

**THAIS ALMEIDA MARQUES DA SILVA**

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA INTRAESPECÍFICA DE *LEISHMANIA*  
*(LEISHMANIA) INFANTUM* EM AMOSTRAS DE CÃES E HUMANOS.**

BELO HORIZONTE, 2013

Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG  
Instituto de Ciências Biológicas – ICB  
Pós-Graduação em Parasitologia

Estudo da variabilidade genética intraespecífica de *Leishmania*  
(*Leishmania*) *infantum* em amostras de cães e humanos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro

Co-orientadora: Dra. Luciana Inácia Gomes

THAIS ALMEIDA MARQUES DA SILVA  
BELO HORIZONTE, 2013

**Orientadora: Dra. Mariângela Carneiro.** Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Parasitologia – Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias.

**Co-orientadora: Dra. Luciana Inácia Gomes.** Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou – Laboratório de Pesquisas Clínicas.

## **COLABORADORES**

### **Fundação Oswaldo Cruz - Centro de Pesquisas René Rachou**

Dra. Ana Rabello - Laboratório de Pesquisas Clínicas

Dr. Edward José de Oliveira - Laboratório de Pesquisas Clínicas

Dr. Fabiano Sviatopolk Mirsky Pais - Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio)

### **Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)**

Dr. Alexandre Barbosa Reis - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

Henrique Gama Ker - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

### **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**

Dr. Wendel Coura Vital - Pós Doutorado em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical

## **APOIO FINANCEIRO**

O trabalho foi parcialmente financiado pelos editais: PPSUS/MS/CNPq/FAPEMIG/SES-MG/- CDS-APQ-00343-10 e Universal MCT/CNPq: 477430/2010.

CAPES: concessão da bolsa de mestrado

*DEDICO ESSE TRABALHO AOS MEUS QUERIDOS E AMADOS PAIS:*

*FRANCISCO MARQUES DA SILVA E MARIA EDUARDA ALMEIDA MARQUES DA SILVA;*

*E AOS MEUS IRMÃOS:*

*NATASCHA ALMEIDA MARQUES DA SILVA E PEDRO ALMEIDA MARQUES DA SILVA.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade! Oportunidade de ser selecionada para o mestrado, permanecer neste e finalizar esta etapa da minha vida. Agradecer por direcionar os meus caminhos e colocar nele pessoas maravilhosas que me ajudaram nesta caminhada! Agradecer pelo crescimento profissional e também pessoal que adquiri durante esta fase da minha vida.

À minha orientadora Dra. Mariângela Carneiro pela orientação, pelos ensinamentos, pelo carinho, amizade, apoio e confiança. Agradeço por me acolher com tanta gentileza em seu grupo de pesquisa e por ter me concedido a oportunidade de aprender muito com todos que dele fazem parte. Mariângela é, para mim, um exemplo de profissionalismo, sabedoria, competência e ética. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Dra. Luciana Inácia Gomes, por toda atenção, carinho e AMIZADE! Lú, mesmo estando à distância nesta etapa final do trabalho, você sempre esteve presente em todos os momentos. Sempre com entusiasmo, ótimas idéias e principalmente palavras de incentivo. Obrigada mesmo por toda a ajuda e orientação precisa, apurada e principalmente pela paciência diante das minhas limitações.

Ao Dr. Edward José de Oliveira, a quem considero como um segundo co-orientador, que esteve presente ao meu lado sempre me ajudando a superar os problemas que surgiram ao longo da trajetória. A você, o meu “muito obrigada” por toda a ajuda e amizade durante todo este tempo!

À banca de avaliação, Dra. Célia Gontijo, Dra. Héliida Monteiro de Andrade e ao Dr. Wendel Vital Coura por aceitarem o meu convite, pela disponibilidade e pela contribuição que com certeza serão de grande importância para melhoria do meu trabalho.

Aos meus pais, Francisco e Eduarda, por todo amor, carinho, força, conselhos, incentivo e pela ajuda durante todo o tempo em que me dediquei para a realização desse trabalho. Vocês são meus exemplos de vida, meu conforto, meu porto seguro, meu alicerce. O amor

que sinto é incondicional e, sem vocês ao meu lado sempre, a realização deste trabalho não seria possível. Amo muito vocês! Muito obrigada por tudo!

À minha irmã Natascha, por sempre me incentivar, dar força, conselhos e por me acalmar nos momentos difíceis. Por ter sido sempre um exemplo para mim, na verdade foi a minha maior fonte de inspiração para que eu optasse por seguir este caminho.

Ao meu irmão Pedro, pela convivência, companheirismo, amizade e principalmente por ter paciência comigo nos meus momentos de “estresse”.

À minha querida e amada família em geral, que é um tanto quanto agitada, animada, alegre e bagunceira, mas que principalmente possuem muito amor uns pelos outros. Minha querida avó Geresa, minhas tias (especialmente Norma, Rosa e Denise) e tios (especialmente Arnaldo, Cláudio, Adriano), primos, “priminhos” e agregados, obrigada por todo amor, pela acolhida, incentivo, torcida e por alegrarem a minha vida sempre. Amo vocês!

À minha querida turma de mestrado, ou melhor, “turma do pepino”, agradeço pela união, amizade e pelo apoio nos momentos de tensão. Vou guardar com carinho os momentos maravilhosos de descontração que vivemos juntos. Em especial, agradeço a minha amiga Luciana Lima, que foi sempre a minha “dupla” em todos os trabalhos. A Luciana foi fundamental nesta etapa da minha vida. Antes da seleção, estudamos juntas e juntas permanecemos durante todo o mestrado. Lú, obrigada pela amizade verdadeira, pelo incentivo, pelos estudos e pelos milhões de conselhos. Gostaria também de agradecer a minha colega Soraia, que sempre me deu dicas importantes durante a execução do meu projeto de mestrado. E também a turminha dos trabalhos e estudo: Bruninha, Ana Luiza e Júlia, que são pessoas muito especiais.

Às minhas queridas amigas da Biologia, em especial a Deborah, Fabi, Flávia, Carlinha, Camila e Kênia, agradeço por estarem sempre comigo, por fazerem os meus dias mais alegres e coloridos. Obrigada pela amizade e pelo companheirismo de sempre.

Às minhas queridas amigas da vida inteira, em especial a Vanessa, Mayara, Melina e Patrícia, agradeço por fazerem parte da minha história desde o início e por acreditarem e

apoiarem as minhas escolhas. Obrigada pelo carinho, companheirismo, pelos conselhos e pela amizade. Por compreenderem com paciência a minha ausência em alguns momentos desta etapa da minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa da Dra. Érika Martins Braga, coordenadora do curso, pela oportunidade de crescimento científico e por todos os ensinamentos adquiridos.

Aos professores do departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, por todos os ensinamentos, pela rica convivência e por contribuírem para a minha formação. Em especial ao professor Alan Lane de Melo, que nos proporcionou uma viagem maravilhosa a partir da qual foi possível compreendermos a importância de se estudar “Parasitologia”.

Às secretarias do programa de Parasitologia, Sumara e Sibebe, agradeço pela atenção, disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre.

À Dra. Ana Rabello, por permitir que os experimentos fossem realizados no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou, onde tive toda a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

Aos queridos amigos do Laboratório de Pesquisas Clínicas, pela agradável convivência, pelo apoio, companheirismo e por estarem sempre dispostos a me ajudar nas soluções dos problemas. Agradeço especialmente a Dani (Daniela Cristina Campos Portela), que além de uma ótima secretária, se tornou uma grande amiga. Foi minha companheira, minha confidente, minha “terapeuta”. Obrigada Dani, por compartilhar todos estes momentos comigo! Obrigada pelo carinho, pelas conversas, pelos conselhos, pelas risadas, pela paciência, pela torcida, pelas diversas e divertidas idas e vindas ao René! Obrigada pela sua AMIZADE! Você foi muito importante para mim nesta caminhada! Adoro você! Agradeço também a Gláucia Cota e Maria Vitória por disponibilizarem amostras que faziam parte dos seus projetos de doutorado e mestrado, respectivamente.

Aos queridos amigos do Laboratório de Epidemiologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias, Maria Helena, Valdelaine, Francisca, Ana Paula, Wendel, Letícia, Iara, Thais



e demais estudantes, pelo apoio, incentivo, amizade, companheirismo, troca de informações e maravilhosa convivência. Agradeço especialmente a amiga Letícia, que sempre me ajudou em todas as minhas escolhas e me incentivou ativamente a tentar o mestrado na UFMG. Obrigada mesmo por toda a sua amizade e carinho! Agradeço também: à Iara, que se tornou uma grande amiga e que também me ajudou em muitas etapas dessa trajetória; bem como ao Wendel, à Maria Helena e à Val, que sempre estavam dispostos a me ensinar, ajudar e contribuir para a melhoria da minha dissertação.

Ao Fabiano Pais, do CEBio do CPqRR/FIOCRUZ, que me ajudou a criar os fenogramas. Agradeço pela disponibilidade, pela paciência com minhas limitações e também por todas as “dicas” que me deu em relação ao meu trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Parasitologia Celular e Molecular do CPqRR/FIOCRUZ, principalmente à Dra. Anna Christina de Matos Salim e ao Dr. Flavio Marcos Gomes de Araújo por me autorizarem e ajudarem na utilização do equipamento “Agilent 2100 Bioanalyzer”. Em especial, agradeço também as queridas Bárbara Xavier, Paula Fonseca, Ana Paula Cordeiro e Juvana Andrade por toda boa vontade, carinho e ajuda quando precisei.

Aos colegas do Laboratório de Esquistossomose do CPqRR/FIOCRUZ, Dr. Elio Hideo Babá e Wander de Jesus Jeremias. Agradeço em especial ao Wander por toda a sua disponibilidade, paciência e boa vontade em me auxiliar nos experimentos do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer. Wander, não tenho palavras para descrever o quanto a sua ajuda foi importante. A você, o meu “muito obrigada”!

Às queridas Dra. Célia Gontijo e a Dra. Patrícia Quaresma do Laboratório de Leishmaniose do CPqRR/FIOCRUZ, por todas as conversas, conselhos e ajuda quando precisei. Agradeço principalmente por disponibilizarem que eu utilizasse o laboratório de leishmaniose, até em horários alternativos, para fotografar meus géis no fotodocumentador L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

Às amigas do Laboratório de Química do CPqRR/FIOCRUZ, Tânia, Dani, Fernanda, Karine, Marcinha, Alba, Roberta pelos almoços maravilhosos e descontraídos na cantina da ASFOC.

Aos colegas do Departamento de Análises Clínicas do Núcleo da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Dr. Alexandre Barbosa Reis, Dr. Wendel Coura Vital, Henrique Gama Ker e Levi Eduardo Soares Reis por cederem tão gentilmente e com profissionalismo as amostras de cães. Em especial ao Wendel, que sempre ajudou em toda a dinâmica para que essas amostras chegassem as minhas mãos, além dos conselhos e dicas em relação ao meu trabalho.

## SUMÁRIO

Resumo.....	xiv
Abstract .....	xvi
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Figuras .....	xviii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xx
1.0 Introdução.....	01
1.1 Leishmanioses.....	01
1.2 Leishmaniose Visceral.....	02
1.3 Variabilidade Genética em <i>Leishmania</i> .....	05
1.4 Métodos moleculares e isoenzimáticos como instrumentos epidemiológicos na LV.....	06
1.4.1 Análise de isoenzimas ( <i>Multi-locus enzyme electrophoresis</i> – MLEE) ....	07
1.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase.....	08
1.4.3 Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP) .....	09
1.4.4 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD).....	10
1.4.5 Análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites (MLMT).....	10
1.5 Variabilidade Genética em <i>L. infantum</i> no Brasil.....	11
2.0 Justificativa.....	16
3.0 Objetivos.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4.0 Material e métodos.....	19
4.1 Municípios de seleção das amostras .....	19
4.2 Amostras clínicas e de cultura de <i>L. infantum</i> .....	19
4.3 Delineamento do estudo.....	22
4.4 Obtenção de massa de promastigotas de <i>L. infantum</i> .....	23
4.5 Extração de DNA.....	23
4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	23
4.6.1 Desempenho dos métodos – limite de detecção.....	24
4.7 Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP).....	25
4.8 Teste padrão com uso de amostras referência.....	28
4.9 Análise de sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank e posterior análise <i>in silico</i> no programa “RestrictionMapper”.....	28

4.10	Análise.....	30
4.11	Considerações éticas.....	31
5.0	Resultados.....	32
5.1	Produtos da Reação em cadeia da Polimerase.....	32
5.1.1	Produtos da PCR da região do minicírculo do kDNA.....	32
5.1.2	Produtos da PCR da região intragênica da glicoproteína gp63.....	32
5.2	Desempenho dos métodos – limite de detecção.....	32
5.3	Especificidade do ensaio de PCR.....	33
5.3.1	Especificidade do ensaio de PCR para o alvo kDNA.....	33
5.3.2	Especificidade do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63.....	34
5.4	Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (PCR-RFLP).....	35
5.4.1	PCR-RFLP para a região de minicírculo do kDNA.....	35
5.4.1.1	Endonuclease VspI.....	35
5.4.1.1.1	Dendograma sem raiz – endonuclease VspI.....	37
5.4.1.1.2	Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> – endonuclease VspI.....	39
5.4.1.2	Endonuclease RsaI.....	41
5.4.1.2.1	Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> – endonuclease RsaI.....	41
5.4.1.3	Endonuclease BglIII.....	44
5.4.1.4	Endonuclease DdeI.....	45
5.4.1.5	Endonuclease HpaII.....	46
5.4.1.5.1	Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> – endonuclease HpaII.....	47
5.4.2	PCR-RFLP para a região intragênica da glicoproteína gp63.....	49
5.4.2.1	Endonuclease HincII.....	49
5.4.2.2	Endonuclease TaqI.....	50
6.0	Discussão.....	52
7.0	Conclusão.....	58
8.0	Referências Bibliográficas.....	59
9.0	Anexos.....	69

9.1 Anexo 1: Resultado da caracterização de espécies de Leishmania por eletroforese de enzimas (MLEE) – CLIOC.....	69
9.2 Anexo 2: Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa- UFMG.....	72

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença distribuída mundialmente e potencialmente fatal para o homem se não diagnosticada e tratada precocemente. Além de humanos a LV acomete outros mamíferos, especialmente cães, que no contexto urbano são os principais reservatórios da doença. Indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também são considerados grupos susceptíveis para LV e merecem uma maior atenção. O município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil possui um dos maiores índices de letalidade humana por LV no país, além de uma alta prevalência da doença em cães. A *Leishmania (Leishmania) infantum* é o agente etiológico da LV no Brasil e o objetivo central deste trabalho foi estudar a variabilidade genética intraespecífica de parasitos provenientes de casos humanos e caninos do município de Belo Horizonte e de alguns municípios próximos com o uso da técnica de PCR-RFLP e diferentes alvos gênicos: kDNA e gp63. Para este trabalho foram avaliadas 47 amostras de DNA extraídas de amostras clínicas (n=35) e de cultura de *L. infantum* (n=12), sendo que estas amostras eram provenientes de três grupos diferentes: adultos (n=16), crianças (n=18) e cães (n=13). As amostras foram amplificadas para o alvo kDNA com os iniciadores MC1 e MC2, específicos para o Complexo *Leishmania donovani*, e que geram um fragmento de 447pb (pares de base). Para o alvo da glicoproteína gp63 foram utilizados os iniciadores Sg1 e Sg2, que geram um fragmento de 1330pb. Para avaliação por RFLP do alvo kDNA foram usadas cinco endonucleases de restrição, sendo elas: VspI, RsaI, BglII, DdeI e Hpa II. Para avaliação por RFLP do alvo da glicoproteína gp63 foram usadas duas endonucleases, sendo elas: Hinc II e TaqI. Os padrões de restrição enzimática das 47 amostras de DNA obtidos com as enzimas RsaI, BglII, DdeI, Hpa II, HincII e TaqI, revelaram-se monomórficos. Dois perfis distintos puderam ser identificados com a enzima VspI: Tipo I (apresentado por 46 amostras de DNA) e Tipo II (apresentado por apenas uma amostra de DNA avaliada no estudo). Este mesmo resultado foi também visualizado por análise de fenograma, construído com matriz binária e agrupamento Neighbor-Joining. A amostra variável é proveniente de indivíduo adulto, que apresentou quadro clássico de LV, residente do município de Minas Novas-MG, não pertencente à Região Metropolitana de Belo Horizonte. Esses achados revelam um alto grau de homogeneidade entre amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos e caninos de Belo Horizonte e outros municípios de Minas Gerais, Brasil.

**Palavras Chaves:** *Leishmania (Leishmania) infantum*, variabilidade intraespecífica, PCR-RFLP, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a disease distributed worldwide and potentially fatal to humans if not diagnosed and early treated. In addition to human, other mammals are also affected, especially dogs in the urban context, which are the major reservoir of the disease. Individuals showing human immunodeficiency virus (HIV) infection are also susceptible to VL and deserve more attention. The city of Belo Horizonte, Minas Gerais state, has one of the highest lethality rates for VL in humans in Brazil and a high prevalence for the disease in dogs. *Leishmania (Leishmania) infantum* is the etiological agent for VL in Brazil and the aim of this work was to study the intraspecific genetic variability of *Leishmania* from human and dogs cases in Belo Horizonte, and some other municipalities in Minas Gerais state, applying PCR-RFLP with different DNA targets: kDNA and gp63. In this work were evaluated 47 DNA samples extracted from clinical specimens (n = 35) and *L. infantum* culture (n = 12), and these samples were from three different groups: adults (n = 16), children (n = 18) and dogs (n = 13). The samples were amplified for kDNA using the primers MC1 and MC2, specific to the *Leishmania donovani complex*, which generate a fragment of 447pb (base pairs). For gp63 glycoprotein the primers used were SG1 and SG2, which generate a fragment of 1330bp. To perform the kDNA RFLP five restriction enzymes were used: VspI, RsaI, BglII, DdeI and Hpa II. The gp63 glycoprotein RFLP was performed with two enzymes: Hinc II and TaqI. The results obtained with RsaI, BglII, DdeI, Hpa II, HincII and TaqI restriction enzymes proved to be monomorphic. Two distinct profiles were identified with the VspI enzyme: Type I (revealed by 46 DNA samples) and Type II (shown for only one DNA sample evaluated in the study). This same result was also seen by phenogram analysis, constructed with binary matrix and neighbor-joining clustering. The variable sample was from an adult who presented classic VL and is resident of Minas Novas city, Minas Gerais state, municipality not belonging to the Metropolitan Region of Belo Horizonte. These findings reveal there is a high degree of homogeneity among *Leishmania* from human and dogs in Belo Horizonte, and some other municipalities in Minas Gerais state, Brazil.

**Key words:** *Leishmania (Leishmania) infantum*, intraspecific variability, PCR-RFLP, Belo Horizonte, Minas Gerais state, Brazil.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Características relacionadas ao grupo das crianças, tipo de amostra utilizada na identificação molecular do estudo.....21
- Tabela 2:** Características relacionadas ao grupo de adultos, presença da co-infecção *Leishmania*/HIV, tipo de amostra utilizada na identificação molecular do estudo.....21
- Tabela 3:** Enzimas de restrição utilizadas na PCR-RFLP com seus respectivos sítios de restrição.....25
- Tabela 4:** Cepas referências utilizadas no trabalho como padrão referência na reação de PCR-RFLP.....27
- Tabela 5:** Dados das sequências nucleotídicas depositadas no GenBank para o alvo kDNA que foram selecionadas para análise por fenograma.....29
- Tabela 6:** Dados das sequências nucleotídicas depositadas no GenBank para o alvo gp63 selecionadas para análise por fenograma.....30

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Municípios de seleção das amostras.....	19
<b>Figura 2:</b> Delineamento do estudo.....	22
<b>Figura 3:</b> Mapas de restrição enzimática dos fragmentos kDNA e gp63.....	27
<b>Figura 4:</b> Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb) em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%.....	32
<b>Figura 5:</b> Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb) em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. ....	32
<b>Figura 6:</b> Limite de detecção do ensaio de PCR para o alvo kDNA.....	33
<b>Figura 7:</b> Limite de detecção do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63.....	33
<b>Figura 8:</b> Especificidade do ensaio de PCR para o alvo kDNA (447pb) , em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%.....	34
<b>Figura 9:</b> Especificidade do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63 (1330pb), em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. ....	34
<b>Figura 10:</b> Perfil tipo I da restrição enzimática realizada com a endonuclease VspI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	36
<b>Figura 11:</b> Perfil tipo II da restrição enzimática realizada com a endonuclease VspI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	36
<b>Figura 12:</b> Dendograma sem raiz - endonuclease VspI.....	38

<b>Figura 13:</b> Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> - endonuclease VspI.....	40
<b>Figura 14:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease RsaI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	41
<b>Figura 15:</b> Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> - endonuclease RsaI.....	43
<b>Figura 16:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease BglII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	44
<b>Figura 17:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease DdeI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	45
<b>Figura 18:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease HpaII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb).....	46
<b>Figura 19:</b> Dendograma sem raiz com análise <i>Bootstrap</i> - endonuclease HpaII.....	48
<b>Figura 20:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease HincII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb).....	49
<b>Figura 21:</b> Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease TaqI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb).....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µl</b>	Microlitro
<b>µM</b>	Micromolar
<b>AD</b>	Adulto
<b>CA</b>	Cão
<b>Clín</b>	Amostra clínica
<b>CLIOC</b>	Coleção de <i>Leishmania</i> do Instituto Oswaldo Cruz
<b>CN</b>	Controle negativo
<b>CPqRR</b>	Centro de Pesquisas René Rachou
<b>CR</b>	Criança
<b>Cult</b>	Amostra de cultura
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>dNTP's</b>	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
<b>F</b>	Feminino
<b>fg</b>	Fentograma
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>GEEPI</b>	Gerência de Epidemiologia e Informação
<b>gp63</b>	Glicoproteína 63
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>ITS</b>	Região intergênica do RNA ribossomal
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>KDNA</b>	DNA do Cinetoplasto
<b>LIT</b>	Meio de cultura "Liver Infusion Triptose"
<b>LPC</b>	Laboratório de Pesquisas Clínicas
<b>LV</b>	Leishmaniose Visceral
<b>LVA</b>	Leishmaniose Visceral Americana
<b>M</b>	Masculino
<b>min</b>	Minutos
<b>MLEE</b>	Eletroforese de enzimas multilocais
<b>MLMT</b>	Análise de regiões de DNA com marcadores microsatélites
<b>mM</b>	Milimolar

<b>MO</b>	Aspirado de medula óssea
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nm</b>	Nanometro
<b>NNN</b>	Meio de cultura "Novy McNeal e Nicolle" - Ágar bacteriológico
<b>°C</b>	Grau "Celsius"
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PM</b>	Padrão de tamanho molecular
<b>RAPD</b>	Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
<b>RFLP</b>	Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição
<b>RMBH</b>	Região Metropolitana de Belo Horizonte
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>SMSA/PBH</b>	Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte
<b>SSR-PCR</b>	PCR de repetições de sequências simples
<b>ST</b>	Sangue total
<b>U</b>	Unidades
<b>V</b>	Volts

## 1.0 INTRODUÇÃO

### 1.1 Leishmanioses

Atualmente, as leishmanioses encontram-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo e são caracterizadas por sua grande diversidade e complexidade. Estima-se que no mundo cerca de 12 milhões de indivíduos estejam acometidos com a doença, e que aproximadamente 350 milhões estão expostos ao risco de infecção (Ministério da Saúde 2006).

As leishmanioses ocorrem em cinco continentes: Américas, África, Ásia, Sul da Europa e mais recentemente na Oceania (Austrália) (Rose et al. 2004, OMS 2011, Dougall et al. 2011, OMS 2013). São prevalentes em 98 países, dos quais 72 são países em desenvolvimento. Em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão ocorrem 90% dos casos de leishmaniose visceral; na Bolívia, Brasil e Peru ocorrem 90% dos casos de leishmaniose mucocutânea; e no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria ocorrem 90% dos casos de leishmaniose cutânea (OMS 2011, OMS 2013).

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Ross 1903 apud Gállego 2004). Estes protozoários possuem ciclo de vida heteroxênico, portanto, alternam estádios de vida entre hospedeiros mamíferos e hospedeiros invertebrados (Laison & Shaw 1987). Apresentam-se em duas formas principais, amastigota e promastigota. A forma amastigota não possui flagelo livre, é arredondada e encontrada nos tecidos de hospedeiros vertebrados em células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente em macrófagos. A forma promastigota é flagelada, extracelular, e é encontrada no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados.

Dentre os hospedeiros vertebrados, as leishmanioses podem acometer o homem e outros mamíferos como roedores, edentados (tatu, tamanduá e preguiça), marsupiais (gambás), canídeos e outros primatas (Laison & Shaw 1987). Os insetos vetores, hospedeiros invertebrados, são pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília *Phlebotominae*, assim denominados flebotomíneos. Pertencem aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo. Através do repasto sanguíneo, realizado no momento da picada por fêmeas desses insetos, as espécies do gênero *Leishmania* são transmitidas ao homem e demais hospedeiros. Os flebotomíneos são encontrados nos mais diferentes nichos ecológicos da natureza e compreendem

aproximadamente trinta espécies de vetores envolvidos no ciclo de transmissão das leishmanioses no Velho e no Novo Mundo (Shaw 2003).

As diferentes manifestações clínicas das leishmanioses dependem de vários fatores, dentre eles a espécie de *Leishmania* envolvida, sua virulência e aspectos relacionados ao hospedeiro, como seu estado imunológico e nutricional, dentre outros. Nesse contexto, essas enfermidades podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar, que acometem pele e mucosas, e visceral ou calazar, que acomete órgãos internos como baço e fígado, principalmente (Convit et al. 1972, Ministério da Saúde 2006, Lynn & McMaster 2008, OMS 2011).

## 1.2 Leishmaniose Visceral (LV)

A OMS estima que existam, por ano, 500 mil novos casos humanos de leishmaniose visceral (LV) e 59 mil mortes em decorrência da doença em todo o mundo. Nas Américas é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neotropical, encontrada desde o México até o norte da Argentina. Houve descrição de casos em pelo menos 12 países, sendo que 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste (Miles et al. 1999, Desjeux 2004, OMS 2010).

O primeiro relato de LV no Brasil foi feito em 1934, quando foram encontradas amastigotas de *Leishmania* em cortes histológicos de fígado de pessoas que morreram com suspeita de febre amarela. Estas pessoas eram provenientes de vários estados do Nordeste e do Norte do país (Penna 1934, Maia-Elkhoury et al. 2008).

Desde então, no Brasil, as estatísticas oficiais registram o aparecimento de novos casos de LV e o aumento desses, de forma gradativa em todas as regiões brasileiras, configurando ampla endemicidade da doença. Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, até dezembro de 2011 a doença era encontrada em 21 das 27 unidades da federação, com incidência média anual de 2 casos/100.000 habitantes. Possui nítida expansão geográfica e crescente número de casos, resultado estes decorrentes de fatores como a urbanização acelerada e alterações do meio ambiente. (Maia-Elkhoury et al. 2008, Werneck 2008, Brasil 2009, MS/SINAN 2011).

Em sua distribuição geográfica inicial, a LV era mais frequente no meio rural. A partir da década de 1980, quando uma epidemia de LV ocorreu em Teresina, Piauí (Costa et al. 1990), tornou-se notória a alteração do padrão de transmissão rural com tendência à urbanização da endemia com casos autóctones em outros grandes centros urbanos como

São Luís, Fortaleza, Natal, Aracaju, Belo Horizonte, Santarém e Corumbá (Maia-Elkhoury et al. 2008, Romero & Boelaert 2010, Harhay et al. 2011).

Acredita-se que diversos fatores contribuíram e ainda contribuem para esta mudança no perfil epidemiológico da doença como: desflorestamento, ou transformações no ambiente, que levam a uma redução do espaço ecológico da doença e facilita a ocorrência de epidemias em centros urbanos; migração de pessoas de áreas rurais endêmicas para centros urbanos; boa adaptação do vetor ao ambiente doméstico e a presença do reservatório (cão); desnutrição, principalmente em vilas e favelas, levando a uma alta susceptibilidade a doença; entre outros (Reithinger & Davies 2002, Desjeux 2004, Werneck 2008).

É importante ressaltar que as medidas de controle preconizadas até então, não foram suficientes para contenção da doença no ambiente urbano, principalmente em relação ao controle de vetores e reservatórios da doença.

A *Leishmania (Leishmania) infantum*, sinónímia de *Leishmania (Leishmania) chagasi*, é a espécie causadora de LV no Brasil. A LV é uma doença que apresenta, geralmente, curso prolongado, caracterizado por febre, palidez, emagrecimento, hepatoesplenomegalia, aumento de volume abdominal, pancitopenia, edema e linfadenopatia (Chappuis et al. 2007, Romero & Boelaert 2010), porém com variabilidade entre os indivíduos (Zijlstra 1991, Herwaldt 1999).

Em atenção aos hospedeiros, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório urbano do parasito, desempenhando um papel importante na transmissão e epidemiologia da doença. Observa-se que a enzootia canina precede a ocorrência de casos humanos, sendo que a infecção em cães é mais prevalente do que no homem. Como o cão é considerado um importante hospedeiro e fonte de infecção para os vetores, vêm sendo um dos principais alvos nas estratégias de controle, com a prática da eutanásia em todos os animais sororreagentes e/ou com exame parasitológico positivo (Ministério da Saúde 2006).

Quanto ao vetor, o *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* é a principal espécie no Brasil. Entretanto devido a sua importância como vetor da LV, diversos estudos tem sido realizados como, por exemplo, análises de genes associados à resistência a inseticidas e genes envolvidos na biologia reprodutiva desses vetores. Assim, atualmente existe um consenso de que o *L. longipalpis* respresenta um complexo de espécies, no entanto, o número e distribuição dessas ainda é incerto (Araki et al. 2009, Azevedo et al. 2012, Ferreira et al. 2012, Lins et al. 2012). Alguns resultados indicam que este complexo de



espécies pode ser dividido em dois grupos principais, um representando uma única espécie e um segundo grupo mais heterogêneo e que provavelmente, representa um número de espécies incipientes (Lins et al. 2012). Ainda, recentemente o *L. cruzi* foi descrito como vetor em um foco no estado de Mato Grosso do Sul (Santos et al. 1998). As ações de controle destinadas aos flebotomíneos constam de levantamentos entomológicos das duas espécies citadas anteriormente, e se caso estiverem presentes e ainda dependendo das características da localidade, é feito controle químico por meio da utilização de inseticidas de ação residual (Ministério da Saúde 2006).

Os indivíduos que mais frequentemente são acometidos por LV são crianças e idosos. Além desses, pessoas que possuem o sistema imunológico deficiente, como por exemplo, indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) também são considerados grupos susceptíveis (Alvar et al. 1997, Cota et al. 2011).

A razão da maior susceptibilidade das crianças pode ser explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular, agravado pela desnutrição, tão comuns nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (Palumbo 2010). De acordo com Botelho e Natal (2009) e Guimarães e Almeida (2011), uma possível explicação para uma maior susceptibilidade em idosos é a diminuição da capacidade de resposta do sistema imunológico.

A LV é comumente fatal quando não tratada, especialmente nos grupos mais susceptíveis descritos anteriormente. Assim, o diagnóstico e tratamento precoce da doença são de extrema importância para a redução das taxas de letalidade e do grau de morbidade da doença. (Chappuis et al. 2007, OMS 2011)

Normalmente o diagnóstico é realizado com base em parâmetros clínicos e epidemiológicos. No entanto, para um diagnóstico definitivo é necessário a complementação por exames laboratoriais, especialmente parasitológicos que exigem a demonstração dos parasitos. Sendo os mais utilizados, a microscopia de aspirado de medula óssea, baço, fígado ou linfonodo e isolamento em cultivo *in vitro* do parasito com a demonstração do mesmo em microscópio. Diferentes técnicas podem ainda ser utilizadas para o diagnóstico de leishmaniose visceral, tais como os métodos sorológicos (Aglutinação Direta - DAT, Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI, Ensaio Imunoenzimático – ELISA e os testes imunocromatográficos) e moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase -PCR).

Muitos avanços têm ocorrido nos últimos anos, mas apesar do grande número de testes disponíveis para o diagnóstico da LV, nenhum apresenta 100% de sensibilidade e

especificidade. A PCR tem se mostrado um método sensível e promissor para o diagnóstico da LV. Possui a vantagem de poder ser utilizado em uma grande variedade de amostras clínicas, entretanto ainda possui custo elevado para utilização em larga escala (Tavares et al. 2003, Gontijo & Melo 2004).

### 1.3 Variabilidade genética em *Leishmania*

A variabilidade genética em parasitos pode ser a principal estratégia evolucionária dos mesmos e tem profundo impacto nas características biológicas daqueles de importância médica (Tybayrenc & Ayala 1988). De acordo com Alvarenga (2007) há necessidade de um conhecimento confiável e consensual sobre a taxonomia, baseado no conhecimento da estrutura da população e na diversidade filogenética, sendo estes pré-requisitos indispensáveis para um melhor entendimento da epidemiologia de parasitos patogênicos. Neste contexto, Salotra et al. (2001) e Schallig e Oskam (2002) afirmam que a identificação correta da espécie do parasito responsável pela doença é de extrema importância para delinear estratégias de controle e tratamento apropriado.

Desde a primeira descrição do gênero *Leishmania* em 1903, o número de novas espécies dentro deste gênero vem se expandindo e diferentes classificações vêm sendo propostas. Inicialmente as diferentes espécies de *Leishmania* eram classificadas de acordo com aspectos extrínsecos (externos), tais como aspectos geográficos, clínicos, biológicos e epidemiológicos. Nos dias atuais, a classificação, além dos caracteres extrínsecos, é baseada em características intrínsecas (internas) do parasito, tais como características bioquímicas, composição de lipídios, composição de proteínas, entre outros. Atualmente com o desenvolvimento das técnicas moleculares, a análise de polimorfismos no DNA tem sido bastante utilizada na caracterização desses parasitos. A vantagem de se trabalhar com caracteres intrínsecos é que esses normalmente não são modificados ou mascarados por hospedeiros ou fatores ambientais (Grimaldi et al. 1987, Grimaldi & Tesh 1993, Cupolillo et al. 2001, Kuhls et al. 2007, Lukes et al. 2007).

A diversidade genética em *Leishmania* é alvo de intenso estudo, visto que o número de espécies patogênicas ao homem é elevado, sendo aproximadamente 22 espécies. Alguns trabalhos têm mostrado grandes variações inter e intraespecíficas em populações naturais de *Leishmania*. Segundo Tibayrenc e Ayala (1988), este fenômeno pode estar relacionado ao mecanismo de reprodução destes parasitos e parece ter grande importância para o entendimento da epidemiologia destas doenças.

A forma de reprodução dos parasitos do gênero *Leishmania* ainda é bastante discutida. A maioria dos estudos de genética de populações mostra uma estrutura de população basicamente clonal em diferentes espécies de *Leishmania* (Bañuls et al. 1999). Assim, se a espécie reproduz de forma clonal, seus genótipos se propagam como fotocópias genéticas e, portanto, podem ser usados como marcadores epidemiológicos confiáveis. Entretanto, se há recombinação gênica, ou seja, se a espécie se reproduz sexuadamente, seus multilocos genéticos são incertos, assim não devem ser usados como marcadores epidemiológicos. Alguns autores já registraram a ocorrência da recombinação gênica em populações naturais de *Leishmania* no Novo e Velho Mundo (Evans et al. 1987, Tibayrenc et al. 1990, Belli et al. 1994, Dujardin et al. 1995, Akopyants et al. 2009).

Ainda, além de eventos de recombinação gênica, Ravel et al. (2006), descreveram a ocorrência de híbridos naturais, cruzamento entre *L.infantum* e *L.major*. Na natureza, estas duas espécies de *Leishmania* são transmitidas por diferentes vetores e possuem diferentes reservatórios. A infecção por *L. infantum*, é uma zoonose onde o cão é o principal reservatório. No mediterrâneo essa espécie é transmitida por várias espécies de vetores do subgênero *Larroussius* (Killick-Kendrick 1999, Volf et al. 2007). Em contraste, *L. major* é típica de áreas áridas e semi-áridas, tendo como principal reservatório os roedores (Gramiccia & Gradoni 2005), e é transmitida principalmente por *Phebotomus papatasi* (Killick-Kendrick 1999, Volf et al. 2007). A descoberta de híbridos naturais entre espécies tão divergentes veio levantar a questão sobre o processo de troca genética nestes parasitos e a possível circulação de híbridos em condições naturais (Ravel et al. 2006).

Todas estas questões citadas anteriormente devem ser levadas em consideração num estudo de variabilidade genética desses protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo Schönian et al. (2008), a epidemiologia das leishmanioses está evoluindo rapidamente tanto na região mediterrânica como em outras regiões do mundo. Assim, é importante unirem esforços para que ocorram novos estudos, nomeadamente com aplicação das técnicas moleculares de forma a complementarem os convencionais inquéritos epidemiológicos.

#### 1.4 Métodos moleculares e isoenzimáticos como instrumentos epidemiológicos na LV

As metodologias de análise gênica inter e intraespécies possibilitam a obtenção de informações úteis para se estudar a influência da variabilidade genética sobre fatores epidemiologicamente importantes, como a infecciosidade, virulência, patogenicidade,

imunogenicidade e suscetibilidade à ação de quimioterápicos entre populações de parasitos (Alvarenga 2007).

#### 1.4.1 Análise de isoenzimas (*Multi-locus enzyme electrophoresis* – MLEE)

A técnica de isoenzimas consiste em analisar e diferenciar organismos através das diferenças na mobilidade eletroforética de proteínas, que varia em função da carga elétrica, forma estrutural ou peso molecular.

A análise de polimorfismos presentes em isoenzimas metabólicas constituiu uma das primeiras metodologias a ser utilizada, e é universalmente aceita até os dias atuais, como método de referência para caracterizar e identificar *Leishmania*. Esta metodologia começou a ser utilizada no início da década de 80, pelo laboratório de referência da OMS: “Laboratoire d’Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier, France”. Os zimodemas são internacionalmente aceitos e nomeados pela sigla “MON”, derivada ao local onde foi feita a tipagem (Montpellier). Após diversos estudos, o zimodema denominado MON-1 ainda é o zimodema mais frequente para *L. infantum*, tanto em cepas do velho mundo como do novo mundo (Rioux et al. 1990).

As isoenzimas podem ocorrer devido a diversos fatores tais como: presença de mais de um loco que codifica a enzima; presença de mais de um alelo para o loco codificador da enzima; modificações ou alterações pós-traducionais na cadeia polipeptídica formada e enzimas poliméricas cujos componentes são de alelos ou locus. Neste tipo de análise, as cepas são divididas em grupos com padrões enzimáticos idênticos ou homogêneos, são os chamados zimodemas. Os zimodemas podem representar diferenças enzimáticas simples ou conjunto de diferenças ocorrendo entre grupos populacionais de organismos (Momen 1984). A ampla distribuição de um único zimodema pode indicar a estrutura populacional clonal, como proposto para *Leishmania* (Tibayrenc et al.1990).

Apesar dessa metodologia ser amplamente aceita, ela pode não identificar de forma eficaz a diversidade genética, pois algumas substituições nucleotídicas não são suficientes para alterar os aminoácidos o que permite que mutações silenciosas passem despercebidas e, assim, cepas distintas possam ser consideradas idênticas. Ainda, esta metodologia tem a desvantagem de requerer o isolamento e o cultivo do parasito, o que impede a caracterização de algumas amostras (Cortes 2008).

A técnica é bastante sensível e possui conveniência de que cada variante enzimática seja considerada na prática como um genótipo e cada eletromorfo (banda

eletroforética) como um alelo. Todavia, dois organismos não podem ser considerados idênticos apenas por possuírem a mesma migração para uma ou duas enzimas. Assim, para que não haja interpretações incorretas deve-se aumentar o número de enzimas analisadas e conseqüentemente, o número de caracteres observados (Miles et al. 1981, Momen 1984).

#### 1.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é considerada uma técnica extremamente sensível, que possibilita a amplificação exponencial de uma sequência específica de DNA de interesse a partir de uma mistura complexa, sem a necessidade de clonagem molecular. É amplamente utilizada em pesquisa básica, em medicina forense e no diagnóstico de doenças genéticas e infecciosas (Nascimento et al. 2003).

A utilização da PCR para diagnóstico das leishmanioses foi descrita primeiramente por Rodgers et al. (1990) e atualmente tem sido amplamente utilizada. Essa técnica possui a vantagem de empregar uma grande variedade de amostras biológicas como medula óssea, baço, linfondo, sangue total e pele. Existe necessidade também de uma boa padronização para este tipo de diagnóstico, pois uma série de variáveis, tais como: método empregado na extração de DNA, protocolo de amplificação, forma de detecção do material amplificado e possíveis contaminantes da PCR podem prejudicar o desempenho da técnica.

Um dos alvos mais utilizados para PCR no diagnóstico de *Leishmania* é a região conservada do minicírculo do cinetoplasto (kDNA). É característico das leishmanias e outros membros da ordem Kinetosplastidae, onde está contido cerca de 10 a 20% do DNA extracelular. O kDNA é uma rede enorme de DNA constituído de milhares de moléculas circulares em um arranjo conectado. É funcionalmente semelhante ao DNA mitocondrial e constituído por dois tipos de moléculas de DNA, os maxicírculos (25-50 cópias por célula) e minicírculos (20000-30000 cópias por célula). Os minicírculos possuem duas regiões: uma é denominada região conservada e a outra região variável. A região conservada do minicírculo de kDNA possui aproximadamente 150-200 pares de base (pb) e possui grande homologia dos nucleotídeos entre as diferentes espécies de *Leishmania*. Já a região variável possui entre 650-800 pb e apresenta alto grau de heterogeneidade não só entre espécies, mas também entre minicírculos de um mesmo parasito (Shapiro & Englund 1995). Devido ao alto número de cópias dos minicírculos de kDNA de *Leishmania* e ao alto grau de heterogeneidade, estes se tornaram um bom alvo para

técnicas de detecção e diferenciação molecular das leishmanias (Rodgers et al. 1990, Degraive et al. 1994).

Muitos trabalhos foram realizados utilizando a PCR do kDNA como ferramenta no diagnóstico molecular diferencial das leishmanias. Entretanto, outros alvos, tais como o gene da pequena subunidade do RNA ribossomal (SSU rRNA) (Van Eys et al. 1992), região ITS1 do gene rRNA (El Tail et al. 2000), gene hsp70 (Garcia et al. 2004), gene codificador para gp63 (Guerbouj et al. 2001) entre outros, também foram estudados e se revelaram alvos promissores na detecção e identificação de *Leishmania*.

#### 1.4.3 Polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (RFLP)

A descoberta das endonucleases, ou enzimas de restrição revolucionou a biologia molecular. Elas são divididas em várias classes, dependendo da estrutura, da atividade e dos sítios de reconhecimento e clivagem. As enzimas do Tipo II são as mais utilizadas na tecnologia do DNA Recombinante, pois são proteínas monoméricas ou diméricas e clivam o DNA no mesmo sítio do seu reconhecimento. Reconhecem sequências específicas de 4 a 8 pares de base (pb) na molécula de DNA e fazem dois cortes, um em cada fita (Nascimento et al. 2003).

A técnica de PCR-RFLP é baseada na amplificação pela PCR de um sítio específico do DNA e a subsequente digestão desse fragmento com diversas enzimas de restrição. O perfil de restrição normalmente é analisado em um gel de agarose ou poliacrilamida. Assim, através desta análise, espera-se identificar as diferentes espécies ou subtipos de parasitas. Muitos autores como Chicharro et al. (2002) utilizaram esta técnica para estudos de variabilidade em *Leishmania*.

Alguns alvos estão sendo utilizados para estes estudos, tais como: a região variável dos minicírculos do kDNA, pois conforme descrito anteriormente, esta região apresenta alto grau de heterogeneidade mesmo entre cepas da mesma espécie de *Leishmania*. Acredita-se que o DNA do cinetoplasto está mais propenso a mudanças (mutações) de maneira mais rápida do que o DNA nuclear, podendo mostrar um nível maior de polimorfismo dentro das espécies, o que o torna um bom alvo para caracterização de espécies do gênero *Leishmania* (Pacheco et al. 1986, Alonso et al. 2010)

O gene codificador para a glicoproteína de superfície de *Leishmania* spp. denominada gp63 também tem sido utilizado como alvo potencial para estudos de variabilidade. Segundo Hoya et al. (1999), a gp63 desempenha importante papel na virulência do parasito e também confere proteção ao mesmo contra estimulação do

sistema imune do hospedeiro. O gene da gp63 possui polimorfismos e sequências repetidas em tandem e a heterogeneidade destas sequências já foram descritas como bons alvos na identificação de espécies ou diferenciação de cepas de uma mesma espécie (Guerbouj et al. 2001, Elamin et al. 2008).

#### 1.4.4 Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD)

A técnica de RAPD consiste basicamente em uma variação do protocolo de PCR, entretanto com algumas características distintas, como por exemplo, utiliza apenas um único iniciador ao invés de um par deles. Este contém aproximadamente 10 a 15 bases, é uma sequência construída aleatoriamente, ou seja, não há necessidade de se conhecer previamente a sequência que se quer amplificar e nem suas extremidades, para que se possa sintetizar os iniciadores a elas complementares. A reação de amplificação utiliza condições de baixa estringência, para que este iniciador possa se ligar de forma arbitrária ao DNA molde (Willans et al. 1990, Welsh & McClelland 1990).

É considerado um método de baixo custo, sensível, rápido, relativamente simples e que revela vários locus dispersos pelo genoma. Assim, a técnica de RAPD apresenta muitas vantagens metodológicas que justificam sua utilização, tornando-a uma poderosa ferramenta para estudos genéticos em diferentes organismos. Entretanto, a RAPD, apresenta algumas desvantagens em relação a outras técnicas, entre as quais se destaca a baixa reprodutibilidade da técnica quando realizada em diferentes centros de pesquisa, sendo difícil a comparação dos resultados entre estes (Tibayrenc et al. 1993).

Alguns pesquisadores têm empregado a técnica de RAPD para identificar polimorfismo genético inter e intra-específico em parasitos do gênero *Leishmania* (Hide et al. 2001, Chicharro et al. 2002, Toledo et al. 2002, Zemanova et al. 2004, Botilde et al. 2006, Alvarenga 2007, Segatto et al. 2012).

#### 1.4.5 Análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites (MLMT)

Os microssatélites são pequenas sequências repetitivas em *tandem* (segmentos consecutivos) consistindo de unidades de aproximadamente 1-6 nucleotídeos, sendo flanqueadas por sequências conservadas para indivíduos da mesma espécie ou gênero. Esses marcadores exibem uma quantidade substancial de variabilidade em vários genomas eucariotos. Dessa forma, estão se tornando um dos principais marcadores moleculares para filogenia, genética de populações e epidemiologia molecular. (Tóth et al. 2000)

Segundo Rossi e colaboradores (1994), o genoma das espécies de *Leishmania* é considerado relativamente rico em microssatélites com cerca de 600 loci por genoma haplóide, sendo as repetições de dinucleotídeos CA as mais abundantes.

A técnica de MLMT consiste em analisar a variação no tamanho dos loci individuais após a amplificação com iniciadores que se anelam especificamente à região flanqueadora aos microssatélites (Kuhls et al. 2007, Segatto 2012). Vários pesquisadores têm desenvolvido painéis de marcadores que permitem o estudo de populações específicas de *Leishmania* (Jamjoom et al. 2002, Schwenkenbecher et al. 2004, Ochsenreither et al. 2006).

Assim, a MLMT tem se mostrado uma ferramenta promissora para estudos taxonômicos, epidemiológicos e de genética populacional em *Leishmania* e muitos pesquisadores tem utilizado esta metodologia para tais fins (Ochsenreither et al. 2006, Botilde et al. 2006, Kuhls et al. 2007, Cortes 2008, Alonso 2011, Kuhls et al. 2011, Segatto et al. 2012, Ferreira et al. 2012).

Essa metodologia possui a vantagem de ser simples e rápida na detecção de polimorfismos de microssatélites por PCR, possui boa reprodutibilidade, alto poder discriminatório entre amostras analisadas e é fácil de ser comparada entre diferentes centros de pesquisas. Ainda possui a vantagem de não precisar isolar os parasitos em cultura, sendo que os experimentos podem ser realizados partindo diretamente de amostras clínicas provenientes dos hospedeiros. Entretanto, possui a desvantagem de ainda ser uma metodologia de custo considerável e há necessidade de conhecer previamente a sequência que se quer amplificar e principalmente suas extremidades (Ochsenreither et al. 2006, Kuhls et al. 2007).

### 1.5 Variabilidade genética em *L. infantum* no Brasil

Diversos estudos têm sido realizados no intuito de compreender melhor a epidemiologia da leishmaniose visceral em diversas regiões do mundo, especialmente em áreas endêmicas para doença. Tem-se investigado a variabilidade genética intraespecífica em cepas de *L. infantum* e suas possíveis correlações com diferentes tipos de hospedeiros, diferentes origens geográficas, dinâmica de transmissão do parasito, disseminação da LV, virulência das diferentes cepas, resistência a drogas entre outros. No entanto, poucos utilizam um número representativo de amostras provenientes do Brasil.

Neste contexto, em 2007, Alvarenga avaliou a variabilidade genética intraespecífica de *L. infantum*, em amostras isoladas de casos humanos e de reservatórios



caninos, utilizando as técnicas de RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), PCR-RFLP (Reação em cadeia da polimerase seguida da técnica de polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição), SSR-PCR (PCR com iniciadores de repetições de sequências simples) e LSSP-PCR (PCR de único iniciador sob baixa estringência). Para isso, foram avaliadas 20 amostras provenientes da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e 20 amostras da Região do Mediterrâneo, Portugal. Desse estudo pôde ser concluído que as amostras foram geneticamente muito similares, independentemente da origem geográfica (Brasil e Portugal) e do ciclo de transmissão.

Alguns anos depois, Alonso e colaboradores (2010) estudaram variabilidade genética intraespecífica de *L. infantum* provenientes de casos humanos, caninos e flebotomínios (*Lutzomyia longipalpis*) de 40 amostras do município de Teresina, Piauí. Para tal estudo foi utilizada a técnica de PCR-RFLP tendo como alvo minicírculos do kDNA de *Leishmania*. As amostras deste estudo apresentaram um nível significativo de heterogeneidade genotípica. Em um trabalho mais recente de Alonso (2011), foi utilizada a mesma abordagem e técnica do trabalho anterior, porém foi adicionada a análise por genotipagem de microssatélites e sequenciamento do gene ITS (*Internal Transcribed Spacer*). O total de 88 amostras de Teresina foram comparadas com 54 amostras provenientes da cidade de Campo Grande, no estado de Mato Grosso do Sul e 15 amostras da cidade de Bauru, no estado de São Paulo. Neste trabalho pode-se concluir que houve uma correlação entre variabilidade genética e origem geográfica das amostras, já que a maioria das amostras ficaram separadas em dois grupos na análise por árvore filogenética. Um grupo foi composto somente por amostras de Teresina (PI) e o outro por amostras de Campo Grande (MS) e de Bauru (SP), visto que esses dois últimos estados são “vizinhos”. Esse resultado foi gerado principalmente pela técnica de PCR-RFLP dos minicírculos do kDNA, que neste trabalho também foi considerada a melhor técnica para estudar variabilidade genética de amostras geograficamente próximas.

Também em 2011, Coutinho e colaboradores avaliaram e compararam a variabilidade fenotípica de 153 amostras de *L. infantum* isoladas de cães oriundos dos municípios do Rio de Janeiro- RJ (57 amostras) e Belo Horizonte- MG (96 amostras) através da análise de eletroforese de isoenzimas (MLEE), padrão ouro para caracterização de espécies. Como resultado deste trabalho, todas as amostras analisadas apresentaram perfil eletroforético idêntico, sugerindo que as populações circulantes de *L. infantum* dos municípios citados anteriormente podem ser agrupadas num único zimodema (cepas que possuem o mesmo perfil isoenzimático).

Kuhls e colaboradores (2011) através da técnica MLMT estudaram a variabilidade intraespecífica de *L. infantum* a fim de compreender melhor as hipóteses existentes da origem da LV no Novo Mundo (Américas). Para isso 98 isolados de *L. infantum* de diferentes focos do Novo Mundo foram avaliados, sendo que 62 amostras eram provenientes do Brasil. Estas amostras foram comparadas a outras 308 amostras de *L. infantum* e 20 de *L. donovani*, que representavam populações já bem definidas do Velho Mundo (Europa, África e Ásia). A maioria das cepas de *L. infantum* do Novo Mundo foi agrupada em uma única população (População 1). Todas as cepas de *L. infantum* brasileiras foram agrupadas em uma única população, estas representavam 61% da amostra e eram provenientes de nove estados brasileiros, sendo eles: Rio de Janeiro, Espírito Santo, Ceará, Bahia, Pará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Piauí e Mato Grosso do Sul. Houve uma maior semelhança entre cepas do Novo Mundo com cepas do sudoeste europeu, quando comparadas a cepas de outras regiões do Velho Mundo, como a região do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central. Esses achados corroboram com a hipótese de que a *L. infantum* foi introduzida nas Américas, diversas vezes, a partir do sudoeste europeu na época das grandes navegações.

Outro trabalho utilizando amostras do Brasil foi realizado por Segatto e colaboradores em 2012. Neste estudo, a diversidade genética das amostras foi avaliada através das técnicas RAPD, SSR-PCR e análise por MLMT. Foram utilizadas 53 amostras, sendo que 49 eram amostras de *Leishmania* isoladas de casos humanos e 4 de casos caninos. Essas amostras eram provenientes de cinco estados do Brasil, sendo eles: Espírito Santo (5 amostras), Maranhão (7 amostras), Minas Gerais (20 amostras), Paraíba (8 amostras) e Piauí (13 amostras). Neste estudo concluiu-se que houve uma baixa diversidade genotípica entre amostras das diversas regiões do Brasil. Entretanto, os perfis gerados com as técnicas de RAPD e SSR-PCR permitiram a formação de grupos de acordo com a região geográfica dos isolados. No perfil apresentado na árvore filogenética, as amostras de Minas Gerais e Espírito Santo ficaram mais próximas, assim como as amostras do Piauí, Maranhão e Paraíba. Também neste trabalho não foi possível relacionar a variabilidade genética com o tipo de hospedeiro (humanos e cães).

Em trabalho recente, Ferreira e colaboradores (2012) utilizaram 14 marcadores de microsatélites para avaliar a estrutura populacional de cepas de *L. infantum* isoladas de diferentes hospedeiros: humanos (84 amostras), cães (87 amostras), gambá (*Didelphis marsupialis*) (1 amostra) e raposa (*Cerdocyon* sp.) (1 amostra). Estas amostras eram provenientes da cidade de Assunção, capital do Paraguai (11 amostras) e da maioria das

regiões endêmicas para LV no Brasil (162 amostras). No Brasil, as amostras eram provenientes do Distrito Federal e diferentes estados, sendo eles: Amazonas, Bahia, Ceará, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Sergipe e São Paulo. Os resultados mostram uma baixa diversidade genética entre as amostras, sugerindo que a forma principal de reprodução dos parasitos ainda é clonal. Entretanto também foi possível observar neste estudo sinais de reprodução sexual, pois através de valores estatísticos pode se perceber que dois locus da POP1 e um da POP3 apresentavam altos níveis de heterozigose e esta característica já foi associada em estudos prévios, como indicador da existência de troca genética entre os parasitas. Três populações puderam ser identificadas a partir da análise de agrupamento, que apresentou uma boa inferência estatística F e parcialmente corrobora a hipótese de variabilidade genética estar relacionada à distância geográfica. Cepas originárias de um surto de LV canina no Sul do Brasil ficaram agrupadas na POP1 juntamente com as cepas provenientes do Paraguai, o que corrobora para a hipótese da dispersão dos parasitos ter ocorrido do nordeste da Argentina e Paraguai. Ainda a distribuição de LV no Mato Grosso do Sul parece ter seguido a direção oeste-leste, juntamente com a existência do gasoduto Bolívia-Brasil, no município de Corumbá. Esta distribuição sugere que os genótipos que inicialmente formam a POP3 podem estar associados a presença do vetor *Lutzomyia cruzi*, o qual é o principal vetor para LV em Corumbá.

Também em trabalho recente, Batista e colaboradores (2012) fizeram uma avaliação da diversidade genética de *L. infantum* em 44 amostras de cães provenientes de Jequié-BA (20 amostras) e Campo Grande-MS (24 amostras). Para esta avaliação foram utilizadas a técnica de RAPD e MLMT. Houve uma baixa variabilidade genética encontrada nas amostras analisadas neste trabalho e estes achados corroboram com a hipótese de que *L. infantum* foi recentemente introduzida nas Américas, juntamente com as grandes navegações, e este tempo ainda não foi o suficiente para a espécie se diversificar geneticamente de forma significativa.

Devido à relevância da leishmaniose visceral no país, novos estudos de variabilidade genética de *L. infantum* com um maior número de amostras, de diferentes localidades, devem ser realizados. Visto que os resultados dos estudos já existentes nessa linha de pesquisa tem sido promissores e gradualmente vem contribuindo para um melhor entendimento da epidemiologia das leishmanioses no Brasil.

## 2.0 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose visceral (LV) ocorre em grandes centros urbanos do Brasil, desde a década de 1980. Atualmente, a incidência média da doença é de 2,0 casos/100.000 habitantes. Segundo dados do Ministério da Saúde entre o período de 2001 a 2009 foram notificados 30.373 casos autóctones de LV, o que resulta uma média anual de 3.375 casos. Desse total de casos, 12,9% ocorreu no estado de Minas Gerais (Brasil 2009, OMS 2010).

O primeiro caso autóctone na Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), Minas Gerais, ocorreu em 1993, em Sabará. A partir daí, a doença se expandiu para Belo Horizonte e outras áreas da RMBH. Segundo Luz et al. (2001), no município de Belo Horizonte (BH), o número de casos de LV tem se elevado a cada ano desde 1994. No período de 1994 a 2011 foram confirmados 1.527 casos de LV, com ocorrência de 204 óbitos. A incidência da doença neste período variou de 1,2 a 7,2/100.000 habitantes. Atualmente a LV se distribui em todo o município, de maneira desigual.

Em 2011, de acordo com a Gerência de Epidemiologia e Informação (GEEPI) da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte (SMSA/PBH) a taxa de letalidade foi de 16,1%. O grande número de óbitos tem contribuído para que BH tenha uma das maiores taxas de letalidade do país.

Além de Belo Horizonte, outras cidades que pertencem a RMBH também apresentam crescimento no número de casos de LV e altas taxas de letalidade da doença. Em Contagem, por exemplo, registrou-se uma elevação no número de casos confirmados de LV a partir de 2004, semelhante ao que ocorre na região metropolitana de Belo Horizonte. O número de casos em Contagem no período 1999-2009 variou de um (2000 e 2003) a 23 (2008). Em 2001, houve um óbito por LV e no período de 2004-2009 houve registro de pelo menos um óbito, em cada ano (SMS/PMC).

Entre os anos de 2007 a 2012, altas taxas de letalidade foram registradas em algumas cidades da RMBH, entre elas, Betim (11,8%), Ribeirão das Neves (10,8%), Ibirité (9,2%) e Contagem (9,1%).

Além dos casos humanos deve-se também levar em consideração os casos caninos de LV na RMBH. Segundo Fiuza et al. (2008) e Araújo et al. (2012) o município de Belo Horizonte possui alta positividade canina, sendo que entre os anos de 1996 e 2007 houve uma variação de 4,3 a 9,3%. O estudo de Oliveira et al. (2001) avaliou a distribuição espacial da LV em Belo Horizonte (BH) no período de 1994 a 1997. Observaram que os casos humanos ocorreram em áreas com elevada densidade de cães sororreagentes.

Margonari et al. (2006), utilizando técnicas de análise espacial, definiram locais de concentração de leishmaniose canina em BH e demonstraram que 84,2% dos casos humanos estavam relacionados aos casos caninos.

Ainda deve-se levar em consideração o aparecimento da AIDS, na década de 80, e sua rápida disseminação. A partir de então foi observada a presença de co-infecção entre o vírus HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e *Leishmania* spp. Segundo a Organização Mundial de Saúde a co-infecção *Leishmania*/HIV é considerada como doença emergente e crescente em vários países do mundo. Tem se observado que a forma visceral é mais frequente nos casos de co-infecções, apesar de formas cutâneas também já terem sido descritas (Lindoso et al. 2009, Lindoso & Lindoso 2009). No Brasil, estima-se que 620.000 pessoas estejam infectadas pelo HIV, o que corresponde a um terço da infecção na América do Sul (Alvar et al. 2008). A infecção pelo HIV aumenta o risco de desenvolvimento de LV de 100 para 2.320 vezes em áreas endêmicas e, por outro lado, a LV promove a progressão clínica da AIDS (Cota et al. 2011). Neste contexto, a co-infecção *Leishmania*/HIV vem ganhando importância sendo considerada um padrão de doença grave, inclusive na RMBH.

Muitos trabalhos tem sido realizados no intuito de verificar a diversidade genética de *L. infantum* (Ochsenreither et al. 2006, Alvarenga 2007, Kuhls et al. 2007, Alonso et al. 2010, Alonso 2011, Kuhls et al. 2011, Segatto et al. 2012, Ferreira et al. 2012, Batista et al. 2012) e compreender melhor sobre a epidemiologia da doença, mas poucos trabalhos abordaram a região metropolitana de Belo Horizonte, Brasil (Coutinho et al. 2011, Alvarenga 2007). Nesse contexto, um estudo que busca avaliar se há variabilidade genética de *L. infantum* proveniente de diferentes amostras humanas e de cães do município de Belo Horizonte e outras cidades próximas, poderá contribuir para o melhor entendimento de sua epidemiologia, dado sua relevância no município, bem como aos altos índices de letalidade humana e prevalência canina.

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar a variabilidade intraespecífica de *L. infantum* em amostras de casos humanos e caninos pela técnica de PCR-RFLP para os alvos kDNA e gp63.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de polimorfismos no DNA de *L. infantum* pela técnica de PCR-RFLP com os alvos kDNA e gp63;
- Determinar as relações fenéticas entre amostras de cães e humanos usando a taxonomia numérica para agrupar amostras com características semelhantes;
- Associar a existência da diversidade genética com fatores epidemiológicos da LV humana, tais como: localização geográfica, hospedeiro, idade, sexo e presença de co-infecção *Leishmania*/HIV.

## 4.0 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Municípios de seleção das amostras

As amostras foram selecionadas de casos de leishmaniose visceral humana e canina que ocorreram em municípios do estado de Minas Gerais. Entre os municípios de ocorrência dos casos, cinco pertencem a Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH), constituída por 34 municípios com uma área de aproximadamente 9.467.797 Km<sup>2</sup>. As amostras estudadas foram selecionadas de cinco municípios, que são: Belo Horizonte, Betim, Contagem, Ibirité e Ribeirão das Neves.

Foram incluídas também uma amostra proveniente de Minas Novas (Vale do Jequitinhonha) e uma amostra de Aimorés (Vale do Rio Doce). (Figura 1) Estas duas amostras foram obtidas de casos humanos hospitalizados em Belo Horizonte.

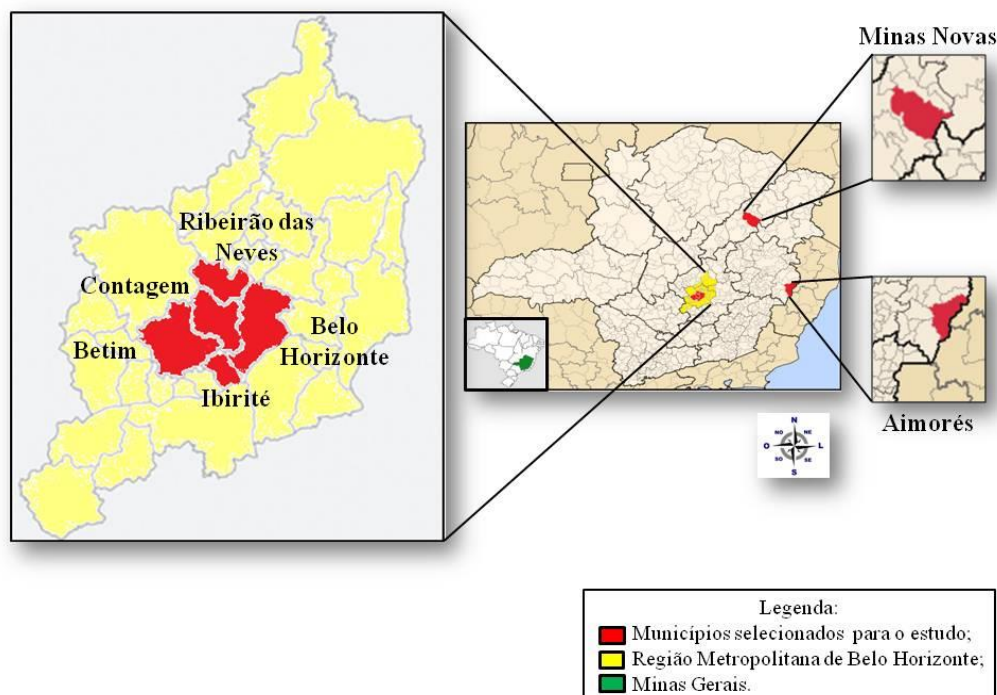


Figura 1: Municípios de seleção das amostras.

### 4.2 Amostras clínicas e de cultura de *L. infantum*

Para este trabalho foram utilizadas 35 amostras clínicas (sangue total, aspirado de medula óssea ou biópsia de baço) e 12 amostras de cultura de *L. infantum* provenientes de casos humanos e caninos. As amostras eram provenientes de três grupos diferentes: crianças (n=18), adultos (n=16) e cães (n=13), todos sintomáticos para LV. Entre os

adultos existiam também indivíduos co-infectados *Leishmania*/HIV. As amostras de humanos (crianças e adultos) pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Pesquisas Clínicas (LPC) do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ), onde os experimentos foram realizados. As amostras de cães pertencem ao banco de amostras do Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

No grupo das crianças foram utilizadas amostras de 18 indivíduos, sendo uma amostra de cultura de *L. infantum* isolada por meio de punção de medula óssea e 17 eram amostras clínicas de sangue total ou aspirado de medula óssea. Nove indivíduos eram do sexo masculino e nove do sexo feminino. Dez amostras eram do município de Belo Horizonte e as demais de outros municípios da RMBH (Tabela 1). A média da idade dos indivíduos deste grupo foi 4,5 anos.

No grupo dos adultos foram utilizadas amostras de 16 indivíduos, sendo que seis eram amostras de cultura *L. infantum* isoladas através de punção de medula óssea e dez eram amostras clínicas de sangue total ou aspirado de medula óssea. Doze indivíduos eram do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Das dezesseis amostras, dez são de indivíduos que apresentam a co-infecção *Leishmania*/HIV e seis de indivíduos sintomáticos apenas para leishmaniose visceral. Nove amostras eram provenientes do município de Belo Horizonte e as demais dos outros municípios da RMBH (Tabela 2). Neste grupo foram incluídas as amostras provenientes dos municípios de Minas Novas, isolada de um adolescente de 14 anos do sexo feminino; e de Aimorés, isolada de um adulto de 39 anos, do sexo masculino. A média da idade dos casos deste grupo foi 37,2 anos.



Tabela 1: Características relacionadas ao grupo das crianças, tipo de amostra utilizada na identificação molecular do estudo.

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Cidade	Tipo de amostra
CR <sup>a</sup> 1	M <sup>b</sup>	7	Belo Horizonte	MO <sup>c</sup>
CR2	F <sup>d</sup>	1	Belo Horizonte	CL <sup>e</sup>
CR3	F	6	Contagem	MO
CR4	M	2	Contagem	MO
CR5	F	4	Ribeirão das Neves	MO
CR6	M	7	Ribeirão das Neves	MO
CR7	M	3	Belo Horizonte	ST <sup>f</sup>
CR8	M	2	Belo Horizonte	ST
CR9	M	6	Belo Horizonte	ST
CR10	M	5	Belo Horizonte	ST
CR11	F	3	Belo Horizonte	ST
CR12	F	1	Belo Horizonte	MO
CR13	F	5	Belo Horizonte	ST
CR14	F	4	Belo Horizonte	MO
CR15	M	5	Ribeirão das Neves	MO
CR16	F	7	Betim	MO
CR17	M	5	Ibirité	MO
CR18	F	8	Ribeirão das Neves	MO

<sup>a</sup>CR: Criança; <sup>b</sup>M: Masculino; <sup>c</sup>MO: Aspirado de medula óssea; <sup>d</sup>F: Feminino; <sup>e</sup>CL: Cultura de *L.infantum*, <sup>f</sup>ST: Sangue total.

Tabela 2: Características relacionadas ao grupo de adultos, presença da co-infecção *Leishmania*/HIV, tipo de amostra utilizada na identificação molecular do estudo.

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Cidade	HIV	Tipo de amostra
AD <sup>a</sup> 1	F <sup>b</sup>	14	Minas Novas	Negativo	CL <sup>c</sup>
AD2	M <sup>d</sup>	53	Ibirité	Positivo	CL
AD3	M	30	Belo Horizonte	Positivo	CL
AD4	M	44	Ibirité	Positivo	CL
AD5	M	39	Aimorés	Negativo	CL
AD6	M	38	Contagem	Positivo	CL
AD7	M	54	Belo Horizonte	Negativo	MO <sup>e</sup>
AD8	M	50	Belo Horizonte	Positivo	ST <sup>f</sup>
AD9	M	51	Belo Horizonte	Positivo	ST
AD10	F	37	Belo Horizonte	Positivo	MO
AD11	M	41	Belo Horizonte	Positivo	ST
AD13	F	20	Belo Horizonte	Negativo	ST
AD15	M	34	Contagem	Positivo	ST
AD16	M	37	Contagem	Negativo	ST
AD18	M	20	Belo Horizonte	Positivo	MO
AD19	F	33	Belo Horizonte	Negativo	MO

<sup>a</sup>AD: Adulto; <sup>b</sup>F: Feminino; <sup>c</sup>CL: Cultura de *L.infantum*; <sup>d</sup>M: Masculino; <sup>e</sup>MO: Aspirado de medula óssea; <sup>f</sup>ST: Sangue total

No grupo dos cães foram utilizadas amostras de treze animais, sendo que cinco eram culturas de *L. infantum* isoladas através de punção de medula óssea e oito eram amostras clínicas de biópsia de baço. Todas as amostras de cães foram provenientes do município de Belo Horizonte.

Para o presente estudo todas as amostras foram analisadas por técnicas moleculares (PCR-RFLP) (Figura 2). As amostras de cultura de *Leishmania*, além da análise molecular, foi feita a classificação segundo a espécie realizada na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC), pela técnica de MLEE, de acordo com protocolo estabelecido por Cupolillo et al. (1994). A CLIOC possui um painel com diversos sistemas enzimáticos, tais como: G6PDH/ Glicose 6-fosfato-desidrogenase e 6PGDH/6-fosfo-glico-desidrogenase, que foram usados nas amostras deste estudo. Todas as amostras foram caracterizadas como *L. infantum* (Anexo 1).

As amostras clínicas (sangue total, aspirado de medula óssea e biópsia de baço) foram amplificadas para a região do kDNA com os iniciadores MC1 e MC2, seguindo protocolo descrito por Cortes et al. 2004. Esses iniciadores são específicos para o complexo *Leishmania donovani*, assim conclui-se que para todas as amostras clínicas havia DNA proveniente de *L. infantum*, visto que originam do estado de Minas Gerais/Brasil, aonde a única espécie circulante do complexo *Leishmania donovani* é a *L. infantum*.

#### 4.3 Delineamento do estudo

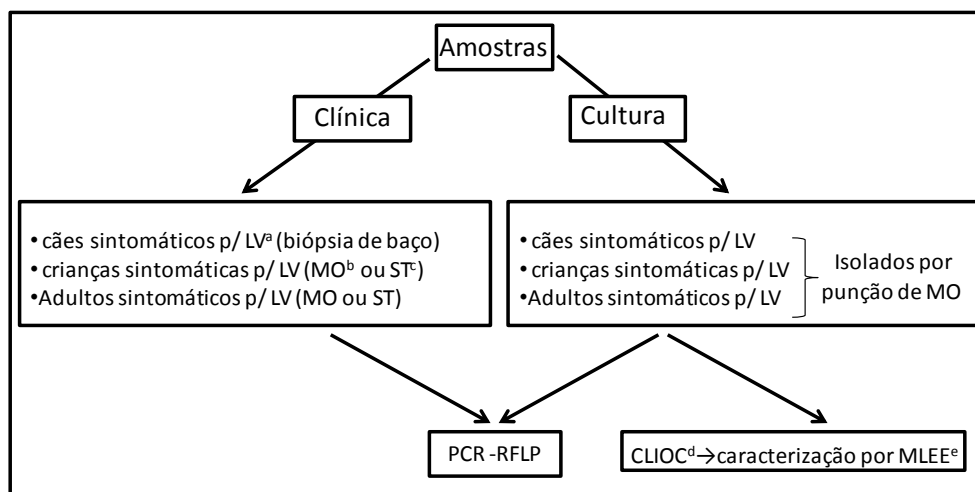


Figura 2: Delineamento do estudo. <sup>a</sup>Leishmaniose visceral; <sup>b</sup>Aspirado de medula óssea; <sup>c</sup>Sangue total; <sup>d</sup>Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz; <sup>e</sup>Análise por isoenzimas.

#### 4.4 Obtenção de massa de promastigotas de *L. infantum*

Alíquotas de cultura de promastigotas de *L. infantum* foram isoladas através de punção de medula óssea tanto de humanos quanto de cães. Algumas amostras estavam criopreservadas no LPC e no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, respectivamente, outras encontravam-se viáveis em ambos os laboratórios. As amostras que encontravam-se congeladas, foram descongeladas para obtenção das culturas.

Todas estas amostras foram cultivadas em meio de cultura LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino inativado e meio NNN-sangue (ágar bacteriológico com sangue de coelho desfibrinado). Após aproximadamente 45 dias de cultivo foi possível obter volume suficiente para a obtenção de alíquotas do cultivo que foram usadas na análise isoenzimática pela técnica MLEE e na análise molecular, esta última após extração do DNA genômico.

#### 4.5 Extração do DNA

O DNA total das amostras clínicas (sangue total, aspirado de medula óssea e biópsia de baço) e o DNA genômico de cultura de *L. infantum* foram extraídos com uso do kit “DNA QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as especificações do fabricante. Controles negativos do processo de extração de DNA foram realizados para cada ensaio mediante a adição de todos os reagentes, exceto a amostra. O rendimento da extração foi determinado com a leitura da absorbância a 260nm em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). A razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$  foi calculada para verificar a pureza do DNA obtido.

#### 4.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para este estudo dois alvos de DNA de *L. infantum* foram usados na reação de PCR, sendo eles: regiões do minicírculo de kDNA e região intragênica da glicoproteína gp63.

A reação específica para as regiões dos minicírculos do kDNA foi descrita segundo Cortes et al. (2004), porém com algumas modificações. Os iniciadores utilizados foram MC1 (5' GTTAGCCGATGGTGGTCTTG 3') e MC2 (5' CACCCATTTTCCGATTTTG 3'). Estes amplificam uma sequência com 447 pares de base (pb), dos quais 38 pb pertencem à região conservada do minicírculo e o restante

à região variável. A reação foi preparada para um volume final de 100µl, contendo 5-10µl de DNA (volume suficiente para completar 50ng do DNA), 3 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCL - Invitrogen), 0,6 µM de cada iniciador, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,4mM de dNTPs (Promega, WI, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma etapa inicial de 94° C por 2 minutos e 35 ciclos a 94 °C por 20 segundos, 58 °C por 20 segundos e 72°C por 30 segundos. Uma etapa final de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionada.

A reação de PCR específica para região intragênica da glicoproteína gp63 foi descrita segundo Guerbouj et al. (2001), porém com algumas modificações. Os iniciadores utilizados foram SG1 (5' GTCTCCACCGAGGACCTCACCGA3') e SG2 (5'TGATGTAGCCGCCCTCCTCGAAG 3'). Estes iniciadores amplificam uma sequência de 1330pb. A reação foi preparada para um volume final de 40µl, contendo aproximadamente 4µl de DNA (volume suficiente para completar 30ng do DNA), 1,5 unidades de Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1X PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCL - Invitrogen), 0,6 µM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,2 mM de dNTPs (Promega, WI, EUA). O programa de ciclagem consistiu de uma etapa inicial de 94° C por 4 minutos e 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 67 °C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão de 72°C por 8 minutos foi adicionada.

Após a amplificação, 5 µL dos produtos de amplificação de ambas as reações foram fracionados em gel de poliacrilamida a 6% e submetidos a eletroforese a 150V por 50min. As bandas foram visualizadas pela coloração com nitrato de prata 0,2%. O restante dos produtos de amplificação foi conservado a -20°C até o momento da análise por restrição enzimática.

Para todos os ensaios foram incluídos controles negativos da PCR (mix da PCR sem o DNA), controles negativos da extração de DNA (mix da PCR com o controle negativo da extração do DNA) e controles positivos da PCR (DNA extraído de promastigotas de *L. infantum* da amostra referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV).

#### 4.6.1 Desempenho dos métodos – limite de detecção

Para determinar o limite de detecção do ensaio de PCR para o alvo kDNA e para o alvo da região intragênica da glicoproteína gp63, o DNA genômico da amostra referência de *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) foi diluído em série (1:10).

#### 4.7 Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (RFLP)

Para digestão do fragmento de 447pb do kDNA foram utilizadas cinco endonucleases: VspI, DdeI, HpaII, BglII, RsaI (Promega, WI, EUA) (Tabela 3) e para a digestão do fragmento de 1330pb da região intragênica da glicoproteína gp63 foram utilizadas 2 endonucleases: HincII e TaqI (Promega, WI, EUA) (Tabela 3). A Figura 3 mostra os mapas de restrição enzimática dos fragmentos de DNA construído com o Programa NebCutter V2.0, com as sequências nucleotídicas correspondentes ao kDNA e gp63 depositadas no GenBank sob números de acesso: AF103741.1 e U48798.1, respectivamente. Não foi possível visualizar um mapa de restrição enzimática para a endonuclease BglII analisada para os minicírculos do kDNA, já que este fragmento não possui sítio de ligação específico para esta enzima.

As reações para cada enzima foram realizadas separadamente em um volume final de 20µL. Todas as reações continham 15µL do produto de amplificação, 5U da enzima de restrição, tampão 1X específico para cada enzima usada e 1µg de BSA. As reações de todas as enzimas, exceto a TaqI, foram submetidas a incubação a 37°C (temperatura ótima para atuação dessas enzimas) por 3 horas e 30 minutos, seguido de 10 minutos a 65°C (desativação da enzima), conforme o protocolo do fabricante. As reações com a enzima TaqI foram submetidas a incubação a 65°C (temperatura ótima para atuação dessa enzima) por 3 horas e 30 minutos.

Tabela 3: Enzimas de restrição utilizadas na PCR-RFLP com seus respectivos sítios de restrição

Enzimas utilizadas para o alvo kDNA	
Enzima de Restrição	Sítio de Restrição
VspI	5' AT▼TA AT 3' 3' TA AT▲TA 5'
DdeI	5' C▼TNA G 3' 3' G ANT▲C 5'
HpaII	5' C▼CG G 3' 3' G GC▲C 5'
BglII	5' A▼GATC T 3' 3' T CTAG▲A 5'
RsaI	5' GT▼AC 3' 3' CA▲TG 5'
Enzimas utilizadas para o alvo gp63	

Enzima de Restrição	Sítio de Restrição
HincII	5' GT(T/C)▼(A/G)AC 3' 3' CA(A/G)▲(T/C)TG 5'
TaqI	5' T▼CG A 3' 3' A GC▲T 5'

Após a etapa de restrição enzimática, 13 µL dos produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%, que apresentava 1,5mm de espessura, 16cm de altura e 14cm de comprimento. Em cada gel de poliacrilamida a 6% foi possível utilizar 15 canaletas, sendo que em todos os géis foram adicionados 2 padrões de tamanho molecular: 100pb e Phixφ174 ambos da marca Promega. A eletroforese foi padronizada para ser realizada em 2h45min a 150v na cuba “SE 400 Vertical Unit” (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, US). Após esta etapa, os géis de poliacrilamida a 6% foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados em fotodocumentador L-Pix Ex (Loccus Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

A imagem dos géis foram analisadas no programa GelAnalyzer 2010. Este programa está disponível em: <http://www.gelanalyzer.com> e foi usado para detectar bandas nos géis e estimar com maior precisão o tamanho dos fragmentos analisados. Este programa possui diversas ferramentas para melhorar a qualidade da imagem do gel e minimizar problemas ocorridos durante a eletroforese, permitindo que a análise seja mais válida e menos subjetiva.

Adicionalmente, após a restrição enzimática algumas amostras de cada grupo foram analisadas no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemanha). Este equipamento possui a capacidade de detectar e separar com precisão, fragmentos de DNA com tamanhos moleculares próximos pelo uso de eletroforese capilar em microchip e detecção de fluorescência induzida a laser. Esta técnica é considerada eficiente, sensível e precisa. Estabelece com precisão o tamanho dos fragmentos analisados.

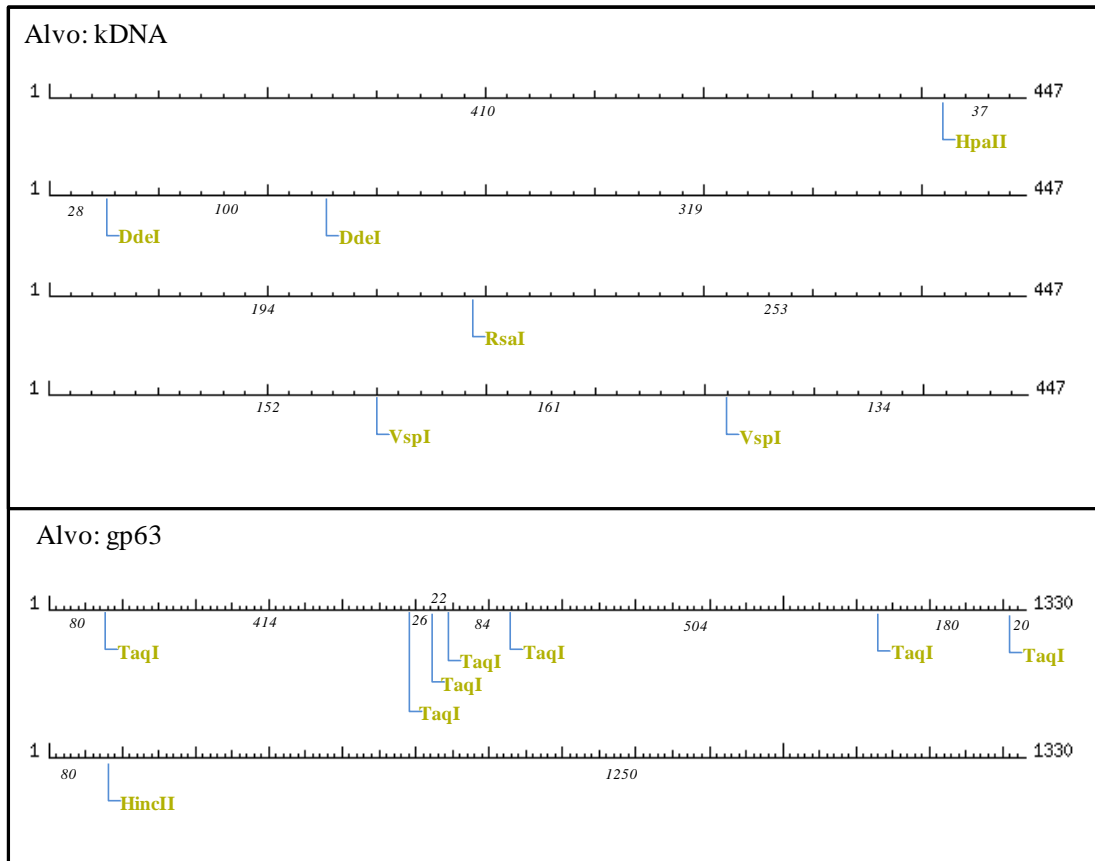


Figura 3: Mapas de restrição enzimática dos fragmentos kDNA e gp63.

#### 4.8 Teste padrão com uso de amostras referência

Como padrão de referência para a reação de PCR-RFLP foram utilizados cinco amostras de cultura (Tabela 4) que eram mantidas criopreservadas no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ. Foram realizados experimentos como extração do DNA (descrito no item 4.5), reação em cadeia da polimerase para os alvos kDNA e gp63 (descrito no item 4.6) e a técnica de polimorfismo por tamanho de fragmento de restrição (descrito no item 4.7) com todas as cepas referência (Tabela 4).

Tabela 4: Cepas referências utilizadas no trabalho como padrão referência na reação de PCR-RFLP

Identificação	Espécie	Código Internacional
Cepa Referência nº1 (Ref1)	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/2002/LPC-RPV
Cepa Referência nº2 (Ref2)	<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	MHOM/BR/1974/PP75
Cepa Referência nº3 (Ref3)	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	MHOM/ET/1967/HU3
Cepa Referência nº4 (Ref4)	<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	IFLA/BR/1967/PH-8
Cepa Referência nº5 (Ref5)	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	MHOM/BR/75/M2903

#### 4.9 Análise de sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper”

Foi utilizado o banco de dados Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para busca de sequências de nucleotídeos correspondente aos alvos do trabalho: kDNA e região intragênica da glicoproteína gp63. Para isso, foram usadas as sequências dos iniciadores correspondentes MC1 e MC2, bem como os iniciadores SG1 e SG2, descritos anteriormente. Foram usadas apenas sequências que obedeciam aos parâmetros de qualidade: alto grau de identidade (aproximadamente 100%) com os iniciadores e ao organismo *Leishmania*. Os dados das sequências escolhidas encontram-se nas Tabelas 5 e 6.

Posteriormente, estas sequências nucleotídicas foram digeridas *in silico* no programa “RestrictionMapper version 3” disponível em: <http://www.restrictionmapper.org/>. Neste programa existe um painel de enzimas disponíveis para digestão virtual. Dessa forma, foram escolhidas as mesmas enzimas utilizadas nos experimentos laboratoriais: VspI, DdeI, HpaII, BglII, RsaI para o alvo kDNA e HincII e TaqI para o alvo gp63. Após a restrição, o programa gera o tamanho exato dos fragmentos obtidos. Estas sequências foram utilizadas para serem comparadas com as amostras do estudo na análise por fenograma. Estas sequências não correspondem aos critérios estabelecidos para seleção das amostras biológicas deste trabalho, como por exemplo, pertencer ao estado de Minas Gerais. As sequências correspondentes às regiões dos minicírculos do kDNA são de amostras de *L. infantum* de diferentes países, correspondentes à amostras da África, América Central e Sul, além da Europa (Tabela 5).

Foram também utilizados perfis de restrição encontrados para amostras descritas na literatura em artigos que foram usados como referência para este estudo (Cortes et al. 2006, Cortes 2008, Guerbouj et al. 2001), e incluídos na análise por fenograma para comparação com os resultados obtidos em experimentos realizados no laboratório.



Tabela 5: Dados das sequências nucleotídicas depositadas no GenBank para o alvo kDNA que foram selecionadas para análise por fenograma.

Número de Acesso e Identificação	Espécie	Descrição	Query Coverage	Max Ident	País/Continente
AF169140.1 (GenBank1)	<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	100%	Tunísia África do Norte
AF169133.1 (GenBank2)	<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , cepa MHOM/DZ/85/LIPA141, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	100%	Algéria África do Norte
AF103741.1 (GenBank3)	<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , cepa MCAN/TN/78/LEM78, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	100%	Tunísia África do Norte
AF169131.1 (GenBank4)	<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , cepa MCAN/PT/88/REBELO2, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	95%	Portugal Sudoeste da Europa
AF103740.1 (Genbank5)	<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , cepa MHOM/UK/88/CILLONICZ, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	95%	Reino Unido Noroeste da Europa
AJ010077.2 (GenBank6)	<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i> , minicírculo do DNA do cinetoplasto, isolado MHOM/SD/85/FORSTER, clone 14	100%	100%	Sudão África
AF103739.1 (GenBank7)	<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i> , cepa MHOM/BR/74/PP75, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	100%	Nordeste do Brasil Ámerica do Sul
AF169137.1 (GenBank8)	<i>L. chagasi</i>	<i>Leishmania chagasi</i> , cepa MHOM/PA/79/WR317, minicírculo do DNA do cinetoplasto, sequência completa	100%	100%	Panamá Ámerica Central

Tabela 6: Dados das sequências nucleotídicas depositadas no GenBank para o alvo gp63 selecionadas para análise por fenograma.

Número de Acesso e Identificação	Espécie	Descrição	Query Coverage	Max Ident
Y08156.1 (GenBank1)	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i> , gene que codifica a glicoproteína Gp63	100%	100%
Z83677.1 (GenBank2)	<i>L.infantum</i>	<i>L.infantum</i> , gene da GP63	100%	100%
U48798.1 (GenBank3)	<i>L.infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , glicoproteína de superfície gp63, gene (gp63), cds completos	100%	100%
XM_001463660.2 (Genbank4)	<i>L.infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i> , JPCM5 GP63, leishmanolysin (GP63-4) mRNA, cds completos	100%	100%
AJ495003.1 (GenBank5)	<i>L.donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i> , mspC gene para GP63, cepa MHOM/KE/1954/LRC-L53	100%	100%
AJ495006.1 (GenBank6)	<i>L.donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i> , mspC gene para GP63, cepa MCAN/IQ/1977/Bumm3	100%	100%
AJ495004.1 (GenBank7)	<i>L.donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i> , mspC gene para GP63, cepa MHOM/CN/0000/WangJie1	100%	100%

#### 4.10 Análise

Inicialmente, cada padrão de restrição resultante da hidrólise dos produtos da PCR pelas endonucleases foi analisado visualmente em géis de poliácridamida 6%. Em seguida, as imagens dos géis foram avaliadas com o programa GelAnalyzer ([www.gelanalyzer.com](http://www.gelanalyzer.com)) para determinar, com precisão, o tamanho dos fragmentos observados. Estes padrões de bandas foram utilizados para a determinação de perfis ou genótipos e interpretados através de análise qualitativa. Cada perfil de restrição foi inserido em uma matriz binária, onde as bandas visualizadas no gel foram codificadas como presentes (1) ou ausentes (0) em cada isolado. A partir da matriz binária, foram geradas 100 novas matrizes binárias fictícias através de embaralhamento dos perfis obtidos por meio do programa SEQBOOT (PHYLIP - Phylogeny Inference Package - <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). A partir de cada uma das matrizes binárias, foi obtida uma matriz de distância com o programa RESTDIST (PHYLIP) em modo *restriction fragments*. Em seguida foram construídas árvores para inferir relações filogenéticas entre os isolados, com o programa NEIGHBOR (PHYLIP) no modo

UPGMA. A partir das 100 árvores geradas, foi obtida uma árvore consenso com o programa CONSENSE (PHYLIP). A topologia da árvore consenso, com os valores de suporte dos nós foi visualizada com o programa MEGA (<http://www.megasoftware.net/>).

#### 4.11 Considerações éticas

O uso das amostras clínicas de aspirado de medula óssea, sangue total, biópsia de baço e de cultura de *L. infantum* no presente estudo foi submetido à análise do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, que conjuntamente com as outras instituições envolvidas no trabalho: Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ e Universidade Federal de Ouro Preto gerou o protocolo de aprovação CAEE-03904112.0.0000.5149 (Anexo 2).

## 5.0 RESULTADOS

### 5.1 Produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

#### 5.1.1 Produtos da PCR da região do minicírculo do kDNA.

Todas as 47 amostras utilizadas para este estudo (amostras clínicas e amostras de cultura de *L. infantum*) foram amplificadas para região de minicírculo do kDNA, utilizando os iniciadores MC1 e MC2 descrito por Cortes e colaboradores em 2004. Todas as amostras apresentaram um fragmento de 447pb (Figura 4).

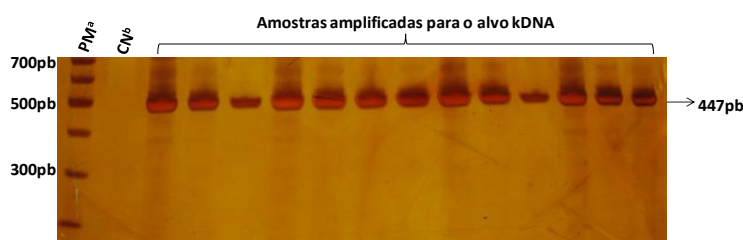


Figura 4: Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb) em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular→ 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup>Controle Negativo da PCR.

#### 5.1.2 Produtos da PCR da região intragênica da glicoproteína gp63.

Todas as 47 amostras utilizadas para este estudo (amostras clínicas e amostras de cultura de *L. infantum*) foram amplificadas para região intragênica da glicoproteína gp63, utilizando os iniciadores SG1 e SG2 descrito por Guerbouj e colaboradores em 2001. Todas as amostras apresentaram um fragmento de 1330pb (Figura 5).

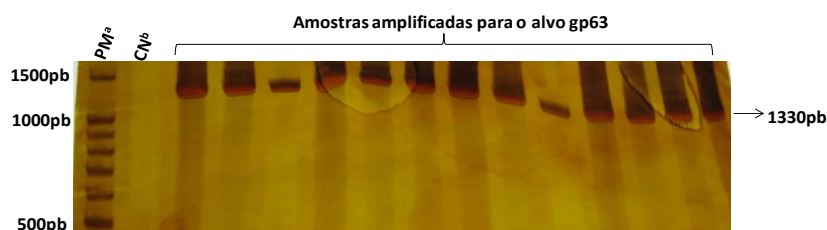


Figura 5: Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb) em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular→ 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup>Controle Negativo da PCR.

### 5.2 Desempenho dos métodos – limite de detecção

O ensaio de PCR para o alvo kDNA apresentou limite de detecção de 1 pg de DNA genômico da amostra referência de *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) diluído em série (1:10) (Figura 6).

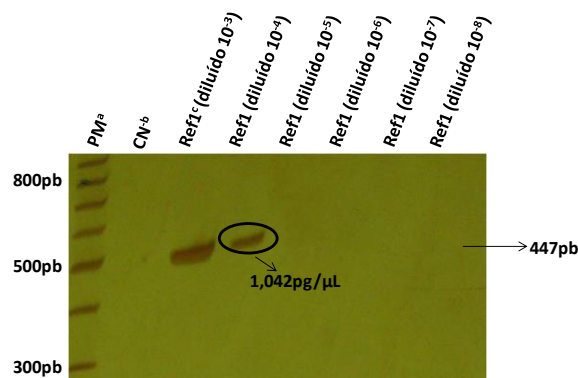


Figura 6: Limite de detecção do ensaio de PCR para o alvo kDNA/Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb) em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup>Controle Negativo da PCR; <sup>c</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV (dosagem do DNA total: 10,42ng/μL).

O ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 apresentou limite de detecção de 10,42 fg de DNA genômico da amostra referência de *L. infantum* (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) diluído em série (1:10) (Figura 7).

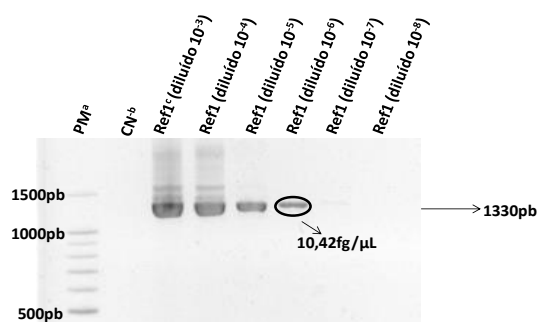


Figura 7: Limite de detecção do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63/Visualização dos produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb) em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio 0,5 μg/ml - <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup>Controle Negativo da PCR; <sup>c</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV (dosagem do DNA total: 10,42ng/μL).

### 5.3 Especificidade do ensaio de PCR

#### 5.3.1 Especificidade do ensaio de PCR para o alvo kDNA

Todas as amostras desse estudo foram amplificadas para a região do kDNA com os iniciadores MC1 e MC2, seguindo protocolos descritos por Cortes et al. 2004. Esses iniciadores são específicos para o complexo *Leishmania donovani*, assim conclui-se que para todas as amostras deste trabalho, havia DNA proveniente de *L. infantum*, visto que essas amostras originam-se do estado de Minas Gerais/Brasil, aonde a única espécie circulante do complexo *Leishmania donovani* é a *L. infantum*. Foram feitos testes com

outras espécies de *Leishmania*, como *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Figura 8).

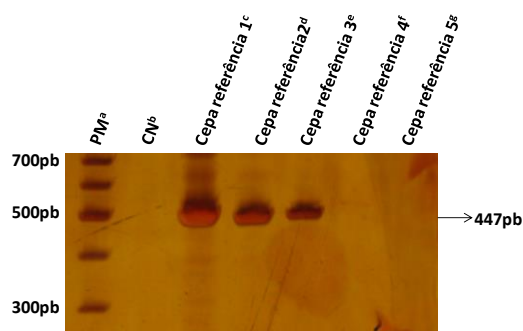


Figura 8: Especificidade do ensaio de PCR para o alvo kDNA (447pb), em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Controle Negativo da reação de PCR, <sup>c</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>d</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>e</sup>*L. donovani* → MHOM/ET/1967/HU3; <sup>f</sup>*L. amazonensis* → IFLA/BR/1967/PH-8; <sup>g</sup> *L. braziliensis* → MHOM/BR/75/M2903.

Como visualizado na imagem do gel anterior, o DNA proveniente das cepas referência de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* não puderam ser amplificados para o alvo do kDNA (447pb), já que estas espécies não pertencem ao complexo *Leishmania donovani*.

### 5.3.2 Especificidade do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63

Todas as amostras desse estudo foram também amplificadas para a região intragênica da glicoproteína gp63 com os iniciadores SG1 e SG2, seguindo protocolos descritos por Guerbouj et al. 2001. Esses iniciadores são para tripanossomatídeos. Foram feitos testes com outras espécies de *Leishmania*, como *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Figura 9).

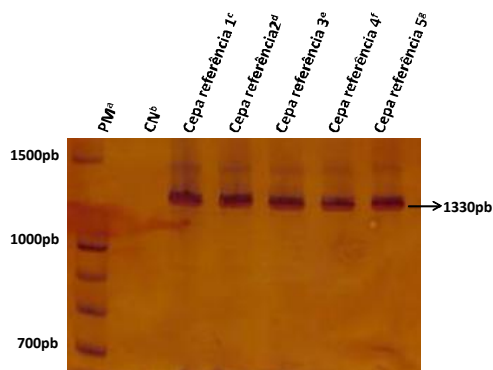


Figura 9: Especificidade do ensaio de PCR para o alvo da região intragênica da gp63 (1330pb), em gel de poliacrilamida 6% corado com nitrato de prata 0,2%. <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Controle Negativo da reação de PCR, <sup>c</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>d</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>e</sup>*L. donovani* →

MHOM/ET/1967/HU3; <sup>f</sup>*L. amazonensis*→ IFLA/BR/1967/PH-8; <sup>g</sup>*L. braziliensis*→ MHOM/BR/75/M2903.

Como visualizado na imagem do gel anterior, o DNA proveniente das cepas referência de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram amplificados para o alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 (1330pb), uma vez que estes iniciadores são para tripanossomatídeos.

#### 5.4 Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo por Tamanho de Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)

Para avaliação da variabilidade intraespecífica de *L. infantum* foram utilizadas diversas endonucleases de restrição direcionadas para a avaliação das regiões de minicírculos do kDNA e da região intragênica da glicoproteína gp63.

Todos os perfis de cada enzima foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 6% e confirmados no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Alemanha) com a utilização do kit “Agilent High Sensitivity DNA Kit”, que através da eletroforese capilar é capaz de separar, quantificar e determinar exatamente os tamanhos dos fragmentos em pb. Este kit é ideal para análise de fragmentos entre 50 e 7000pb.

##### 5.4.1 PCR-RFLP para a região de minicírculo do kDNA

Para o alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) foram avaliadas cinco endonucleases, sendo elas: VspI, RsaI, BglII, DdeI e Hpa II. Dessas, os padrões de restrição obtidos com as enzimas RsaI, BglII, DdeI, HpaII revelaram-se monomórficos para as amostras do estudo e apenas os padrões de restrição da enzima VspI mostraram-se polimórficos.

###### 5.4.1.1 Endonuclease VspI

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com a enzima VspI dois perfis puderam ser identificados, sendo eles: Perfil tipo I → Perfil apresentando três bandas: 134pb, 152pb e 161pb (Figura 10).

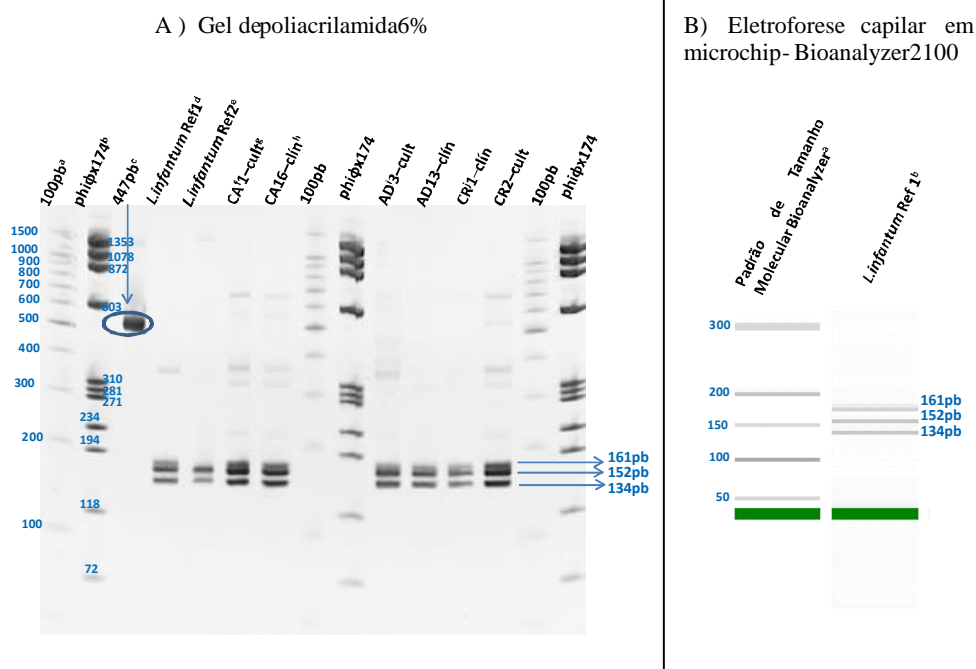


Figura 10: Perfil tipo I da restrição enzimática realizada com a endonuclease VspI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb). A) Gel de poliácridamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação do minicirculo do kDNA intacto, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup> Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup> Amostras clínicas; <sup>i</sup> Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup> Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum* → MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

Perfil tipo II → Perfil apresentando duas bandas: 310pb e 164pb (Figura 11).

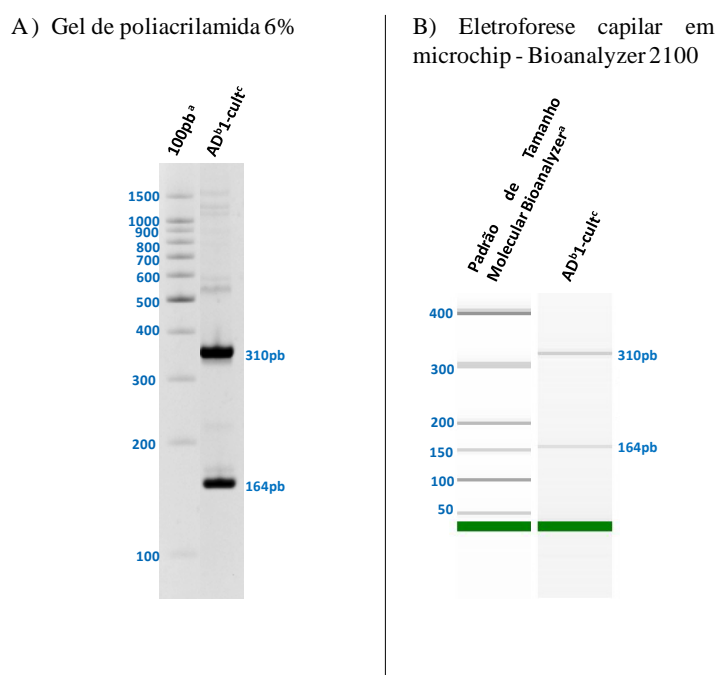




Figura 11: Perfil tipo II da restrição enzimática realizada com a endonuclease VspI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup>Amostra do grupo de adultos; <sup>c</sup>Amostra de cultura. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup>Amostra do grupo de adultos; <sup>c</sup>Amostra de cultura.

Apenas uma amostra de cultura de *L. infantum*, AD1, apresentou o Perfil tipo II, todas as outras quarenta e seis amostras apresentaram o Perfil tipo I.

A amostra que apresentou variabilidade genética com a restrição enzimática realizada pela endonuclease VspI, que apresentou o Perfil tipo II, foi isolada de uma paciente do grupo de adultos, que é residente do município de Minas Novas, localizado no Alto Jequitinhonha na região Nordeste do estado de Minas Gerais, a 485Km do município de Belo Horizonte.

Os parasitos da amostra AD1 foram isolados através da punção de medula óssea e cultivados em meio de cultura LIT (Liver Infusion Triptose), suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino inativado e meio NNN-sangue (ágar bacteriológico com sangue de coelho desfibrinado). A coleta dessa amostra clínica foi realizada no ano de 2011 e a paciente era sintomática para leishmaniose visceral, do sexo feminino, tendo 14 anos de idade, sem histórico de infecção pelo HIV e sem nenhuma outra comorbidade. A paciente apresentava a forma clínica clássica de LV e todos os seus outros exames para o diagnóstico da doença foram considerados positivos (exame direto - medula óssea, RIFI e Teste Rápido). A paciente iniciou o tratamento com Anfotericina B no hospital e depois da melhora do quadro clínico, o tratamento foi finalizado com a administração de Glucantime, no ambulatório. Após o fim do tratamento, a paciente fez acompanhamento regular com médicos especializados e atualmente encontra-se em bom estado de saúde.

#### 5.4.1.1.1 Dendograma sem raiz – endonuclease VspI

Para melhor visualização dos resultados obtidos com a análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) usando a endonuclease de restrição VspI, os dados foram agrupados em um dendograma sem raiz (Figura 12).

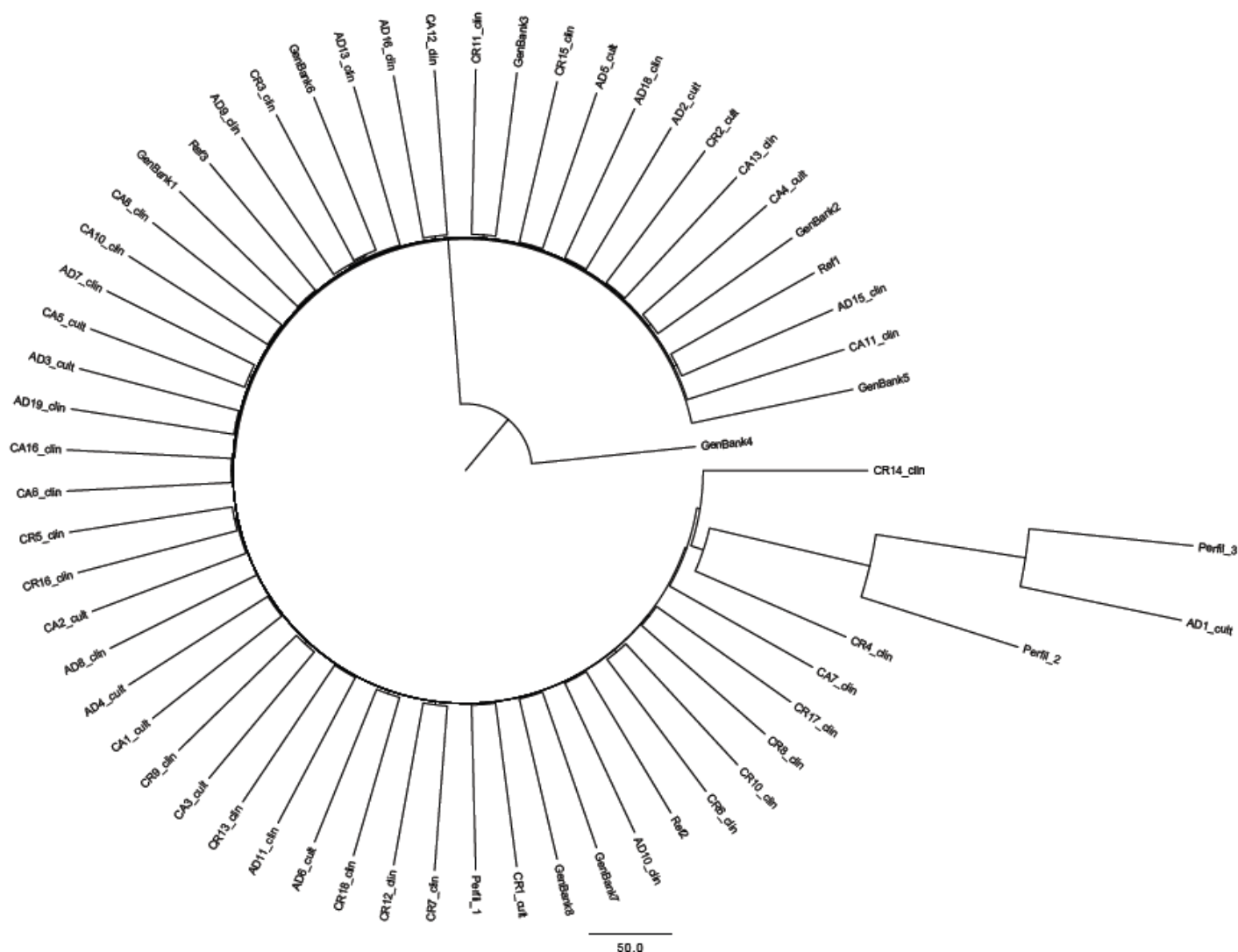


Figura 12: Dendograma sem raiz - endonuclease VspI. CA→Amostras do grupo de cães; CR→ amostras do grupo de crianças; AD→Amostras do grupo de adultos; Cult→Amostras de cultura; Clín→Amostras clínicas; Ref (Tabela 4); Genbank (Tabela 5); Perfil 1,2 e 3 (Cortes et al. 2006 e Cortes 2008).

Através da análise da imagem do dendograma sem raiz é possível perceber que a única amostra variável foi a amostra AD1\_cult, Perfil tipo II deste trabalho (bandas de 310 e 164pb). Este Perfil encontrado é semelhante ao Perfil 3, para enzima VspI (bandas 310 e 137pb) descrito por Cortes (2008).

Também é possível perceber que as outras quarenta e seis amostras que apresentaram o Perfil tipo I deste trabalho (bandas 134,152 e 161pb) ficam pareadas com o Perfil 1 (bandas 134,152 e 161pb) descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008). Estas amostras também ficaram pareadas com todas as demais oito sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper” sendo elas: AF169140.1/Genbank1,

AF169133.1/GenBank2, AF103741.1/GenBank3, AF169131.1/Genbank4,  
AF103740.1/Genbank5, AJ010077.2/GenBank6, AF103739.1/GenBank7,  
AF169137.1/GenBank8. Ainda, estas amostras ficaram pareadas com as cepas referência  
MHOM/BR/2002/LPC-RPV (Ref1), MHOM/BR/1974/PP75 (Ref2) e  
MHOM/ET/1967/HU3 (Ref3) (Tabela 4).

O Perfil 2 descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008) para enzima VspI formou um grupo separado dos demais, e isto deve-se ao fato deste padrão ser representado por bandas de 170, 137, 90 e 50pb, e para o qual nenhuma das amostras deste trabalho demonstraram, além das sequências obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e amostras referência (Tabela 4).

#### 5.4.1.1.2 Dendograma sem raiz com análise *Bootstrap* – endonuclease VspI

Foi gerado um outro tipo de representação para análise dos dados do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com a enzima VspI. Um novo dendograma sem raiz foi criado com adição da análise por *Bootstrap* (Figura 13). Este é um método de simulação que objetiva a obtenção de intervalos de confiança para as estimativas dos parâmetros de interesse, por reamostragem do conjunto de dados original (Matinez-Espinosa et al. 2006). Os resultados visualizados são os mesmos encontrados na representação anterior no item 5.4.1.1.1. Ainda, nesta representação é possível analisar os valores de *Bootstrap*, que indicam o percentual de suporte calculado pelo teste às relações apresentadas, como por exemplo, a amostra AD1\_cult que fica pareada com o Perfil 3 Cortes (2008) apresenta um valor de suporte do nó de 92%. Já o Perfil 2 descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008) para enzima VspI que formou um grupo separado dos demais possui um valor de suporte do nó de 100%.

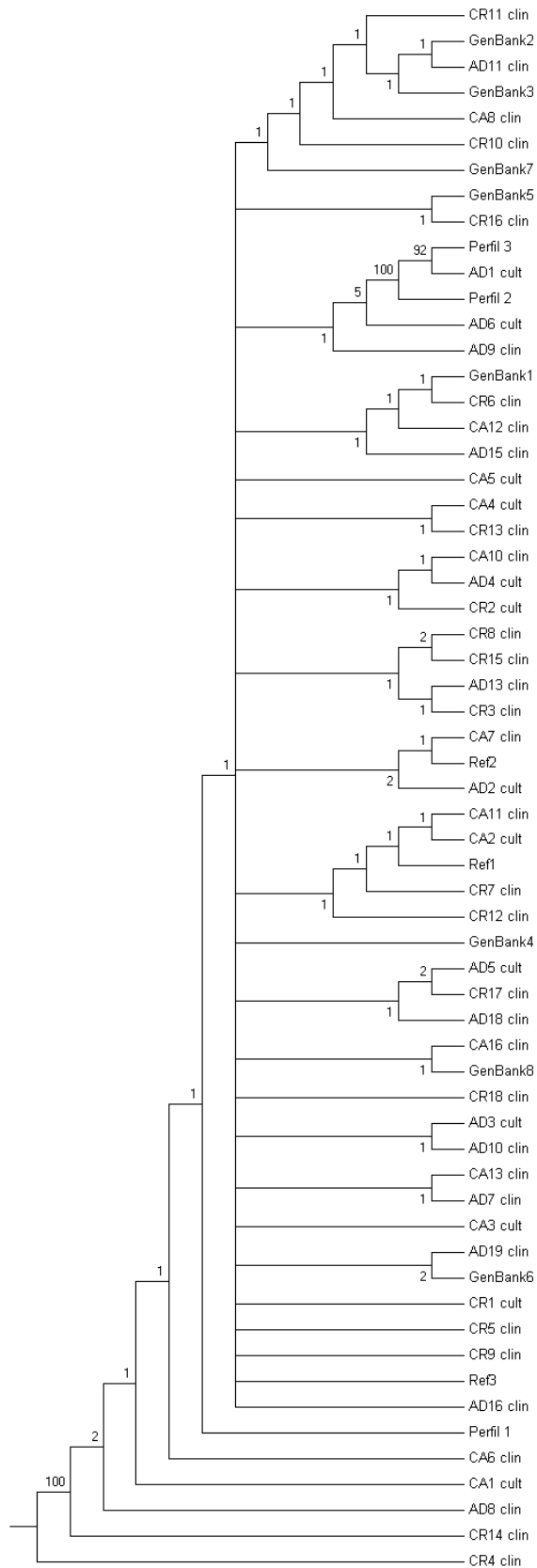


Figura 13: Dendograma sem raiz com análise *Bootstrap* - endonuclease VspI. CA→Amostras do grupo de cães; CR→ amostras do grupo de crianças; AD→Amostras do grupo de adultos; Cult→Amostras de cultura; Clín→Amostras clínicas; Ref (Tabela 4); Genbank (Tabela 5); Perfil 1,2 e 3 (Cortes et al. 2006 e Cortes 2008).

## 5.4.1.2 Endonuclease RsaI

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com uso da enzima RsaI foi possível observar apenas um perfil, sendo ele:

Perfil tipo I → Perfil apresentando duas bandas: 194pb e 253pb (Figura 14).

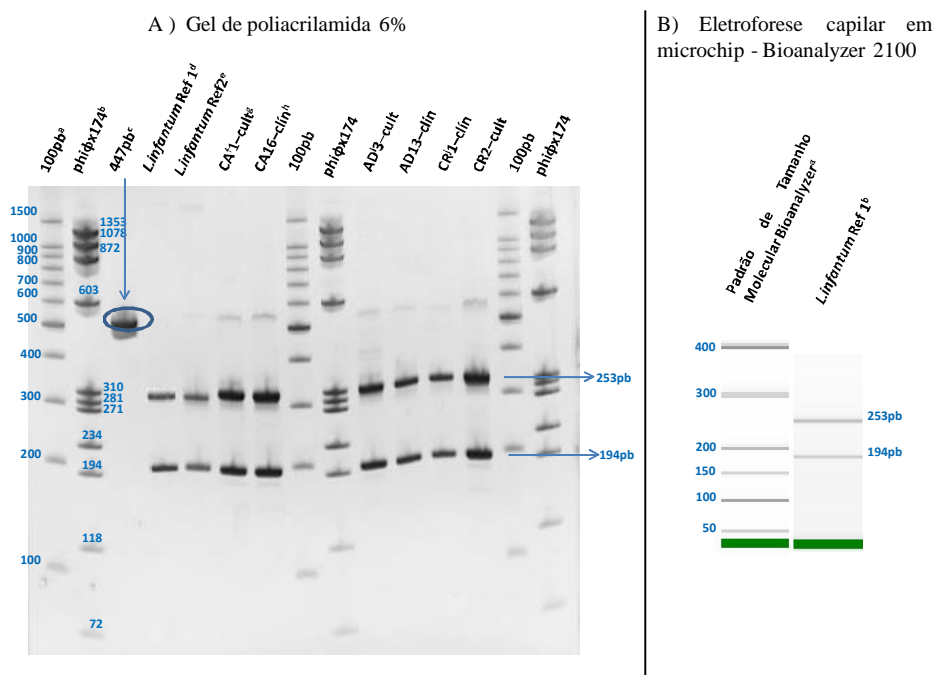


Figura 14: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease RsaI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb) . A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação do minicírculo do kDNA intacto, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

Este Perfil tipo I, encontrado neste trabalho (bandas 194 e 253pb) também foi descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008), como Perfil I para enzima RsaI (bandas 194 e 253pb).

5.4.1.2.1 Dendograma sem raiz com análise *Bootstrap* – endonuclease RsaI

Através da análise da imagem do dendograma sem raiz com a análise *Bootstrap* para a enzima RsaI (Figura 15) é possível perceber que a única amostra que apresentou variabilidade e com um valor de suporte do nó de 97% foi a sequência de nucleotídeos

AF169140.1/Genbank1 (Tabela 5), que ficou pareada com o Perfil 3, descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008).

O Perfil 2 descrito por estes autores também ficou num grupo separado das demais e com um valor de suporte do nó de 86%.

As outras sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper”: AF169133.1/GenBank2, AF103741.1/GenBank3, AF169131.1/Genbank4, AF103740.1/Genbank5, AJ010077.2/GenBank6, AF103739.1/GenBank7, AF169137.1/GenBank8, as cepas referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV (Ref1), MHOM/BR/1974/PP75 (Ref2) e MHOM/ET/1967/HU3 (Ref3) (Tabela 4) apresentaram o mesmo perfil das 47 amostras avaliadas neste estudo e que corresponde ao Perfil 1, descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008).

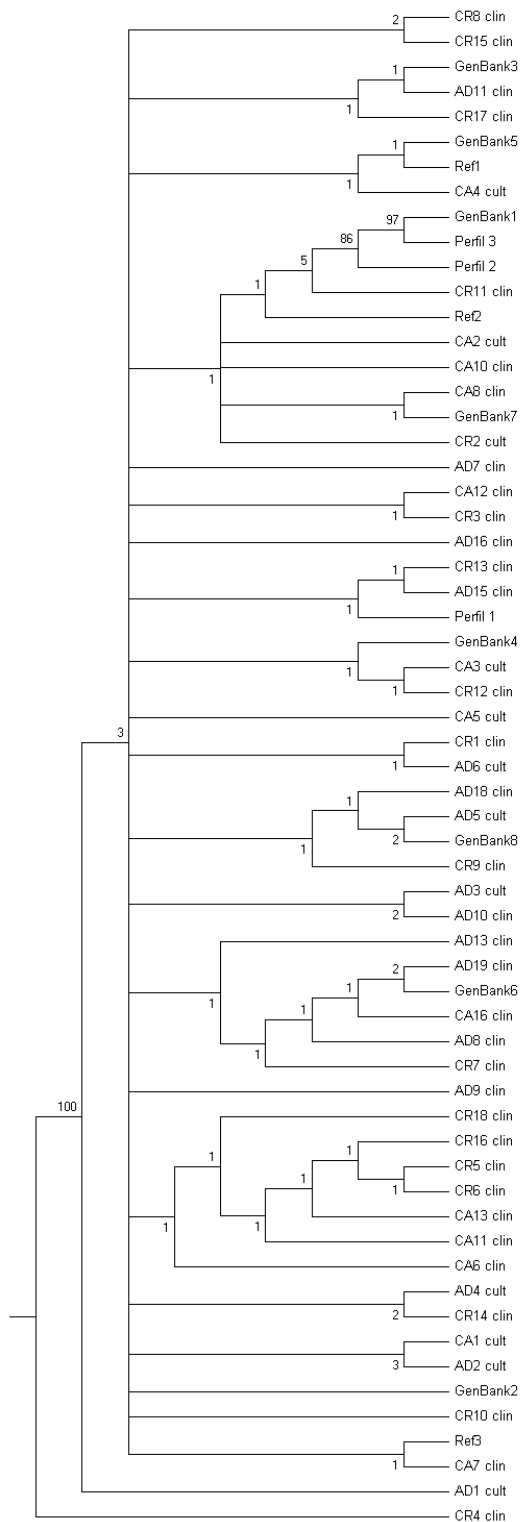


Figura 15: Dendrograma sem raiz com análise *Bootstrap* - endonuclease *RsaI*. CA→Amostras do grupo de cães; CR→ amostras do grupo de crianças; AD→Amostras do grupo de adultos; Cult→Amostras de cultura; Clín→Amostras clínicas; Ref (Tabela 4); Genbank (Tabela 5); Perfil 1,2 e 3 (Cortes et al. 2006 e Cortes 2008).

## 5.4.1.3 Endonuclease BglII

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com uso da enzima BglII apenas um perfil pode ser identificado, sendo ele:

Perfil tipo I → Perfil apresentando apenas uma banda: 447pb (Figura 16).

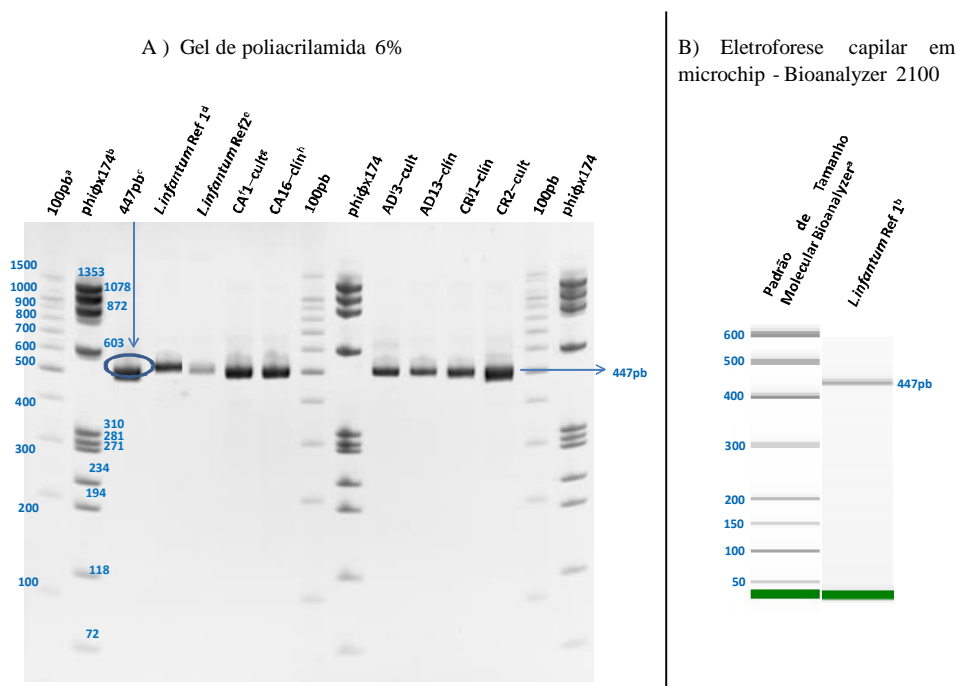


Figura 16: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease BglII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação do minicírculo do kDNA intacto, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

As sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper”: AF169140.1/Genbank1 AF169133.1/GenBank2, AF103741.1/GenBank3, AF169131.1/Genbank4, AF103740.1/Genbank5, AJ010077.2/GenBank6, AF103739.1/GenBank7, AF169137.1/GenBank8, bem como as cepas referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV (Ref1), MHOM/BR/1974/PP75 (Ref2) e MHOM/ET/1967/HU3 (Ref3) (Tabela 4) apresentaram o mesmo perfil das 47 amostras avaliadas neste estudo e que corresponde ao Perfil 1(banda 447pb) , descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008).



## 5.4.1.4 Endonuclease DdeI

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com uso da enzima DdeI apenas um perfil pode ser identificado, sendo ele:

Perfil tipo I → Perfil apresentando duas bandas: 100pb e 319pb (Figura 17).

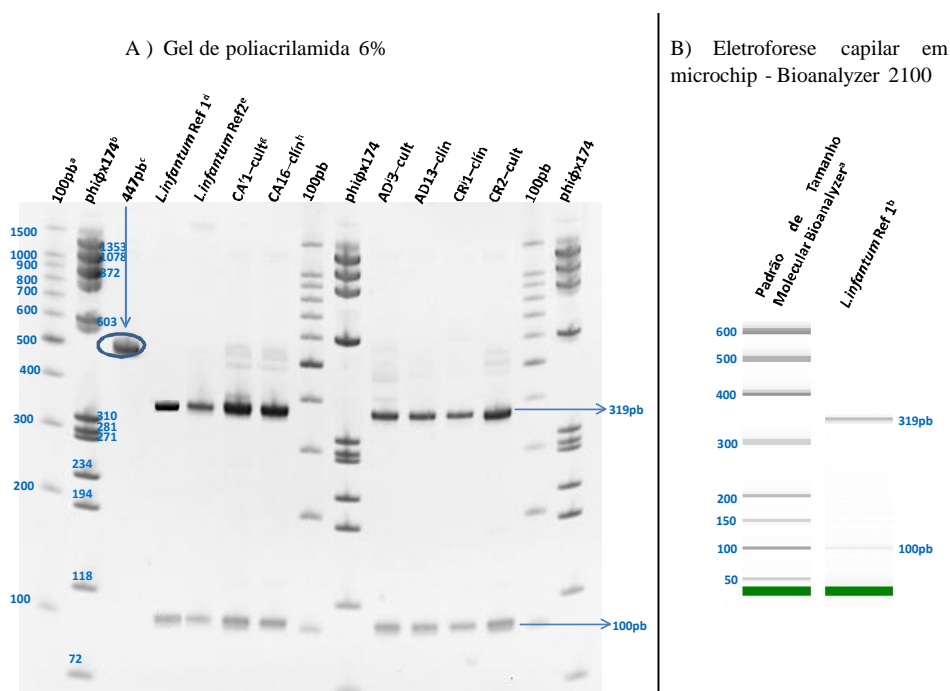


Figura 17: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease DdeI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação do minicírculo do kDNA intacto, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

As sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper”: AF169140.1/Genbank1 AF169133.1/GenBank2, AF103741.1/GenBank3, AF169131.1/Genbank4, AF103740.1/Genbank5, AJ010077.2/GenBank6, AF103739.1/GenBank7, AF169137.1/GenBank8, bem como as cepas referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV (Ref1), MHOM/BR/1974/PP75 (Ref2) e MHOM/ET/1967/HU3 (Ref3) (Tabela 4) apresentaram o mesmo perfil das 47 amostras

avaliadas neste estudo e que corresponde ao Perfil 1 (bandas 100 e 319pb) , descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008).

#### 5.4.1.5 Endonuclease HpaII

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região do minicírculo do kDNA (447 pb) com uso da enzima HpaII apenas um perfil pode ser identificado, sendo ele:

Perfil tipo I → Perfil apresentando duas bandas: 37pb e 410pb (Figura 18). A banda de 37pb por ser de tamanho bastante pequeno não pode ser observada em todas as amostras. Apesar de padronizado o tempo de corrida na eletroforese, muitas vezes esta banda era perdida na mesma, ou aparecia com pouca intensidade.

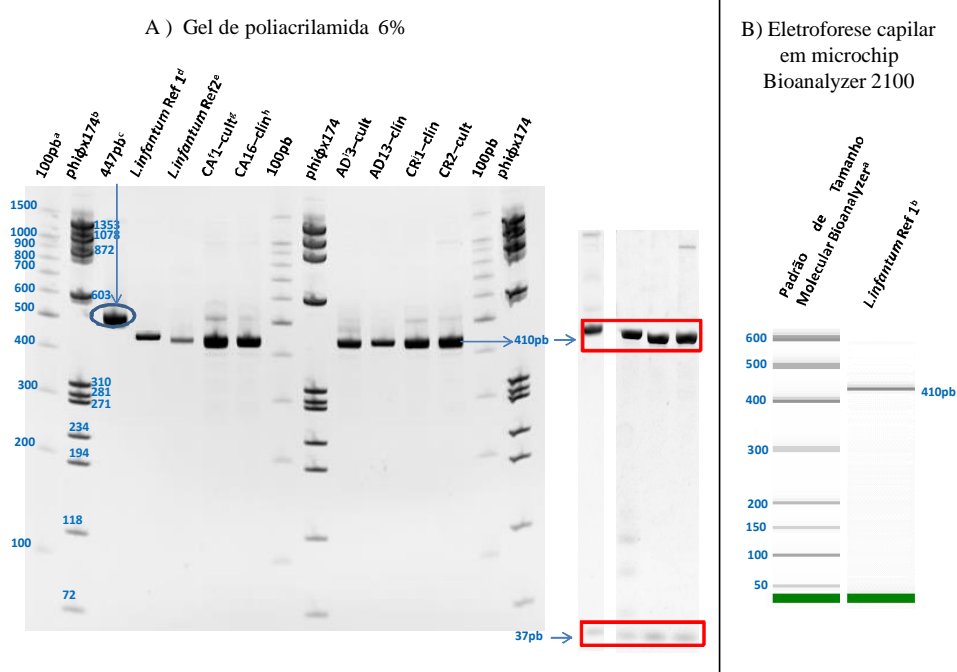


Figura 18: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease HpaII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo kDNA(447pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação do minicírculo do kDNA intacto, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

Este Perfil tipo I, encontrado neste trabalho (bandas 37 e 410pb) também foi descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008), como Perfil 1 para enzima HpaII (bandas 37e 410pb).

#### 5.4.1.5.1 Dendograma sem raiz com análise *Bootstrap* – endonuclease HpaII

Através da análise da imagem do dendograma sem raiz com a análise *Bootstrap* para a enzima HpaII (Figura 19) é possível perceber que duas amostras apresentaram variabilidade com um valor de suporte do nó de 97%, sendo elas: a sequência de nucleotídios AF169140.1/Genbank1 (Tabela 5), que ficou pareada com o Perfil 2, descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008).

A sequência AF169133.1/GenBank2, que mostra-se num grupo separado com um valor de suporte do nó de 50%. Para esta última não foi encontrado nenhum perfil semelhante na literatura que utilizasse o mesmo alvo e análise pela mesma enzima.

O Perfil 4 descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008) também ficou num grupo separados das demais amostras com um valor de suporte do nó de 84%.

A sequência de nucleotídios AF169137.1/GenBank8 (Tabela 5) ficou pareada com o Perfil 3, descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008), com um valor de suporte do nó de 54%.

As outras sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper”: AF103741.1/GenBank3, AF169131.1/Genbank4, AF103740.1/Genbank5, AJ010077.2/GenBank6, AF103739.1/GenBank7, bem como as cepas referência MHOM/BR/2002/LPC-RPV (Ref1), MHOM/BR/1974/PP75 (Ref2) e MHOM/ET/1967/HU3 (Ref3) (Tabela 4), e o Perfil 1 descrito por Cortes e colaboradores (2006) e Cortes (2008) apresentaram o mesmo perfil das outras 47 amostras do estudo.

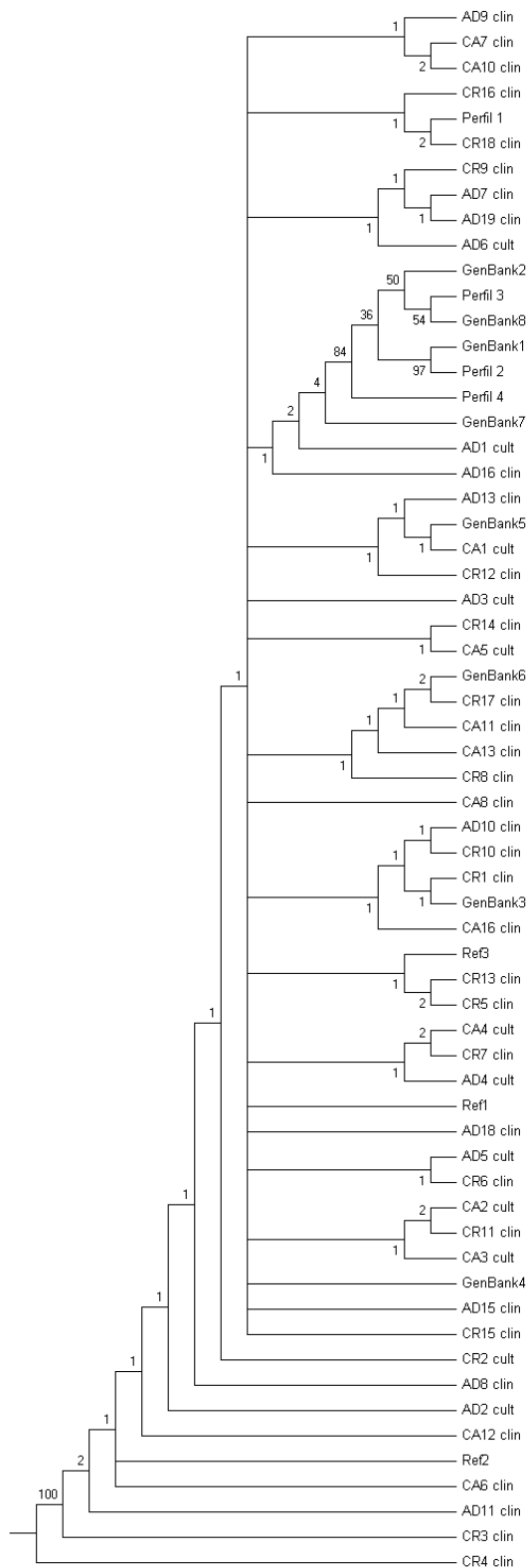


Figura 19: Dendograma sem raiz com análise *Bootstrap* - endonuclease HpaII. CA→Amostras do grupo de cães; CR→ amostras do grupo de crianças; AD→Amostras do grupo de adultos; Cult→Amostras de cultura; Clín→Amostras clínicas; Ref (Tabela 4); Genbank (Tabela 5); Perfil 1,2,3 e 4 (Cortes et al. 2006 e Cortes 2008).

#### 5.4.2 PCR-RFLP para a região intragênica da glicoproteína gp63

Para o alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 foram avaliadas duas endonucleases, sendo elas: HincII e TaqI.

Os padrões de restrição obtidos com as enzimas HincII e TaqI revelaram-se monomórficos para as amostras do estudo.

##### 5.4.2.1 Endonuclease HincII

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 com a enzima HincII apenas um perfil pode ser identificado, sendo ele:

Perfil tipo I → Perfil apresentando quatro bandas: 80pb, 400pb, 850pb e 1250pb (Figura 20). Importante ressaltar que as bandas de 80 e 1250pb sempre eram as mais nítidas e de melhor resolução, enquanto as bandas de 400 e 850pb mostravam-se mais fracas e menos nítidas.

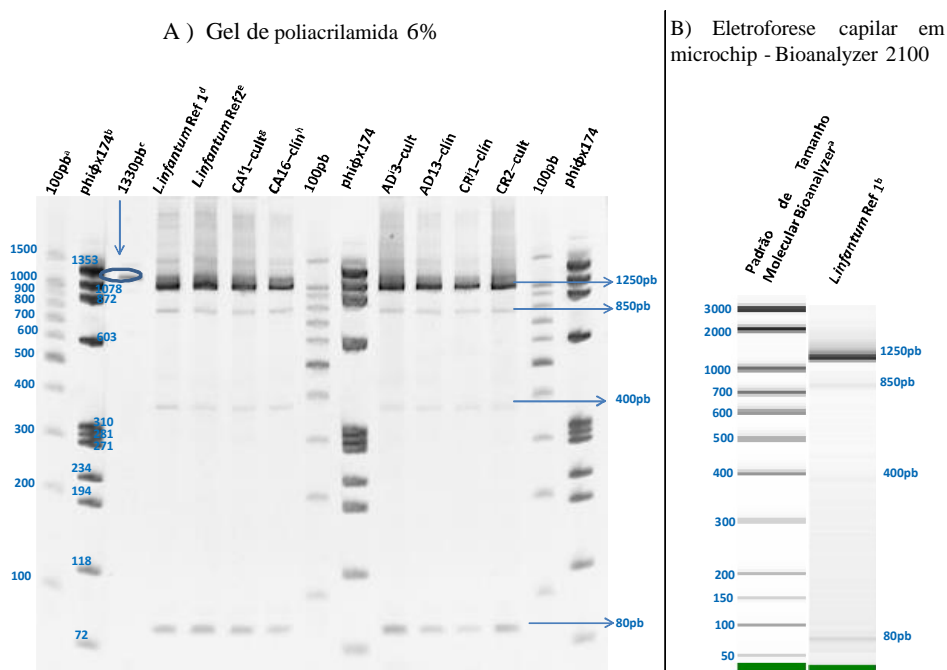


Figura 20: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease HincII a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação da região intragênica da gp63 intacta, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

Este Perfil tipo I, encontrado neste trabalho (bandas 80, 400, 850 e 1250pb) também foi descrito por Guerbouj e colaboradores em 2001 para enzima HincII (bandas 80, 400, 850 e 1250pb).

#### 5.4.2.2 Endonuclease TaqI

Na análise do perfil da reação de PCR-RFLP do alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 com a enzima TaqI apenas um perfil pode ser identificado, sendo ele: Perfil tipo I → Perfil apresentando cinco bandas: 80pb, 84pb, 180, 414 e 504 (Figura 21).

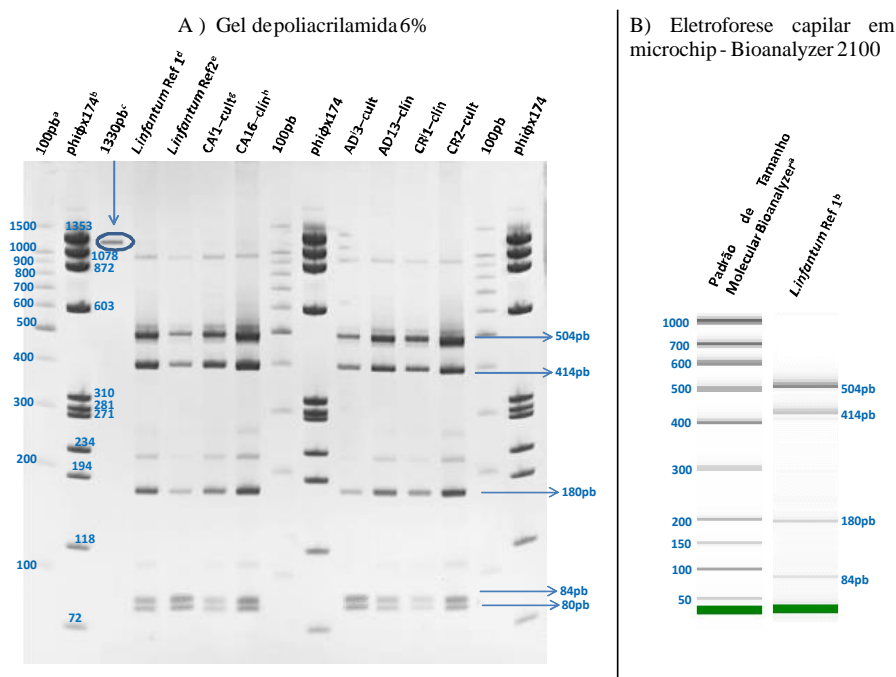


Figura 21: Perfil da restrição enzimática realizada com a endonuclease TaqI a partir de produtos de amplificação da reação de PCR para o alvo gp63(1330pb). A) Gel de poliacrilamida 6% corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml; <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular → 100pb(PROMEGA); <sup>b</sup> Padrão de Tamanho Molecular → Phixφ174(PROMEGA); <sup>c</sup> Produto de amplificação da região intragênica da gp63 intacta, sem a etapa de digestão enzimática; <sup>d</sup>*L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV; <sup>e</sup>*L. infantum* → MHOM/BR/1974/PP75; <sup>f</sup>Amostras do grupo de cães; <sup>g</sup> Amostras de cultura; <sup>h</sup>Amostras clínicas; <sup>i</sup>Amostras do grupo de adultos; <sup>j</sup>Amostras do grupo de crianças. B) Eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100, <sup>a</sup>Padrão de Tamanho Molecular Bioanalyzer; <sup>b</sup> *L. infantum*→ MHOM/BR/2002/LPC-RPV.

Vários autores utilizaram a técnica de PCR-RFLP para o alvo da região intragênica da glicoproteína gp63 com a endonuclease de restrição TaqI, entretanto os padrões de fragmentos gerados não foram demonstrados com clareza nestes trabalhos (Quispe- Tintaya et al. 2004, Botilde et al. 2006, Seridi et al. 2008). Dessa maneira, o Perfil tipo I encontrado neste trabalho (bandas 80, 84, 180, 414 e 504pb) pode ser comparado com sequências de nucleotídeos para o alvo gp63 obtidas após busca no GenBank e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper” (Tabela 6). As

47 amostras analisadas neste trabalho, obtiveram perfil semelhante às sequências de nucleotídeos Z83677.1/Genbank2 e U48798.1/Genbank3 (Tabela 6).

## 6.0 DISCUSSÃO

A importância das leishmanioses nos contextos social, econômico e sanitário está baseada na ampla distribuição geográfica das mesmas e na gravidade de suas manifestações clínicas. O crescimento dessa importância nos últimos anos está relacionado ao aumento da incidência e da disseminação de algumas formas de leishmaniose para novas áreas geográficas, bem como da sua tendência à urbanização.

Nas últimas décadas, com o aparecimento e aprimoramento da biologia molecular, avanços tecnológicos têm contribuído para o estudo da caracterização de linhagens patogênicas e melhor compreensão da epidemiologia de muitas doenças infecto parasitárias bem como de suas dinâmicas de transmissão.

O estudo da diversidade genética de uma espécie permite que as diferenças encontradas entre grupos, possam ser relacionadas a características observadas entre populações analisadas, como por exemplo: manifestações de diferentes formas clínicas, apresentação de diferentes distribuições geográficas, acometimento de diferentes hospedeiros ou vetores, apresentação de resistência ou sensibilidade a tratamentos específicos, entre outros (Alvarenga 2007, Segatto et al. 2012).

Considerando a importância da leishmaniose visceral para a saúde pública e a necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia desta doença, estudos focando identificar a variabilidade genética do parasito têm sido amplamente abordados. No presente estudo, avaliou-se a variabilidade genética intraespecífica de *L. infantum* provenientes de casos humanos e caninos do município de Belo Horizonte, de alguns municípios próximos e de outros do estado de Minas Gerais, através do uso da técnica de PCR-RFLP e diferentes alvos gênicos: região intragênica da glicoproteína gp63 e minicírculos do DNA do cinetoplasto (kDNA).

Diversos estudos apontam que os minicírculos do kDNA são excelentes alvos a serem analisados para estudos de variabilidade genética, pois estes estão mais envolvidos com uma rápida resposta a diferentes condições ambientais e situações de estresse fisiológico. Essa resposta provavelmente interfere na adaptabilidade do parasita que pode adquirir vantagens seletivas diferentes conforme a classe de minicírculos que mais prevalece dentro da rede de kDNA (Alonso et al. 2010, Alonso 2011).

A gp63 é uma glicoproteína de 63kDa expressa na superfície de promastigotas e amastigotas de todas as espécies de *Leishmania* e representa mais de 1% da proteína total



do parasito. Esta enzima cliva o componente C3b do Sistema Complemento em C3bi, facilitando assim a fixação da *Leishmania* ao macrófago e sua ligação às *células natural killer* (células NK), o que inibe a multiplicação destas células e facilita a infecção parasitária (Guerbouj et al. 2001, Silva-López 2010). Esta glicoproteína possui grande importância na virulência do parasito e sofre constantes pressões seletivas frente à adaptação do mesmo. Dessa forma, o gene codificador da gp63 é um outro alvo promissor para o estudo de variabilidade genética em *Leishmania* (Guerbouj et al. 2001, Elamin et al. 2008).

Várias abordagens moleculares vem sendo escolhidas para estudos de variabilidade genética de espécies do gênero *Leishmania*: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso - RAPD (Bañuls et al. 1999, Hide et al. 2001, Chicharro et al. 2002, Toledo et al. 2002, Zemanová et al. 2004, Botilde et al. 2006, Segatto et al. 2012); análise de regiões de DNA com marcadores microssatélites - MLMT (Jamjoom et al. 2002, Bulle et al. 2002, Schwenkenbecher et al. 2004, Schwenkenbecher et al. 2005, Botilde et al. 2006, Ochsenreither et al. 2006, Kuhls et al. 2007, Kuhls et al. 2011, Segatto et al. 2012, Ferreira et al. 2012); PCR de repetições de sequências simples - SSR-PCR (Oliveira et al. 1997, Segatto et al. 2012); análise por hibridização de sondas de DNA - Southern blotting (Sreenivas et al. 2004) e análise por polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição-RFLP (Mauricio et al. 2001, Guerbouj et al. 2001, Morales et al. 2001, Chicharro et al. 2002, Cupolillo et al. 2003, Quispe-Tintaya et al. 2004, Cortes et al. 2006, Cortes 2008; Laurent et al. 2007, Alonso et al. 2010, Alonso 2011). Embora todas essas técnicas tenham apresentado bons resultados, na maioria dos trabalhos a MLMT e RFLP tem se revelado como as melhores ferramentas para investigações de genética de populações, assim como para investigações epidemiológicas.

A MLMT possui um alto poder discriminatório, pois se trata de marcadores moleculares codominantes (ambos os alelos do gene se expressam), abundantes (amplamente distribuídos nos organismos), ubíquos (presentes em todo genoma), hipervariáveis e estáveis (eventualmente ocorrem mutações). A diversidade desses marcadores pode ser explicada, especialmente, pela derrapagem da DNA polimerase no momento da replicação, devido às repetições, ocasionando ganho ou perda de unidades repetitivas e, com isso, alterações em seu tamanho (Tachida & Izuca 1992). A aplicação dessa metodologia pode ser considerada simples e rápida na detecção de polimorfismos de microssatélites por PCR, com boa reprodutibilidade e alto poder discriminatório entre isolados, possuem o mais elevado conteúdo de informações de polimorfismo na

terminologia de marcadores moleculares. (Ochsenreither et al. 2006, Botilde et al. 2006, Kuhls et al. 2007, Cortes 2008, Alonso 2011, Kuhls et al. 2011, Ferreira et al. 2012, Segatto et al. 2012).

A RFLP permite uma discriminação refinada entre linhagens do parasita, pois gera diferentes padrões de restrição através de polimorfismos, mutações pontuais, inserções ou deleções encontradas no sítio de restrição das endonucleases utilizadas. Entretanto essas mutações tornam-se estáveis quando são transmitidas aos seus descendentes (Alonso et al. 2010, Alonso 2011). Nesse contexto, deve-se levar em consideração que a maioria das leishmanias são espécies clonais, ou seja, seus genótipos podem ser usados como marcadores epidemiológicos confiáveis, facilitando assim o estudo de dispersão desse parasita. Entretanto, eventos de recombinação genética têm sido registrados por alguns autores, mas ainda são considerados eventos mais raros, sendo que a forma mais comum de reprodução entre espécies de *Leishmania* seria ainda a forma clonal (Dujardin et al. 1995, Bañuls et al. 1999, Akopyants et al. 2009).

Em 1986, Pacheco e colaboradores, foram pioneiros ao utilizar a técnica de PCR-RFLP do kDNA para analisar diversidade genotípica entre isolados de *L. infantum* dos estados do Rio de Janeiro e Bahia. Uma amostra referência de *L. infantum* da França e outra da Índia também foram analisadas. A RFLP foi capaz de distinguir essas duas cepas referência com clareza, pois essas apresentaram perfis nitidamente diferentes. Também foi possível observar que os isolados da Bahia eram genotipicamente distintos daqueles encontrados nas amostras do Rio de Janeiro. Guerbouj et al. (2001), também através da RFLP, avaliaram o polimorfismo do gene codificador para a gp63 de *L. infantum* proveniente de diferentes países, e demonstraram o agrupamento dos isolados de acordo com a região de origem. Do mesmo modo Toledo et al. (2002) mostraram a formação de dois grupos de *L. infantum* da Espanha que tiveram associação com a origem geográfica. Em trabalho mais recente, Alonso (2011), através da técnica de RFLP dos minicírculos do kDNA foi capaz de distinguir em dois grupos as amostras do estudo, sendo eles: um grupo composto somente por amostras de Teresina (PI) e o outro por amostras de Campo Grande (MS) e de Bauru (SP), visto que esses dois últimos são regiões geograficamente próximas, evidenciando assim uma relação entre distância genética e origem geográfica.

Assim, para o presente estudo, optou-se por utilizar a PCR-RFLP em dois alvos (gene codificador da glicoproteína gp63 e minicírculo do kDNA) como já descrito anteriormente. Para o alvo kDNA foram utilizadas cinco endonucleases de restrição, sendo elas: VspI, RsaI, BglII, DdeI e Hpa II. Para o alvo da glicoproteína gp63 foram

utilizadas duas endonucleases, sendo elas: HincII e TaqI. Das sete endonucleases de restrição utilizadas para a técnica de RFLP, apenas uma endonuclease, VspI, foi capaz de detectar dois perfis diferentes (Tipo I e Tipo II) e assim variabilidade genotípica entre as amostras de DNA avaliadas no estudo.

As amostras deste trabalho eram principalmente provenientes do município de Belo Horizonte-MG ou de municípios bem próximos a esse como: Contagem, Ribeirão das Neves, Ibirité e Betim, que fazem parte da Região Metropolitana de Belo Horizonte (RMBH). Duas amostras foram incluídas neste estudo por conveniência. Uma é proveniente do município de Minas Novas-MG e outra do município de Aimorés-MG. Esses dois municípios não fazem parte da RMBH e encontram-se um pouco mais afastados da cidade de Belo Horizonte.

A amostra que apresentou variabilidade genética neste trabalho era proveniente de Minas Novas. Este município encontra-se no Alto Jequitinhonha na região Nordeste do estado de Minas Gerais e está localizado a 485 Km de Belo Horizonte. Esses achados, no entanto, não permitem concluir que a variabilidade genética encontrada para esta amostra esteja relacionada à distância geográfica entre as amostras. As outras 46 amostras do estudo, juntamente com demais oito sequências de nucleotídeos para o alvo kDNA obtidas após busca no GenBank (Tabela 5) e posterior análise *in silico* no programa “RestrictionMapper” apresentaram Perfil Tipo I. Essas amostras do GenBank são provenientes de vários países do mundo, inclusive de outros continentes como África, Europa e América Central.

Cortes (2008) ao estudar diversidade genética de *L. infantum* a partir de isolados de humanos, cães e flebotomíneos obtidos em diferentes regiões geográficas de Portugal, utilizando a PCR-RFLP em minicírculos do kDNA, encontrou perfil semelhante ao Perfil Tipo II deste estudo, quando utilizada a endonuclease VspI. No entanto, o perfil encontrado no trabalho de Cortes (2008) foi chamado de Perfil Tipo III para endonuclease VspI, que apresenta duas bandas: 310pb e 137pb é semelhante ao Perfil Tipo II do presente trabalho, porém com bandas de 310pb e 164pb. A banda de menor tamanho molecular difere em 27pb no tamanho dos fragmentos observados entre esses dois perfis. Esta variação pode estar relacionada ao tipo de gel utilizado na análise dos perfis. Cortes (2008) utilizou gel de agarose 3% para separação e visualização das bandas e, no presente estudo foi utilizado gel de poliacrilamida 6% e confirmado o tamanho das bandas com eletroforese capilar em microchip no equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). Dependendo do tamanho da banda que se espera encontrar existem

sistemas de eletroforese em gel mais adequados para a sua visualização. O gel de poliacrilamida tem maior capacidade de resolução e é mais efetivo para separar pequenos fragmentos de DNA (5-500pb). Esse gel também pode acomodar maiores quantidades de DNA sem perda de resolução, até 10 $\mu$ g, comparado ao de gel de agarose, que pode acomodar bandas que contenham até aproximadamente 10ng de DNA com boa resolução. Ainda, o gel de agarose tem menor capacidade de resolução, porém apresenta maior extensão de separação. Longos fragmentos de DNA (500-20.000 bp) podem ser separados em gel de agarose com diferentes concentrações (Teixeira 2003). O equipamento Bioanalyzer 2100 possui um sistema de eletroforese capilar com detecção induzida a laser em microchips, possui alta capacidade para separação de moléculas de DNA de tamanhos moleculares diferentes o que a torna a técnica bastante eficiente e precisa.

As amostras analisadas neste trabalho pertenciam a diferentes grupos: amostras provenientes de cães e de humanos. Dentre as amostras provenientes de humanos havia dois grupos: amostras provenientes de crianças e de adultos, estes últimos podiam ser co-infetados com HIV ou não. A amostra variável, que foi a única amostra do estudo a apresentar Perfil Tipo II, após restrição com a endonuclease VspI, pertence ao grupo de adultos, e é proveniente de uma paciente sintomática para leishmaniose visceral, do sexo feminino, tendo 14 anos de idade, sem histórico de infecção pelo HIV e sem nenhuma outra comorbidade. Como apenas esta amostra foi variável não se pode estabelecer nenhuma relação entre a variabilidade genética e diferentes manifestações clínicas, idade, sexo, localização geográfica e especialmente nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os diferentes tipos de hospedeiro (cães e humanos). Outros autores também encontraram resultados semelhantes a esses. Chicharro et al. (2002) utilizando as técnicas de RAPD e IRT (Tipagem de região intergênica do RNA ribossomal-ITS) não observaram diferenças genótípicas entre isolados de *Leishmania* de caninos e humanos da Ilha de Majorca, Espanha. Segatto e colaboradores em 2012, avaliando a variabilidade genética de *L. infantum* em amostras de diferentes regiões do Brasil não encontraram diferenças significativas entre amostras de cães e humanos.

Essa baixa variabilidade encontrada no presente estudo corrobora com a hipótese sugerida por Lukes e colaboradores em 2007, estes fizeram uma análise multifatorial com 25 cepas do complexo *Leishmania donovani* geograficamente representativas da Europa, África e Ásia, através da análise de microssatélites, RFLP, análise de sequência de DNA codificantes e não codificantes. A análise permitiu o rastreamento molecular dessas espécies e propôs uma nova teoria de como *L. infantum* foi introduzida nas Américas. Os

resultados mostraram que o ancestral comum de *L. donovani* e *L. infantum* apareceu na Ásia Central há aproximadamente 20 milhões de anos, e há mais ou menos um milhão de anos divergiu, dando origem a *L. infantum* na Europa e *L. donovani* na África e Índia. Com as grandes navegações marítimas *L. infantum* foi introduzida na América do Sul há aproximadamente 500 anos. Esses achados levam em consideração que o modo prevalente de reprodução de espécies do gênero *Leishmania* é clonal, mas há algumas evidências de trocas genéticas entre cepas, particularmente na África. Ainda os autores concluíram que 500 anos é um tempo relativamente curto para gerar variabilidade genética especialmente quando se trata do Brasil, onde a LV tem praticamente um vetor principal (*L. longipalpis*) bem como um reservatório principal (*Canis familiaris*), e além disso, como já dito anteriormente, tem como principal tipo de reprodução a clonal. Ainda, diversos outros estudos realizados com amostras do Brasil, de uma maneira geral, também encontram baixa variabilidade genética entre as amostras analisadas (Alvarenga 2007, Alonso 2011, Coutinho et al. 2011, Kulhs et al. 2011, Segatto et al. 2012, Ferreira et al. 2012, Batista et al 2012).

Os resultados deste estudo mostraram-se promissores, porém estudos adicionais devem ser feitos com amostras de outros municípios de Minas Gerais com a adição de outras técnicas moleculares, maior número de amostras de DNA provenientes de cães, humanos e se possível vetores. Assim, busca-se compreender melhor o papel de hospedeiros, vetores e reservatórios, bem como se a distância geográfica entre a origem das amostras pode estar relacionada à geração e manutenção da diversidade genética destes parasitas. Ainda, compreender melhor aspectos relacionados à epidemiologia da LV na RMBH.

## 7.0 CONCLUSÃO

- A análise de fragmentos do DNA de *L. infantum* pela técnica de PCR-RFLP com os alvos gp63 e kDNA não detectou polimorfismos entre as amostras do estudo;
- Através da análise fenética dos dados obtidos com as endonucleases de restrição nos diferentes alvos foi observada grande similaridade entre as amostras de *L. infantum* de humanos e cães provenientes de alguns municípios de Minas Gerais, sendo eles: Belo Horizonte, Contagem, Betim, Ibité, Ribeirão das Neves e Aimorés;
- O alto grau de homogeneidade entre amostras estudadas não permitiu associações de amostras de *L. infantum* de humanos e cães provenientes de Belo Horizonte e municípios próximos a esses, com fatores epidemiológicos da LV humana, tais como: localização geográfica, hospedeiro, idade, sexo e presença de co-infecção *Leishmania*/HIV.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, Dobson DE, Beverley SM, Sacks DL 2009. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sand fly vector. *Science* 324: 265–268
- Alonso DP 2011. *Utilização de Marcadores Moleculares no Estudo Populacional de Leishmania infantum chagasi no Brasil*. Tese de doutorado, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 75pp.
- Alonso DP, Costa DL, Mendonça IL, Costa CHN, Ribolla PEM 2010. Short Report: Heterogeneity of *Leishmania infantum chagasi* Kinetoplast DNA in Teresina (Brazil). *Am. J. Trop. Med. Hyg* 82(5): 819–821.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, López-Vélez R, Moreno J 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21(2): 334–359.
- Alvar J, Canavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* 10: 298–319.
- Alvarenga JSC 2007. *Estudo da variabilidade genética inter e intra-específica de Leishmania (Leishmania) chagasi (Cunha & Chagas, 1937) e Leishmania (Leishmania) infantum (Nicolle, 1908)*, Tese de doutorado, Departamento de Parasitologia-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 197pp.
- Araki AS, Vigoder FM, Bauzer LG, Ferreira GE, Souza NA, Araújo IB, Hamilton JGC, Brazil RP, Peixoto AA 2009. Molecular and behavioral differentiation among Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). *PLoS Negl Trop Dis* 3: 365.
- Araújo VEM, Morais MHF, Reia IA, Rabello A, Carneiro M 2012. Early clinical manifestations associated with death from visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: 1511-1519.
- Azevedo RV, Dias DB, Bretãs JA, Mazzoni CJ, Souza NA, Albano RM, Wagner G, Davila AM, Peixoto AA 2012. The transcriptome of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) male reproductive organs. *PLoS One* 2012 7(4): 34495.
- Bañuls AJ, Hide M, Tibayrenc 1999. Molecular epidemiology and evolutionary species of *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* 29: 1137-1147.
- Batista LFS, Segatto M, Guedes CES, Sousa RS, Rodrigues CAT, Brazuna JCM, Silva JS, Santos SO, Laranjeira D, Macedo AM, Schriefer A, Veras PST 2012. An Assessment of the Genetic diversity of *Leishmania infantum* isolates from infected dogs in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 86(5): 799–806.

- Belli AA, Miles MA, Kelly JM 1994. Putative *Leishmania panamensis/Leishmania braziliensis* hybrid is a causative agent of human cutaneous leishmaniasis in Nicaragua. *Parasitology* 109: 435-442.
- Botelho AC, Natal D 2009. Primeira descrição epidemiológica da leishmaniose visceral em Campo Grande, estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 42: 503-508.
- Botilde Y, Laurent T, Quispe Tintaya W, Chicharro C, Canavate C, Cruz I, Kuhls K, Schönian G, Dujardin JC 2006. Comparison of molecular markers for strain typing of *Leishmania infantum*. *Infection genetics and evolution* 6: 440-6.
- Brasil 2009. Guia de vigilância epidemiológica, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância epidemiológica, Ministério da Saúde. In, 7 ed., Brasília, p. 816.
- Bulle B, Millon L, Bart J, Gállego M, Gambarelli F, Portús M, Schnur L, Jaffe CL, Fernandez-Barredo S, Alunda JM, Piarroux R 2002. Practical Approach for Typing strains of *Leishmania infantum* by Microsatellite Analysis. *J Clin Microbiol* 40 (9):3391-3397.
- Chappuis S, Sundar S, Hailu A, Rijal S, Halib H, Peeling W, Alvar J, Boelaert M 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Reviews* 5: 7-16.
- Chicharro C, Morales MA, Serra T, Ares M, Salas A, Alvar J 2002. Molecular epidemiology of *Leishmania infantum* on the island of Majorca: a comparison of phenotypic and genotypic tools. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93-99.
- Convit J, Pinardi ME, Rondón AJ. 1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a diseasedue to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66(4): 603-10.
- Cortes S, Maurício I, Almeida A, Cristovão JM, Pratlong F, Dedet JP, Campino L 2006. Application of kDNA as a molecular marker to analyse *Leishmania infantum* diversity in Portugal. *Parasitol Int* 55: 277-83.
- Cortes S, Rolão N, Ramada J, Campino L 2004. PCR as a rapid and sensitivetool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 12-17.
- Cortes SJC 2008 . *Diversidade genética da população parasitária de Leishmania em Portugal*, Tese de Doutorado, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 163pp. Disponível em: <http://run.unl.pt/bitstream/10362/6590/1%20doutoramento%20S.%20Cortes.pdf>. Acesso em 03/2011.
- Costa CH, Pereira HF, Araújo MV 1990. Epidemia de leishmaniose visceral no Estado do Piauí, Brasil, 1980-1986. *Rev. Saúde Publ* 24: 361-372.



- Cota GF, de Souza MR, Rabello A 2011. Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-Infected patients: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6): 1153-1153.
- Coutinho CER, Santos DO, Baptista C, Figueiredo FB, Madeira MF 2011. Evaluation of *Leishmania (Leishmania) chagasi* strains isolated from dogs originating from two visceral leishmaniasis-endemic areas in Brazil using multilocus enzyme electrophoresis. *Rev Soc Bras Med* 44 (5) 572-575.
- Cupolillo E, Aguiar AF, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP, Falqueto A, Grimaldi GJr 2001. Recent advances in the taxonomy for the New World leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol* 190 (1-2):57-60.
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito ME, Falqueto A, de Farias NM, Grimaldi GJr 2003. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41: 3126-3132.
- Cupollilo E, Grimaldi GJR, Momen H 1994. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg* 50: 296-311.
- Degrave W, Fernandes O, Campbell D, Bozza M, Lopes U 1994. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 463-469.
- Desjeux P 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318.
- Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF 2011. Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol* 41(5): 571-579
- Dujardin JC, Bañuls AL, Llanos-Cuentas A, Alvarez E, De Doncker S, Jacquet D, Le Ray D, Arevalo J, Tibayrenc M 1995. Putative *Leishmania* hybrids in the Eastern Andean valley of Huanuco, Peru. *Acta Tropica* 59: 293-307.
- El Tail NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Shonian G 2000. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94: 575-579.
- Elamim EM, Guizani I, Guerbouj S, Gramiccia M, El Hassan AM, Di Muccio T, Taha MA, Mukhtar MM 2008. Identification of *Leishmania donovani* as a cause of cutaneous leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 54-57.
- Evans DA, Kennedy, Elbihari S, Chapman CJ, Smith V, Peters W 1987. Hybrid formation within the genus *Leishmania*? *Parassitologia* 29: 165-173.

- Ferreira GEM, Santos BN, Dorval MEC, Ramos TPB, Renato Porrozzi R, Peixoto AA, Cupolillo E 2012. The Genetic Structure of *Leishmania infantum* Populations in Brazil and Its Possible Association with the Transmission Cycle of Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE* 7(5): e36242
- Fiúza VOP, Brandão ST, Pessanha JEM, Menezes FC, Costa IO, Mesquita DM, Bessa MAS, Morais MHF, Said RFC 2008. Perspectivas para a produção de insumos estratégicos para vigilância e controle das leishmanioses. A situação e as necessidades de grandes centros urbanos no Brasil: o exemplo de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 82-88.
- Gállego M 2004. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. *Rev Sci Tech*. 23(2): 661-76.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Quispe-Tintaya KW, Dujardin JC 2004. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Micro bio* 42: 2294-2297.
- Gontijo CMF, Melo MN 2004. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 7(3): 338-349.
- Gramiccia M, Gradoni L 2005. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int J Parasitol* 35: 1169-80.
- Grimaldi JrG, David JR, McMahon-Pratt D 1987. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. *Am J Trop Med Hyg* 36: 270-287.
- Grimaldi JrG, Tesh RB 1993. Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6: 230-250.
- Guerbouj S, Victoir K, Guizani I, Seridi N, Nuwayri-Salti N, Belkaid M, Ismail RB, Le Ray D, Dujardin JC 2001. Gp63 gene polymorphism and population structure of *Leishmania donovani* complex: influence of the host selection pressure? *Parasitology* 122: 25-35.
- Guimarães IG, Almeida AE 2011. The Brazilian scientific production in the last decade about mortality of elderly people by Kala-azar. *Revista Eletrônica Gestão & Saúde* 2: 237-248. Disponível em: <http://gestaoesaude.unb.br/index.php/gestaoesaude/article/view/115/pdf>. Acesso em 20/03/2012.
- Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN 2011. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol* 27(9):403-9.
- Herwaldt BL 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354: 1191-1199.

- Hide M, Banuls AL, Tibayrenc M 2001. Genetic heterogeneity and phylogenetic status of *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodeme MON-1: epidemiological implications. *Parasitology* 123: 425-432.
- Hoya RD, Trujillo CE, Cardenas C, Puentes F, Patarroyo ME, Murillo LA 1999. *Leishmania panamensis*: a 44bp deletion in gp63 gene is found in cDNA and genomic libraries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(5): 641-643.
- Jamjoom MB, Ashford RW, Bates PA, Kemp SJ, Noyes HA 2002. Towards a standard battery of microsatellite markers for the analysis of the *Leishmania donovani* complex. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 265-270.
- Killick-Kendrick R 1999. The biology and control of phlebotomine sandflies. *Clin Dermatol* 17: 279-289
- Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GE, Mauricio IL, Oddone R, Feliciangeli MD, Wirth T, Miles MA, Schönian G 2011. Comparative microsatellite typing of New World *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and its recent Old World origin. *PLoS Negl Trop Dis* 5:1155.
- Kuhls K, Keilonat L, Ochsenreither S, Schaar M, Schweynoch C, Presber W, Schönian G 2007. Multilocus microsatellite typing (MLMT) reveals genetically isolated populations between and within the main endemic regions of visceral leishmaniasis. *Microbes Infect* 9: 334-343.
- Lainson R, Shaw JJ 1987. Evolution, classification and geographical distribution. In W Peters, RKillick-Kendrick, *The leishmaniasis in biology and medicine*, Academic Press Inc, London, p. 1-120.
- Laurent T, Rijal S, Yardley V, Croft S, De Doncker S, Decuypere S, Khanal B, Singh R, Schönian G, Kuhls K, Chappuis F, Dujardin J 2007. Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: Genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Inf. Gen. Evol* 7: 206-212.
- Lindoso JA, Barbosa RN, Posada-Vergara MP, Duarte MI, Oyafuso LK, Amato VS, Goto H 2009. Unusual manifestations of tegumentary leishmaniasis in AIDS patients from de New World. *Br J Dermatol* 160: 311-318.
- Lindoso JA, Lindoso AA 2009. Neglected Tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop* 51: 247-253.
- Lins RMMA, Souza NA, Brazil RP, Maingon RDC, Peixoto AA 2012. Fixed Differences in the paralytic Gene Define Two Lineages within the *Lutzomyia longipalpis* Complex Producing Different Types of Courtship Songs. *PLoS One* 9: 44323
- Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, Kuhls K, Tintaya KW, Jirku M, Chocholová E, Haralambous C, Pralong F, Oborník M, Horák A, Ayala FJ, Miles MA 2007. Evolutionary and geographical history of the

- Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy, *Proc Natl Acad Sci* 104: 9375–9380
- Luz ZMP, Pimenta DN, Cabral ALLV, Fiuza VOP, Rabello A 2001. A urbanização das leishmanioses e a baixa resolutividade diagnóstica em municípios da Região Metropolitana de Belo Horizonte. *Rev Soc Bras Med Trop* 34: 249-254
- Lynn MA, McMaster WR 2008. Leishmania: conserved evolution diverse diseases. *Trends Parasitol* 24(3):103-105.
- Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA 2008. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad. Saúde Pública* 24: 2941-2947
- Margonari C, Freitas CR, Ribeiro RC, Moura ACM, Timbó M, Gripp AH, Pessanha JE, Dias ES 2006. Epidemiology of visceral leishmaniasis through spatial analysis, in Belo Horizonte municipality, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(1): 31-38.
- Martinez-Espinosa M, Sandanielo VLM, Louzada-Neto F 2006. O método de *Bootstrap* para o estudo de dados de fadiga dos materiais. *Rev Mat Estat* 24(2): 37-50.
- Mauricio IL, Gaunt MW, Stothard JR, Miles MA 2001. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. *Parasitology* 122: 393-403.
- Miles MA, Lainson R, Shaw JJ, Povoas M, Souza AA. 1981. Leishmaniasis in Brazil: XV. Biochemical distinction of *Leishmania Mexicana amazonensis*, *L. braziliensis braziliensis* and *L. braziliensis guyanensis*- aetiological agents of cutaneous leishmaniasis in the Amazon Basin of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75: 524-539.
- Miles MA, Vexenat JA, Campos JHF, Castro JAF 1999. Canine leishmaniasis in Latin America: control strategies for visceral leishmaniasis. In Proceedings of the international canine leishmaniasis forum *Hochst Roussel Vet* 121-122
- Momen H 1984. Parasite characterization by zimodeme analysis. In: Morel CM (ed.) *Genes and Antigens of Parasites: A laboratory manual*. Rio de Janeiro, UNDP/WHO-FINEPCNPq- FIOCRUZ, 111-120.
- Morales MA, Chicharro C, Ares M, Cañavate C, Barker DC, Alvar J 2001. Molecular tracking of infections by *Leishmania infantum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 104-107.
- MS - Ministério da Saúde Brasil 2006. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*, 3rd ed., MS, Brasília, 120 pp.
- MS - Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2011. Disponível em:

- [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=21383](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21383). Acesso em: 13/12/2012.
- Nascimento AAC, Espreafico EM, Larso MLP, Monesi N, Rossi NMM, Vanderlei R 2003. *Tecnologia do DNA Recombinante*. Apostila, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
- Ochsenreither S, Kuhls K, Schaar M, Presber W, Schönian G 2006. Multilocus microsatellite typing as a new tool for discrimination of *Leishmania infantum* MON-1 strains. *J Clin Microbiol* 44: 495-503.
- Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SD 1997. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. *Parasitol Today* 13(5): 196-200.
- Oliveira CDL, Assunção RM, Reis IA, Proietti FA 2001. Spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brasil, 1994-1997. *Cad Saúde Pública* 17(5): 1231-1239.
- OMS 2010 - World Health Organization 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *World Health Organ Tech Rep Ser* 172p.
- OMS 2011 - World Health Organization - Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 12/02/2012.
- OMS 2013- World Health Organization - Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases / Leishmaniasis. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases](http://www.who.int/neglected_diseases). Acesso em 12/02/2012.
- Pacheco RS, Lopes UG, Morel CM, Grimaldi JRG, Momem H 1986. Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques, p. 57-65. In: *Leishmania Taxonomy et Phylogenese. Applications Eco-epidemiologiques*. IMEEE, Montpellier.
- Palumbo E 2010. Visceral leishmaniasis in children: a review. *Minerva Pediatr* 62(4):389-95.
- PBH - Prefeitura de Belo Horizonte 2011. Portal da internet. Índice de Vulnerabilidade à Saúde. Secretaria Municipal de Saúde, Gerência de Epidemiologia e Informação. 10pp. Disponível em: <http://www.pbh.gov.br/smsa/biblioteca>. Acesso em 24/01/12.
- Penna HA 1934. Leishmaniose visceral no Brasil. *Bras Med* 48: 949-950
- PMC – Prefeitura Municipal de Contagem 2009. Secretaria Municipal de Saúde de Contagem / Boletim epidemiológico, nº 08, Dezembro, Contagem, MG.
- Quispe-Tintaya KW, Ying X, Dedet JP, Rijal S, De Bolle X, Dujardin JC 2004. Antigen genes for molecular epidemiology of leishmaniasis: polymorphism of cysteine

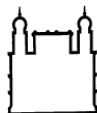
- proteinase B and surface metalloprotease glycoprotein 63 in the *Leishmania donovani* complex. *J Infect Dis* 189: 1035-43.
- Ravel C, Cortes S, Pratlong F, Morio F, Dedet JP, Campino L 2006. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. *Int J Parasitol* 36: 1383-1388.
- Reithinger R, Davies CR 2002b. Canine leishmaniasis: novel strategies for control. *Trends Parasitol* 18: 289-290.
- Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J 1990. Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp* 65: 111-125.
- Rodegers MR, Popper SJ, Wirth DF 1990. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. *Exp Parasitol* 71: 267-275.
- Romero GA, Boelaert M 2010. Control of visceral leishmaniasis in latin america-a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 4:584.
- Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakathianandeswaren A, Spurck T, Low Choy J, Handman E 2004. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos isolation and characterization of the causative organism. *Int. J. Parasitol* 34: 655-664.
- Ross R 1903. Further Notes on Leishmania's bodies. *British Medical Journal*. (11): 1401, 1903 apud Gállego M. Emerging parasitic zoonoses: leishmaniosis. *Rev Sci Tech*. 23(2):661-76
- Rossi V, Wincker P, Ravel C, Blaineau C, Pages M, Bastien P 1994. Structural organisation of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)<sub>n</sub> loci. *Mol Biochem Parasitol* 65: 271-282.
- Salotra, P, Sreenivas G, Ramesh V, Sundar S 2001. A simple and sensitive test for field diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Br J Dermatol* 2: 145: 630.
- Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, de Paiva Hoffmann M, de Freitas RA, Malacco MA 1998. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol* 12: 315-7.
- Schallig HD, Oskam L 2002. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 7: 641-651.
- Schönian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC 2008. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* 24: 135-42.

- Schwenkenbecher JM, Fröhlich C, Gehre F, Schnur LF, Schönian G 2004. Evolution and conservation of microsatellite markers for *Leishmania tropica*. *Inf Gen Evol* 4: 99–105.
- Schwenkenbecher JM, Wirth T, Schnur LF, Jaffe CL, Schallig H, Al-Jawabreh A, Hamarsheh O, Azmi K, Pratlong F, Schönian G 2005. Microsatellite analysis reveals genetic structure of *Leishmania tropica*. *Int J Parasitol*. 36(2): 237-46
- Segatto M, Ribeiro LS, Costa DL, Costa CHN, Oliveria MR, Carvalho SFG, Macedo, AM, Valadares HMS; Dietze R, Brito CFA, Lemos EM 2012. Genetic diversity of *Leishmania infantum* field populations from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 39-47.
- Seridi N, Belkaid M, Quispe-Tintaya W, Zidane C, Dujardin JC 2008. Application of PCR-RFLP for the exploration of the molecular diversity of *Leishmania infantum* in Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 556-563.
- Shapiro TA, Englund PT 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu. Microbiol* 49: 117-143.
- Shaw J 2003. Visceral leishmaniasis after renal transplantation: report of 4 cases in northeastern Brazil. *Transpl Infect Dis*. 10(5):364-8.
- Silva-López RE. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos 2010. *Leishmania proteases: new targets for rational drug development*. *Quím. Nova* [online]. 33 (7): 1541-1548. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422010000700022](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000700022).
- Sreenivas G, Raju BVS, Singh R, Selvapandiyan A, Duncan R, Sarkar D, Nakhasi HL, Salotra P 2004. DNA Polymorphism assay distinguishes isolates of *Leishmania donovani* that cause kala-Azar from those that cause post-kala-azar dermal leishmaniasis in humans. *J Clin Microbiol* 42:1739-1741.
- Tachida H, Iizuka M 1992. Persistence of repeated sequences that involve by replication slippage. *Genetics* 131: 471-478.
- Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN 2003. Molecular diagnosis of Leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn* 3(5): 657-667
- Teixeira AB, 2003. Manual de aula prática de eletroforese para DNA. Botucatu.
- Tibayrenc M, Ayala FJ 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.
- Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ 1990. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci* 87(7): 2414-2418

- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4):1335-1339.
- Toledo A, Martin-Sanchez J, Pesson B, Sanchiz-Marin C, Morillas-Marquez F 2002. Genetic variability within the species *Leishmania infantum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. *Mol Biochem Parasitol* 119: 257-264.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Res* 10: 967-981.
- Van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebelin SB 1992. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 51: 133-142.
- Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C 2007. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *The Int J Parasitol* 37: 589-593.
- Welsh J & McClelland M 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18(24): 7213-7218.
- Werneck GL 2008. Forum: geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cad. Saúde Pública* 24: 2937-2940.
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18(22): 6531-6535.
- Zemanová E, Jirku M, Mauricio IL, Miles MA, Lukes J 2004. Genetic polymorphism within the *Leishmania donovani* complex: correlation with geographic origin. *Am J Trop Med Hyg* 70: 613-617.
- Ziljlstra EE 1991. Kala-azar in displaced people from southern Sudan: epidemiological, clinical and therapeutic findings. *Tran R Soc Trop Med Hyg* 85: 365-369.



## 9.0 ANEXOS

9.1 Anexo 1 - Resultado da caracterização de espécies de *Leishmania* por eletroforese de enzimas (MLEE) – Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz.

Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 731  
 Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania*

### RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

FORMULÁRIO Nº: ER 06/2012

Solicitação (s) nº 100/2011, 101/2011 e 102/2011

Solicitante (nome e instituição): **Mariangela Carneiro**  
 Laboratório de Pesquisas Clínicas – Depto. Doenças Infecciosas e Parasitárias  
 Centro de Pesquisas René Rachou

Data da entrada da amostra na CLIOC: 08 e 20/12/2011

Data da liberação do resultado: 23/01/2012

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
AD1	265/2011	Cultura	<i>L. infantum</i>	3368
AD2	266/2011	Cultura	<i>L. infantum</i>	3369
CR1	267/2011	Cultura	<i>L. infantum</i>	3370

*L. infantum* – sin. *L. chagasi* (ver Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, et al. 2011. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. PLoS Negl Trop Dis 5(6): e1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155.

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH NADP	IDH NAD	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

#### Registro do ensaio

Formulário de ensaio isoenzimático [Form-LRNTL/CLIOC-027-001]: página 28 e 29

Executado por:  
**Mariana Côrtes Boité**  
 Tecnologista II

Conferido por:  
**Elisa Cupolillo**  
 Pesquisador- Curadora CLIOC

Rio de Janeiro, 23 de janeiro de 2011

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-361 – Brasil  
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – sala 509 e 1º andar – sala 116  
 Tel.: (0055) (21) 3865-8226 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Instituto Oswaldo Cruz  
 Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose



Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz - CLIOC – WDCM 73  
 Serviço de isolamento, cultivo e tipagem de *Leishmania*

## RESULTADO DA CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES POR ELETROFORESE DE ENZIMAS

FORMULÁRIO Nº: ER 11/2012

Solicitação (s) nº 001/2012, 002/2012, 008/2012, 009/2012, 010/2012, 011/2012  
 012/2012, 013/2012, 014/2012, 015/2012, 016/2012, 017/2012

Solicitante (nome e instituição): **Mariangela Carneiro**  
 Laboratório de Pesquisas Clínicas – Centro de Pesquisas René Rachou

Data da entrada da amostra na CLIOC: 28/02 e 08/05/2012

Data da liberação do resultado: 16/07/2012

Amostra	Ordem de Entrada CLIOC	Forma de recebimento	Resultado da caracterização	IOC-L
AD3	001/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3373
AD4	002/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3374
CA1	010/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3378
CA2	011/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3379
CA3	012/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3380
CA4	013/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3381
CA5	014/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3382
AD5	015/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3383
AD6	016/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3384
AD7	017/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3385
CR2	018/2012	Cultura	<i>L. infantum</i>	3386
CR3	019/2012	Cultura	Descartada	--- <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Amostra descartada por não apresentar parasitos viáveis.

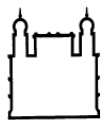
*L. infantum* – sin. *L. chagasi* (ver Kuhls K, Alam MZ, Cupolillo E, Ferreira GEM, Mauricio IL, et al. 2011. Comparative Microsatellite Typing of New World *Leishmania infantum* Reveals Low Heterogeneity among Populations and Its Recent Old World Origin. PLoS Negl Trop Dis 5(6): e1155. doi:10.1371/journal.pntd.0001155.

Enzimas ensaiadas:

ME	MDH	ACP	G6PDH	PGM	6PGDH	GPI	FUM	MPI
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
IDH	IDH	PEPD	PEPD2	PEPD3	ACON	HK	NH	
NADP	NAD							
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Método utilizado: MLEE (multilocus enzyme electrophoresis) seguindo protocolo descrito em Cupolillo et al 1994. Am. J. Trop. Med. Hyg.

Av. Brasil, 4.365 Manguinhos – Rio de Janeiro, RJ – CEP 21040-361 – Brasil  
 Pavilhão Leônidas Deane, 5º andar – sala 509 e 1º andar – sala 116  
 Tel.: (0055) (21) 3865-8226 / 3865-8195 – Fax: (0055) (21) 3865-8195



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose



---

**Registro do ensaio**

Formulário de ensaio isoenzimático [Form-LRNTL/CLIOC-027-001]: página 4 e 11

Executado por:  
*Mariana Côrtes Boité*  
*Tecnologista II*

Conferido por:  
*Elisa Cupolillo*  
*Pesquisador- Curadora CLIOC*

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2012

9.1 Anexo 2 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 03904112.0.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Mariângela Carneiro**  
**Departamento de Parasitologia**  
**Instituto de Ciências Biológicas- UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 05 de setembro de 2012, o projeto de pesquisa intitulado “**Estudo da variabilidade genética intra-específica de Leishmania (Leishmania) infantum em amostras de cães e humanos residentes no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**