características das lesões, associado à anamnese, no qual os dados epidemiológicos são de grande importância (Costa *et al.*,

2009; Gontijo & Carvalho, 2003; Mello *et al.*, 2011). A suspeita de LT comumente ocorre ao identificar lesões compatíveis com as manifestações da doença em áreas endêmicas ou em pacientes que moram ou viajaram para áreas endêmicas (Mello *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2003).

A LT produz um amplo espectro de lesões, o que torna o diagnóstico clínico complicado e não imediato (Gontijo & Carvalho, 2003). Em áreas endêmicas, muitas lesões de pele, primárias ou secundárias, são diagnosticadas erroneamente como lesões iniciais de leishmaniose cutânea, bem como as lesões de LT são confundidas com as de outras doenças de pele em áreas não endêmicas (Singh *et al.*, 2006). As lesões provenientes da LT podem ser confundidas com manifestações de infecções bacterianas, neoplasias, hanseníases, lúpus eritematoso, trauma local, entre outras, o que torna necessário um diagnóstico diferencial dessas doenças (Costa *et al.*, 2009; Gontijo & Carvalho, 2003; Reithinger *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2006; Osakwe *et al.*, 2013).

Todo paciente com lesão cutânea com suspeita clínica de LT deve ser submetido ao exame de mucosa nasal e orofaríngea, para que se possa detectar possível envolvimento mucoso concomitante, logo no início da doença. Quando, por meio do exame clínico, há suspeita de LT, são imprescindíveis exames laboratoriais para confirmar o diagnóstico (Costa *et al.*, 2009).

1.5.2. Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico laboratorial das LT baseia-se em: (I) demonstração do parasito em tecidos de relevância (pele, mucosa ou tecidos linfóides), após coloração, por exemplo pelo Giemsa, e exame ao microscópio óptico; (II) detecção de anticorpos anti-*Leishmania* no soro do paciente; (III) detecção de antígenos do parasito em tecidos; (IV) detecção do DNA do parasito em amostras de tecidos; (V) detecção de imunidade mediada por células específicas (Sundar & Rai, 2002; Tavares *et al.*, 2003).

A sensibilidade de cada método diagnóstico pode variar muito e depende da experiência de cada serviço, da qualidade do equipamento e dos insumos utilizados, do tempo da evolução das lesões, da carga parasitária, da manifestação clínica da doença, do local onde o parasito será investigado e das diferentes espécies de *Leishmania* envolvidas (Mello *et al.*, 2011).

O diagnóstico parasitológico é considerado por vários autores como padrão ouro para LT. A presença do parasito em lesões é essencial para o diagnóstico. Moléculas relacionadas a antígenos ou ao parasito são ocasionalmente detectadas, e estas podem servir como marcadores para o diagnóstico da leishmaniose (Goto & Lindoso, 2012). O diagnóstico consiste na demonstração do parasito em tecidos cutâneo, mucoso ou linfóide, e pode ser obtido por processos diretos e indiretos (Reithinger *et al.*, 2007). Por meios diretos por raspagem, punção por agulha ou biópsia para esfregaço por oposição, histologia e inoculação em animais de laboratório, enquanto os processos indiretos incluem o isolamento do parasito em cultura e imunohistoquímica para detectar antígenos de *Leishmania*. A sensibilidade destes métodos em geral é baixa mas pode ser maior que 58% usando cultura (Weigle *et al.*, 1987), ou 88% associando a imunohistoquímica (Sotto *et al.*, 1989). A sensibilidade pode também depender da forma clínica; lesões por leishmaniose difusa apresentam-se com uma alta densidade parasitária, enquanto lesões crônicas como as mucocutâneas e disseminada apresentam poucos parasitos, mas a especificidade dos métodos diretos é de 100%.

Abordagens alternativas ou complementares para diagnóstico incluem a avaliação de parâmetros indiretos usando reações imunológicas como reação de hipersensibilidade tardia a antígenos anti-*Leishmania* (a reação de Montenegro ou teste cutâneo da leishmanina) e reações de anticorpos anti-*Leishmania*. Cerca de 48 a 72 horas após a injeção do antígeno de *Leishmania* no antebraço, a endureção no local é avaliada e considerada positiva quando maior que 5 mm. Este teste cutâneo da leishmanina é usado no diagnóstico, mas pode revelar infecção presente ou passada (Sassi *et al.*, 1999), mesmo em indivíduos infectados assintomáticos. Sendo assim, é mais apropriado para uso em estudos epidemiológicos para determinar a prevalência da doença ou para diagnóstico em viajantes que vivem em regiões não endêmicas e não tiveram exposição prévia a doença. Em pacientes com leishmaniose difusa o teste apresenta-se negativo. Cem por cento dos pacientes com leishmaniose mucocutânea ou disseminada apresentam o teste positivo, e 82% a 89% dos pacientes com leishmaniose cutânea localizada possuem testes positivos (Shaw & Lainson, 1975).

Reação de imunofluorescência indireta (IIFA) e reação de imunoabsorção ligada a enzima (ELISA) são métodos que são comumente utilizados no diagnóstico da leishmaniose; porém, na leishmaniose tegumentar, a sensibilidade é considerada baixa. Em lesões crônicas, como na leishmaniose recidiva, mucocutânea e disseminada, a

sensibilidade pode ser um pouco maior. No caso da mucocutânea (na qual é difícil detectar o parasito), sorologia positiva pode ser o único critério para diagnóstico (WHO, 2010). Adicionalmente, devido a redução dos níveis de anticorpos após tratamento (Romero *et al.*, 2005), um resultado positivo pode indicar infecção corrente. Na coinfeção HIV/*Leishmania*, o diagnóstico de leishmaniose é difícil devido a variedade de manifestações clínicas. Um teste sorológico positivo pode ajudar a providenciar um diagnóstico acurado. Na região do Mediterrâneo, testes sorológicos apresentaram baixa sensibilidade em indivíduos infectados com HIV/*Leishmania* (Alvar *et al.*, 2008), mas no Brasil, a sensibilidade foi maior, chegando a 77% (Lindoso *et al.*, 2009). Estes achados podem ser explicados devido a alguns pacientes apresentarem manifestações severas e/ou exposição prévia a *Leishmania* em áreas endêmicas e assim possuírem células de memória específicas para *Leishmania* preservadas, principalmente devido a imunossupressão pela infecção por HIV.

Estes métodos podem detectar o parasito, mas não permitem a identificação da espécie de *Leishmania*, o que é possível somente em laboratórios de referência que usam parasitos recuperados de culturas de lesões e realização de testes para identificação usando anticorpos monoclonais espécie-específicos (Grimaldi & McMahon-Pratt, 1996) ou por análise de perfis de eletroforese multilocus enzimática (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis) (Cupolillo *et al.*, 1995).

1.6. Diagnóstico molecular das Leishmanioses e identificação da espécie

O “padrão ouro” para a identificação de espécies de *Leishmania* é a eletroforese de isoenzimas – MLEE (Rioux *et al.*, 1990). No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações: (i) requer o isolamento do parasito da lesão, seguido de cultura para obter proteína suficiente para ser extraída para o método, levando 3-5 semanas para o diagnóstico definitivo; (ii) somente detecta mudanças em aminoácidos que afetam o padrão de migração eletroforética da proteína, enquanto mutações genéticas sinônimas permanecem indetectáveis; e (iii) diferentes condições laboratoriais podem levar a um diferente padrão de migração das proteínas, tornando difícil comparar resultados obtidos em diferentes laboratórios e centros de referência (Tsukayama *et al.*, 2009). Sendo assim, enquanto a MLEE é essencial para estudos epidemiológicos, esta técnica não é

rápida o suficiente para guiar a decisão primária de qual terapia a ser escolhida. Portanto, na maioria das vezes os clínicos determinam o começo da terapia com base somente em dados epidemiológicos (Foulet *et al.*, 2007).

Para contornar as limitações da MLEE, diversos métodos baseados no DNA tem sido buscadas para estudar a diversidade genética da *Leishmania* (Bañuls *et al.*, 2007; Schönian *et al.*, 2010). A reação em cadeia da polimerase (PCR – Polimerase Chain Reaction) fornece resultado em um ou dois dias de trabalho e o teste é mais sensível do que culturas in vitro para o diagnóstico de infecção por *Leishmania* (Costa *et al.*, 1996). A associação de uma PCR convencional juntamente com uma PCR real-time, possibilita a confiabilidade do diagnóstico positivo e fornece resultados quantitativos para verificar a eficiência do tratamento (Bretagne *et al.*, 2001).

Ao longo das últimas décadas, análises de marcadores de DNA, incluindo genes codificadores e não codificadores têm fornecido informações adicionais para o avanço da nossa compreensão das relações evolucionárias e filogenéticas e identificação das espécies. Dados pertencentes a sequências gênicas de rRNA ribossomal – em particular, os dois não codificantes, altamente variáveis transcritos internos das regiões espaçadoras (ITS1 e ITS2) são considerados critérios moleculares aceitáveis para resolver questões taxonômicas e determinar as afinidades filogenéticas entre espécies de *Leishmania* próximas (Yang *et al.*, 2010; Dávila & Memen, 2000; Schönian *et al.*, 2000; El Tai *et al.*, 2001; Kuhls *et al.*, 2005; Parvizi *et al.*, 2008). Enquanto genes codificantes são amplamente utilizados para estudos taxonômicos, como gene da proteína heat-shock 70 (hsp70) (Fraga *et al.*, 2010), o gene que codifica a subunidade maior da RNA polimerase II (rpoIILS) (Dujardin *et al.*, 2000; Croan *et al.*, 1997), o gene da glicoproteína 63 (gp63) (Mauricio *et al.*, 2007) e genes de cisteína protease B (cpb) (Hide *et al.*, 2007).

Sequenciamento de DNA e PCR-RFLP do gene da proteína *heat shock* 70 se mostraram promissores para a identificação de *Leishmania* (da Silva *et al.*, 2010), no entanto são muito conservados para estudos intra-espécies. Por outro lado, marcadores altamente polimórficos, como microsátélites, tiveram fraco desempenho em níveis taxonômicos para distinção entre espécies (Montalvo *et al.*, 2010).

Com a intenção de aumentar a sensibilidade das metodologias, muitos pesquisadores tem escolhido como alvo genes e regiões gênicas que estão presentes em vários números de cópias (Uliana *et al.*, 1991; Van Eys *et al.*, 1992; Meredith *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 1994; Cupolillo *et al.*, 1995). No entanto, o poder discriminatório desses alvos dependem do nível de variabilidade das sequências inter e intra espécies (Van Eys *et al.*, 1992).

1.7. Ferramentas moleculares baseadas no DNA mitocondrial para o diagnóstico das Leishmanioses

As espécies do gênero *Leishmania*, como outros cinetoplastídeos, possuem dois genomas, representados pelo DNA nuclear e pelo DNA mitocondrial (kDNA), este conhecido como cinetoplasto, que se localiza em um única e grande mitocôndria do parasito. O kDNA organiza-se em uma rede compacta de maxicírculos concatenados com aproximadamente 50 cópias (Stuart, 1983) que contêm genes de rRNA e de proteínas da cadeia transportadora de elétrons e milhares de minicírculos heterogêneos que, por sua vez, codificam pequenos RNA guias (gRNA); que juntos formam uma rede compacta de DNA, que corresponde entre 15% e 35% do DNA total da célula (Barker & Arnot, 1981). A rede de cinetoplasto evoluiu junto com o processamento do mRNA, por meio da inserção e deleção de uridinas. Muitos maxicírculos codificam mRNA que não podem ser traduzidos sem estas modificações pós transcricionais (Simpson, 1987).

Sequências gênicas da rede de maxicírculos do kDNA têm sido um dos alvos mais utilizados para estudos de diversidade e filogenia devido ao seu tamanho, modo de herança maternal, alta taxa de mutação e estrutura genômica simples (Avisé, 2004). Embora as sequências de kDNA tenham se mostrado valiosas nas determinações de relações filogenéticas, a escolha do gene que servirá de marcador molecular na filogenia é também muito importante (Vélez-Zuazo & Agnarsson, 2011; Naylor *et al.*, 2012). Por exemplo, estudos filogenéticos recentes em diferentes táxons sugerem que o sequenciamento mitocondrial completo promove uma alta resolução para a reconstrução de uma filogenia robusta e para a datação molecular dos eventos divergentes dentro da filogenia (Inoue *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos na literatura demonstram a aplicação do minicírculo do kDNA para diagnóstico da leishmaniose (Le Fichoux *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 1992; Salotra *et al.*, 2001; Cortes *et al.*, 2004). Apesar de terem se mostrado úteis na detecção da doença, eles não foram capazes de detectar com precisão qual a espécie presente em cada amostra, visto que os minicírculos são muito conservados entre espécies de *Leishmania*.

Os genes localizados no maxicírculo do kDNA se mostraram mais promissores para o propósito de identificação da espécie, além do simples diagnóstico da doença. O gene citocromo b (Cyt b) faz parte do genoma mitocondrial de uma larga variedade de espécies existentes e codifica uma subunidade central catalítica de uma enzima presente na cadeia respiratória da mitocôndria. Este gene tem sido amplamente utilizado para estudos filogenéticos e identificação de animais e plantas (Irwin *et al.*, 1991; Degli *et al.*, 1993). Na última década, o sequenciamento do Cyt b tem se mostrado útil na identificação e análise filogenética de isolados do tipo selvagem de *Leishmania* sp. do Velho Mundo (Luyo-Acero *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2005; Marco *et al.*, 2006; Foulet *et al.*, 2007), assim como o gene Citocromo Oxidase subunidade II (CO II) (Ibrahim & Barker, 2001) utilizando cepas da espécie *Leishmania (L.) donovani*.

Aquisição de conhecimento detalhado da estrutura e evolução das populações de *Leishmania* sp. são importantes para direcionar o diagnóstico e tratamento das diferentes espécies causadoras de leishmaniose. O conhecimento das mutações adquiridas ao longo da evolução das espécies de *Leishmania* permite um estudo da origem comum do protozoário. Tal estudo é possível a partir da investigação de sequências gênicas comuns entre as espécies relacionadas.

O problema para sua utilização na identificação de espécies de *Leishmania* é a escassez de sequências mitocondriais disponíveis, principalmente das espécies do subgênero *Viannia*.

1.8. Tratamento da Leishmaniose

A droga de primeira escolha é o antimonial pentavalente. Visando padronizar o esquema terapêutico, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a dose desse

antimonial seja calculada em mg/Sb+5/kg/dia (Sb+5 significando antimônio pentavalente). Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados: o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e o stibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo o último não comercializado no Brasil.

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e o isotionato de pentamidina. As lesões ulceradas podem sofrer contaminação secundária, razão pela qual devem ser prescritos cuidados locais, como limpeza com água e sabão e, se possível, compressas com permanganato de potássio (KMNO₄), com diluição de 1/5.000ml de água morna (Portal da Saúde, 2013).

A resposta ao tratamento medicamentoso é influenciada pelas espécies (Magill, 2005; Navin *et al.*, 1992). Embora a forma clínica apresentada de leishmaniose cutânea seja influenciada pela espécie infectante (Herwaldt & Berman, 1992; Murray *et al.*, 2005), constituição individual de cada pessoa, a apresentação clínica não é específica o suficiente para permitir uma determinação confiável específica da espécie (Dauden *et al.*, 1996; Herwaldt & Berman, 1992; Taillan *et al.*, 1992). A identificação da espécie pode também ajudar a prever o risco de disseminação em pacientes imunocomprometidos (Foulet *et al.*, 2006; Guiguemde *et al.*, 2003). Sendo assim, a identificação da espécie é importante para determinar o prognóstico clínico e para selecionar o tratamento terapêutico adequado a ser administrado para cada indivíduo.

Por exemplo, um paciente que esteve somente no território brasileiro, pode estar infectado com *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. shawi* ou *L. amazonensis*. A infecção por *L. braziliensis* ou *L. amazonensis* é melhor tratada com 10 a 20 doses de antimonial pentavalente (Magill, 2005), enquanto a infecção por *L. guyanensis* frequentemente é curada após um baixo número ou até mesmo após uma única injeção de pentamidina (Soto *et al.*, 1994; Roussel *et al.*, 2006) ou com miltefosina oral (Soto *et al.*, 2004).

A diferença fenotípica observada não somente entre espécies, mas também nos níveis de virulência entre os clones (Garin *et al.*, 2001) que, juntamente com a interação entre a resposta imunológica do hospedeiro, contribui para determinar a pleiotropia observada na clínica e afeta na eficácia da terapia utilizada (Arevalo *et al.*, 2007). A diversidade genética da *Leishmania* compromete também o desenvolvimento de

vacinas, embora alguns genes antigênicos alvo sejam altamente conservados. O entendimento da leishmaniose e o desenvolvimento de medidas para conter sua disseminação, dependem da habilidade em identificar a espécie de *Leishmania* e caracterizar variantes genéticas (Boité *et al.*, 2012).

A identificação correta das espécies reduz significativamente o risco de efeitos adversos graves, assim como a duração da hospitalização e também reduz o número de injeções, uma mudança importante, principalmente para crianças.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista a necessidade de uma metodologia capaz de identificar a espécie de *Leishmania* presente em uma infecção com rapidez e aplicabilidade na clínica, e os resultados já obtidos em outros trabalhos utilizando DNA mitocondrial (kDNA), existe a possibilidade de aplicação do kDNA para identificação de espécies de *Leishmania*. Uma busca prévia no banco de dados do NCBI mostrou poucos estudos de sequências gênicas do maxicírculo do kDNA das espécies do subgênero *Leishmania Viannia*, o que dificulta conhecer a origem filogenética desses parasitos. Os subtipos de maxicírculos, se conhecidos, poderiam ser utilizados como marcadores taxonômicos. Este tipo de análise poderia elucidar a filogenia das espécies desses protozoários e aumentar nossa compreensão das tendências, mecanismos e forças seletivas, envolvidas na evolução dos genomas mitocondriais em geral (Simpson, 1987). Portanto, esse tipo de estudo retrospectivo, que visa estabelecer uma filogenia clara para o subgênero *Leishmania Viannia*, é extremamente interessante para a avaliação do percurso evolutivo das principais espécies causadoras da leishmaniose, forma tegumentar, no Brasil.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudo da diversidade de genes mitocondriais de cepas do subgênero *Leishmania Viannia*, com perspectivas de encontrar ferramentas/marcadores capazes de contribuir para estudos filogenéticos e taxonômicos das principais espécies deste subgênero.

3.2. Objetivos específicos

- Enriquecer o banco de dados do NCBI com sequências mitocondriais de espécies do subgênero *Leishmania Viannia*.
- Pesquisar alvos moleculares para aplicação em amostras biológicas para identificação das espécies, com foco no subgênero *Leishmania Viannia*.

3.3. Estratégias utilizadas

1. Sequenciamento e análise de alguns genes mitocondriais de espécies do subgênero *Leishmania Viannia*.
2. Sequenciamento completo e análise da região codificadora do maxicírculo da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2903.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS – ESTRATÉGIA I

4.1.1. Escolha dos genes alvos para estudo e desenho dos iniciadores

Foram realizadas buscas no GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e levantados, inicialmente quatro genes mitocondriais para estudo, sendo eles: ATPase subunidade 6 (ATP6), Citocromo Oxidase subunidade II (COII), Citocromo Oxidase subunidade III (COIII) e Citocromo B (Cyt b).

Os iniciadores para os genes COII e COIII foram desenhados utilizando sequências mitocondriais disponíveis no GenBank, proveniente das espécies de *Leishmania* subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. major* e *L. donovani*). As sequências obtidas foram alinhadas e as regiões mais conservadas foram escolhidas para desenho dos primers, sendo que alguns tiveram que apresentar bases degeneradas para garantir a amplificação. Para os outros genes, os iniciadores utilizados foram descritos em estudos ATP6 (Ochs *et al.*, 1996) e Cyt b (Luyo-Acero *et al.*, 2004).

Ao todo, obtivemos quatro pares de primers para sequenciamento de genes isolados, possíveis candidatos a genes alvo para tipagem das espécies de *Leishmania*. No Quadro 1 estão representados esquematicamente os primers utilizados no presente trabalho. Em vermelho estão as bases degeneradas.

Quadro 1 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos genes do maxicírculo

ATP6F	5'-TATTTATGAGTGGTTTTTTAG-3'	43,4°
ATP6R	5'-TTAACTGCATTATCATATTAC-3'	43,1°
COIIF	5'-AAGAGCAGGACCAATTCTTATTTG-3'	53,0°
COIIR	5'-ATACACGACTCAGTCCTTCTTTCC-3'	55,9°
COIIIF	5'-TTTTGTATWATGTTTGGTAGTTTT-3'	47,3°
COIIIR	5'-CTACACTTAAMACATCAAATATAC-3'	47,3°
Cyt bF	5'-TAATACGACTCACTATAGTTTATATTGACATTTTGTWGATT-3'	56,8°
Cyt bR	5'-GGGTTTTCCCAGTCACGACGAATCTCTCTCCCTT-3'	66,4°

Iniciadores forward (F) e reverse (R). Respetivos TM (°C) ao lado direito. Em negrito estão as bases degeneradas.

4.1.2. Obtenção de culturas das principais espécies do subgênero *Leishmania* (*Viannia*)

As cepas utilizadas neste trabalho foram cultivadas em meio alfa MEM (Minimum Essential Medium Eagle) e gentilmente cedidas do banco de cepas de

Leishmania do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, coordenado pela professora Maria Norma Melo em colaboração com sua aluna de Doutorado Soraia Silva.

As cepas utilizadas neste estudo foram:

- *Leishmania colombiensis* (IHAR/CO/1985/CL500)
- *Leishmania panamensis* (MHOM/PA/1971/LS94)
- *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/1970/M1176)
- *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903)
- *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904)
- *Leishmania naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533)
- *Leishmania lainsoni* (MHOM/BR/1981/M6426)
- *Leishmania shawi* (MCEB/BR/1984/M8408)

4.1.3. Extração do DNA das cepas do subgênero *Leishmania* (*Viannia*) para PCR convencional

A extração do DNA total foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Macedo *et al.*, 1992; a partir de culturas das cepas em estudo. As amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1%, com a utilização de padrões com concentrações conhecidas de DNA genômico do plasmídeo PUC18. A concentração final estoque de cada amostra de DNA foi ajustada para 50ng/μL e estocada a 4°C até o momento do uso.

4.1.4. Amplificação dos genes de interesse

A amplificação dos genes escolhidos foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR convencional). As amostras estoque de DNA tiveram as concentrações ajustadas para 1ng/μL. O protocolo utilizado foi: 94°C por 10 minutos (desnaturação inicial), 94°C por 1 minuto (desnaturação), TM - 5°C por 1 minuto (anelamento) e 72° por 1 minuto e 30 segundos (extensão), repetindo as etapas de desnaturação, anelamento e extensão por 27 vezes, em seguida 72°C por 10 minutos (extensão final) e 4°C para armazenar o produto da reação.

4.1.5. Purificação e dosagem dos produtos de PCR obtidos

Após a amplificação, os produtos da PCR foram purificados utilizando PEG 8000 (polietilenoglicol) 20%. As dosagens dos produtos da purificação foram feitas em gel de agarose 1%.

4.1.6. Sequenciamento dos genes de interesse

As amostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho ABI3130, utilizando-se polímero POP7 e BigDye v3.1, por serviço terceirizado da empresa Myleus Biotechnology. Para análise da qualidade dos arquivos gerados, utilizamos o software livre *Sequence Scanner Software* da Applied Biosystems®.

4.1.7. Análise dos genes de interesse

As sequências obtidas foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE - *Multiple Sequence Comparison by Log Expectation* (Edgar *et al.*, 2004). Em seguida, as sequências foram “trimadas” com uso do programa Gblocks (Talavera & Castresana, 2007), de modo a remover todos os “gaps” e ajustar as pontas das sequências, de modo que todas ficassem com o mesmo tamanho, com início e fim nas mesmas posições. Para melhor visualização e confirmação das sequências obtidas, foi construída uma árvore filogenética para cada gene utilizando o programa PhyML (Guindon *et al.*, 2010). Esse método utiliza o algoritmo de construção de árvores por Máxima Verossimilhança, com modelo HKY de substituição, que considera que as taxas de mutações serão diferentes para transições e transversões e considera também que a frequência de cada nucleotídeo é diferente ao longo da sequência, visto que a mitocôndria possui um alto conteúdo de A e T.

Para a busca de polimorfismos específicos de cada espécie, foi utilizado o programa DNAsp (sequence polymorphism) (Librado & Rozas, 2009).

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS – ESTRATÉGIA II

4.2.1. Obtenção de cultura da cepa *Leishmania (Viannia) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903)

A cepa foi cultivada em meio MEM (Minimum Essential Medium Eagle) modificação alfa e gentilmente cedida do banco de cepas de *Leishmania* do Laboratório de Biologia de *Leishmania* do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG, coordenado pela professora Maria Norma Melo em colaboração com sua aluna de Doutorado Soraia Silva.

Para esta etapa do trabalho foi escolhida a espécie *L. braziliensis* cepa M2903, a principal causadora da LT no Brasil e por ser uma cepa de referência pela WHO. Até o momento deste trabalho não foi disponibilizada a sequência do genoma mitocondrial desta cepa.

4.2.2. Extração do DNA da *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa M2903 para LongPCR

Para assegurar a integridade do DNA mitocondrial, a extração do DNA total de *L. braziliensis* cepa M2903 foi realizada com o uso do Blood & Cell Culture DNA Mini Kit da Qiagen® (cat. no. 13323), seguindo o protocolo padrão para extração de DNA de cultura de célula. A amostra de DNA foi quantificada em gel de agarose 1%, com a utilização de padrões com concentrações conhecidas de DNA genômico do plasmídeo PUC18. A concentração final estoque da amostra de DNA foi ajustada para 50 ng/ μ L e estocada a 4°C até o momento do uso.

4.2.3. Escolha dos genes alvo e desenho dos iniciadores

Os genes alvo escolhidos para o desenho dos iniciadores da reação de LongPCR do região codificadora do maxicirculo da *L. braziliensis* foram a subunidade 12 do RNA ribossomal (12s rRNA) como primer Forward e a subunidade 5 da NADH desidrogenase (ND5) como primer Reverse, como demonstrado na Figura 3.

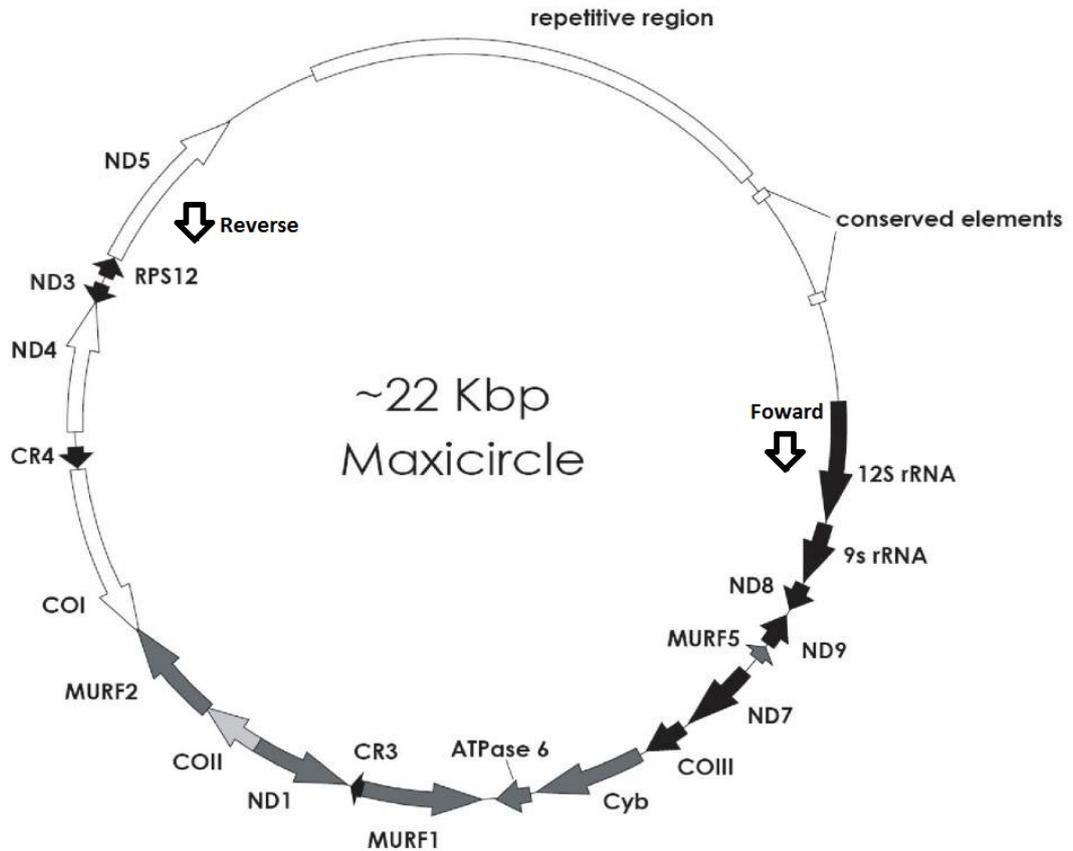


Figura 3 – Representação esquemática do maxicírculo da *L. braziliensis*. A metodologia utilizada foi feita de modo que somente a região codificadora do genoma mitocondrial fosse amplificado, descartando a região repetitiva, que não foi abordada no nosso estudo. Adaptado de Westenberger, 2006.

A escolha dos iniciadores para amplificação do maxicírculo foi feita a partir de regiões conservadas dos genes ND5 e 12srRNA, utilizando como molde sequências disponíveis no GenBank, provenientes de espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. donovani*) e a *Sauroleishmania tarentolae*; cepas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brenner e 231) e da espécie *Trypanosoma brucei*.

As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa Multalin em busca de regiões altamente conservadas entre as espécies. Para desenho dos iniciadores foi utilizado o programa Primer 3 com os seguintes parâmetros: TM ~ 60°C, conteúdo de GC ~ 50%, uma vez que a amplificação deve ser altamente específica. Os iniciadores selecionados estão representados no Quadro 2.

Quadro 2 – Sequências dos iniciadores utilizados para amplificação do maxicírculo

12sF	5'-TGCAGATACAGGTATTGGTCCTTCCAT-3'	59,4°
ND5R	5'-GGGCAAGTCCTACTCTCCTTACAAAGAGA-3'	66,4°

Na coluna da direita estão os respectivos TM (°C).

4.2.4. Amplificação do maxicírculo

Para a amplificação da região codificadora do maxicírculo foi utilizada a técnica de LongPCR, técnica utilizada para a amplificação de grandes fragmentos de DNA (Cheng *et al.*, 1994). Para a reação de amplificação, as amostras estoque de DNA tiveram as concentrações ajustadas para 3ng/μL. A amplificação da região codificadora do maxicírculo foi realizada pela metodologia de LongPCR utilizando o kit GeneAmp XL da Applied Biosystems®, de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo utilizado foi: 75°C por 1 minuto e 30 segundos (hot start) em seguida, adição da Taq DNA polimerase (que precisa do choque térmico para ativação), 94°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 12 minutos (anelamento e extensão), repetindo as etapas de desnaturação, anelamento e extensão por 35 vezes, em seguida 72°C por 10 minutos (extensão final) e 4°C para armazenar o produto da reação.

4.2.5. Purificação e dosagem dos produtos de PCR obtidos

Após a amplificação, os produtos da LongPCR gerados foram purificados utilizando PEG 8000 (polietilenoglicol) 20%. A visualização e dosagem dos produtos da purificação foram feitas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo.

4.2.6. Sequenciamento da região codificadora do maxicírculo obtido por LongPCR

O sequenciamento da região amplificada do maxicírculo da espécie *L. braziliensis* cepa M2903 foi realizado por serviço terceirizado por empresa especializada (BGI tech©, China). A estratégia escolhida foi de sequenciamento de

nova geração no aparelho HiSeq2000 da Illumina®, produzindo *reads* pareadas com tamanho de fragmento de 90 pb e tamanho de inserto de 500 pb.

4.2.7. Montagem e anotação da região codificadora do maxicículo obtido por Long PCR

Inicialmente a qualidade das *reads* obtidas foram analisadas por meio do programa FastQC versão 0.10.1 (Andrews, 2011). Em seguida, todas as *reads* redundantes foram removidas e os dois arquivos (forward e reverse) foram convertidas em um arquivo único, utilizando um *script* do pacote Velvet (Zerbino & Birney, 2008). A cobertura da sequência foi então reduzida para 100x com uso da ferramenta CG-Tools (Kislyuk *et al.*, 2010), valor ideal para realizar a montagem dos *contigs*. Finalmente foram removidas as *reads* de baixa qualidade ($\text{phred} < 30$) com a ferramenta PRINSEQ (Schmieder & Edwards, 2011).

O arquivo resultante foi utilizado para a montagem do maxicículo do kDNA. A montagem dos *contigs* foi feita com uso do VelvetOptimizer (Gladman, 2009) que complementa os *scripts* do pacote Velvet. O *script* faz a montagem *de novo* do genoma utilizando vários K-mers diferentes (15-31, intervalo de +2), e utiliza o parâmetro $n50 * L_{con} / \text{tbp} + \log(L_{bp})$ para definir a melhor montagem. Os *contigs* gerados foram então filtrados para fragmentos maiores que 500pb e colocados em ordem de acordo com os genomas de referência. Como referência para montagem do maxicículo da *L. braziliensis* foram utilizadas as sequências dos maxicículos de *L. tarentolae*, *L. donovani* e *L. amazonensis* por serem os únicos disponíveis no banco de dados do NCBI. A montagem foi realizada com uso do programa ABACAS - *algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences* (Assefa *et al.*, 2009).

Finalmente, foi realizada a anotação do genoma do maxicículo da *L. braziliensis* cepa M2903 de acordo com os genomas de referência por transferência da anotação pelo RATT – *Reference Anotation Transfer Tool* (Otto *et al.*, 2011). O que não foi possível obter por esta abordagem foi anotado manualmente mas todos os genes preditos foram submetidos ao Blast – Basic local alignment search tool (Altschul, 1990) para conferência da anotação. Para visualização do arquivo de anotação foi utilizado o programa Artemis - *Genome Browser and Anotation Tool* (Rutherford *et al.*, 2000).

4.2.8. Pipeline utilizado para montagem do fragmento do maxicirculo da *Leishmania braziliensis*

Conversão dos dois arquivos de *reads* em um único

```
shuffleSequences_fastq.pl reads.R1.fastq reads.R2.fastq shuffled.fastq
```

Remoção das *reads* redundantes

```
run_assembly_removeDuplicateReads.pl --unique shuffled.fastq > shuffled.reduced.fastq
```

Redução da cobertura para 100x

```
perl bin/cg_tools/scripts/run_assembly_removeDuplicateReads.pl --unique --downsample 0.0016 shuffled.fastq > shuffled.reduced_100x.fastq
```

Remoção das *reads* de baixa qualidade

```
prinseq-lite.pl -fastq shuffled.reduced_100x.fastq -out_format 3 -no_qual_header -min_len 30 -min_qual_mean 30 -ns_max_p 20 -trim_tail_right 5 -trim_tail_left 5 -trim_qual_step 1 -trim_ns_right 5 -trim_ns_left 20 -trim_qual_type mean -trim_qual_rule lt -trim_qual_window 5 -out_bad null
```

Montagem dos *contigs*

```
perl /home/bioinfo/programs/velvet/velvet_1.2.10/contrib/VelvetOptimiser-2.2.4/VelvetOptimiser.pl --a --v --d tmpasm_100x_20x_473 --s 15 --e 31 --c -k 'n50*Lcon/tbp+log(Lbp)' --o '-exp_cov 100 -cov_cutoff 20 -ins_length 473' -f '-shortPaired -fastq shuffled_prinseq_good_bZkw.fastq'
```

Filtro para manter apenas os *contigs* maiores que 500pb

```
bioawk -c fastx '{if (length($seq) > 500) {print ">"$name;print$seq}}' contigs.fa > filtered500_contigs100x.fa
```

Ordenação dos *contigs* de acordo com o genoma de referência

```
perl /usr/local/pagit/latest/PAGIT/ABACAS/abacas.pl -r ../../leishmania_tarentolae.fasta -q ../../filter_500_contigs100x.fa -p nucmer -m -b -o isaabacas2
```

Transferência da anotação do genoma referência

```
/usr/local/pagit/latest/PAGIT/RATT/start.ratt.sh ./EMBL ./isaabacas2.fasta myPrefix Species > rattisaamazon.output.txt
```

5. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS – ESTRATÉGIA I

5.1.1. Dosagem do DNA obtido após a extração

Para todas as oito espécies do nosso estudo, foi possível obter quantidade suficiente de DNA para execução do trabalho. Todas as amostras obtidas foram ressuspendidas em 50µL de H₂O miliQ.

- *Leishmania colombiensis* – 200ng/µL
- *Leishmania panamensis* – 40ng/µL
- *Leishmania guyanensis* – 150ng/µL
- *Leishmania braziliensis* cepa M2903 – 100ng/µL
- *Leishmania braziliensis* cepa M2904 – 80ng/µL
- *Leishmania naiffi* – 10ng/µL
- *Leishmania lainsoni* – 250ng/µL
- *Leishmania shawi* – 30ng/µL

5.1.2. Amplificação dos genes alvo

Das oito espécies utilizadas em nosso estudo, foi possível obter amplicons para os genes representados no Quadro 3.

Quadro 3 – Espécies que amplificaram para cada gene alvo

Genes Espécies	ATPase subunidade 6	Citocromo oxidase II	Citocromo oxidase III	Citocromo b
<i>L.colombiensis</i> CL500	-	-	-	✓
<i>L. panamensis</i> LS94	✓	✓	✓	✓
<i>L. guyanensis</i> M1176	✓	✓	✓	✓
<i>L. braziliensis</i> M2903	✓	✓	✓	✓
<i>L. braziliensis</i> M2904	✓	✓	✓	✓
<i>L. naiffi</i> M5533	✓	✓	-	✓
<i>L. lainsoni</i> M6426	✓	✓	-	✓
<i>L. shawi</i> M8408	✓	✓	✓	✓

Onde não foi possível obter o fragmento correspondente ao esperado (-).

5.1.3. Sequenciamento dos genes de interesse

Foi possível obter a sequência de todas as espécies que amplificaram. Portanto, nosso trabalho gerou 27 novas sequências correspondentes a quatro genes de *Leishmania* para estudo.

Além disso, por meio de uma busca no NCBI foram coletadas outras 24 sequências do subgênero *Leishmania*, também correspondentes aos quatro genes, para comparação e análise das novas sequências obtidas neste trabalho.

5.1.4. Construção das árvores filogenéticas

Foram construídas árvores pelo método de Máxima Verossimilhança, com modelo HKY de substituição, utilizando as sequências obtidas para os quatro genes (Fig. 4 gene ATP6, Fig. 5 gene COII, Fig. 6 gene COIII e Fig 7 gene Cyb). Para comparar as sequências do subgênero *Viannia*, foram utilizadas também sequências do subgênero *Leishmania* e a *Sauroleishmania tarentolae*.

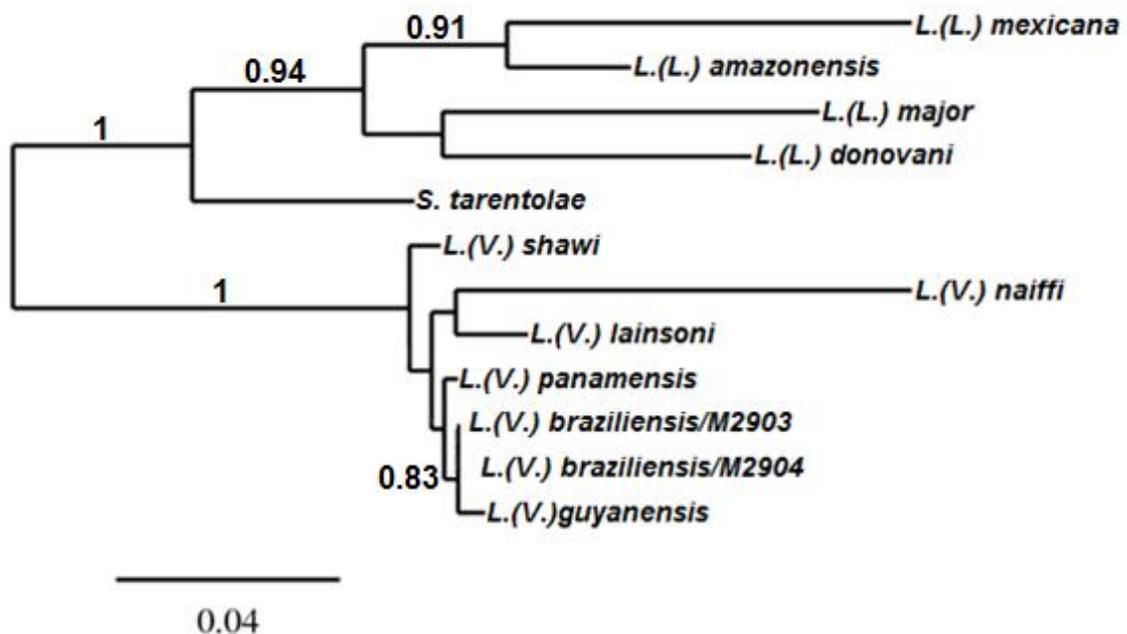


Figura 4 – Árvore filogenética das espécies do gênero *Leishmania* para o gene ATPase subunidade 6, obtida pelo método de Máxima Verossimilhança.

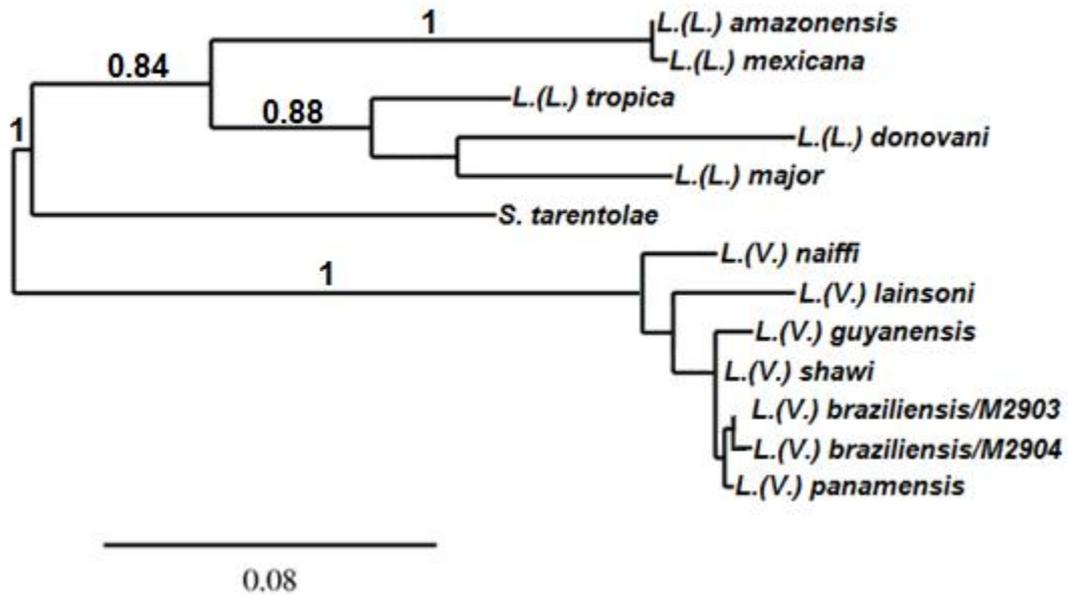


Figura 5 – Árvore filogenética das espécies do gênero *Leishmania* para o gene Citocromo Oxidase subunidade II, obtida pelo método de Máxima Verossimilhança.

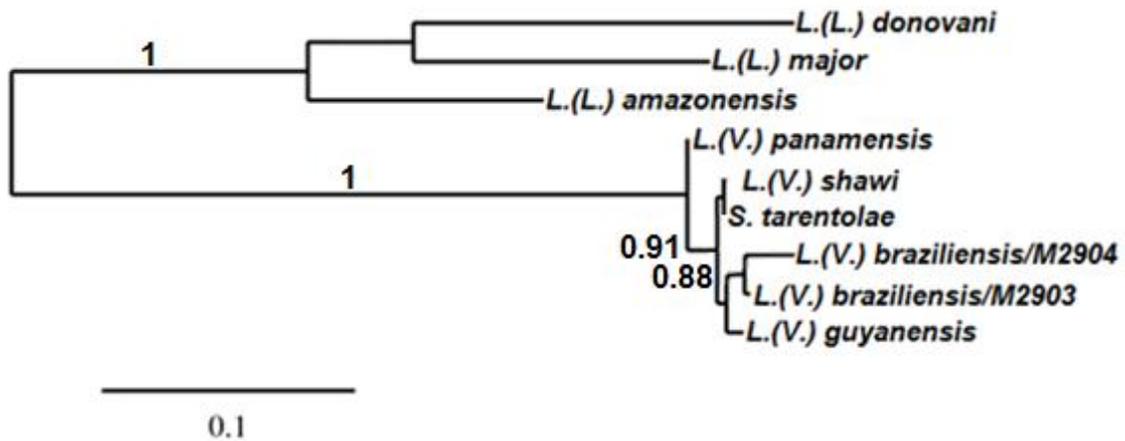


Figura 6 – Árvore filogenética das espécies do gênero *Leishmania* para o gene Citocromo Oxidase subunidade III, obtida pelo método de Máxima Verossimilhança .

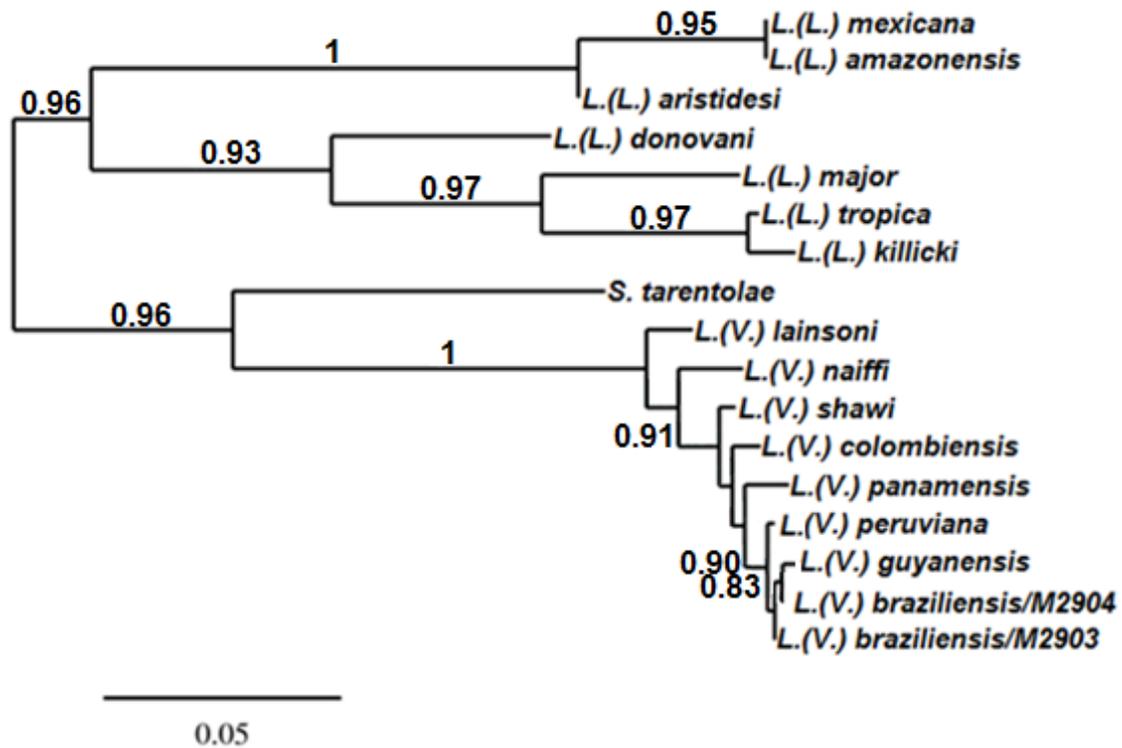


Figura 7 – Árvore filogenética das espécies do gênero *Leishmania* para o gene Citocromo b, obtida pelo método de Máxima Verossimilhança.

5.1.5. Busca por SNPs específicos para cada espécie

Por meio da busca para SNPs específicos, foram obtidos para todos os genes estudados, regiões que permitiram a identificação das espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Similarmente, foram também identificados alguns SNPs que permitiram identificar as espécies dentro do subgênero *Viannia*.

Os genes que apresentaram potencial para identificação das espécies dentro do subgênero *Viannia* foram: Citocromo Oxidase subunidade II (Figuras 8 até 11), Citocromo Oxidase subunidade III (Figuras 12 até 17) e Citocromo b (Figuras 18 até 26). O gene da ATPase subunidade 6 não apresentou nenhum SNP adequado à identificação de espécies dentro do subgênero *Viannia*.

- SNPs encontrados após análise do gene COII

	230	240
<i>lainsoni</i> /1-703	AATATTTATTG	CACATGAGAA
<i>naiffi</i> /1-714	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>gyuanensis</i> /1-712	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>braz03</i> /1-729	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>braz04</i> /1-591	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>panamensis</i> /1-708	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>shawii</i> /1-633	AATATTTATTG	TACATGAGAA
<i>tarentolae</i> /1-629	AATATATAATTG	TACTTGAGAA
<i>amazonensis</i> /1-580	AATATTTATTG	TACCTGAGAA
<i>mexicana</i> /1-577	AATATTTATTG	TACCTGAGAA
<i>donovani</i> /1-629	AATGTTTATTG	TACTTGAGAA
<i>tropica</i> /1-561	AATGTATAATTG	TACTTGAGAA
<i>major</i> /1-578	AATGTTTATTG	TACTTGAGAA

Figura 8 – SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) lainsoni*. SNP destacado em vermelho.

	320	330
<i>lainsoni</i> /1-703	TACGATTATG	TTTACT
<i>naiffi</i> /1-714	TACGATTG	TGTTTACT
<i>gyuanensis</i> /1-712	TACGACTATA	TGTTTACT
<i>braz03</i> /1-729	TACGATTATG	TTTACT
<i>braz04</i> /1-591	TACGATTATG	TTTACT
<i>panamensis</i> /1-708	TACGATTATG	TTTACT
<i>shawii</i> /1-633	TACGATTATG	TTTACT
<i>tarentolae</i> /1-629	TACGTTTATA	TGTTTACT
<i>amazonensis</i> /1-580	TCAGATTATA	TGTTTATT
<i>mexicana</i> /1-577	TCAGATTATA	TGTTTATT
<i>donovani</i> /1-629	TAAGGTTATA	TCTGTT
<i>tropica</i> /1-561	TTAGGTTATA	TGTTTGTT
<i>major</i> /1-578	TTAGGTTATA	TGTTTGTT

Figura 9 – SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) naiffi*. SNP destacado em vermelho.



Figura 10 – SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) guyanensis*. SNP destacado em vermelho.

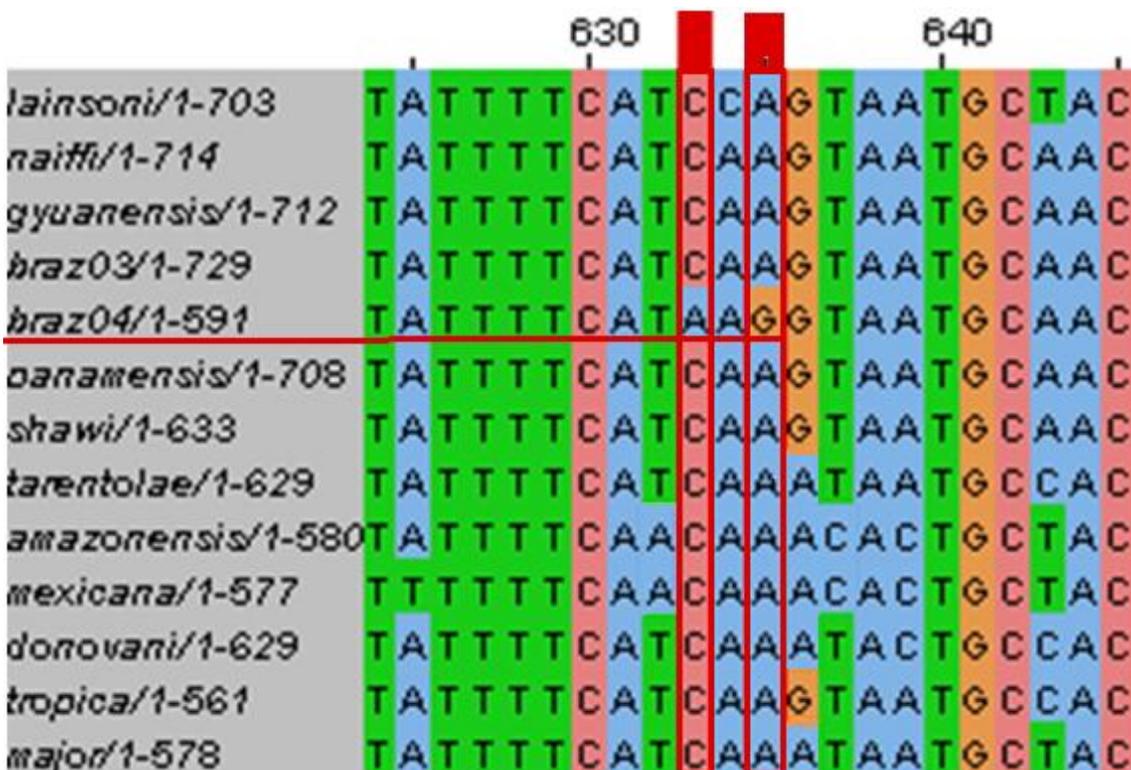


Figura 11 – SNP no gene COII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2904. SNPs destacados em vermelho.

- SNPs encontrados após análise do gene COIII

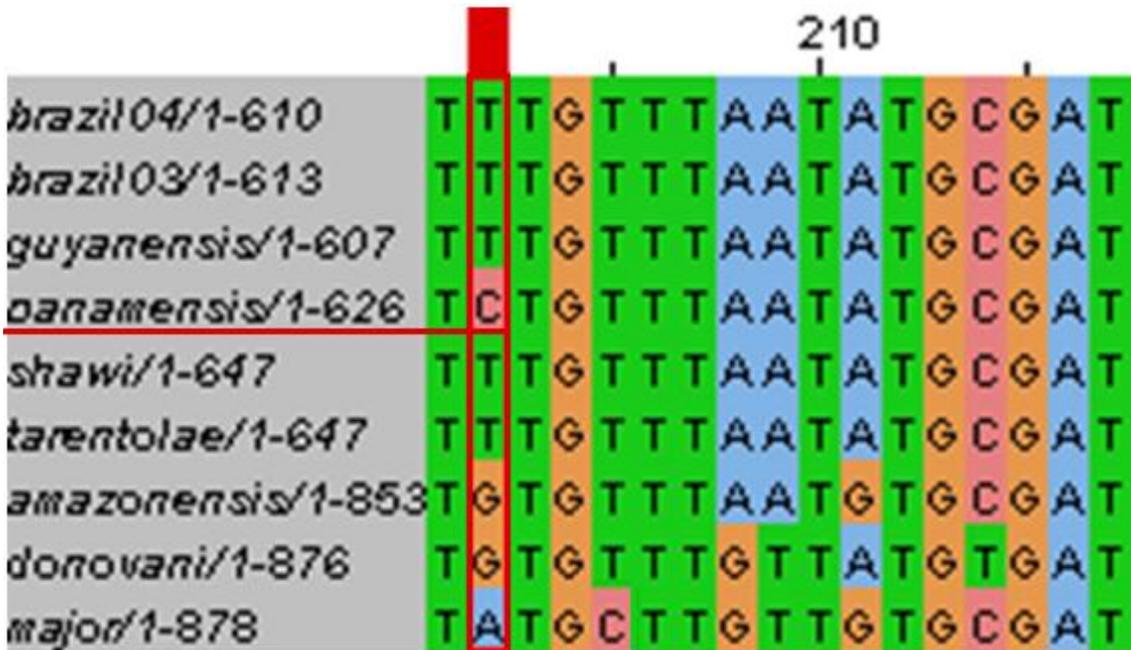


Figura 12 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) panamensis*. SNP destacado em vermelho.

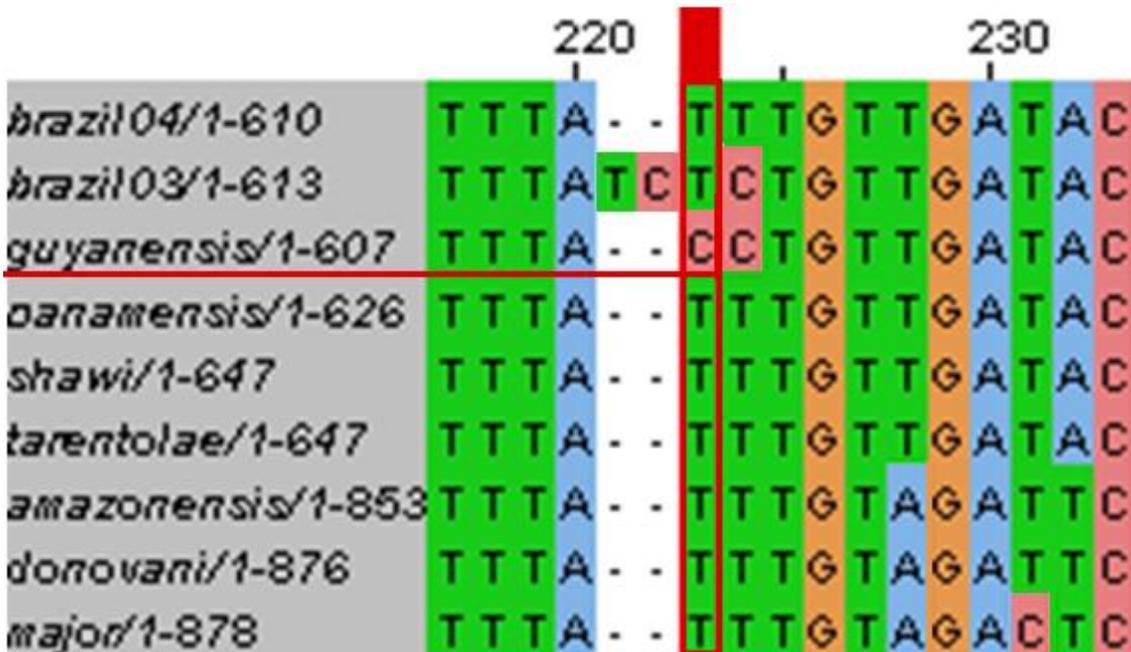


Figura 13 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) guyanensis*. SNP destacado em vermelho.



Figura 14 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2904. SNPs destacados em vermelho.

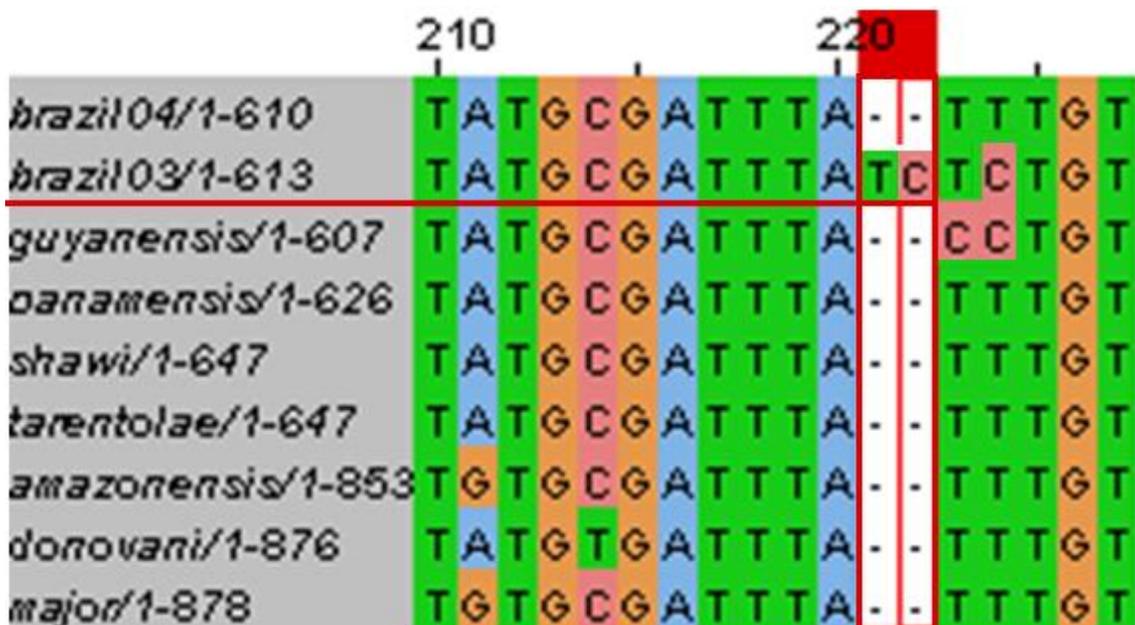


Figura 15 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2903. SNPs destacados em vermelho.

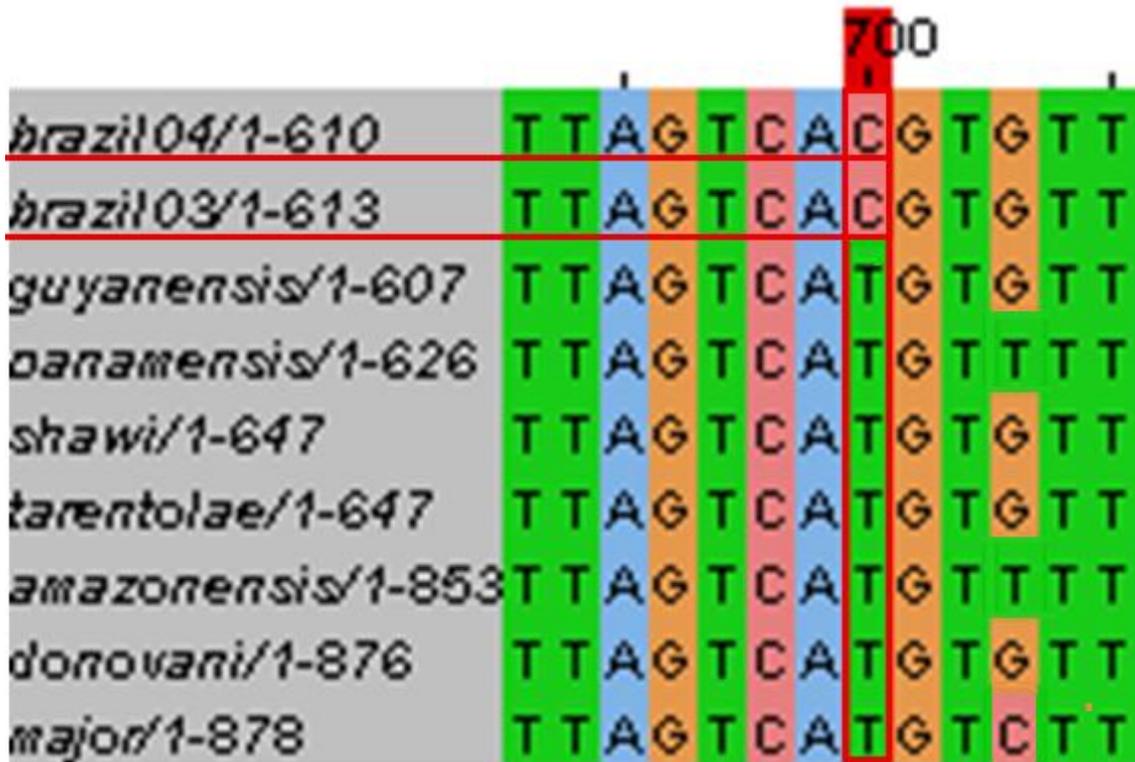


Figura 16 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* cepas M2903 e M2904. SNPs destacados em vermelho.

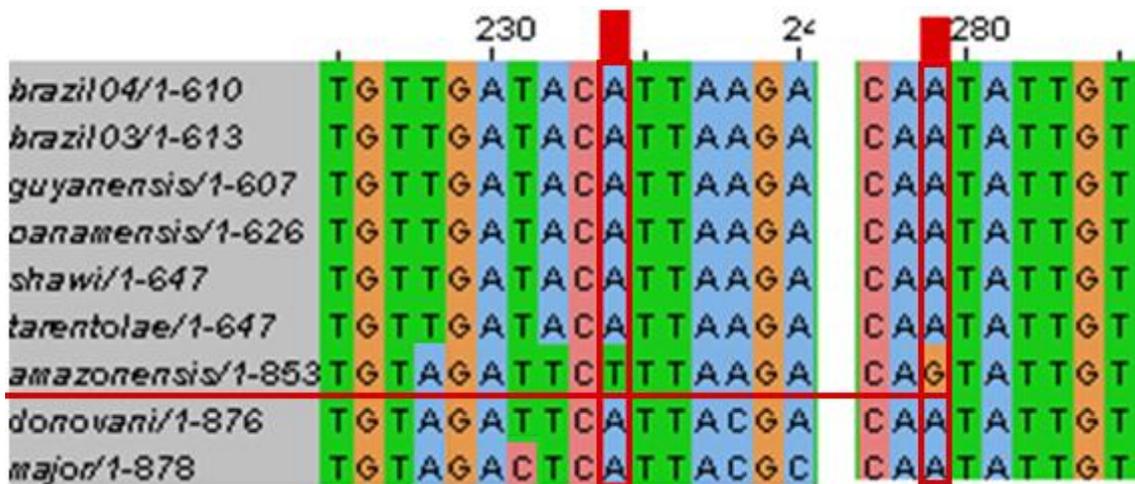


Figura 17 – SNP no gene COIII potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (L.) amazonensis*. SNPs destacados em vermelho.

- SNPs encontrados após análise do gene Cyt b

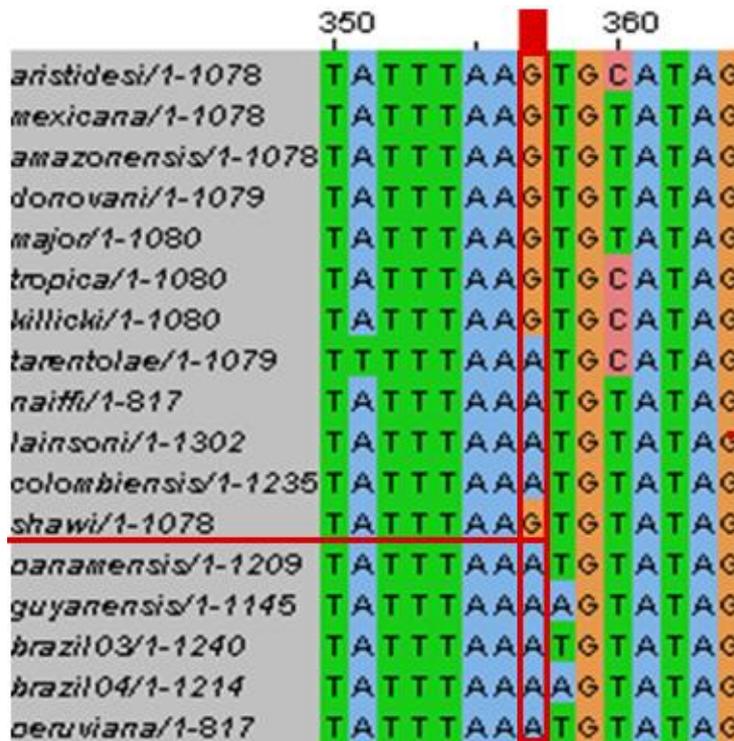


Figura 18 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) shawi*. SNP destacado em vermelho.

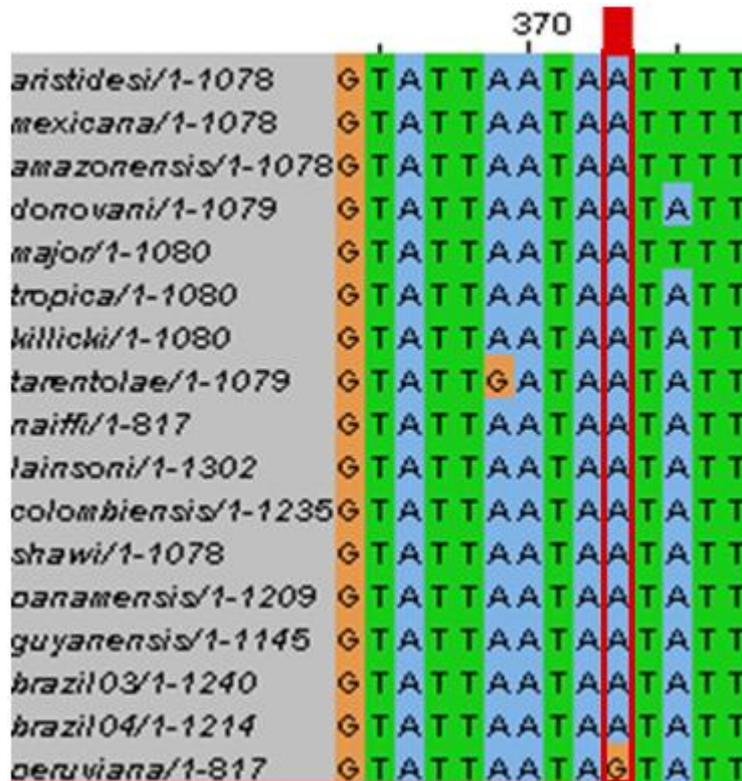


Figura 19 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) peruviana*. SNP destacado em vermelho.

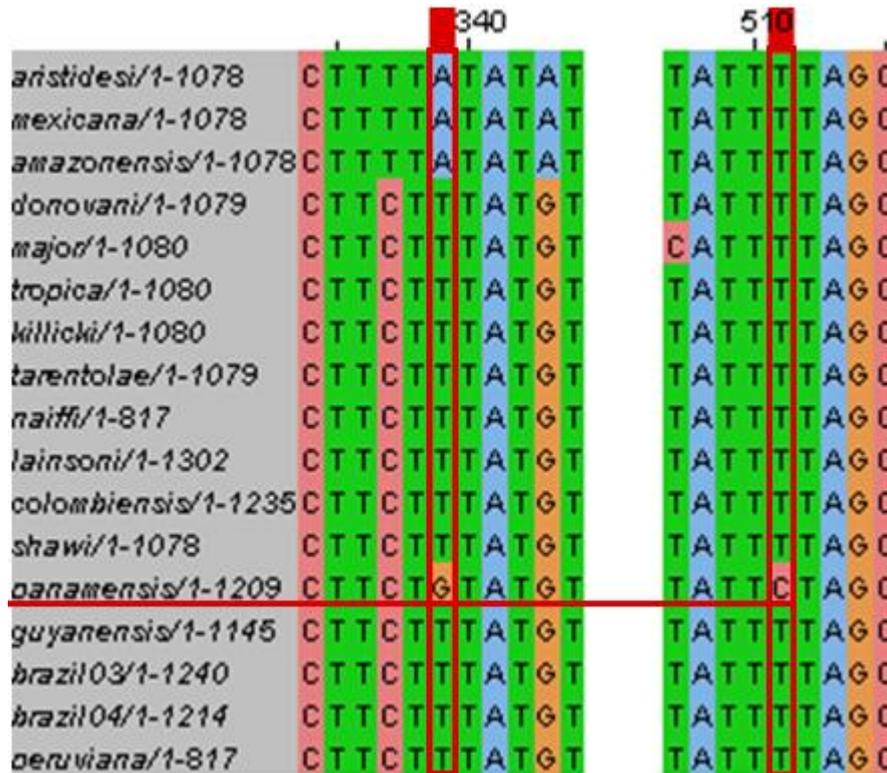


Figura 20 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania* (*V.*) *panamensis*. SNPs destacados em vermelho.

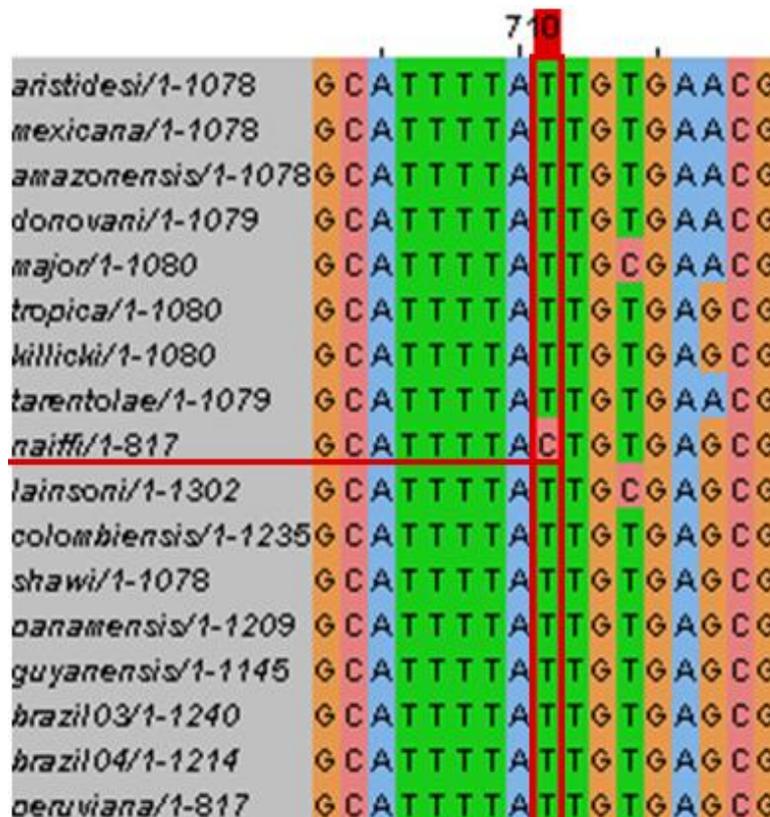


Figura 21 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *L. (V.) naiffi*. SNP destacado em vermelho.

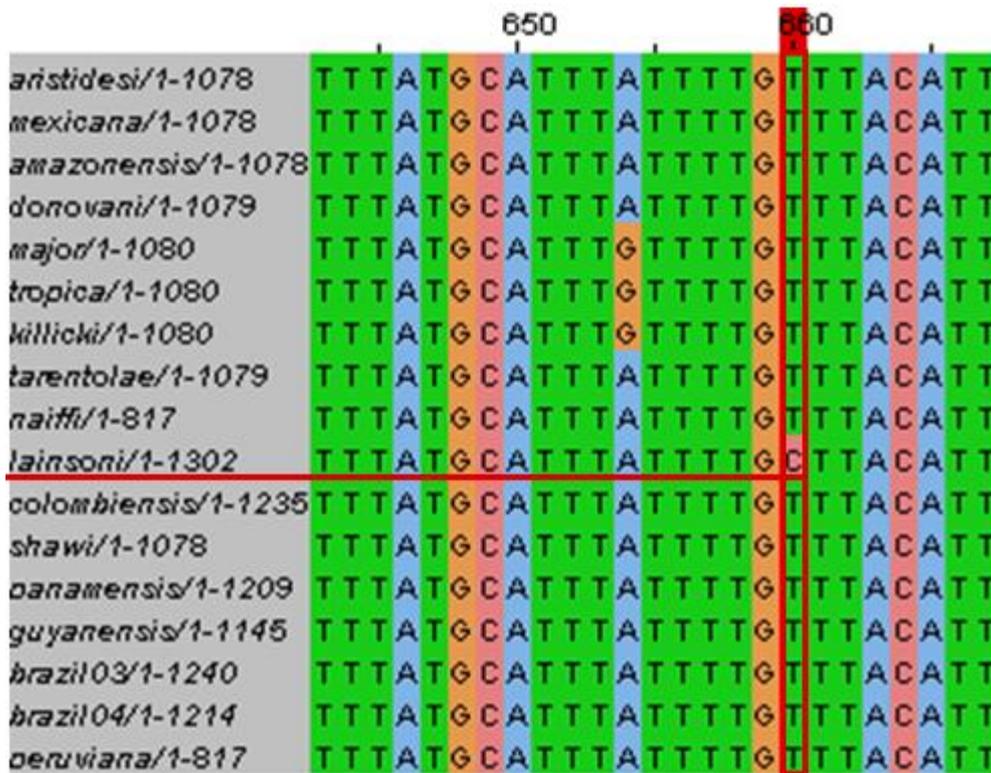


Figura 22 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) lainsoni*. SNP destacado em vermelho.

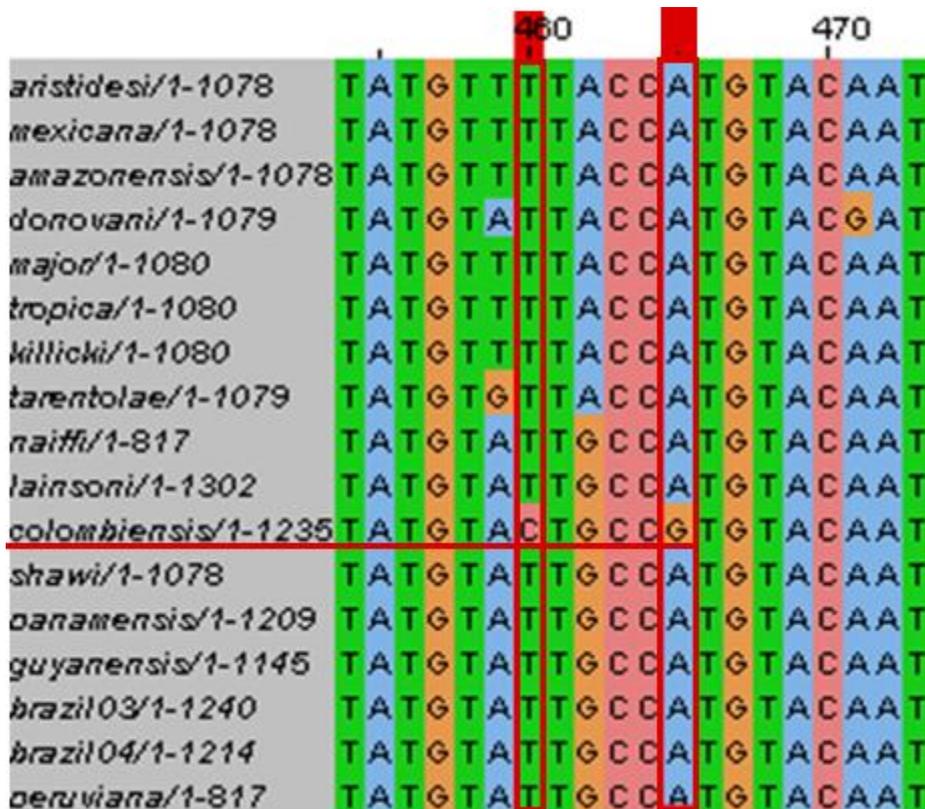


Figura 23 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) colombiensis*. SNPs destacados em vermelho.

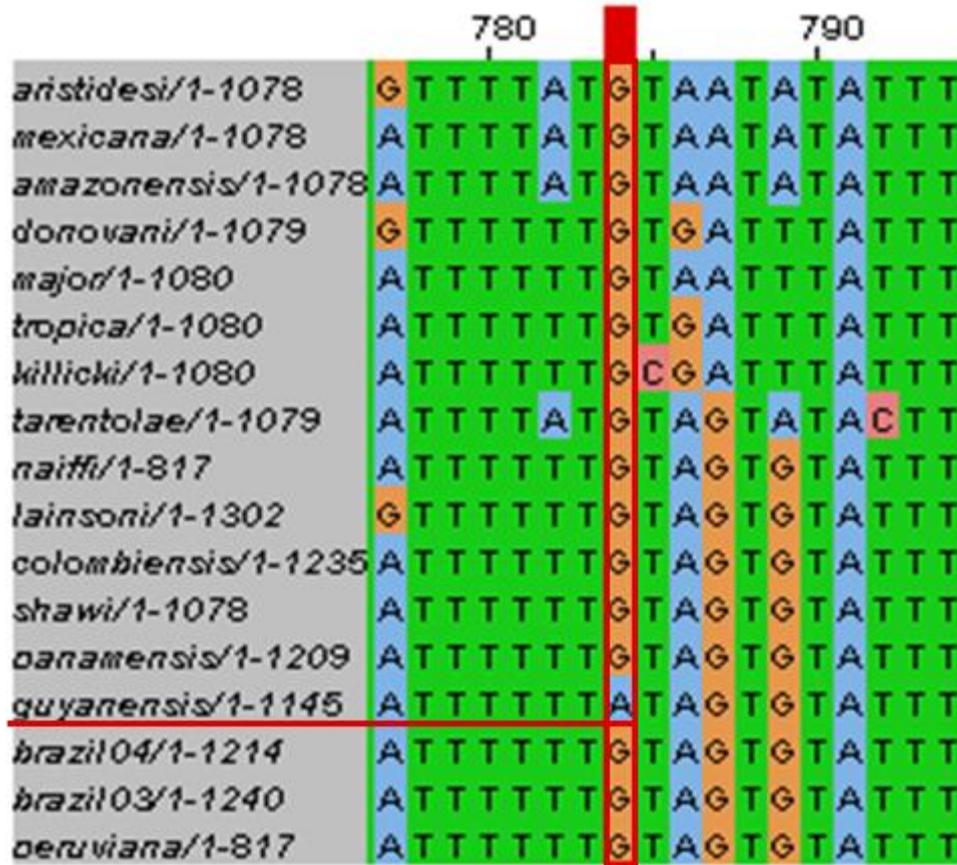


Figura 24 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) guyanensis*. SNP destacado em vermelho.

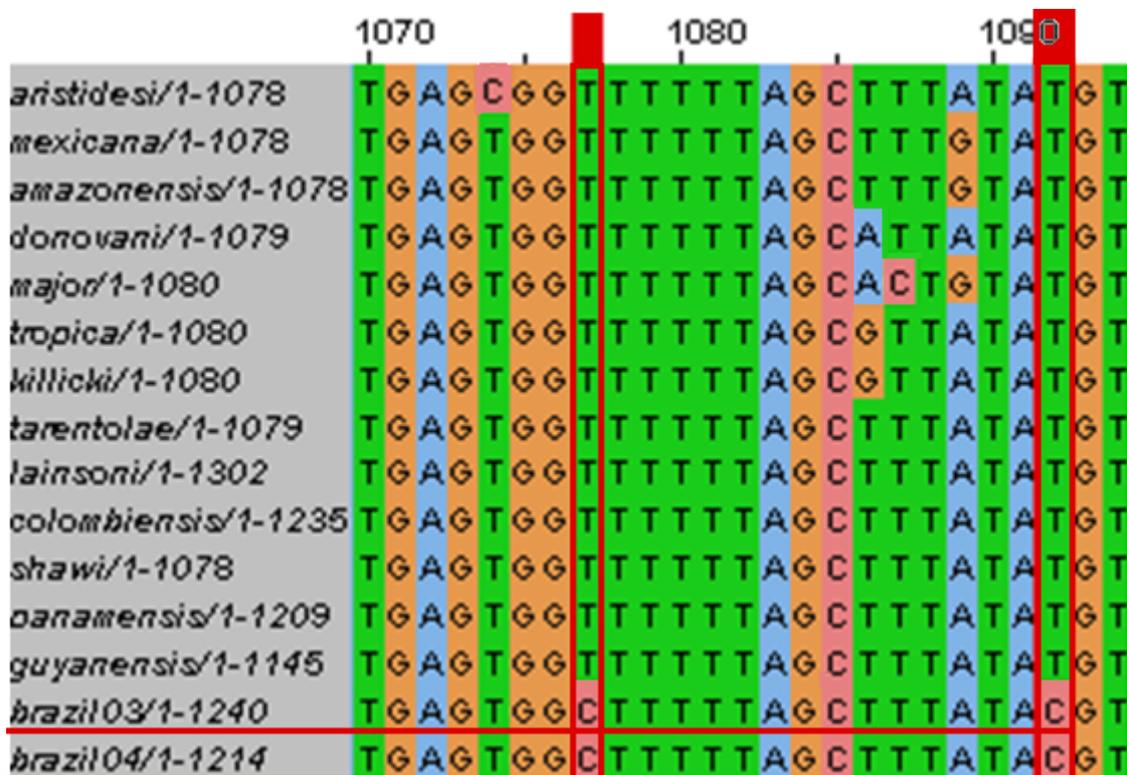


Figura 25 – SNP no gene Cyt b potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (V.) braziliensis* cepas M2903 e M2904. SNPs destacados em vermelho.

	150	160
<i>aristidesi</i> /1-1078	T T T A T G G C G T A G G T T T T A G T	
<i>mexicana</i> /1-1078	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>amazonensis</i> /1-1078	T T T A T G G C G T A G G T T T T A G T	
<i>donovani</i> /1-1079	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>major</i> /1-1080	T T T A T G G T G T G G G T T T T A G T	
<i>tropica</i> /1-1080	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>killicki</i> /1-1080	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>tarentolae</i> /1-1079	T A T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>lainsoni</i> /1-1302	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>colombiensis</i> /1-1235	T T T A T G G T G T A G G C T T T T A G T	
<i>shawii</i> /1-1078	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>panamensis</i> /1-1209	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>guyanensis</i> /1-1145	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>brazil04</i> /1-1214	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	
<i>brazil03</i> /1-1240	T T T A T G G T G T A G G T T T T A G T	

Figura 26 – SNP no gene *Cyb* potencialmente característico para identificação da espécie *Leishmania (L.) amazonensis*. SNP destacado em vermelho.

5.2. RESULTADOS – ESTRATÉGIA II

5.2.1. Amplificação da região codificadora do maxicirculo

A extração do DNA da cepa M2903 com o Blood & Cell Culture DNA Mini Kit permitiu a obtenção de 205ng/ μ L de amostra de DNA genômico total puro e íntegro da *L. braziliensis* cepa M2903, permitindo assim prosseguir com a estratégia de amplificação total da região codificadora.

Por meio da metodologia de Long PCR foi possível amplificar um fragmento de aproximadamente 12kb (Fig. 27) correspondente à região entre os genes 12srRNA e ND5. O material foi amplificado e purificado até a obtenção de 6 μ g com concentração maior que 30ng/ μ L, quantidade necessária para o sequenciamento. Como controle positivo foi utilizado DNA da cepa CL Brener de *T. cruzi*.

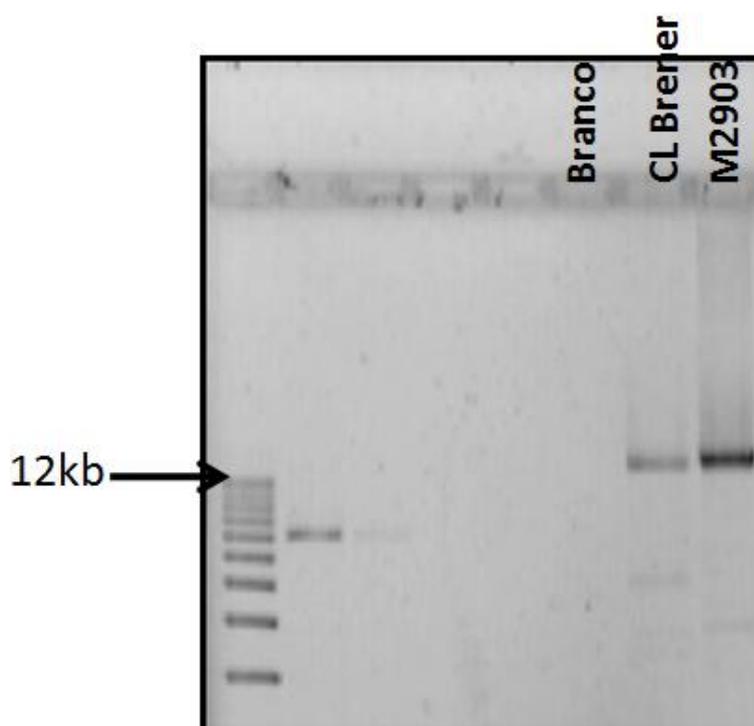


Figura 27 – Gel de agarose 1% corado por brometo de etídeo com produtos de amplificação da Long PCR. Marcador de peso molecular indicando banda de 12kb, Branco (controle -), CL Brener (controle +), M2903 (amostra de interesse).

5.2.2. Obtenção das reads

O dado bruto gerado por meio de insertos com 500pb resultou em dois arquivos .fastq contendo um total de 9.593.472 *reads* paired-end, cada uma com 90pb, totalizando uma cobertura de aproximadamente 72.000x (Cálculo da cobertura: número de *reads* x tamanho de cada *read* / tamanho esperado da sequência). A qualidade das *reads* gerada pelo equipamento Illumina foram de alta qualidade, com média de score phred > 30 (Fig. 28). A vantagem de se analisar as *reads* pelo FastQC é que ele permite uma fácil visualização da qualidade por meio das cores no gráfico. Em nossa análise, todas as *reads* se apresentaram dentro do padrão de alta qualidade (região verde), exceto uma *read* de baixa qualidade, que foi removida da análise posterior.

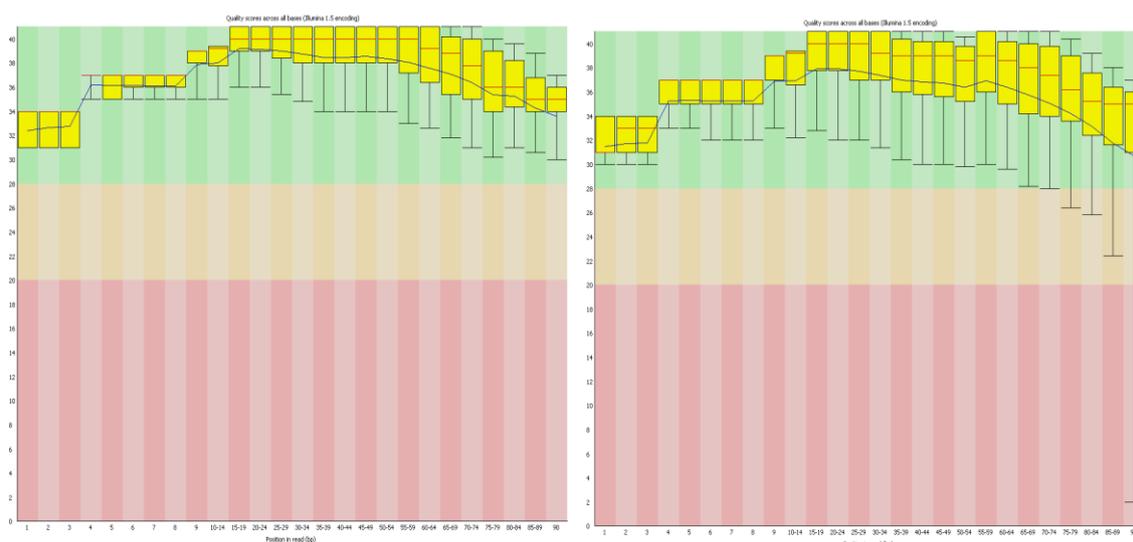


Figura 28 – Qualidade das *reads* forward (lado direito) e reverse (lado esquerdo) geradas por sequenciamento no aparelho Illumina. Apenas uma *read* se apresentou com phred < 30 e esta foi removida da análise.

5.2.3. Montagem do genoma parcial do maxicírculo sequenciado

Após a fusão dos dois arquivos em um único e remoção das *reads* redundantes, as *reads* restantes totalizaram 5.372.388 com uma cobertura de aproximadamente 40.000x. Para que a montagem de *contigs* fosse feita seguindo os requisitos do

programa Velvet, foi realizada a redução da cobertura (ideal para o programa: cobertura 50x-100x). Sendo assim, o número de *reads* foi reduzido com a ferramenta CG-Tools para 14.504 resultando em uma cobertura de 108x. Em seguida, as *reads* de baixa qualidade (phred < 30) foram removidas, o que não alterou a cobertura pois apenas uma foi removida (Fig. 28).

Tendo as *reads* selecionadas, foi dado prosseguimento a montagem dos *contigs*. Foram montados 152 *contigs* com o programa Velvet. Todavia, apenas os *contigs* maiores de 500pb foram selecionados para prosseguir com a montagem, totalizando 12.894pb, conteúdo GC 23% e 8 *contigs*. Estes foram então ordenados de acordo com o genoma de referência da *Sauroleishmania tarentolae* e *Leishmania donovani*. As *reads* originais foram utilizadas para estender os *contigs* para fechar os gaps, de modo a gerar um *contig* único de 12.894pb.

O *contig* assim obtido foi, então, analisado de acordo com sua similaridade com o genoma da *S. tarentolae* (Fig. 29) e *L. donovani* (dado não mostrado) com a finalidade de se verificar a natureza do produto obtido e se sua corresponde à aquela esperada para um maxicírculo da espécie *Leishmania*, que neste caso é a região codificadora do maxicírculo da *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2903.

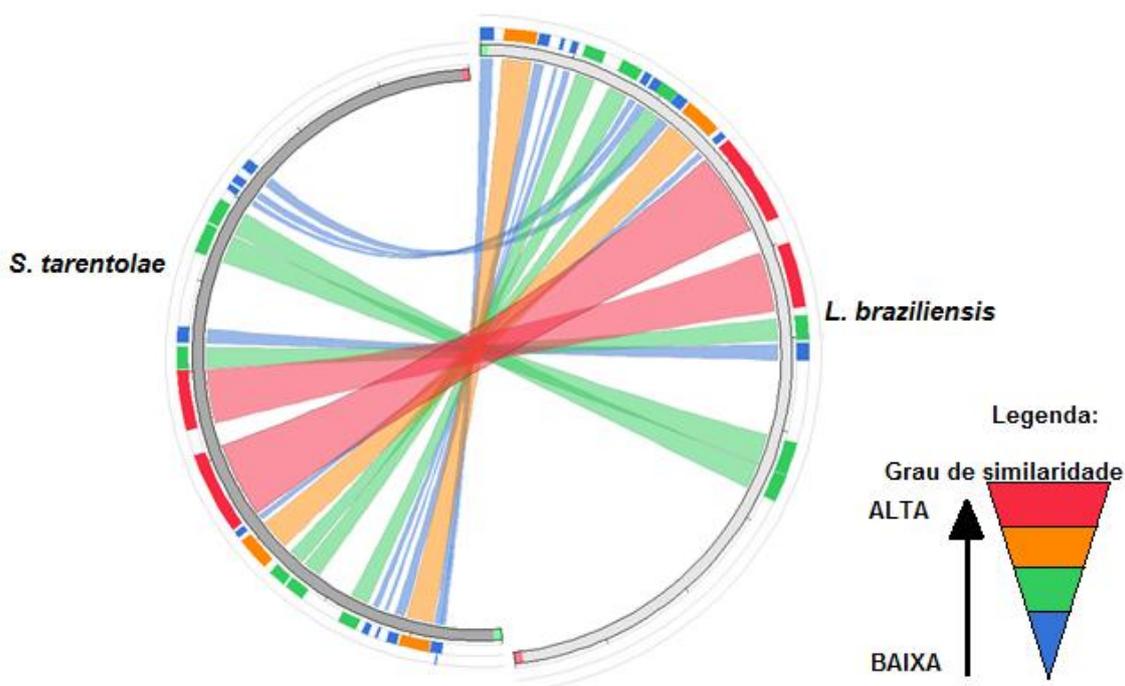


Figura 29 – Imagem gerada pelo programa Circos, onde podem ser visualizados os graus de similaridade entre a sequência depositada em banco de dados para a espécie *S. tarentolae* (cinza escuro) e a sequência obtida neste trabalho para a espécie *L. braziliensis* (cinza claro).

5.2.4. Anotação do genoma parcial do maxicículo de *Leishmania braziliensis* cepa M2903

A partir do *contig* gerado 12.894pb para o maxicículo de *L. braziliensis*, foi realizada a transferência de anotação automática do genoma usando o programa RATT. Para isto foram utilizadas, como referência, sequências de três espécies disponíveis no GenBank do NCBI: *S. tarentolae*, *L. donovani* e *L. amazonensis*; a primeira e a segunda por abrangerem todo o maxicículo e a terceira por apresentar maior similaridade com a espécie de interesse. Assim, foi possível anotar 16 regiões codificadoras, correspondentes aos genes: 9srRNA (subunidade menor 9s do RNA ribossomal), ND8 (NADH desidrogenase subunidade 8), ND9 (NADH desidrogenase subunidade 9), MURF5 (*maxicircle unassigned reading frame 5*), ND7 (NADH desidrogenase subunidade 7), COIII (citocromo oxidase subunidade III), Cyt b (citocromo b), ATP6 (ATPase subunidade 6), ND2 (NADH desidrogenase subunidade 2), G3 (região 3 rica em G), ND1 (NADH desidrogenase subunidade 1), COII (citocromo oxidase subunidade II), MURF2 (*maxicircle unassigned reading frame 2*), COI (citocromo oxidase subunidade I), G4 (região 4 rica em G) e ND4 (NADH desidrogenase subunidade 4) representados em verde na Fig 30.

Dos quatro genes sem anotação automática, foi possível realizar a anotação manual de dois, ND3 (NADH desidrogenase subunidade 3) e RPS12 (proteína ribossomal S12) por meio de Blast com sequências de outras espécies, representados em azul na Fig.30. E o gene ND5 foi possível anotar apenas seu começo, pois o primer reverse utilizado na estratégia de amplificação do maxicículo para sequenciamento alinhava no meio do gene.

Dos 19 genes presentes na região codificadora do maxicículo, apenas o 12srRNA (subunidade maior 12s do RNA ribossomal) não foi anotado, pois o primer forward utilizado na estratégia de amplificação do maxicículo não permitiu a amplificação deste gene (representado em vermelho na Fig.30) pois o primer se anelava na região terminal do gene.

Nosso arquivo de anotação final gerou uma sequência de 10.745 pb (incluindo apenas regiões de alta resolução do sequenciamento), englobando um total de um gene parcial e 17 genes completos anotados (Fig. 31).

5.2.5. Tamanho predito dos genes anotados por transferência de anotação

Após a transferência de anotação das sequências de referência foi gerado um arquivo .embl contendo as posições preditas de início e fim de cada gene. Para este trabalho, baseamos em sequências referência para estimar o tamanho dos genes, visto que estes sofrem edição (adição e remoção de uridinas), tornando difícil determinar com exatidão o tamanho dos genes (Quadro 4).

Quadro 4 – Representação dos tamanhos preditos dos genes anotados do genoma parcial do maxicirculo de *Leishmania braziliensis* cepa M2903.

GENE	TAMANHO (pb)
9srRNA	611
ND8	257
ND9	323
MURF5	302
ND7	1143
COIII	850
Cyt b	1078
ATP6	634
ND2	1356
G3	187
ND1	921
COII	628
MURF2	1151
COI	1691
G4	151
ND4	1284

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

As espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia* possuem alto grau de similaridade gênica, o que dificulta o desenvolvimento de uma metodologia molecular capaz de identificar as espécies. Atualmente, o que se tem de mais confiável é a análise por eletroforese de isoenzimas, que além de muito trabalhosa, necessita de grandes quantidades de células do parasito em cultura (1×10^9 parasitos), não sendo adequada para um rápido diagnóstico com aplicação clínica (Marco *et al.*, 2006).

O que se tem de mais recente na literatura, é o trabalho de Van der *et al.*, 2014; que realizaram a comparação dos polimorfismos encontrados nos quatro principais marcadores aplicáveis diretamente em amostras clínicas: o mini-éxon ou *spliced leader*, o espaçador interno transcrito do RNA ribossomal, o gene 7SL-RNA e gene da proteína *heat-shock 70*. A capacidade de identificação foi avaliada em 74 cepas do gênero *Leishmania*, selecionadas para representar uma vasta distribuição geográfica e variabilidade genética das espécies de maior importância médica. Para a correta identificação da espécie envolvida, nenhum dos quatro métodos demonstrou eficiência isoladamente, sendo necessário no mínimo dois métodos em conjunto para identificação da espécie; o gene da proteína *heat-shock 70* e o mini-éxon.

Nesse aspecto, o uso do DNA mitocondrial como alvo para o desenvolvimento de uma nova metodologia de diagnóstico diferencial se apresenta com potencial para identificação das espécies, pois o kDNA apresenta pequeno tamanho, estrutura simples, herança uniparental, ausência de recombinação e é encontrado em alto número de cópias nas células (Avisé, 2004). O kDNA é formado por uma rede compacta de dezenas de maxicírculos concatenados (Stuart, 1983) e milhares de minicírculos heterogêneos (Barker & Arnot, 1981; Simpson, 1987). O uso dos minicírculos já se mostrou inviável para identificação entre espécies por ser muito conservado (Le Fichoux *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 1992; Salotra *et al.*, 2001; Cortes *et al.*, 2004). Maxicírculos tem se mostrado promissores, no entanto, o seu sequenciamento completo na prática clínica seria inviável devido aos custos. Sendo assim, o ideal é a escolha de um gene alvo para aplicações diagnósticas baseadas em estratégias de PCR.

Para auxiliar na escolha dos melhores genes alvo para diagnóstico diferencial das espécies, no presente trabalho foram analisados quatro genes (ATP6, COII, COIII e Cyt b), que se apresentaram viáveis para o desenho de iniciadores, amplificação e sequenciamento. Existe um problema já relatado quanto a divergência entre um sequenciamento realizado em um laboratório diferente daquele que depositou a sequência no NCBI (Foulet *et al.*, 2007). Algumas cepas poderiam ter se tornado misturas após repetitivas subculturas ou identificação incorreta dos tubos após várias manipulações. Para evitar tal problema com as amostras utilizadas neste trabalho, estas foram previamente tipadas pela metodologia de eletroforese isoenzimática.

Para a construção das árvores filogenéticas, além das sequências geradas neste trabalho, 24 sequências de espécies do subgênero *Leishmania* disponíveis no GenBank do NCBI foram também utilizadas. Esta abordagem permitiu a confirmação de que sequências obtidas no presente trabalho, correspondiam a sequências de espécies do subgênero *Viannia*.

Todas as árvores foram construídas por Máxima Verossimilhança com modelo de substituição HKY, modelo que considera que a frequência de cada nucleotídeo é diferente ao longo da sequência, principalmente devido ao alto conteúdo de AT (75%) que já se sabe ser característico do kDNA. Para todas elas foi possível observar a separação entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (valores de bootstrap >96%), assim como um claro agrupamento da maioria das espécies do subgênero *Viannia*, mostrando assim o alto grau de similaridade entre as sequências das espécies com pequenas diferenças entre si, possíveis de serem percebidas visualmente no fenograma, possibilitando a distinção entre as espécies deste subgênero.

Um fato curioso e que merece um pouco de atenção é a posição da *S. tarentolae*, que para os genes ATP6 (Fig. 4) e COII (Fig. 5), se agrupou com as espécies do subgênero *Leishmania*, enquanto que, para os genes COIII (Fig. 6) e Cyt b (Fig. 7), se agrupou com as espécies do subgênero *Viannia*. Lainson & Shaw, 1987, propuseram a classificação da *S. tarentolae* no gênero *Sauroleishmania* baseado no fato de que ela infecta lagartos e não infecta mamíferos. Porém, as árvores filogenéticas de um outro estudo mostram *Sauroleishmania* e *Leishmania* de mamíferos formando um grupo monofilético bem suportado (Croan *et al.*, 1997; Brewster & Barker, 1999). Os resultados no presente trabalho para os genes ATP6 e COII são consistentes com

estudos prévios, usando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, que agruparam *Sauroleishmania* junto com o subgênero *Leishmania*. Todavia, *S. tarentolae* agrupa junto com outras espécies pertencentes ao subgênero *Viannia* quando regiões conservadas do minicírculo são utilizadas para análises filogenéticas (Yurchenko *et al.*, 2000) concordando com o que foi observado em nosso trabalho para os genes COIII e Cyt b. Assim, a posição ambígua da *S. tarentolae* no presente estudo reflete a discrepância existente na literatura quanto a este tema.

A espécie *L. (V.) colombiensis* não amplificou para os genes ATP6, COII e COIII. Uma justificativa para tal observação seria que esta espécie diverge das demais para os genes citados. Outra explicação seria o local de onde a espécie foi isolada, já que ela é a única que foi isolada de inseto, enquanto as demais foram isoladas de mamíferos. As espécies *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) lainsoni* não amplificaram para o gene COIII, provavelmente por este ser o gene mais divergente entre os estudados, fato que já foi relatado no trabalho de Vidal *et al.*, 1984.

Quanto a busca dos polimorfismos nucleotídicos específicos para cada espécie, todos os genes utilizados neste trabalho (ATP6, COII, COIII e Cyt b) apresentaram um grande número de posições nucleotídicas com potencial para distinção entre espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania* daquelas pertencentes ao subgênero *Viannia*, fato que também foi observado em outro estudo por Martínez *et al.*, 2010. A fácil distinção entre os subgêneros é importante na identificação de espécies do Novo Mundo, visto que nele estão presentes espécies dos dois subgêneros.

O grande problema reside na identificação das espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*. Enquanto para distinção entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* são encontrados vários polimorfismos; entre as espécies do subgênero *Viannia* são poucos os polimorfismos encontrados. Isto pode ser explicado pela separação evolucionária relativamente recente entre as espécies do subgênero *Viannia*, que dificulta a identificação destas utilizando algumas técnicas laboratoriais (Tuon *et al.*, 2008).

Além da distinção entre os subgêneros, foi possível observar também, embora em menor quantidade, polimorfismos potencialmente característicos para identificação das espécies do subgênero *Viannia* quando analisados os genes COII (Fig. 8-11), COIII (Fig. 12-17) e Cyt b (Fig. 18-26).

O gene COII apresentou sítios polimórficos potencialmente capazes de identificar as espécies *L. braziliensis* cepa M2904, *L. guyanensis*, *L. naiffi* e *L. lainsoni*. O gene COII já havia sido utilizado em estudos prévios, porém para permitir a identificação de espécies do subgênero *Leishmania* do Velho Mundo (*L. donovani* e *L. infantum*) (Ibrahim & Barker, 2001) e espécies do subgênero *Leishmania* encontradas na China (Cao *et al.*, 2011).

O gene COIII apresentou outros sítios polimórficos com potencial para identificação das espécies *L. braziliensis* cepa M2903, *L. braziliensis* cepa M2904, *L. guyanensis* e *L. panamensis*; além da espécie *L. amazonensis* representante do subgênero *Leishmania* e também causadora de LT. Até o último levantamento na literatura, este parece ser o primeiro trabalho que utiliza o COIII como gene alvo para identificação de espécies de *Leishmania*.

Finalmente, o gene Cyt b apresentou sítios polimórficos para todas as espécies do subgênero *Viannia* utilizadas neste estudo, e para a *L. amazonensis*, englobando as principais espécies causadoras de LT no Brasil. Dentre os genes estudados neste trabalho, o Cyt b foi o que se mostrou com maior potencial para identificação das espécies. Ele é também o gene mais estudado na literatura para possível aplicação em diagnóstico de leishmaniose em amostras biológicas.

O Cyt b faz parte do genoma mitocondrial de uma larga variedade de espécies existentes e codifica uma subunidade central catalítica de uma enzima presente na cadeia respiratória da mitocôndria. Cyt b é um dos citocromos envolvidos no processo de transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial e é considerado um dos genes mais úteis para trabalhos de filogenia (Asato *et al.*, 2009). Este gene tem sido amplamente utilizado para estudos filogenéticos e identificação de animais e plantas (Irwin *et al.*, 1991; Degli *et al.*, 1993). Ele possui uma pequena região que é editada logo no seu início (~22-24pb) seguido de ~1056pb não editados (Benne, 1994), o que é interessante para utilizar este gene como alvo para estudos de identificação entre espécies.

Bañuls *et al.*, 1999, usando eletroforese de isoenzimas e polimorfismos de DNA amplificados randomicamente (RAPD) questionaram a possibilidade de distinção entre as espécies *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis*. O sequenciamento de Cyt b foi recentemente aplicado com sucesso na identificação de espécies na Argentina (Marco *et*

al., 2006) e no Paquistão (Marco *et al.*, 2006). Nestes estudos, o sequenciamento do gene Cyt b forneceu resultados confirmatórios para 53 diagnósticos clínicos. Estes e outros trabalhos (Yang *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2010; Asato *et al.*, 2009; Kato *et al.*, 2005; Luyo-Acero *et al.*, 2004) realizaram a identificação e análise filogenética de espécies do Velho Mundo e algumas do Novo Mundo, sendo a *L. amazonensis* do subgênero *Leishmania* e a *L. braziliensis* (cepas M2903 e M2904), *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi* e *L. equatoriensis* do subgênero *Viannia*. Estes dados concordam com nossos achados, que enriquecem o número de espécies que são possíveis de serem identificadas por meio do sequenciamento deste gene. Apesar do baixo número de polimorfismos entre as espécies do subgênero *Viannia* para o gene Cyt b, estes são suficientes para abranger as principais espécies de interesse clínico para LT no Brasil. As posições dos nucleotídeos polimórficos descritos corroboram com o potencial deste gene como um marcador molecular para a caracterização de espécies de *Leishmania*.

Para espécies do Novo Mundo, Luyo-Acero *et al.*, 2004 realizaram um trabalho utilizando reação de PCR real-time tendo como alvo a região do gene 18S (nuclear), seguida de um passo de identificação de espécies usando o sequenciamento da região do Cyt b, que se sabe apresentar alguns polimorfismos entre as espécies de *Leishmania*.

É possível que outros genes mitocondriais também possam ser interessantes para identificar espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*. Para viabilizar o enriquecimento dos bancos de dados com genes alvo para identificação de espécies, na segunda parte do presente trabalho foi abordada uma estratégia de sequenciamento da região codificadora do maxicírculo da cepa de referência da espécie *L. braziliensis* (cepa M2903), principal causadora de LT no Brasil.

Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências provenientes de espécies de *Leishmania* do subgênero *Leishmania* (*L. amazonensis* e *L. donovani*) e a *Sauroleishmania tarentolae*; cepas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brenner e 231) e da espécie *Trypanosoma brucei*. O fato destes iniciadores terem amplificado a região de interesse de *L. braziliensis* já indica uma sentença entre os genes das espécies e similaridade de sequências, o que já havia sido descrito para espécies de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Sauroleishmania tarentolae* (Westenberger *et al.*, 2006).

Para ampliar o número de marcadores mitocondriais disponíveis para análises filogenéticas, neste trabalho foi realizado também o sequenciamento completo do DNA

mitocondrial da espécie *L. braziliensis* cepa M2903. Estudos filogenéticos recentes, em diferentes táxons, sugeriram que o sequenciamento mitocondrial completo promoveria um mapa de uma alta resolução para a reconstrução de uma filogenia robusta e para a datação molecular dos eventos divergentes dentro dos táxons (Inoue *et al.*, 2010).

A anotação dos genes foi realizada utilizando como referência a espécie *Sauroleishmania tarentolae*, que apesar de ser mais divergente com as espécies de *Leishmania*, é a que possui seu genoma completo sequenciado. Foi utilizada também a espécie *L. amazonensis*, que é mais similar à *L. braziliensis*, porém não possui a região codificadora do maxicírculo completamente sequenciada, englobando a região situada entre o gene 12srRNA até metade do COII (Dmitri, 2010). Sendo assim, a região situada entre os genes 9srRNA e COII foi anotada tendo como referência a sequência de *L. amazonensis*, enquanto que a região situada entre os genes MURF2 e ND4 foi anotada tendo como referência a sequência de *Sauroleishmania tarentolae*.

A necessidade de transferência de anotação de uma sequência referência se deve ao já descrito processo de edição do RNA mensageiro mitocondrial que ocorre nos protozoários cinetoplastídeos (Benne, 1994), o que torna difícil a predição automática de genes editados. No processo de edição por RNA, vários resíduos de uridina (U) são inseridos ou deletados para reparar janelas de leitura presentes na sequência genômica de forma a criar códons de iniciação da tradução AUG e outros. Na *S. tarentolae*, por exemplo, o transcrito do gene Cyt b recebe a inserção de 39 resíduos de U em 15 sítios dentro da região editada. Consequentemente, um total de 20 códons são criados, incluindo o códon AUG (Met) para iniciar a tradução por inserção de um resíduo U entre as posições 2 e 3 da região editada, e o códon ATT (Leu) se torna o primeiro aminoácido na região não editada (Feagin *et al.*, 1988). Sendo assim, recorreremos a transferência de anotação a partir de espécies já bem estudadas (*S. tarentolae* e *L. donovani*) para ter uma estimativa da posição e tamanho dos genes, já que não foi possível fazer a anotação baseada em códons de início e terminação da tradução.

Dentre os genes anotados, os genes COI, COII e Cyt b foram aqueles que se mostaram mais conservados entre as espécies enquanto o gene COIII se apresentou como sendo o menos conservado. O baixo nível de conservação da sequência de aminoácidos no gene COIII, se comparado com os níveis de conservação deste gene em mamíferos e fungos, se destaca tendo em vista o alto nível relativo de conservação de

outros genes estruturais do maxicírculo. É possível que as restrições funcionais na subunidade COIII do kDNA de *Leishmania* estejam reduzidas, levando a uma maior taxa mutacional deste gene quando comparado a outros genes do citocromo. A falta aparente de um gene COIII reconhecível no DNA do maxicírculo de algumas espécies de cinetoplastídeos pode estar relacionada com este problema (Vidal *et al.*, 1984).

O fato de os genes COI, COII e Cyt b terem se mostrado os mais conservados, induz a idéia de que estes provavelmente sejam os melhores genes alvo para aplicação direta em amostras biológicas para diagnóstico da leishmaniose e identificação da espécie envolvida. O presente trabalho teve como foco as espécies causadoras da forma tegumentar e aqui é mostrado o grande potencial do gene Cyt b para aplicação na prática clínica quando associados os resultados aqui obtidos com os já existentes na literatura. Tendo agora disponível a sequência da região codificadora da espécie *L. braziliensis* cepa M2903, torna-se viável um estudo mais aprofundado de outros genes, principalmente COI e COII por terem se mostrado mais conservados.

As metodologias baseadas em PCR convencional desenvolvidas para diagnóstico da leishmaniose já se mostraram mais sensíveis do que o isolamento em meio de cultura *in vitro* (Costa *et al.*, 1996; Lachaud *et al.*, 2000). Entretanto, manipulação de DNA amplificado para diagnóstico e identificação aumentam o risco de contaminação e, assim, o risco de resultados falso-positivos (Foulet *et al.*, 2007). Portanto, para se ter uma metodologia baseada em PCR confiável, é aconselhável a associação da técnica de PCR real-time com PCR alelo específica, visto que tal abordagem reduziria a chance de falso positivo, como foi mostrado em dois trabalhos envolvendo PCR em tempo real de genes do kDNA, porém utilizando espécies de *Leishmania* do Velho Mundo (Mary *et al.*, 2004; Nicolas *et al.*, 2002). Sendo assim, a idéia é associar em futuros trabalhos a metodologia de PCR real-time com a PCR alelo específica para os genes alvo.

O presente trabalho enriquece o banco de dados de sequências de *Leishmania*, principalmenete as do subgênero *Viannia*, até então menos estudado. Se associado com outros trabalhos, maior será a confiabilidade do gene alvo para aplicação no diagnóstico e auxílio na prática clínica, já que cada espécie possui o tratamento adequado para melhor eficácia terapêutica.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- ✓ O genoma mitocondrial se mostrou uma ferramenta potencial para diagnóstico e identificação de espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*.
- ✓ Todos os genes mitocondriais analisados permitiram a fácil distinção entre espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, pois eles apresentam vários sítios polimórficos ao longo das sequências.
- ✓ O gene Citocromo Oxidase subunidade II se mostrou o melhor candidato com potencial para identificação de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil.
- ✓ Existe uma sintenia (conservação da ordem dos genes) do maxicírculo de *Sauroleishmania tarentolae*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (V.) braziliensis*.
- ✓ O sequenciamento da região codificadora do maxicírculo de *Leishmania (V.) braziliensis* (cepa M2903) forneceu mais genes candidatos para estudo quanto a potenciais alvos para identificação das espécies causadoras de leishmaniose tegumentar no Brasil.

8. PERSPECTIVAS

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Desenhar iniciadores alelo específicos para cada espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil e testar a eficiência para diagnóstico da doença com correta tipagem da espécie patogênica em amostras biológicas.
- ✓ Associar a metodologia de PCR alelo específica com a PCR real-time para garantir resultados com alta especificidade.
- ✓ Finalizar a anotação dos genes da região codificadora do maxicírculo da *Leishmania (V.) braziliensis* cepa M2903 aumentando a resolução interna de alguns genes.
- ✓ Disponibilizar todas as sequências geradas neste trabalho no banco de dados GenBank do NCBI, aumentando em 17% o número de sequências de genes do maxicírculo de *Leishmanias* disponíveis.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL SF, GISH W, MILLER W, MYERS EW, LIPMAN DJ. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol.** v.215, p.403–410, 1990.

ALVAR J, APARICIO P, ASEFFA A, DEN BOER M, CAÑAVATE C, DEDET JP, GRADONI L, TER HORST R, LÓPEZ-VÉLEZ R, MORENO J. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin Microbiol Rev.** v.21, p.334–359, 2008.

ALVAR J, VÉLEZ ID, HERRERO M, DESJEUX P. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of its incidence. **PLoS ONE.** v.7, p.1-12, 2012.

ANDREWS S. FastQC, **Babraham Bioinformatics.** Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.

AREVALO J, RAMIREZ L, ADAUI V, ZIMIC M, TULLIANO G, MIRANDA-VERÁSTEGUI C, LAZO M, LOAYZA-MURO R, DE DONCKER S, MAURER A, CHAPPUIS F, DUJARDIN JC, LLANOS-CUENTAS A. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **J Infect Dis.** v.195, p.1846–1851, 2007.

ASATO Y, OSHIRO M, MYINT CK, YAMAMOTO Y, KATO H, MARCO JD, MIMORI T, GOMEZ EA, HASHIGUCHI Y, UEZATO H. Phylogenetic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. **Exp Parasitol.** v.121 p.352–361, 2009.

ASSEFA S, KEANE TM, OTTO TD, NEWBOLD C, BERRIMAN M. ABACAS: algorithm-based automatic contiguation of assembled sequences. **Bioinformatics.** v.25, p.1968-1969, 2009.

AVISE JC. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. **Sinauer Associates.** 2nd edition, 2004.

BALESTIERI FM, QUEIROZ AR, SCAVONE C, COSTA VM, BARRAL-NETTO M, ABRAHAMSOHN A. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect.** v.4, p.23–29, 2002.

BAÑULS AL, JONQUIERES R, GUERRINI F, LE PONT F, BARRERA C, ESPINEL I, GUDERIAN R, ECHEVERRIA R, TIBAYRENC M. Genetic Analysis of *Leishmania* Parasites in Ecuador: are *Leishmania (Viannia) panamensis* and *Leishmania (V.) guyanensis* Distinct Taxa? **Am J Trop Med Hyg.** v.61, p.838-845, 1999.

BAÑULS AL, 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.109, 2007.

- BARKER DC, ARNOT DE. Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. I. Ultrastructural and buoyant density analysis. **Mol Biochem Parasitol.** v.3, p.33-46, 1981.
- BENNE R. RNA editing in *Trypanosomes*. **Europ J of Biochem.** v.221, p.9-23, 1994.
- BOITÉ MC, MAURICIO IL, MILES MA, CUPOLILLO E. New Insights on Taxonomy, Phylogeny and Population Genetics of *Leishmania (Viannia)* Parasites Based on Multilocus Sequence Analysis. **PLoS Negl Trop Dis.** v.6, p.1-14, 2012.
- BRETAGNE S, DURAND R, OLIVI M, GARIN JF, SULAHIAN A, RIVOLLET D, VIDAUD M, DENIAU M. Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.8, p.828-831, 2001.
- BREWSTER S, BARKER DC. The ATPase subunit 6 gene sequence predicts that RNA editing is conserved between lizard- and human-infecting *Leishmania*. **Gene.** v.235, p.77-84, 1999.
- CAO DP, GUO XG, CHEN DL. Species delimitation and phylogenetic relationships of Chinese *Leishmania* isolates reexamined using kinetoplast cytochrome oxidase II gene sequences. **Parasitology Research.** v.109, p.163, 2011.
- CHENG S, FOCKLER C, BARNES WM, HIGUCHI R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.91, p.5695-5699, 1994.
- CONVIT J, ULRICH M, FERNANDEZ CT, TAPIA FJ, CACERES-DITTMAR G, CASTÉS M, RONDÓN AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v.87, p.444-448, 1993.
- CORTES S, ROLÃO N, RAMADA J, CAMPINO L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Tr of R of Soc Trop Med and Hyg.** v.98, p.12-17, 2004.
- COSTA JM, MARSDEN PD, LLANOS-CUENTAS EA, NETTO EM, CARVALHO EM, BARRAL A, ROSA AC, CUBA CC, MAGALHAES AV, BARRETO AC. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: are port of eight cases. **J. Trop. Med.Hyg.** v.89, p.319-323, 1986.
- COSTA JM, DURAND R, DENIAU M, RIVOLLET D, IZRI M, HOUIN R, VIDAUD M, BRETAGNE S. PCR enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Clin. Microbiol.** v.34, p.1831-1833, 1996.
- COSTA MA, MATHESON C, IACHETTA L, LLAGOSTERA A, APPENZELLER O. Ancient Leishmaniasis in a highland desert of Northern Chile. **PLoS One.** v.4, 2009.
- CROAN DG, MORRISON DA, ELLIS JT. Evolution of the genus *Leishmania* revealed by comparison of DNA and RNA polymerase gene sequences. **Mol Biochem Parasitol.** v.89, p.149-159, 1997.

CUPOLILLO E, GRIMALDI GJR, MOMEN H, BEVERLEY SM. Intergenic region typing (IRT): A rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. **Molec and Bioch Parasitol.** v.73, p.145–155, 1995.

CUPOLILLO E, GRIMALDI GJR, MOMEN H. Discrimination of *Leishmania* isolates using a limited set of enzymatic loci. **Ann Trop Med Parasitol.** v.89, p.17–23, 1995.

DA SILVA LA, DE SOUSA CDS, DA GRAÇA GC, PORROZZI R, CUPOLILLO E. Sequence analysis and PCR-RFLP profiling of the hsp70 gene as a valuable tool for identifying *Leishmania* species associated with human leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol.** v.10, p.77–83, 2010.

DAUDEN E, PENAS PF, RIOS L, JIMENEZ M, FRAGA J, ALVAR J, GARCIA-DIEZ A. Leishmaniasis presenting as a dermatomyositis-like eruption in AIDS. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.35, p.316–319, 1996.

DAVIES CR, REITHINGER R, CAMPBELL-LENDRUM D, FELICIANGELI D, BORGES R, RODRIGUEZ N. Review: The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. **Cad Saude Publica.** v.16, p.925-950, 2000.

DÁVILA AMR, MEMEN H. Internal transcribed spacer (ITS) sequences used to explore phylogenetic relationships within *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol.** v.94 p.651–654, 2000.

DEGLI EM, DE VRIES S, CRIMI M, GHELLY A, PATARNELLO T, MEYER A. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1143, p.243–271, 1993.

DMITRI AM. Complete set of mitochondrial pan-edited mRNAs in *Leishmania mexicana amazonensis* LV78. **Mol & Bioch Parasitol.** v.173, p.107–114, 2010.

DUJARDIN JC, HENRIKSSON J, VICTOIR K, BRISSE S, GAMBOA D, AREVALO J, LE RAY D. Genomic Rearrangements in Trypanosomatids: an Alternative to the ‘One Gene’ Evolutionary Hypotheses? **Mem Inst Oswal Cruz.** v.95, p.527–534, 2000.

EDGAR RC, DRIVE RM, VALLEY M. MUSCLE : multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Matrix.** v. 32, p. 1792-1797, 2004.

EL TAI NO, EL FARI M, MAURICIO I, MILES MA, OSKAM L, EL SAFI SH, PRESBER WH, SCHÖNIAN G. *Leishmania donovani*: intraspecific polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR based analyses and DNA sequencing. **Exp Parasit.** v.97, p.35–44, 2001.

FEAGIN JE, SHAW JM, SIMPSON L, STUART K. Creation of AUG initiation codons by addition of uridines within cytochrome b transcripts of kinetoplastids. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** v.5, p.539–543, 1988.

FERNANDES O, MURTHY VK, KURATH U, DEGRAVE WM, CAMPBELL DA. Mini-exon gene variation in human pathogenic *Leishmania* species. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v.66, p.261–271, 1994.

- FOULET F, COSNES A, DELLION S, BLUM L, BACHMEYER C, RAGUIN G, TOURTE-SCHAEFFER C, DENIAU M, BRETAGNE S. *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis in HIV-positive patients does not spread to extralesional sites. **Arch. Dermatol.** v.142, p.1368–1369, 2006.
- FOULET F, BOTTEREL F, BUFFET P, MORIZOT G, RIVOLLET D, DENIAU M, PRATLONG F, COSTA JM, BRETAGNE S. Detection and identification of *Leishmania* species from clinical specimens by using a real-time PCR assay and sequencing of the Cytochrome b gene. **J Clin Microbiol.** v.45, p.2110–2115, 2007.
- FRAGA J, MONTALVO AM, DONCKER S, DUJARDIN JC, DER AUWERA GV. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infect Genet Evol.** v.10, p.238–245, 2010.
- GARIN YJ, SULAHIAN A, PRATLONG F, MENECEUR P, GANGNEUX JP, PRINA E, DEDET JP, DEROUIN F. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infect Immun.** v.69, p.7365–7373, 2001.
- GLADMAN S. VelvetOptimizer. **CSIRO & Monash University.** 2009. Disponível em: <<http://www.vicbioinformatics.com/software.velvetoptimiser.shtml>>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.
- GONTIJO B, CARVALHO MLR. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v.36, p.71-80, 2003.
- GONTIJO CMF, MELO MN. Visceral Leishmaniasis in Brazil: current status, challenges and prospects. **Rev. Bras. Epidemiol.** v.7, p.338-349, 2004.
- GOTO H, LINDOSO JAL. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin N Am.** v.26, p.293–307, 2012.
- GRIMALDI G, MCMAHON-PRATT D. Monoclonal antibodies for the identification of New World *Leishmania* species. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.91, p.37–42, 1996.
- GUIGUEMDE RT, SAWADOGO OS, BORIES C, TRAORE KL, NEZIEN D, NIKIEMA L, PRATLONG F, MARTY P, HOUIN R, DENIAU M. *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.97, p.168–169, 2003.
- GUINDON S, DUFAYARD JF, LEFORT V, ANISIMOVA M, HORDIJK W, GASCUEL O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Sys Biol.** v.59, p.307-21, 2010.
- HERWALDT BL, BERMAN JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.46, p.296–306, 1992.
- HERWALDT BL. Leishmaniasis. **Lancet.** v.354, p.1191–1199, 1999.

HIDE M, BRAS-GONCALVES R, BAÑULS AL. Specific cpb copies within the *Leishmania donovani* complex: evolutionary interpretations and potential clinical implications in humans. **Parasitology**. v.134, p.379–389, 2007.

IBRAHIM ME, BARKER DC. The origin and evolution of the *Leishmania donovani* complex as inferred from a mitochondrial cytochrome oxidase II gene sequence. **Infect Genet Evol**. v.1, p.61–68, 2001.

INOUE JG, MIYA M, LAM K, TAY BH, DANKS JA, BELL J, WALKER TI, VENKATESH B. Evolutionary origin and phylogeny of the modern holocephalans (Chondrichthyes: Chimaeriformes): a mitogenomic perspective. **Molecular Biology and Evolution**. v.27, p.2576–2586, 2010.

IRWIN DM, KOCHER TD, WILSON AC. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**. v.32, p.128–144, 1991.

KATO H, UEZATO H, KATAKURA K, CALVOPIÑA M, MARCO JD, BARROSO PA, GÓMEZ EA, MIMORI T, KORENAGA M, IWATA H, NONAKA S, HASHIGUCHI Y. Detection and identification of *Leishmania* species within naturally infected sand flies in the Andean areas of Ecuador by a polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**. v.72, p.87–93, 2005.

KILLICK-KENDRICK R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med Vet Entomol**. v.4, p.1–24, 1990.

KILLICK-KENDRICK R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clin Dermatol**. v.17, p.279–289, 1999.

KISLYUK AO, KATZ LS, AGRAWAL S, HAGEN MS, CONLEY AB, JAYARAMAN P, NELAKUDITI V, HUMPHREY JC, SAMMONS SA, GOVIL D, MAIR RD, TATTI KM, TONDELLA ML, HARCOURT BH, MAYER LW, JORDAN IK. A computational genomics pipeline for prokaryotic sequencing projects. **Bioinformatics**. v.26, p.1819–1826, 2010.

KUHLS K, MAURICIO IL, PRATLONG F, PRESBER W, SCHÖNIAN G. Analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences of the *Leishmania donovani* complex. **Microbes Infect**. v.7, p.1224–1234, 2005.

Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. Disponível em: <www.dpd.cdc.gov/dpdx>. Acesso em 8 de dezembro de 2013.

LACHAUD L, DEREURE J, CHABBERT E, REYNES J, MAUBOUSSIN JM, OZIOL E, DEDET JP, BASTIEN P. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. **J. Clin. Microbiol**. v.38, p.236–240, 2000.

LAINSON R, WARD RD, SHAW JJ *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Proc R Soc Lond Biol**. v.199, p.309–320, 1977.

LAINSON R, SHAW JJ. Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis*. **Academic Press**. p.1–120 , 1987.

LAINSON R, SHAW JJ, SILVEIRA FT. A *Leishmania* e as leishmanioses. **In:** Instituto Evandro Chagas; 50 Anos De Contribuição Às Ciências Biológicas E À Medicina Tropical. **Fund Serv de Saúde Pública**. v.1, p.83-124, 1986.

LE FICHOUX Y, QUARANTA JF, AUFEUVRE JP, LELIEVRE A, MARTY P, SUFFIA I, ROUSSEAU D, KUBAR J. Occurrence of *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in Southern France. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, p.1953-1957, 1999.

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

LINDOSO JA, BARBOSA RN, POSADA-VERGARA MP, DUARTE MI, OYAFUSO LK, AMATO VS, GOTO H. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from the New World. **Br J Dermatology**. v.160, p.311–318, 2009.

LUYO-ACERO GE, UEZATO H, OSHIRO M, TAKEI K, KARIYA K, KATAKURA K, GOMEZ-LANDIRES E, HASHIGUCHI Y, NONAKA S. Sequence variation of the cytochrome b gene of various human infecting members of the genus *Leishmania* and their phylogeny. **Parasitology**. v.128, p.483–491, 2004.

MACEDO AM, MARTINS, MS, CHIARI E, PENA SD. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol Biochem Parasitology**. v.55, p.147-153, 1992.

MAGILL AJ. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. **Infect. Dis. Clin. N. Am.** v.19, p.241–266, 2005.

Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar americana. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf>. Acesso em 29 de novembro de 2013.

MARCO JD, BHUTTO AM, SOOMRO FR, BALOCH JH, BARROSO PA, KATO H, UEZATO H, KATAKURA K, KORENAGA M, NONAKA S, HASHIGUCHI Y. Multilocus enzyme electrophoresis and Cytochrome b gene sequencing-based identification of *Leishmania* isolates from different Foci of Cutaneous Leishmaniasis in Pakistan. **Am J Trop Med Hyg**. v.75, p.261-266, 2006.

MARCO JD, UEZATO H, MIMORI T, BARROSO PA, KORENAGA M, NONAKA S, BAOSOMBRÍO MA, TARANTO NJ, HASHIGUCHI Y. Are cytochrome b gene sequencing and polymorase chain reaction as reliable as multilocus enzyme electrophoresis for identifying *Leishmania* sp from Argentina? **Am J Trop Med Hyg**. v.75, p.256–260, 2006.

- MARTÍNEZ LP, REBOLLO JA, LUNA AL, COCHERO S, BEJARANO EE. Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. **Parasitol Res.** v.106, p.647-652, 2010.
- MARY C, FARAUT F, LASCOMBE L, DUMON H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. **J. Clin. Microbiol.** v.42, p.5249-5255, 2004.
- MAURICIO IL, GAUNT MW, STOTHARD JR, MILES MA. Glycoprotein 63 (gp63) genes show gene conversion and reveal the evolution of Old World *Leishmania*. **Int J Parasitol.** v.37, p.565-576, 2007.
- MELLO CX, DE OLIVEIRA SCHUBACH A, DE OLIVEIRA RV, CONCEIÇÃO-SILVA F, PIMENTEL MI, LYRA MR, VASCONCELLOS EC, DE FÁTIMA MADEIRA M. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. **Parasitol Res.** v.109, p.927-33, 2011.
- MEREDITH SEO, ZIJLSTRA EE, SCHOONE GJ, KROON CCM, VAN EYS GJJM, SCHAEFFER KU, EL-HASSAN AM, LAWYER PG. Development and application of the polymerase chain reaction for the detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical material. **Arch l'Institut Pasteur de Tunis.** v.70, p.419-431, 1993.
- MIRANDA JC, REIS E, SCHRIEFER A, GONCALVES M, REIS MG, CARVALHO L, FERNANDES O, BARRAL-NETTO M, BARRAL A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz.** v.97, p.185-188, 2002.
- MONTALVO AM, FRAGA J, MONZOTE L, MONTANO I, DE DONCKER S, DUJARDIN JC, VAN DER AUWERA G. Heat-shock protein 70 PCR-RFLP: a universal simple tool for *Leishmania* species discrimination in the New and Old World. **Parasitology.** v.137, p.1159-1168, 2010.
- MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v.366, p.1561-1577, 2005.
- NAVIN TR, ARANA BA, ARANA FE, BERMAN JD, CHAJON JF. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **J. Infect. Dis.** v.165, p.528-534, 1992.
- NAYLOR GJP, KIRSTEN JN, ROSANA KAM, STRAUBE N, LAKNER C. Elasmobranch phylogeny: a mitochondrial estimate based on 595 species. **Biology of Sharks and Their Relatives.** p.31-56, 2012.
- NICOLAS LGM, PRINA E. Rapid differentiation of Old World *Leishmania* species by Light Cycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. **J. Microbiol. Methods.** v.51, p.295-299, 2002.

OCHS DE, OTSU K, TEIXEIRA SMR, MOSER DR, KIRCHHOFF LV. Maxicircle genomic organization and editing of an ATPase subunit 6 RNA in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.76, p.267-278, 1996.

OSAKWE NM, PAULUS A, HAGGERTY PF, WOOD RA, BECKER SJ, WEINA PJ, DOLAN MJ, PRAKASH V. Visceral leishmaniasis with associated immune dysregulation leading to lymphoma. **Mil Med**. v.178, p.386-389, 2013.

OTTO TD, DILLON GP, DEGRAVE WS, BERRIMAN M. RATT: Rapid Annotation Transfer Tool. **Nucleic Acid Research**. v.39, 2011.

PARVIZI P, MORADI G, AKBARI G, FARAHMAND M, READY PD, PIAZAK N, ASSMAR M, AMIRKHANI A. PCR detection and sequencing of parasite ITSrDNA gene from reservoirs host of zoonotic cutaneous leishmaniasis in central Iran. **Parasitol Res**. v.103, p.1273–1278, 2008.

Portal da Saúde. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/>>. Acesso em 18 de dezembro de 2013.

RANQUE P. Etudes morphologiques et biologiques de quelques Trypanosomides récoltes au Sénégal. Doctoral thesis. **University of Aix-Marseilles**. 1973.

REBELO JM, ASSUNCAO ANJR, SILVA O, MORAES JL. Occurrence of sand flies (Diptera, Psychodidae) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. **Cad. Saude Publica**.v.26, p.195–198, 2010.

REITHINGER R, DUJARDIN JC, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**. v.7, p.581-96, 2007.

RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P, PERIERES J. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. **Ann Parasitol Hum Comp**. v.65, p.111-125, 1990.

ROGERS MB, HILLEY JD, DICKENS NJ, WILKES J, BATES PA, DEPLEDGE DP, HARRIS D, HER Y, HERZYK P, IMAMURA H, OTTO TD, SANDERS M, SEEGER K, DUJARDIN JC, BERRIMAN M, SMITH DF, HERTZ-FOWLER C, MOTTRAM JC. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. **Genome Res**. v.21, p.2129-2142, 2011.

ROMERO GA, DE LA GLORIA OM, DE FARIAS GMV, PAES MG, DE OLIVEIRA MV, DE CARVALHO EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. **Acta Trop**. v.93, p.49–56, 2005.

ROUSSEL M, NACHER M, FREMONT G, ROTUREAU B, CLYTI E, SAINTE-MARIE D, CARME B, PRADINAUD R, COUPPIE P. Comparison between one and two injections of pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. **Ann. Trop. Med. Parasitol**. v.100, p.307–314, 2006.

- RUTHERFORD K, PARKHILL J, CROOK J, HORSNELL T, RICE P. **Artemis**: sequence visualization and annotation. v.16, p.944-945, 2000.
- SALOTRA P, SREENIVAS G, POGUE GP, LEE N, NAKHASI HL, RAMESH V, NEGI NS. Development of a species-specific PCR assay for detection of *Leishmania donovani* in clinical samples from patients with kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, p.849-854, 2001.
- SASSI A, LOUZIR H, BEN SALAH A, MOKNI M, BEN OSMAN A, DELLAGI K. Leishmanin skin test lympho proliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. **Clin Exp Immunol**. v.116, p.127-32, 1999.
- SCHMIEDER R, EDWARDS R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**. v.27, p.863-864, 2011.
- SCHÖNIAN G, AKUFFO H, LEWIN S, MAASHO K, NYLÉN S, PRATLONG F, EISENBERGER CL, SCHNUR LF, PRESBER W. Genetic variability within the species *Leishmania aethiopica* does not correlate with clinical variations of cutaneous leishmaniasis. **Mol Biochem Parasitol**. v.106, p.239-248, 2000.
- SCHÖNIAN G, MAURICIO I, CUPOLILLO E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends Parasitol**. v.26, p.466-469, 2010.
- SHAW JJ, LAINSON R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v.69, p.323-335, 1975.
- SHAW JJ. Further thoughts on the use of the name *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* for the aetiological agent of American visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.101, p.577-579, 2006.
- SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: Genomic Organization, Transcription, Replication, and Evolution. **Ann. Rev. Microbiol**. v. 41, p.363-82, 1987.
- SINGH RK, PANDEY HP, SUNDAR S. Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. **Indian J Med Res**. v.123, p.331-444, 2006.
- SMYTH AJ, GHOSH A, HASSAN MQ, BASU D, DE BRUIJN MH, ADHYA S, MALLIK KK, BARKER DC. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. **Parasitology**. v.105, p.183-192, 1992.
- SOTO J, BUFFET P, GROGL M, BERMAN J. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. v.50, p.107-111, 1994.

- SOTO J, ARANA BA, TOLEDO J, RIZZO N, VEGA JC, DIAZ A, LUZ M, GUTIERREZ P, ARBOLEDA M, BERMAN JD, JUNGE K, ENGEL J, SINDERMANN H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** v.38, p.1266–1272, 2004.
- SOTTO MN, YAMASHIRO-KANASHIRO EH, DA MATTA VL, DE BRITO T. Cutaneous leishmaniasis of the New World: diagnostic immunopathology and antigen pathways in skin and mucosa. **Acta Trop.** v.46, p.121–30, 1989.
- STUART, K. Kinetoplast DNA, mitochondrial DNA with a difference. **Molecular and Biochemical Parasitology.** v.9, p.93–110, 1983.
- SUNDAR S, RAI M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol.** v.9, p.951-958, 2002.
- TAILLAN B, MARTY P, SCHNEIDER S, TELLE H, FUZIBET JG, ROSENTHAL E, RAHAL A, LEFICHOUX Y, DUJARDIN P. Visceral leishmaniasis involving a cutaneous Kaposi's sarcoma lesion and free areas of skin. **Eur. J. Med.** v.1, p.255, 1992.
- TALAVERA G, CASTRESANA J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Systematic Biology.** v.56, p.564-577, 2007.
- TAVARES CA, FERNANDES AP, MELO MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. **Expert Rev Mol Diagn.** v.3, p.657-67, 2003.
- TSUKAYAMA P, LUCAS C, BACON DJ. Typing of four genetic loci discriminates among closely related species of New World Leishmania. **Int J Parasitol.** v.39, p.355–362, 2009.
- TUON FF, NETO VA, AMATO VS. *Leishmania*: origin, evolution and future since the Precambrian. **Immunol Med Microbiol.** v.54, p.158–166, 2008.
- TURETZ ML, MACHADO PR, KO AI, ALVES F, BITTENCOURT A, ALMEIDA RP, MOBASHERY N, JOHNSON WD JR, CARVALHO EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **J Infect Dis.** v.186, p.1829-1834, 2002.
- ULIANA SRB, AFFONSO MHT, CAMARGO EP, FLOETER-WINTER LM. *Leishmania*: Genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. **Experimental Parasitology.** v.72, p.157–163, 1991.
- VAN DER AG, RAVEL C, VERWEIJ JJ, BART A, SCHÖNIAN G, FELGER I. Evaluation of four single-locus markers for *Leishmania* species discrimination by sequencing. **J Clin Microbiol.** Não impresso. 2014.
- VAN EYS GJJM, SCHOONE GJ, KROON NCM, EBELING SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. **Molec and Biochem Parasitol.** v.51, p.133–142, 1992.

VÉLEZ-ZUAZO X, AGNARSSON I. Shark tales: a molecular species-level phylogeny of sharks (Selachimorpha, Chondrichthyes). **Mol Phylogenet Evol.** v.58, p.207-217, 2011.

VIDAL FC, NECKELMANN N, SIMPSON L. Sequences of Six Genes and Several Open Reading Frames in the Kinetoplast Maxicircle DNA of *Leishmania tarentolae*. **The Journal Of Biological Chemistry.** v.259, p.15136-15147, 1984.

WEIGLE KA, DE DAVALOS M, HEREDIA P, MOLINEROS R, SARAIVIA NG, D'ALESSANDRO A. Diagnosis of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparison of seven methods. **Am J Tr Med Hyg.** v.36, p.489-496, 1987.

WESTENBERGER SJ, CERQUEIRA GC, EL-SAYED NM, ZINGALES B, CAMPBELL DA, STURM NR. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species- and strain-specific variation and possess a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics.** v.7, p.60, 2006.

WHO: Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva. **WHO technical report series.** v.949 p.22-26, 2010.

YANG BB, CHEN DL, CHEN JP, LIAO L, HU XS, XU JN. Analysis of kinetoplast cytochrome b gene of 16 *Leishmania* isolates from different foci of China: different species of *Leishmania* in China and their phylogenetic inference. **Parasites & Vectors.** v.6, p.32, 2013.

YANG BB, GUO XG, HU XS, ZHANG JG, LIAO L, CHEN DL, CHEN JP. Species discrimination and phylogenetic inference of 17 Chinese *Leishmania* isolates based on internal transcribed spacer 1 (ITS1) sequences. **Parasitol Res.** v.107, p.1049-1065, 2010.

YURCHENKO V, KOLESNIKOV A, LUKES J. Phylogenetic analysis of Trypanosomatina (Protozoa: Kinetoplastida) based on minicircle conserved regions. **Folia Parasitologica.** V.47, p.1-5, 2000.

ZERBINO DR, BIRNEY E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research.** v.18, p.821-829, 2008.